

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA**  
**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**PROCESSOS TECNOLÓGICOS E AMBIENTAIS**

**Gustavo Alexandre dos Santos**

**Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da  
curcumina e do pirocatecol na manutenção da qualidade  
do biodiesel**

**Sorocaba/SP**

**2015**

**Gustavo Alexandre dos Santos**

**Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da  
curcumina e do pirocatecol na manutenção da qualidade  
do biodiesel**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais

**Orientador:** Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Maria Duarte Carvalho Vila

**Sorocaba/SP**

**2015**

## Ficha Catalográfica

Santos, Gustavo Alexandre dos

S235a            Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da curcumina e do pirocatecol na manutenção da qualidade do biodiesel / Gustavo Alexandre dos Santos. -- Sorocaba, SP, 2015.

133 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila.

Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais)  
- Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2015.

1. Biodiesel - Qualidade. 2. Biodiesel – Armazenamento. 3. Antioxidantes. 4. Biotecnologia. 5. Química. I. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, orient. II. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, co-orient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

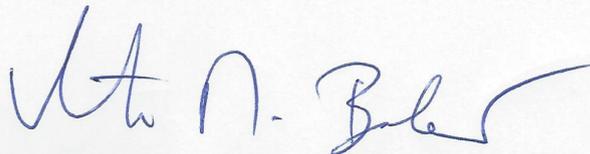
**Gustavo Alexandre dos Santos**

**Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da curcumina e do pirocatecol na manutenção da qualidade do biodiesel**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA:



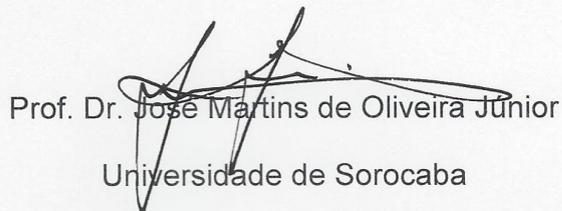
Prof. Dr. Vitor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

Universidade de Sorocaba



Prof. Dr. Matthieu Tubino

Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. José Martins de Oliveira Júnior

Universidade de Sorocaba

## **Dedicatória**

**Dedico a Deus e meus pais!**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, se não fosse Ele a me dar forças, eu não estaria aqui; à Sagrada Família (Jesus, Maria e José).

A meus pais, Salvadora da Conceição Alexandre e Osvaldo dos Santos (*in memoriam*).

A todos os meus familiares, tanto da família Alexandre quanto da família Santos.

À Universidade de Sorocaba, por me dar a oportunidade de expandir meus conhecimentos, tanto no Curso de Graduação de Biotecnologia como no Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Aos Professores Doutores Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, Marta Maria Duarte Carvalho Vila, Renata de Lima, André Kimura Okamoto, Camila Augusta de Oliveira Martins Arakaki e Marco Vinícius Chaud.

Em especial, à pessoa que me ajudou por demais na realização deste projeto, a aluna Bruna Amabili Dezzotti.

Ao Willian Silva, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela colaboração na síntese dos vários biodiesel.

Aos funcionários e estagiários da Universidade de Sorocaba, em especial Valéria Campos Orsi, Rosenéia, Márcia, Evandro, José Anduca, Henrique, Mariane Galvão, Felipe Carriel, Brenda, Thaís, Mara, entre outros...

Ao Grupo de Oração Jovem Yahweh, e ao grupo de servos, que também contribuíram para o meu crescimento.

*"Deus é Deus e vice versa*

*Sou todo Vosso ó Virgem Maria, e tudo que possuo é Vosso"*

## RESUMO

**Introdução:** O biodiesel tem sido empregado por vários países visando minimizar os efeitos da emissão de gases poluentes, e provou ser um bom substituto para o diesel derivado do petróleo por causa de sua melhor biodegradabilidade e mais baixa emissão de dióxido de carbono. Devido à sua higroscopicidade, pode ocorrer acúmulo de água durante o armazenamento de biodiesel por longos períodos de tempo, o que favorece a oxidação lipídica e a proliferação de microrganismos, com consequente perda de qualidade do biodiesel. Para controlar a contaminação microbiana durante a estocagem do biodiesel, tem-se observado o emprego de diversas substâncias químicas com atividade biocida.

**Objetivos:** Neste trabalho de pesquisa objetivou-se avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana das substâncias naturais curcumina (CC) e pirocatecol (PC) na manutenção da qualidade do biodiesel produzido a partir de diversas fontes vegetais. **Método:** Foram testadas várias concentrações mássicas de CC e de PC, entre 0-1,5% (m/m), na ausência e na presença de água adicionada (1%, m/m), para determinação da concentração mínima específica de agente natural com efeito fungistático para cada biodiesel. Amostras dos vários biodieseis foram então preparadas por adição de quantidades variáveis de CC ou de PC, sem e com adição de água, e a atividade antimicrobiana de cada concentração testada por aplicação dos correspondentes biodieseis em culturas em tapete de *Paecilomyces variotii* Bainier previamente preparadas, permitindo assim determinar, após incubação, qual a melhor substância natural e quais as mínimas concentrações que produziram efeito fungistático no biodiesel. Essas concentrações mínimas de CC foram adicionadas a cada um dos biodieseis, na presença de 1% (m/m) de água adicionada, tendo os biodieseis sido inoculados deliberadamente com o mesmo fungo filamentosos e armazenados em frascos âmbar envolvidos com papel de alumínio, a 25 °C. Cada biodiesel foi então analisado ao longo do tempo de armazenamento, a intervalos pré-determinados de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, quanto ao índice de refração, tempo de indução da oxidação lipídica e presença de células viáveis do fungo filamentosos.

**Resultados e Discussão:** A adição combinada de 1% (m/m) de água e uma baixa concentração mássica de CC (i.e., 0,2% (m/m) para o biodiesel de óleo residual de fritura, 0,5% (m/m) para o biodiesel de óleo de soja, 0,1% (m/m) para o biodiesel de óleo de semente de algodão, 0,5% (m/m) para o biodiesel de óleo de semente de gergelim, 0,2% (m/m) para o biodiesel de óleo de amêndoa de macaúba, e 0,2% (m/m) para o biodiesel de óleo de microalgas) foram aquelas variáveis processuais que promoveram a melhor inibição do crescimento microbiano. Os tempos médios de indução da oxidação lipídica dos biodieseis adicionados com quantidades variáveis (mínimas) de CC e 1% (m/m) de água sofreram um aumento generalizado quando

comparados com os dos seus homólogos puros. Exceto para o biodiesel produzido a partir de óleo de soja, que sofreu uma redução de 16% no tempo de indução da oxidação lipídica após adição de CC, significando que este biodiesel foi mais suscetível à oxidação após a adição combinada de água e CC, todos os outros biodieseis provaram ser mais resistentes à oxidação, com aumentos significativos nos seus tempos de indução da oxidação lipídica. Adicionalmente, o biodiesel puro produzido a partir do óleo de amêndoa de macaúba provou ser muito resistente à oxidação, exibindo períodos de indução da oxidação lipídica superiores a 60 h, tornando irrelevante a adição de qualquer antioxidante. Ainda mais, a adição de CC a este biodiesel catapultou a indução da oxidação lipídica para mais de 140 h. Assim, este biodiesel foi descontinuado dos estudos subsequentes. O mesmo aconteceu ao biodiesel produzido a partir de óleo de microalgas, devido à dificuldade de obtenção em grandes quantidades deste biodiesel ainda experimental. Estes resultados demonstram claramente o potencial da adição da CC aos biodieseis na prevenção tanto da oxidação como do crescimento microbiano. Exceto para o biodiesel produzido a partir de óleo residual de fritura, no qual se verificou uma marcada diminuição na estabilidade oxidativa ao longo de todo o período de armazenamento, todos os outros biodieseis provaram ser mais resistentes à oxidação após a adição de CC, exibindo apenas ligeiros decréscimos ao longo do tempo nos seus tempos de indução da oxidação lipídica. O biodiesel produzido a partir de óleo de semente de gergelim exibiu uma elevada estabilidade oxidativa, que se manteve ao longo de todo o período de armazenamento. A ligeira/marginal tendência de aumento do índice de refração durante o armazenamento dos vários biodieseis reflete a manutenção das suas propriedades físicas, o que foi confirmado pela estabilidade oxidativa atingida após a adição de CC a todos os biocombustíveis. Os biodieseis adicionados com CC mantiveram um ambiente hostil que impediu o crescimento microbiano, o que foi confirmado pelos resultados negativos obtidos através da pesquisa microbiológica para a presença de células microbianas viáveis ao longo de todo o período de armazenamento. **Conclusões:** A CC, em baixas concentrações mássicas, foi capaz de aumentar substancialmente os tempos de indução da oxidação lipídica de todos os biodieseis testados, providenciando estabilidade oxidativa, assim como manter ambientes hostis para fungos filamentosos contaminantes de distribuição ubíqua, como é o caso do *Paecilomyces variotii* Bainier. Adicionalmente, a suave tendência de aumento apenas no quarto algarismo significativo dos valores dos índices de refração de todos os biodieseis permite afirmar que as suas características iniciais se mantiveram preservadas após a adição de CC e água.

**Palavras-chave:** Biodiesel. Curcumina. Pirocatecol. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante. Estabilidade oxidativa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Biodiesel has been used by several countries aiming at minimizing the effects of greenhouse gas emissions, and proved to be a good substitute for petroleum-based diesel because of its better biodegradability and lower carbon dioxide emissions. Owing to its hygroscopicity, water may accumulate during biodiesel storage for long periods of time, which favors lipid oxidation and proliferation of microorganisms, with consequent loss of the quality of biodiesel. To control microbial contamination during storage of biodiesel, we have seen the use of various chemicals with biocidal activity. **Objectives:** In this research work one aimed at evaluating the antioxidant and antimicrobial activities of the natural substances curcumin (CC) and pyrocatechol (PC) in maintaining the quality of biodiesel produced from various plant sources. **Methods:** Several mass concentrations of CC and PC were tested, between 0-1.5% (w/w), in the absence and presence of added water (1%, w/w), aiming at determining the minimum specific concentration of natural agent exhibiting fungistatic effect for each biodiesel. Samples of the various biodiesels were then prepared by adding varying amounts of either CC or PC with and without addition of water, and the antimicrobial activity of each concentration was duly tested by applying the corresponding biodiesels in cultures of *Paecilomyces variotii* Bainier previously prepared, allowing to determine, after incubation, what was the better natural substance and which were the minimum concentrations that produced fungicidal effects on biodiesel. Those minimum concentrations of CC were added to each one of the biodiesels, in the presence of 1% (w/w) added water, and the biodiesels were deliberately inoculated with the same filamentous fungus and stored at 25 °C in amber glass flasks further wrapped in aluminum foil. Each biodiesel was then sampled and analyzed throughout the storage time, at pre-determined time intervals of 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days, with regard to refractive index, induction time of lipid oxidation, and the presence of viable cells of the filamentous fungus. **Results and Discussion:** The combined addition of 1% (w/w) water and a low mass concentration of CC (i.e., 0.2% (w/w) for biodiesel from spent frying oil, 0.5% (w/w) for biodiesel from soybean oil, 0.1% (w/w) for biodiesel from cottonseed oil, 0.5% (w/w) for biodiesel from sesame seed oil, 0.2% (w/w) for biodiesel from macauba almond oil, and 0.2% (w/w) for biodiesel from microalgae oil) were those processing variables that promoted the best inhibition of microbial growth. The average lipid oxidation induction times of the biodiesels added with variable (minimum) amounts of CC and 1% (w/w) water suffered a generalized increase when compared with those of their pure counterparts. Except for the biodiesel produced from soybean oil, which underwent a reduction of 16% in the lipid oxidation induction time following addition of CC, meaning that this biodiesel was more prone to lipid oxidation following the combined addition of water and

CC, all remaining biodiesels proved to be more resistant to oxidation, with significant increases in their lipid oxidation induction times. Additionally, pure biodiesel produced from the oil of macauba almond proved to be very resistant to oxidation, exhibiting lipid oxidation induction periods higher than 60 h, thus making irrelevant the addition of any antioxidant. Even more, the addition of CC to this biodiesel catapulted the lipid oxidation induction time to more than 140 h. Hence, this biodiesel was discontinued from further work. The same happened with the biodiesel produced from microalgae oil, due to the difficulty in obtaining this (still experimental) biodiesel in large amounts. These results clearly demonstrate the potential of the addition of CC to biodiesels in the prevention of both oxidation and microbial growth. Except for the biodiesel produced from spent frying oil, for which a marked decrease in the oxidative stability was noticed throughout the entire storage timeframe, all the other biodiesels proved to be more resistant to oxidation following addition of CC, exhibiting only mild decreases in their lipid oxidation induction times throughout storage timeframe. The biodiesel produced from sesame seed oil exhibited a high oxidative stability, which was maintained throughout the entire storage timeframe. The mild/marginal trend of increase in the refractive index during storage of the several biodiesels reflected the maintenance of their physical properties, which was duly confirmed by the oxidative stability attained following addition of CC to all biofuels. Biodiesels added with CC maintained a harsh environment that prevented microbial growth, which was confirmed by the negative results obtained from the microbiological screening for the presence of viable microbial cells throughout the entire storage timeframe. **Conclusions:** CC, in low mass concentrations, was able to substantially increase the lipid oxidation induction times of all tested biodiesels, providing oxidative stability, as well as in maintaining harsh, hostile environments for ubiquitous contaminating filamentous fungi such as *Paecilomyces variotii* Bainier. Additionally, the mild trend of increase in the fourth significant digit of the values of refractive indexes of all biodiesels allows to state that the initial biodiesel characteristics were preserved following the combined addition of CC and water.

**Keywords:** Biodiesel. Curcumin. Pyrocatechol. Antimicrobial activity. Antioxidant activity. Oxidative stability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema simplificado do processo de produção de biodiesel.	23
<b>Figura 2.</b>	Reação de transesterificação de triacilgliceróis com álcool para produção de biodiesel.	24
<b>Figura 3.</b>	Processo de produção de biodiesel por transesterificação alcalina (com etóxido de sódio) de óleo residual de fritura.	27
<b>Figura 4.</b>	Esquema integrado do processo de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos ou gorduras com álcool.	28
<b>Figura 5.</b>	Processos de degradação lipídica, ilustrados para uma molécula de triacilglicerol.	31
<b>Figura 6.</b>	Condições analíticas de um analisador Rancimat 873, para determinação do tempo de indução da oxidação lipídica e consequente estabilidade oxidativa do biodiesel.	32
<b>Figura 7.</b>	Exemplo de gráfico de variação da condutividade em função do tempo produzido pelo método Rancimat, para determinação do tempo de indução da oxidação lipídica.	33
<b>Figura 8.</b>	Estrutura molecular da curcumina.	34
<b>Figura 9.</b>	Coloração amarela do açafrão da Índia, ou “Turmeric”, ou ainda “Cúrcuma” ( <i>Curcuma longa</i> Linn.), planta da família do gengibre (Zingiberaceae).	35
<b>Figura 10.</b>	Estrutura molecular do pirocatecol.	37
<b>Figura 11.</b>	Fluxograma do processo de síntese química do biodiesel.	42
<b>Figura 12.</b>	<i>Design</i> experimental para avaliação do efeito da curcumina e/ou do pirocatecol como agente antimicrobiano e/ou antioxidante em amostras de biodiesel, na ausência ou presença de água ultrapura adicionada.	43

<b>Figura 13.</b>	Fungo Filamentoso <i>Paecilomyces varioti</i> Bainier, inoculado em placa de Petri contendo meio de cultura sólido Sabouraud Dextrose Agar.	45
<b>Figura 14.</b>	Local de armazenamento dos vários biodieseis, após adição combinada de 1% (m/m) de água e curcumina nas percentagens mássicas previamente otimizadas para cada biodiesel (da esquerda para direita, na figura: biodieseis de gergelim (G), algodão (A), soja (S) e fritura (F)).	47
<b>Figura 15.</b>	Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.	48
<b>Figura 16.</b>	Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana de amostras de biodiesel adicionadas com quantidades variáveis de curcumina.	51
<b>Figura 17.</b>	Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana de amostras de biodiesel adicionadas com quantidades variáveis de pirocatecol.	52
<b>Figura 18.</b>	Evolução ao longo do tempo de armazenamento (25 °C) da estabilidade oxidativa dos vários biodieseis produzidos, após adição de 1% (m/m) de água ultrapura e percentagens mássicas variáveis de curcumina, e inoculação com o fungo filamentoso ubíquo <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier.	60
<b>Figura 19.</b>	Evolução ao longo do tempo de armazenamento (25 °C) do índice de refração dos vários biodieseis produzidos, após adição de 1% (m/m) de água ultrapura e percentagens mássicas variáveis de curcumina, e inoculação com o fungo filamentoso ubíquo <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier.	61
<b>Figura 20.</b>	Demonstração da capacidade fungistática da curcumina nos biodieseis de óleo residual de fritura ( <b>a<sub>i</sub></b> ), de óleo de soja ( <b>b<sub>i</sub></b> ), de óleo de semente de algodão ( <b>c<sub>i</sub></b> ) e de óleo de semente de gergelim ( <b>d<sub>i</sub></b> ). (Legenda: <b>a<sub>1</sub></b> , <b>b<sub>1</sub></b> , <b>c<sub>1</sub></b> , <b>d<sub>1</sub></b> - halo de inibição de crescimento produzido pela concentração mínima ótima de curcumina na presença de 1% (m/m) de água ultrapura, indicado pela seta); <b>a<sub>2</sub></b> , <b>b<sub>2</sub></b> , <b>c<sub>2</sub></b> , <b>d<sub>2</sub></b> - resultado da pesquisa de células viáveis de fungo filamentoso em agar sólido Sabouraud Dextrose no início do período de armazenamento; <b>a<sub>3</sub></b> , <b>b<sub>3</sub></b> , <b>c<sub>3</sub></b> , <b>d<sub>3</sub></b> - resultado da pesquisa de	63

células viáveis de fungo filamentoso em agar sólido Sabouraud Dextrose no final do terceiro mês de armazenamento; **a4, b4, c4, d4** - resultado da pesquisa de células viáveis de fungo filamentoso em agar sólido Sabouraud Dextrose no final do sexto mês de armazenamento.)

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Comparação entre os processos de transesterificação química e enzimática na produção de biodiesel.	29
<b>Quadro 2.</b>	Farmacologia e atividade antitumoral da curcumina.	36
<b>Quadro 3.</b>	Halos de inibição de crescimento normalizados, produzidos utilizando o fungo filamentoso <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier e biodieseis de diferentes origens vegetais adicionados com percentagens mássicas variáveis de curcumina ou pirocatecol.	54
<b>Quadro 4.</b>	Concentrações mínimas de curcumina que produziram os maiores halos de inibição de crescimento do fungo filamentoso <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier nos diferentes biodieseis.	55
<b>Quadro 5.</b>	Tempos de indução da oxidação lipídica para os vários biodieseis estudados, antes e depois da adição de curcumina na presença de água adicionada.	57
<b>Quadro 6.</b>	Tempos de indução da oxidação lipídica, índice de refração e número de Unidades Formadoras de Colônias dos vários biodieseis estudados, antes e depois da adição de curcumina na presença de água, ao longo de um período de armazenamento de seis meses.	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AGL</b>	Ácido de Graxos Livres
<b>ANBT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ANFAVEA</b>	Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials
<b>CBMAI</b>	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
<b>CC</b>	Curcumina
<b>CEN</b>	Comité Européen de Normalisation
<b>CNPE</b>	Conselho Nacional de Política Energética
<b>CPQBA/UNICAMP</b>	Centro Multidisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas
<b>DOU</b>	Diário Oficial da União
<b>EAAG</b>	Ésteres Aquílios de Ácido Graxos
<b>FAMEs</b>	Ésteres metílicos de ácidos graxos
<b>IQ-UNICAMP</b>	Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas
<b>IR</b>	Índice de Refração
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>MW</b>	Massa molar
<b>PC</b>	Pirocatecol
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias
<b>USD</b>	United States Dollars
<b>UV</b>	Ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
<b>2.1. Biodiesel</b>	22
2.1.1. Processo de produção de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras	22
2.1.2. Normas relativas à composição regulamentar do biodiesel	24
2.1.3. Processos de catálise química <i>versus</i> enzimática	25
<b>2.2. Contaminação microbiana do biodiesel</b>	29
<b>2.3. Oxidação lipídica do biodiesel</b>	30
2.3.1. Estabilidade oxidativa como parâmetro de qualidade do biodiesel	32
<b>2.4. Curcumina</b>	34
<b>2.5. Pirocatecol (catecol)</b>	36
<b>2.6. Garantia de Qualidade do Biodiesel no armazenamento</b>	37
<b>3. OBJETIVOS</b>	38
<b>3.1. Objetivo Geral</b>	38
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	38
<b>3.3. Limitações do estudo</b>	39
<b>4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	39
<b>4.1. Material e reagentes</b>	39
4.1.1. Reagentes	39
4.1.2. Material biológico	39
4.1.3. Meios de cultura	40
4.1.4. Equipamento analítico	40
<b>4.2. Procedimentos experimentais</b>	41
4.2.1. Preparação de biodiesel	41
4.2.2. <i>Screening</i> para determinação da mínima concentração (ótima) de curcumina e pirocatecol em diferentes condições de hidratação, capaz de produzir efeitos fungistáticos	42
4.2.3. Avaliação da manutenção da estabilidade oxidativa e antimicrobiana dos biodieseis ao longo do período de armazenamento	44
4.2.3.1. Determinação do Índice de Refração	46
4.2.3.2. Determinação do tempo de indução da oxidação lipídica e correlação com a estabilidade oxidativa	46
4.2.3.3. Avaliação da manutenção da atividade antimicrobiana do biodiesel	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48

<b>5.1. <i>Screening</i> para determinação da mínima concentração de curcumina e pirocatecol capaz de produzir efeito fungistático no biodiesel</b>	49
<b>5.2. Avaliação do potencial de atividade antioxidante da curcumina quando adicionada ao biodiesel</b>	55
<b>5.3. Avaliação da manutenção da estabilidade oxidativa e antimicrobiana dos biodieseis ao longo do período de armazenamento</b>	57
5.3.1. Avaliação da manutenção da estabilidade oxidativa dos biodieseis adicionados com curcumina	58
5.3.2. Avaliação da manutenção das propriedades antimicrobianas dos biodieseis adicionados com curcumina	62
<b>6. CONCLUSÕES</b>	65
<b>REFERÊNCIAS</b>	67
<b>ANEXOS</b>	79

## APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa realizado, intitulado “**Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da curcumina e do pirocatecol na manutenção da qualidade do biodiesel**”, é parte integrante de um projeto de pesquisa abrangente, intitulado “*Estudos sobre Biodiesel: Desenvolvimento de métodos analíticos para a caracterização e controle de qualidade e investigação de novos aditivos naturais para melhoria da qualidade deste biocombustível*” aprovado na Chamada MCTI/CNPq N<sup>o</sup> 40/2013 - Seleção Pública de Projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação voltados para a Cadeia Produtiva do Biodiesel. Linha 1 – Caracterização e Controle de Qualidade do Biodiesel, coordenado pelo Prof. Dr. Matthieu Tubino do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

A curcumina e o pirocatecol são compostos naturais, com comprovadas ações antimicrobiana e antioxidante, tendo a primeira já sido empregada com sucesso como agente antioxidante em alguns tipos de biodiesel (Adriano Gomes de Castro (2013) Estudo da Influência da Curcumina na Estabilidade Oxidativa de Biodieseis e Óleos Vegetais, Tese de Doutorado, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNICAMP, 2013), em trabalhos realizados pela equipe do Prof. Dr. Matthieu Tubino, nomeadamente em biodieseis de girassol, milho, canola e coco babaçu. Diante destas informações, foi avaliada a adição de curcumina e pirocatecol em biodieseis preparados a partir de diversas fontes vegetais (óleo de soja, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo usado de fritura, óleo de amêndoa de macaúba e óleo de microalgas) com o objetivo de minimizar a proliferação microbiana e retardar em simultâneo o processo oxidativo.

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho de pesquisa foram apresentados sob a forma de painel científico em dois congressos científicos, nomeadamente o “I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade”, realizado em Sorocaba/SP de 26 a 28 de Novembro de 2014, com o trabalho intitulado “*Curcumin and biodiesel: a fruitful relationship for preventing biodiesel oxidation?*” (**ANEXO A**), e o “38<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química”, realizado em Águas de Lindóia / SP de 25 a 28 de Maio de 2015, com o trabalho intitulado “*Curcumina, pirocatecol e biodiesel: um relacionamento frutífero para a prevenção da degradação microbiana do biodiesel?*” (**ANEXO B**). Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem a dois artigos científicos, tendo sido um deles já submetido para publicação numa revista científica internacional indexada com arbitragem por pares (**ANEXOS C e D**).

# 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem se destacado nos últimos anos no que se refere à produção de biocombustíveis, particularmente de etanol e biodiesel.

No que diz respeito ao biodiesel, desde 01 de Julho de 2014 que o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 7% (v/v) desse biocombustível. Esta regra foi estabelecida pela Lei nº 13.033 de 24 de Setembro de 2014, publicada no Diário Oficial da União (DOU) nº 185, seção 1, em 25 de Setembro de 2014, que aumentou de 6% (v/v) a partir de 01 de Julho de 2014 para 7% (v/v) a partir de 01 de Novembro de 2014 o percentual obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel obtido a partir de fontes não renováveis (DOU, 2014).

O aumento continuado do percentual volúmico adicionado de biodiesel ao diesel de petróleo demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil tanto na produção como no uso de biocombustíveis em larga escala. Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual (dados de 2010) de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, naquele ano, para cerca de 5,8 bilhões de litros. O biodiesel é um combustível produzido tanto a partir de óleos vegetais como de gorduras animais, sendo que dezenas de espécies vegetais podem ser usadas na produção do biodiesel, entre elas, óleos de soja, canola, girassol, milho, dendê, babaçu, amendoim, mamona, pinhão-mansão, entre outras.

Para se tornar compatível com os motores a diesel, o óleo vegetal precisa passar por um processo de transformação química chamado de transesterificação. Esta reação química é realizada industrialmente nas instalações produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP. A venda de “diesel BX”, designação atribuída à mistura de óleo diesel derivado do petróleo com um percentual X (5% (v/v), atualmente) de biodiesel, é obrigatória em todos os postos de abastecimento que revendem óleo diesel no Brasil. A adição de até 5% (v/v) de biodiesel ao diesel de petróleo foi amplamente testada dentro do Programa de Testes coordenado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia do Brasil, que contou com a participação da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA). Os resultados obtidos demonstraram, até ao momento, não haver a necessidade de qualquer ajuste ou alteração mecânica nos motores dos veículos que utilizam diesel BX.

O biodiesel comercializado deve, no entanto, atender a uma série de especificações regulamentadas pelos órgãos responsáveis (no Brasil, a ANP, através da Resolução 14/2012 publicada em 18 de maio de 2012). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), as normas internacionais da “American Society for Testing and Materials” (ASTM), a “International Organization for Standardization (ISO)” e o “Comité Européen de Normalisation” (CEN), todos determinam os parâmetros de qualidade para o biodiesel comercial e estabelecem os limites e métodos de ensaio para o seu controle de qualidade.

O biodiesel é considerado um bom substituto para o diesel derivado do petróleo, devido não só à sua melhor biodegradabilidade como também às baixas emissões de dióxido de carbono. Contudo, o biodiesel é instável quando exposto à umidade e ao ar atmosférico. Devido à sua higroscopicidade, pode ocorrer acúmulo de água durante o armazenamento de biodiesel por longos períodos de tempo, o que o torna um ambiente favorável à proliferação de microrganismos e à oxidação, com consequente diminuição da sua qualidade.

Considerando os fatos expostos, e dada a crescente importância da utilização de combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis, objetivou-se nesta proposta de trabalho de pesquisa estudar o potencial de utilização de compostos naturais com atividades antimicrobiana e antioxidante, a curcumina, e o pirocatecol, em biodieséis produzidos a partir de diversas fontes vegetais, visando minimizar tanto a proliferação microbiana como a oxidação lipídica.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Biodiesel

A utilização de óleos vegetais, como alternativas de combustível, começou a ser estudada no final do século XIX por Rudolph Diesel (BÜCKER, 2009; NASCIMENTO; COSTA NETO; MAZZUCO, 2001; KNOTHE *et al.*, 2006), na forma natural de óleo. Foi constatado que o uso direto dos óleos vegetais nos motores de combustão originava muitos problemas como, por exemplo, a acumulação de material oleoso nos injetores, a queima incompleta do óleo, a formação de depósitos de carvão na câmara de combustão, um baixo rendimento de potência e ainda, a queima direta de óleos vegetais libera a acroleína (propenal), um composto de aldeído etilênico obtido na desidratação da glicerina, que é tóxico (GARDNER; KAZI; ELLIS, 2004). Dentro deste contexto foram estudadas formas mais eficazes de utilização destes óleos como combustíveis, sendo um desses resultados o biodiesel.

A utilização de biodiesel, um combustível derivado de fontes renováveis, tem sido largamente estimulada em diversos países e as tendências mundiais assinalam uma crescente substituição dos combustíveis de origem fóssil pelos de origem renovável, como por exemplo o etanol (para uso em automóveis) e o biodiesel (para caminhões, ônibus, tratores e transportes marítimos, nos quais atualmente o óleo diesel derivado do petróleo é o combustível mais utilizado) (LIMA; SOGABE; CALARGE, 2008).

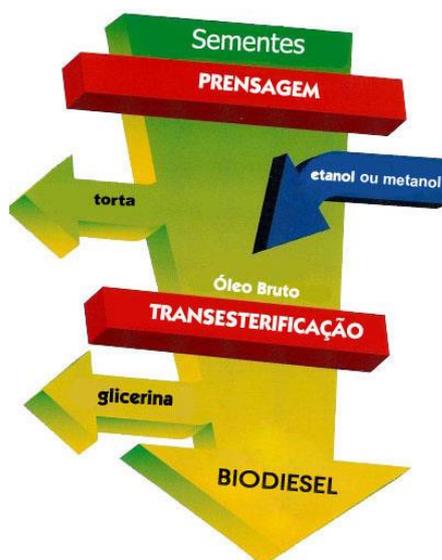
Além de multiplicar as fontes energéticas, o biodiesel apresenta diversas vantagens sobre os combustíveis derivados do petróleo, nomeadamente por: (i) não conter compostos aromáticos e enxofre; (ii) apresentar teores médios de oxigênio, estimulando uma combustão mais completa; (iii) possuir um maior ponto de fulgor, o que o torna mais seguro; (iv) produz, na sua combustão, menor emissão de partículas, HC, CO e CO<sub>2</sub>, diminuindo as emissões de compostos que promovem efeito estufa; e (v) ter caráter não-tóxico e ser biodegradável (HILL *et al.*, 2006).

#### 2.1.1. Processo de produção de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras

A transesterificação é o processo mais comum de produção de biodiesel, sendo que à fase oleosa (constituída maioritariamente por triacilgliceróis, TAGs) é adicionado um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), na presença de um catalisador (químico (metóxido ou

etóxido de sódio) ou enzimático (enzimas lipases)) o que origina biodiesel que é constituído por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerina (ou glicerol, subproduto da reação de transesterificação) O processo simplificado é apresentado na Figura 1.

**Figura 1.** Esquema simplificado do processo de produção de biodiesel.



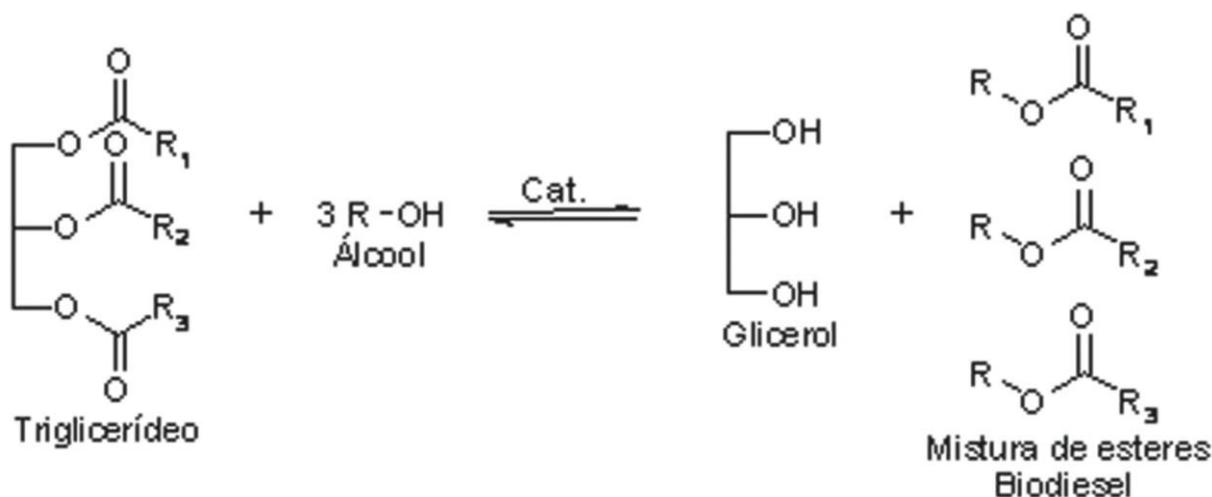
**Fonte:** Adaptado a partir de <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/processo-producao/biodiesel-processo-producao.htm> (acesso em 02/09/2015).

Os TAGs são encontrados em grandes proporções nos óleos vegetais e gorduras animais. A reação de transesterificação é um processo que ocorre em etapas, sendo nada mais do que a separação da glicerina do óleo vegetal, uma vez que, cerca de 20% de uma molécula de óleo vegetal é formada por glicerina que torna o óleo mais denso e viscoso. Nesta reação, por cada molécula de TAG que sofre conversão completa formam-se três moléculas de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) e uma molécula de glicerol (ver Figura 2), que ao ser removida do óleo o deixa mais fino e menos viscoso (KNOTHE *et al.*, 2006; MOSER, 2011).

As reações de transesterificação de óleos vegetais e gorduras são realizadas na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. Os catalisadores mais utilizados são os catalisadores homogêneos alcalinos, pela sua maior eficiência, resultando em altos rendimentos de reação. Além destes, os alcóxidos são mais ativos, produzindo rendimentos superiores a 98% na reação de transesterificação de óleos e gorduras, sendo, no entanto, mais susceptíveis à presença de água (reagindo violentamente na sua presença). Os

hidróxidos de sódio e de potássio, embora menos ativos apresentam menor custo e produzem resultados satisfatórios, tendo sido por isso empregados em grande escala (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; LOTERO *et al.*, 2005).

**Figura 2.** Reação de transesterificação de triacilgliceróis com álcool para produção de biodiesel.



**Fonte:** SANTOS; PINTO, 2009.

### 2.1.2. Normas relativas à composição regulamentar do biodiesel

O biodiesel pode ser definido como sendo um mono-alkiléster de ácidos graxos, derivado de fontes renováveis tais como óleos vegetais e gorduras animais (CANAKCI; VAN GERPEN, 2001), sendo produzido através da conversão de TAGs em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (ENCINAR *et al.*, 2002; NOUREDDINI; HARKEY; MEDIKONDURU, 1998). O biodiesel é uma substância oriunda de biomassa derivada de diversas fontes renováveis, regulamentada de acordo com o órgão que supervisiona a produção e qualidade dos mesmos, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) no Brasil, através da ABNT NBR 2008/ANP 07/08 (ANP 2015), na Europa, através da EN 14214 2003a, e nos Estados Unidos, através da ASTM D6751, 2008.

Existem diversos parâmetros observados na constituição e qualidade dos biodieses como: a reação de transesterificação por bases fracas e ácidos fortes (RAMOS *et al.*, 2009; GERIS *et al.*, 2007; HOLANDA, 2004; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998), o teor de água permitido no biodiesel é de 500 mg/kg (ANP, 2004), uma vez que a presença da água resulta na formação do sabão ao invés do produto desejado. O processo acontece em

altas temperaturas, com isto, acontece a hidrólise dos EAAGs ocasionando a formação dos AGLs (LIRA *et al.*, 2010; RINALDI *et al.*, 2007). O teor de álcool é um ponto de grande importância no processo, sendo que os álcoois que podem ser utilizados na produção do biodiesel são os metílico, etílico, propílico e álcool pentílico (álcool amílico) (DERMIBAS, 2008; GERIS *et al.*, 2007; BAJPAI; TYAGI, 2006), e de entre estes os de cadeias menores têm um potencial nucleofílico maior, sendo os mais utilizados (BAJPAI; TYAGI, 2006).

O Brasil é um dos grandes produtores de etanol, portanto é natural que leve vantagem sobre outros países na produção do biodiesel utilizando o etanol, uma vez que o Brasil é auto-suficiente na sua produção. Em vista a diversos parâmetros a serem observados, como a produção agrícola para a obtenção do etanol, a sua baixa toxicidade e a vantagem de ser renovável (HOLANDA, 2004). Já o metanol é mais atraente pelo ponto de vista da reatividade, como é composto sintetizado do petróleo torna-se mais tóxico em relação ao etanol (MONTEIRO *et al.*, 2008; BOUAID; MARTINEZ; ARACIL, 2009). Entre diversos parâmetros obrigatórios, para a manutenção da qualidade do biodiesel produzido e larga escala.

### 2.1.3. Processos de catálise química *versus* enzimática

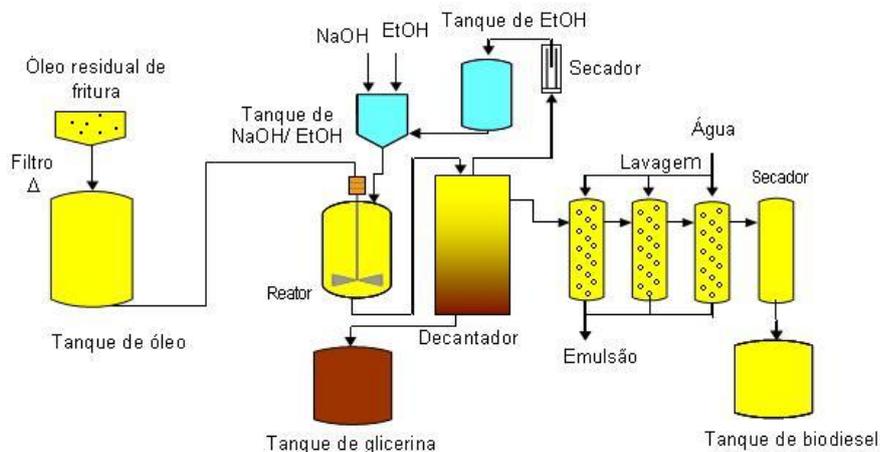
A transesterificação dos óleos vegetais e/ou gorduras associada a algum álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) dá-se na presença de catalisadores químicos alcalinos (usados preferencialmente nos setores comerciais) (conforme mostra a Figura 3) ou enzimáticos (conforme ilustra a Figura 4). Logo os catalisadores químicos são mais acessíveis e por isso os mais utilizados são o NaOH e o KOH (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2008; ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

Na relação custo-benefício, estes produtos químicos provaram ser muito mais econômicos em comparação com as enzimas, devido ao maior índice de conversão de ésteres, curto tempo de reação e utilização de baixa temperatura (BACOVSKY *et al.*, 2007; LEUNG; WU; LEUNG, 2010). A principal desvantagem da utilização dos catalisadores alcalinos reside na sua sensibilidade em presença de água, na sua pureza e na pureza do subproduto gerado. A presença de ácidos graxos livres e água na matéria-prima tem uma influência significativa sobre a reação de transesterificação. Além da purificação do produto final, a reação de transesterificação alcalina necessita de tratamento das águas residuais que são produzidas no processo de neutralização e lavagem do biodiesel (LEUNG; GUO, 2006; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2008).

As águas residuais geradas no processo de produção de biodiesel por transesterificação representam cerca de 0,2 toneladas por cada tonelada de biodiesel produzido. A purificação do produto final requer um extenso processamento, o que faz com que a transesterificação alcalina seja cara e ambientalmente desfavorável, entrando assim em controvérsia com a ideia de um combustível biodegradável e produzido a partir de fontes renováveis, encarado como uma das possíveis soluções para a diminuição da emissão de gases poluentes e com efeito de estufa, se no processo de produção ainda existem resíduos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Alguns tratamentos são abordados para os efluentes residuais da produção do biodiesel, como o tratamento eletroquímico que consiste no processo de eletrocoagulação, onde foram testadas combinações de ânodos e cátodos e alguns materiais: Fe-Fe, Fe-C, Al-Al, Al-C e C-C. Em um reator contendo elétrodos para medição, conectado em paralelo a uma fonte de alimentação contínua, foram medidos as densidades das misturas, o pH inicial e final, para observar e monitorar os teores de óleos e gorduras, sólidos suspensos e concentração de glicerol e metanol (SRIRANGSAN; ONGWANDEE; CHAVALPARIT, 2009). Tratamento biológico, onde foi empregada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, para combater o resíduo; após diversos testes, o crescimento ótimo do microrganismo foi determinado. O método consistiu em observar que quanto maior a concentração de sólidos no efluente, menor o índice de crescimento do microrganismo, percebendo assim que se a presença destes sólidos estivesse acima de  $2,14 \text{ g L}^{-1}$  a levedura encontrava dificuldade de crescimento e assim foram adicionados nutrientes para o seu ótimo crescimento, lembrando que foi necessário a diluição do efluente para a ação eficaz do agente (SUEHARA *et al.*, 2005). Tratamento físico-químico, onde foram abordados 5 métodos para o tratamento dos efluentes: 1º tratamento com solução de ácido acético 0,01% (m/m); 2º tratamento com solução de ácido acético 0,01% (m/m) e filtração em filtro de britas e areia; 3º tratamento com ácido acético 0,01% (m/m), seguido de filtração em filtro de britas e areia e com membrana filtrante entre camadas; 4º tratamento em *Jar test* com a adição de sulfato ferroso com floculante; 5º tratamento em *Jar test*, com a adição de sulfato de alumínio como floculante (GOLDANI; FRANKENBERG; CANTELLI, 2008).

**Figura 3.** Processo de produção de biodiesel por transesterificação alcalina (com etóxido de sódio) de óleo residual de fritura.



**Fonte:** DE PAIVA MENEZES; FIDALGO; SILVA, 2010.

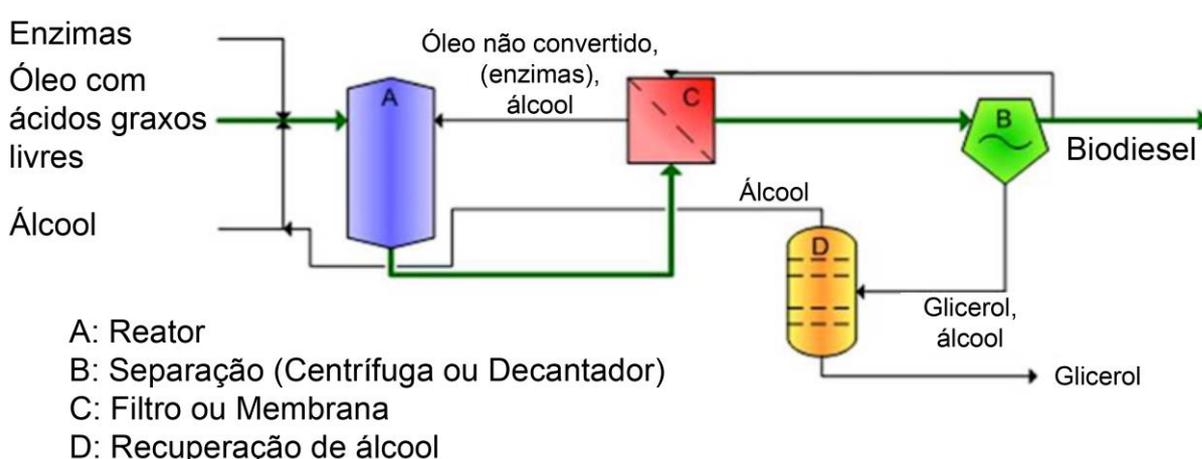
As enzimas são catalisadores biológicos que permitem a realização de muitas reações a velocidades imensamente superiores às das mesmas reações não catalisadas, através da diminuição expressiva da energia de ativação dessas mesmas reações. Sendo catalisadores biológicos, atuam normalmente sob condições fisiológicas de pH e temperatura e a baixíssimas concentrações de substrato. No entanto, através de técnicas de engenharia enzimática consegue-se hoje realizar industrialmente muitas reações que só podíamos observar em organismos vivos, em condições de pH, temperatura e concentrações de substratos substancialmente afastadas das fisiológicas (SILVA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2003; LAMAS *et al.*, 2001; BALCÃO *et al.*, 2001; BALCÃO; OLIVEIRA; MALCATA, 1998; BALCÃO; MALCATA, 1998; BALCÃO *et al.*, 1998a,b). As enzimas têm um enorme potencial de reduzir tanto o consumo energético como os problemas ambientais associados à produção de produtos residuais nas indústrias química e farmacêutica.

A transesterificação enzimática de óleos e/ou gorduras para produção de biodiesel ainda não é, no entanto, uma prática corrente na indústria, porém sabe-se que em 2008 já se produzia biodiesel na China à escala industrial usando esta abordagem totalizando uma produção anual de cerca de 20.000 toneladas (DU *et al.*, 2008).

Comparando a utilização de enzimas como catalisadores na produção de biodiesel com os catalisadores alcalinos ou ácidos (ver Quadro 1), as primeiras apresentam como vantagens o fato de não promoverem saponificação dos TAGs, o produto final não necessita passar pelo processo de lavagem, produzem glicerol de maior qualidade, não discriminam a proveniência das matéria-primas, apresentam uma necessidade reduzida em termos de consumo de energia e necessitam de uma menor proporção de álcool para óleo do que os catalisadores químicos (NARASIMHARAO; LEE; WILSON, 2007; TAMLAMPUDI *et al.*, 2008; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

No entanto, a transesterificação enzimática também apresenta desvantagens (ver Tabela 1) tais como um tempo de reação maior, necessidade de uma maior concentração enzimática para a conclusão da reação, um elevado custo de produção (enquanto as enzimas de utilização industrial (impuras) custam em torno de USD 1000 / kg, o NaOH apresenta um custo em torno de USD 0,62 / kg), e o fato das enzimas tenderem a perder as suas propriedades catalíticas ao fim de 100 dias de utilização em contínuo (BACOVSKY *et al.*, 2007; JEONG; PARK, 2008; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

**Figura 4.** Esquema integrado do processo de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos ou gorduras com álcool.



**Fonte:** NIGAM *et al.*, 2014.

**Quadro 1.** Comparação entre os processos de transesterificação química e enzimática na produção de biodiesel.

<b>Pincipais fatores</b>	<b>Transesterificação com catalizador alcalino</b>	<b>Transesterificação com biocatalizador</b>
<b>Temperatura</b>	60 °C – 80 °C	20 °C – 60 °C
<b>Presença de ácidos graxos nas matérias-primas</b>	Formação de sabões	Conversão completa para os ésteres metílicos
<b>Presença de água</b>	Reação desloca-se na formação de mais sabões, à medida que ocorre a hidrólise do óleo	Sem efeito no produto final
<b>Rendimento da produção de biodiesel</b>	Elevado, quase 99%	Comparativamente mais baixo do que com o catalisador alcalino, em torno de 90%
<b>Processamento a jusante do processo</b>	Purificação multi-etapas dos produtos finais	Nenhum
<b>Custo de produção do biodiesel</b>	Baixo, dado o reduzido custo do catalisador	Elevado, dado o alto custo dos biocatalizadores
<b>Comercialização</b>	100% comercializado	Ainda não é comercializado em grande escala
<b>Geração de águas residuais</b>	Efluentes salinos e alcalinos necessitam de tratamento antes da descarga	Não gera águas residuais

**Fonte:** Elaboração própria.

## **2.2. Contaminação microbiana do biodiesel**

O biodiesel é um bom substituto para o diesel derivado do petróleo por causa da sua melhor biodegradabilidade e baixa emissão de dióxido de carbono a quando da sua combustão nos motores atmosféricos. Contudo, o biodiesel é instável quando exposto à umidade e ao ar atmosférico. Assim, devido à sua higroscopicidade pode ocorrer acumulação de água durante o armazenamento de biodiesel por longos períodos de tempo, o que constitui uma condição favorável à proliferação de microrganismos (ZIMMER *et al.*, 2013; AGUIAR, 2013).

A estabilidade do biodiesel durante o armazenamento está relacionada com a sua capacidade em resistir a mudanças físicas e químicas causadas pela sua interação com o meio ambiente. Tais mudanças são geralmente influenciadas por fatores abióticos como a presença de contaminantes, luz solar, entre outros, que podem levar à formação de depósitos sólidos, mudanças de cor e odor, e turbidez do mesmo. A estabilidade térmica do biodiesel, por outro lado, diz respeito ao efeito da temperatura na oxidação natural do biodiesel (CASTRO, 2013).

A degradação microbiana pode se dar pela contaminação microbiológica advinda de partículas de poeira e de ambientes de armazenagem contaminados. Para o controle da contaminação microbiana do biodiesel durante o seu armazenamento, têm sido utilizadas diversas substâncias biocidas, como por exemplo clorometilisotiazolinona/metilisotiazolinona (CMIT/MIT), em concentrações de 100-400 ppm, nitrobutilmorfolina/nitrotrimetilenodimorfolina (NBM), em concentrações de 125 a 1000 ppm e Glutaraldeído (GA) nas concentrações 500 a 3000 ppm (ZIMMER *et al.*, 2013). Onde a utilização de substâncias sintetizadas também é empregada com sucesso.

No entanto, a adição de substâncias naturais possuindo simultaneamente atividades antioxidante e antimicrobiana poderia mostrar-se mais vantajosa em diversas partes, para evidenciar cada vez mais esta tecnologia e assim levar para novos rumos as pesquisas e descobertas, para acabar com o grande preconceito que é ainda imposto sobre os biocombustíveis. Neste projeto de pesquisa foi por isso objetivado o estudo da adição de duas substâncias naturais ao biodiesel, nomeadamente a curcumina e o pirocatecol, e seus efeitos na manutenção da qualidade do biodiesel.

### **2.3. Oxidação lipídica do biodiesel**

Comparativamente aos combustíveis fósseis, que são relativamente inertes e mantêm suas propriedades e características principais pouco inalteradas ao longo de um determinado período de armazenamento, o biodiesel degrada-se mais rapidamente com a ação do ar, temperatura elevada, luz solar e umidade. Ao entrar em contato com determinados contaminantes, gasosos ou microbianos, ocorre uma diminuição da qualidade do biodiesel, sendo a oxidação lipídica decorrente da exposição ao ar atmosférico um dos principais problemas de degradação a que o biodiesel está sujeito (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

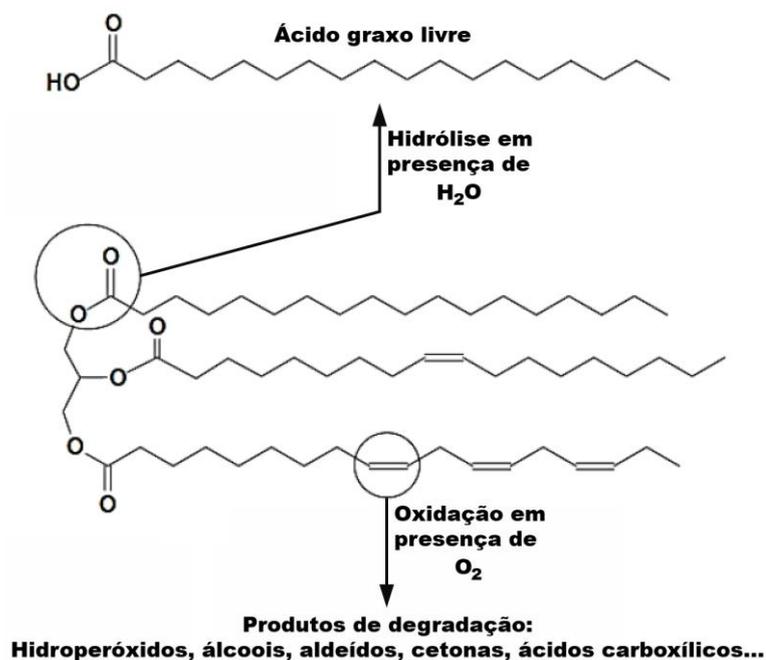
A alteração da qualidade tanto do biodiesel puro como de suas misturas é ligeiramente observada por alguns fatores, tais como elevação da acidez, aumento da corrosividade e formação de produtos indesejáveis como polímeros e depósitos, indícios claros de que o processo oxidativo do biodiesel está ocorrendo durante o armazenamento do produto (BONDIOLI *et al.*, 2003; BONDIOLI *et al.*, 2004).

A proteção contra à oxidação é, também, um importante parâmetro a ser observado e estudado para uma melhor aceitação do produto. O processo de degradação oxidativa do biodiesel depende muito da origem dos ácidos graxos utilizados para a produção do

biodiesel, principalmente do seu grau de insaturação, dos ésteres que estão em sua composição, além de fatores ambientais tais como temperatura, umidade e luz solar (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005; FERRARI; SOUZA, 2009). Assim, a instabilidade oxidativa é atribuída a uma grande percentagem de ésteres insaturados no biodiesel, os quais sofrem com mais frequência a oxidação no meio, tais como o linoleato de metilo (C<sub>18:2</sub>) e o linolenato de metilo (C<sub>18:3</sub>), originando compostos de degradação tais como ácidos, aldeídos, ésteres, cetonas, peróxidos e álcoois (XIN; IMAHARA; SAKA, 2009).

Em consequência da umidade ambiental e residual ou pela contaminação adventícia com água nos tanques de armazenamento, podem ocorrer reações de hidrólise que levam à formação de ácidos graxos livres, com consequente aumento da acidez do biodiesel. Relativamente às reações de oxidação, estas ocorrem em função de vários fatores podendo incluir a combinação de triglicérides com elevado nível de ácidos graxos insaturados com exposição à luz, altas temperaturas, presença de metais e exposição ao oxigênio atmosférico (KNOTHE, 2007; BORSATO *et al.*, 2012, 2014). Na Figura 5 encontram-se esquematizados os principais processos de degradação lipídica, ilustrados para uma molécula de triacilglicerol.

**Figura 5.** Processos de degradação lipídica, ilustrados para uma molécula de triacilglicerol.



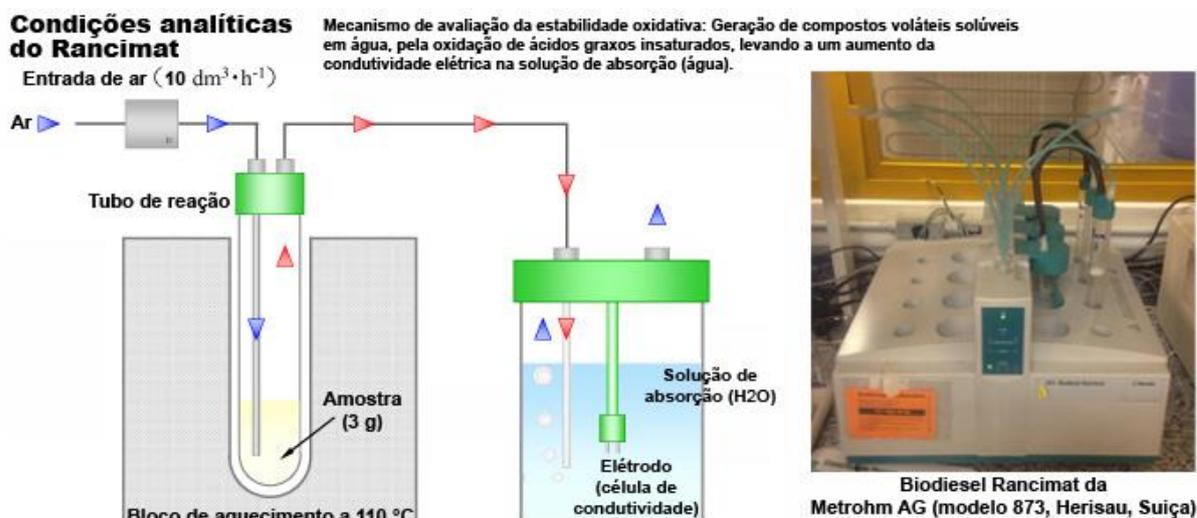
Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2015.

Todos estes compostos originários da degradação dos ésteres insaturados não são apenas problemáticos na composição do biodiesel, mas também acabam por danificar os motores de combustão (MONYEM; VAN GERPEN, 2001; CANAKCI; VAN GERPEN, 2001), impedindo ainda a aceitação e liberação em grande escala para a comercialização deste combustível (DINKOV *et al.*, 2008). O grau de oxidação de ácidos graxos com diferentes níveis de insaturação está relacionado com seu mecanismo de oxidação. A oxidação de um óleo insaturado é uma reação em cadeia de radicais livres: formação do radical livre, formação do hidroperóxido, decomposição do hidroperóxido e formação de produtos de oxidação (LIN, 1991).

### 2.3.1. Estabilidade oxidativa como parâmetro de qualidade do biodiesel

A estabilidade oxidativa expressa a suscetibilidade do biodiesel à oxidação sob condições induzidas de oxidação, tais como a exposição ao ar atmosférico e a temperatura elevada, podendo ser determinada por intermédio do tempo de indução isto é, o tempo necessário para que se iniciem os processos de oxidação com formação de compostos voláteis de pequena massa molecular (tipicamente ácidos carboxílicos ou compostos dissociáveis em água), que aumentam a condutividade de uma célula contendo água (DANTAS *et al.*, 2011). Na Figura 6 pode se visualizar o funcionamento de um dispositivo Rancimat 873, utilizado para medir o tempo de indução da oxidação lipídica de biodiesel. A ANP determina, para o biodiesel, um tempo de indução mínimo de 8 h, em resultado de uma determinação efetuada a 110 °C com fluxo de ar de 10 L. h<sup>-1</sup>, seguindo-se a norma EN ISO 14112 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003)

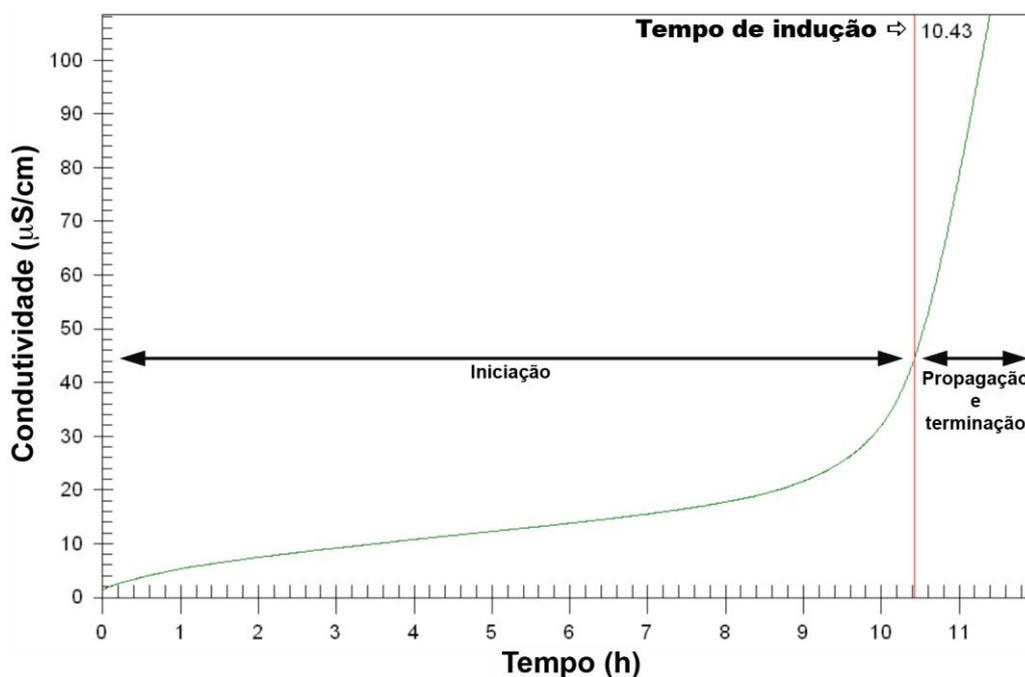
**Figura 6.** Condições analíticas de um analisador Rancimat 873, para determinação do tempo de indução da oxidação lipídica e consequente estabilidade oxidativa do biodiesel.



Fonte: adaptado a partir de [http://www.cyclochem.com/cyclochembio/research\\_e/035.html](http://www.cyclochem.com/cyclochembio/research_e/035.html).

Neste sistema, a condutividade da solução de absorção (água) é medida continuamente (observar Figura 6), obtendo-se uma variação de condutividade em função do tempo, geralmente uma curva característica conforme ilustra a Figura 7. O tempo de indução é definido como sendo aquele período necessário para atingir um ponto crítico de oxidação, correspondente à fase de iniciação dos processos oxidativos. A partir desse instante produz-se uma aceleração brusca da velocidade do processo oxidativo, o que gera um rápido aumento da condutividade da solução de absorção (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

**Figura 7.** Exemplo de gráfico de variação da condutividade em função do tempo produzido pelo método Rancimat, para determinação do tempo de indução da oxidação lipídica.



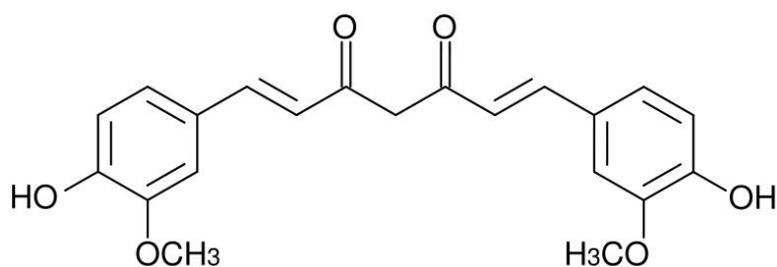
Fonte: Elaboração própria.

O tempo de indução reveste-se assim de especial importância, pois é um indicador do período de tempo no qual o biodiesel pode ser armazenado em condições adequadas sem que haja alterações de suas propriedades físicas e químicas, como por exemplo aumento de acidez e viscosidade (BONDIOLI *et al.*, 1995). Este parâmetro é reflexo da composição molecular do biodiesel relativamente ao número de ligações duplas: regra geral, o tempo de indução do biodiesel diminui quando aumenta a quantidade de insaturações dos óleos a partir do qual ele foi produzido.

## 2.4. Curcumina

A curcumina [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] é um composto polifenólico de massa molecular igual a 368,38 g/mol e fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_6$ , presente naturalmente no açafrão-da-Índia (*Curcuma longa* Linn.) (SHAIKH *et al.*, 2009). A sua estrutura molecular encontra-se ilustrada na Figura 8.

**Figura 8.** Estrutura molecular da curcumina.



**Fonte:** retirado de [http://www.edinformatics.com/interactive\\_molecules/info/curcumin.htm](http://www.edinformatics.com/interactive_molecules/info/curcumin.htm).

A curcumina (ou cúrcuma) disponível comercialmente é na verdade uma mistura de três curcuminóides que lhe conferem a cor amarelo-alaranjada (ver Figura 9): curcumina (77%), desmetoxicurcumina (17%) e bidesmetoxicurcumina (3%) (CHASSAGNEZ; CORRÊA; MEIRELES, 1997). O Açafrão da Índia ou “Turmeric” ou “Cúrcuma” (*Curcuma longa* Linn.) é uma planta da família do gengibre (*Zingiberaceae*) sendo a raiz a parte mais utilizada na culinária e na medicina. No Brasil, principalmente em Minas Gerais e Goiás, é conhecida como Açafrão da Terra, Açafroa ou Gengibre Amarelo. A curcumina tem sido utilizada na alimentação e na medicina Ayuverdica (medicina tradicional Indiana) desde há mais de 6000 anos, para tratamento de diversas doenças (DE FELIPPE JUNIOR, 2008).

**Figura 9.** Coloração amarela do açafrão da Índia, ou “Turmeric”, ou ainda “Cúrcuma” (*Curcuma longa* Linn.), planta da família do gengibre (*Zingiberaceae*).



**Fonte:** <http://www.zentrum-der-gesundheit.de/curcumin-krebshemmende-wirkung-ia.html>.

A respeito dos promissores efeitos biológicos da curcumina, sua biodisponibilidade é baixa devido a uma inexpressiva solubilidade em água. Adicionalmente, é fotossensível e degrada-se quando exposta a pHs alcalinos. Assim, encontram-se na literatura científica da especialidade diversos trabalhos de pesquisa envolvendo modificações farmacotécnicas da curcumina, visando a alteração de suas propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas visando o aumento de sua biodisponibilidade e proteção de sua estrutura

(TIYABOONCHAI; TUNGPRADIT; PLIANBANGCHANG, 2007; MAITI *et al.*, 2007; MUKERJEE; VISHWANATHA, 2009; SHAIKH *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2009; ONOUE *et al.*, 2010).

A atividade antimicrobiana da curcumina tem também sido objeto de pesquisas científicas para utilização deste pigmento natural como agente antimicrobiano em alimentos. As suas propriedades antimicrobianas, aliadas à sua relativamente baixa toxicidade, podem promover a utilização desta substância como conservante em alimentos e cosméticos (PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2005, 2008).

Há relatos do poder antioxidante da curcumina associada a outros compostos, na ação antitumoral da bleomicina sobre os linfócitos humanos (ver Tabela 2), no encapsulamento em micropartículas e filmes de quitosana, entre outros.

**Quadro 2.** Farmacologia e atividade antitumoral da curcumina.

<b>ATIVIDADE CITADA NA LITERATURA PARA A CURCUMINA</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Antiproliferativa, antitumoral e anticancerígena.	AGGARWAL; KUNAR; BHARTI, 2003
Indução da apoptose de células cancerígenas e como quimioprotector na inibição da formação de metástases.	AGGARWAL; KUNAR; BHARTI, 2003, BACHMEIER <i>et al.</i> , 2008
Atividade antiproliferativa e pro-apoptótica.	PISANO <i>et al.</i> , 2007
Proteção contra os efeitos das nitrosaminas sobre as células hepáticas.	SHUKLA, ARORA, 2003

Com seu potente poder antioxidante, a curcumina age por via de diversos mecanismos e acaba combatendo a proliferação de vários tipos de células tumorais (AGGARWAL; KUNAR; BHARTI, 2003).

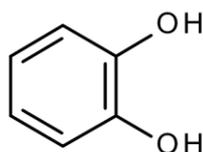
## **2.5. Pirocatecol (catecol)**

O catecol, também conhecido como pirocatecol ou 1,2-dihidroxibenzeno, é um composto orgânico com a fórmula molecular  $C_6H_4(OH)_2$  (ver Figura 10). Tem um aspecto cristalino incolor e odor característico, encontrando-se normalmente na fase sólida, é solúvel

em água, possui uma massa molecular de 110,1 g/mol, densidade de 1,344 g/cm<sup>3</sup>, ponto de fusão de 105 °C e ponto de ebulição de 245,5 °C.

Pequenas quantidades de pirocatecol podem aparecer naturalmente em frutos e vegetais, juntamente com a enzima polifenol oxidase. Os frutos, ao serem expostos ao ar, permitem que o pirocatecol (incolor) neles contido se oxide, resultando desta reação a benzoquinona (de cor avermelhada-castanha). A benzoquinona, produto da oxidação do pirocatecol, é um antimicrobiano natural que previne na maior parte dos casos a infecção de plantas por parte de microrganismos. A oxidação do pirocatecol é também utilizada em laboratório para investigação oncológica, uma vez que alguns ensaios científicos provaram a eficácia dos produtos da oxidação do pirocatecol (várias quinonas e superóxidos) no combate a células de glioblastomas. Conhecendo o seu poder antimicrobiano, a farmacologia emprega-o ainda como antisséptico (SOARES, 2002).

**Figura 10.** Estrutura molecular do pirocatecol.



**Fonte:** retirado de: <http://structuresearch.merck-chemicals.com/cgi-bin/getStructureImage.pl?owner=MDA&unit=CHEM&product=822261>

## **2.6. Garantia de Qualidade do Biodiesel no armazenamento.**

A Petrobras aplica um rigoroso procedimento desde a produção do biodiesel até seus distribuidores e parceiros, resultando em um regime rigoroso para manter a qualidade do produto em todas as etapas produtivas. Alguns pontos são observados para que o produto chegue ao consumidor com a devida qualidade, tais como: recebimento dos caminhões-tanques, onde toda a documentação deve estar em dia de acordo com as normas, para comprovar a qualidade do óleo diesel ou biodiesel antes do embarque para o seu destino, estarem devidamente limpos (sem a presença de água e detergentes). Adicionalmente, a presença de sujeiras nos tanques do armazenamento deve ser eliminada, pois podem influenciar no aparecimento de compostos indesejáveis, pela interação do combustível com aquele material presente. Outro ponto é a sedimentação de contaminantes, onde depois de introduzidos os biocombustíveis onde serão estocados é observada a separação através do

repouso por cerca de 12 a 36 horas dependendo da coluna de óleo diesel ou biodiesel dentro do tanque. E a presença de água, que favorece a proliferação microbiana e também a hidrólise.

Não é descrita é taxada uma norma do tempo total permitido para o armazenamento do combustível e nem o seu prazo de validade, sendo aconselhável que a estocagem seja de no máximo 3 meses para que não hajam influências no produto, como as descritas acima (PETROBRÁS, 2012)

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo geral**

Em função da importância do biodiesel para produção no Brasil, e o manejo dos resíduos, percebe-se que há a necessidade de propostas para a melhoria de sua qualidade e conservação. Assim, o objetivo deste trabalho de pesquisa consistiu em avaliar a aplicação de novos aditivos naturais com comprovadas atividades antimicrobiana e antioxidante, nomeadamente a curcumina e o pirocatecol, para a manutenção da qualidade do biodiesel.

### **3.2. Objetivos específicos**

Especificamente, o trabalho de pesquisa almejou:

- Ⓢ Preparar biodieseis a partir de diferentes fontes vegetais;
- Ⓢ Avaliar a capacidade antimicrobiana da curcumina e do pirocatecol em diferentes concentrações mássicas e sob diferentes condições de hidratação, para escolha do melhor aditivo;
- Ⓢ Avaliar a aplicação do aditivo natural selecionado na manutenção da qualidade dos diferentes biodieseis, em termos de controle da oxidação lipídica, manutenção de ambiente desfavorável ao crescimento microbiano e evolução do índice de refração, ao longo de um período de armazenamento de seis meses.

### **3.3. Limitações do estudo**

- Ⓢ Não foi objetivo deste trabalho de pesquisa estudar a capacidade produtiva.
- Ⓢ Não foi objetivo deste trabalho de pesquisa estudar o manejo dos resíduos.
- Ⓢ Não foi igualmente objetivo estudar o processo produtivo.

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1. Material e reagentes

#### 4.1.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho de pesquisa foram de grau de pureza PA, tendo sido utilizados sem qualquer tipo de purificação adicional. A água utilizada foi purificada num sistema Milli-Q Elga Purelab (Molsheim, França) até uma condutividade final de cerca de  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ . A curcumina foi adquirida à Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Alemanha); O pirocatecol foi adquirido à Fluka (Buchs SG, Suíça). Para a síntese dos vários biodiesel, o óleo refinado de soja foi adquirido no comércio local na cidade de Campinas (Campinas SP, Brasil), o óleo residual de fritura foi coletado através do Programa de Recolha Seletiva de Resíduos do Departamento de Ambiente da Universidade Estadual de Campinas (Campinas SP, Brasil), os óleos de semente de algodão e de microalgas foram oferecidos pela EXTRAE/FEA/UNICAMP (Unicamp SP, Brasil), o óleo de semente de gergelim foi oferecido pela empresa Sésamo Real Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda. (Valinhos SP, Brasil), e o óleo de amêndoa de macaúba foi adquirido à Associação Comunitária de Pequenos Produtores do Vale de Dantas e Regiões Adjacentes a Montes Claros (Minas Gerais MG, Brasil). O metanol absoluto foi adquirido à Synth (Diadema SP, Brasil) e o catalisador metóxido de sódio (30% (m/m) em metanol) foi adquirido à Vetec (Rio de Janeiro RJ, Brasil).

#### 4.1.2. Material biológico

O microrganismo utilizado nos ensaios experimentais, o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* Bainier, de código CMMAI 0543, foi adquirido à Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), do CPQBA/UNICAMP (Campinas SP, Brasil).

#### 4.1.3. Meios de cultura

O meio de cultura utilizado em todos os ensaios microbiológicos foi o meio nutritivo de ágar Sabouraud Dextrose solidificado, adquirido à Promidol Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil). As placas de Petri, descartáveis, foram adquiridas à J. Prolab (São José dos Pinhais, Brasil). O caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) foi adquirido à HiMedia Laboratories (Mumbai, Índia).

#### 4.1.4. Equipamento analítico

Os equipamentos científicos utilizados incluíram uma balança analítica da marca OHAUS (modelo AS200S, Sorocaba, Brasil), uma balança semi-analítica da marca MARTE (modelo AL200, Sorocaba, Brasil), uma estufa de incubação da marca QUIMIS (modelo Q-316-14, Diadema SP, Brasil), uma capela de fluxo laminar da marca TROX TECHNIK (modelo FLV-II, São Paulo SP, Brasil), um analisador de tempo de indução da oxidação lipídica da marca Metrohm AG (modelo Biodiesel Rancimat 873, Herisau, Suíça), e um refratômetro digital da marca Mettler-Toledo (modelo Refracto 30GS, Greifensee, Suíça).

## 4.2. Procedimentos experimentais

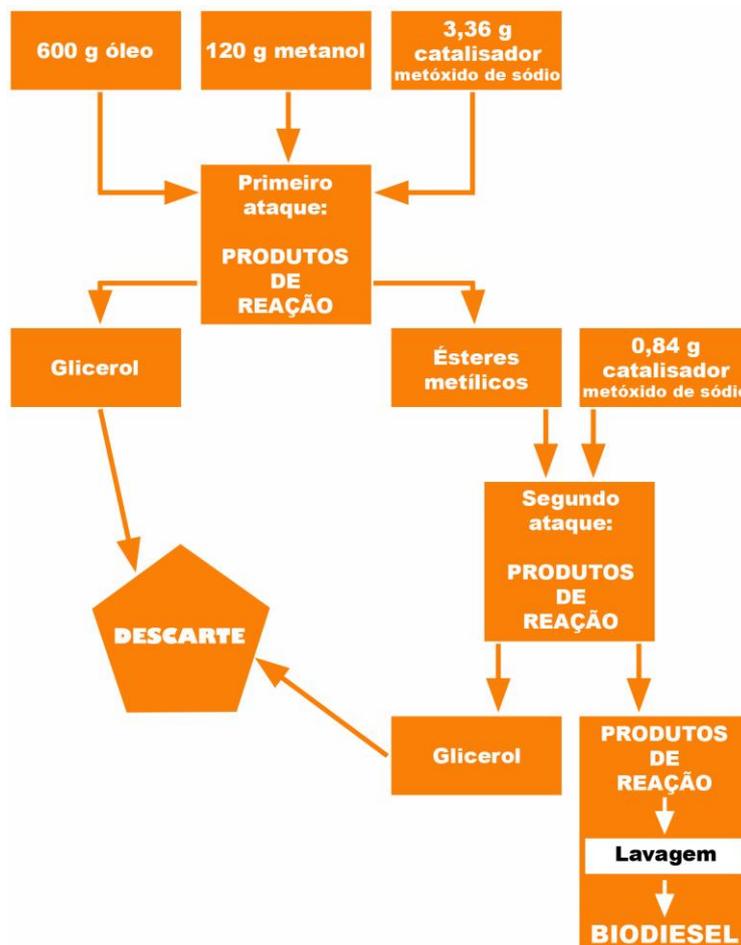
### 4.2.1. Preparação de biodiesel

Os diferentes biodieseis foram preparados a partir de óleos de fontes vegetais distintas (amêndoa de macaúba, residual de fritura, soja, algodão, gergelim e microalgas), por processos de transesterificação química com um mono-álcool de cadeia curta (metanol), na presença de um catalisador químico (metóxido de sódio), produzindo assim uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol.

As reações de síntese foram realizadas de acordo com o procedimento descrito abaixo, proposto por ARICETTI (2010) e DA SILVA *et al.* (2015). Os biodieseis foram sintetizados através de duas reações sequenciais de transesterificação. A primeira reação, de ataque, foi realizada utilizando-se 600 g de óleo, 120 g de metanol (20% (m/m) da massa de óleo) e 3,36 g de catalisador metóxido de sódio (que corresponde a 80% de 0,7% (m/m) da massa de óleo). A mistura foi refluxada durante 1 hora a 60 °C. Uma vez terminada a reação, a solução resultante foi decantada para separação do glicerol. O sobrenadante foi recolhido para a segunda reação de ataque, utilizando-se mais 0,84 g do catalisador metóxido de sódio (20% (m/m) dos restantes 0,7 % da amostra). Novamente, a mistura resultante foi colocada para decantação e a fase inferior rejeitada. A fase superior foi recolhida e submetida a uma etapa de lavagem, usando cinco volumes de 100 mL de água desionizada a 60 °C, para remoção de impurezas tais como vestígios de glicerol, metanol e catalisador químico.

O processo de síntese do biodiesel por processos de transesterificação química, utilizado neste trabalho de pesquisa, encontra-se representado esquematicamente na Figura 11.

**Figura 11.** Fluxograma do processo de síntese química do biodiesel.



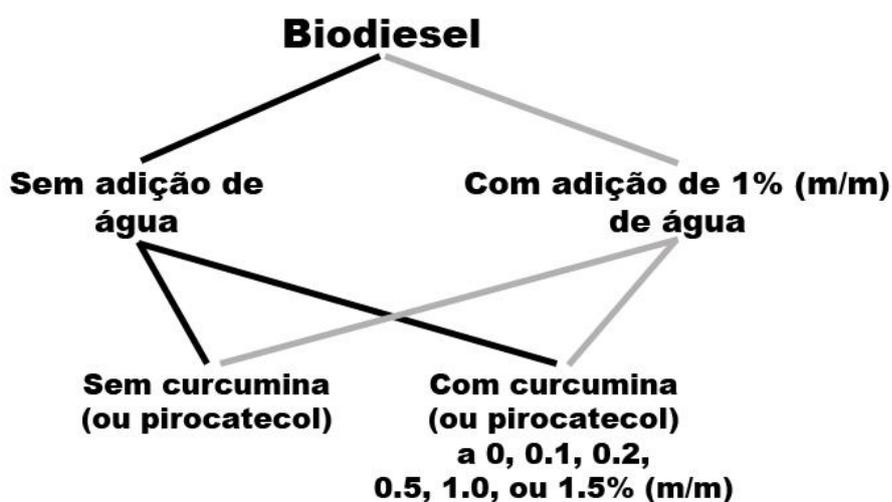
**Fonte:** Elaboração própria.

4.2.2. *Screening* para determinação da mínima concentração (ótima) de curcumina e pirocatecol em diferentes condições de hidratação, capaz de produzir efeitos fungistáticos

Foi efetuado um *screening* para avaliação da mínima concentração de curcumina e de pirocatecol capaz de produzir efeito fungistático no biodiesel, utilizando como microrganismo-alvo o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* Bainier. Foram utilizados curcumina e pirocatecol, na forma de pó, em percentagens mássicas variáveis de 0,10-1,50% em massa em biodiesel (0%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, ou 1,5%, m/m). Vinte e quatro amostras de cada biodiesel foram adicionadas com curcumina e pirocatecol nas percentagens mencionadas. A presença de água foi também avaliada, com adição de 1%

água (m/m) às amostras de biodiesel contendo curcumina ou pirocatecol. Na Figura 12 apresenta-se o *design* experimental utilizado. Todas as amostras de biodiesel adicionadas com curcumina ou pirocatecol, na ausência ou presença de 1% (m/m) de água adicionada, foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidas a 4 °C até uso.

**Figura 12.** *Design* experimental para avaliação do efeito da curcumina e/ou do pirocatecol como agente antimicrobiano e/ou antioxidante em amostras de biodiesel, na ausência ou presença de água ultrapura adicionada.



Fonte: Elaboração própria.

O microrganismo (na forma de *pellet* liofilizado) foi reativado pela adição de 5 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl (m/m) em água ultrapura). Após completa rehidratação do *pellet*, a solução foi suavemente agitada e vertida para placas de Petri contendo Sabouraud Dextrose Agar sólido, e as placas incubadas durante 48 h a 25 °C numa câmara de incubação da QUIMIS (modelo Q-316-14, Diadema, SP, Brasil).

**Figura 13.** Fungo Filamentoso *Paecilomyces varioti* Bainier, inoculado em placa de Petri contendo meio de cultura sólido Sabouraud Dextrose Agar.



**Fonte:** Elaboração própria.

Após incubação, uma unidade formadora de colônias (UFC) foi selecionada e removida usando uma alça metálica flamejada, e suspensa em caldo nutritivo BHI líquido estéril, após o que o tubo foi incubado durante 48 h a 25 °C. Após este período de tempo, e após homogeneização do inóculo, introduziu-se um *swab* estéril na cultura líquida em suspensão, a solução em excesso foi removida comprimindo suavemente o *swab* contra as paredes do tubo, e a superfície de agar sólido Sabouraud Dextrose Agar contido em placas de Petri foi inoculada na forma de estrias em três direções, em cada quadrante (previamente marcados). Imediatamente após inoculação, 20 µL de cada amostra de biodiesel com uma dada percentagem mássica de curcumina ou pirocatecol (sem e com água adicionada) foram gotejadas no centro de cada quadrante na forma de uma única (pequenina) gota, usando ponteiros estéreis e uma micropipeta Gilson (Gilson Inc., Middleton WI, EUA). Para cada biodiesel, as amostras adicionadas ou com curcumina ou com pirocatecol foram gotejadas em quatro placas de Petri contendo agar Sabouraud Dextrose sólido usando a seguinte sequência: placa de Petri #1: quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; placa de Petri #2: quadrante

superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) curcumina; placa de Petri #3: quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; placa de Petri #4: quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) pirocatecol. As placas de Petri foram seguidamente incubadas a 25 °C durante 48 h, período de tempo após o qual as mesmas foram visualmente inspecionadas para a presença de halos de inibição de crescimento realizada utilizando uma craveira e luz reflectida para iluminar as placas de Petri (em posição invertida) colocadas sobre um fundo negro e opaco. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas numa capela de fluxo laminar da marca TROX TECHNIK (modelo FLV-II, São Paulo SP, Brasil). As placas de Petri contendo o meio de cultura sólido foram preparadas de acordo com procedimentos dos fabricantes e seguindo instruções da CLSI (2011).

#### 4.2.3. Avaliação da manutenção da estabilidade oxidativa e antimicrobiana dos biodieseis ao longo do período de armazenamento

Em condições reais de armazenamento, o biodiesel pode sofrer contaminação adventícia com água, proveniente de infiltrações (p.ex.: chuva, lavagem dos locais de abastecimento, microfendas nos tanques de armazenamento). Considerando que, no Brasil, a temperatura ambiente média anual se situa em torno de 25 °C, para avaliar o efeito combinado da presença de água e adição do composto natural selecionado na concentração mínima capaz de produzir efeito fungistático sobre a manutenção da qualidade do biodiesel, os biodieseis produzidos e selecionados foram avaliados do ponto de vista da estabilidade oxidativa e presença de contaminação microbiana ao longo de um período de armazenamento de 6 meses.

Os biodieseis foram adicionados com curcumina nas percentagens mássicas previamente otimizadas (ver seção 4.2.2.), isto é, 0,1% (m/m) (biodiesel de óleo de semente de algodão), 0,2% (m/m) (biodiesel de óleo residual de fritura), e 0,5% (m/m) (biodieseis de óleo de semente de gergelim e de óleo de soja). Todos os biodieseis foram ainda adicionados com 1% (m/m) água ultrapura e inoculados (usando uma alça de Drigalski flamejada) com uma alçada cheia de micélio de *Paecilomyces variotii* Bainier previamente crescido em meio nutritivo sólido Sabouraud Dextrose Agar em placa de Petri. Todos os

biodieseis foram subsequentemente armazenados em frascos de vidro âmbar envolvidos em papel de alumínio para preservar a curcumina da fotodegradação (dado que a curcumina é fotossensível) durante seis meses a 25 °C em câmara de incubação (ver Figura 13).

**Figura 14.** Local de armazenamento dos vários biodieseis, após adição combinada de 1% (m/m) de água e curcumina nas percentagens mássicas previamente otimizadas para cada biodiesel (da esquerda para direita, na figura: biodieseis de gergelim (G), algodão (A), soja (S) e fritura (F)).



**Fonte:** Elaboração própria.

A intervalos de tempo pré-determinados (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias), os frascos de vidro contendo os biodieseis foram retirados da estufa de incubação e colocados na capela de fluxo laminar previamente esterilizada por irradiação com luz UV, e amostras (volumes de 12 mL) de todos os biodieseis retiradas com o auxílio de pipetas de vidro estéreis. As amostras foram seguidamente divididas em dois frascos estéreis, sendo uma parte analisada para determinação do índice de refração (sempre a 25 °C) e tempo de indução da oxidação lipídica, e a outra parte analisada para a presença de células viáveis de *Paecilomyces variotii* Bainier. Amostras dos biodieseis originais (i.e., sem adição de curcumina e água e não-inoculados com o fungo filamentoso) foram também analisadas quanto ao índice de refração, tempo de indução da oxidação lipídica e carga microbiana.

#### 4.2.3.1. Determinação do Índice de Refração

Para determinação do índice de refração dos vários biodieseis ao longo de todo o período de armazenamento, amostras dos mesmos foram condicionadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e uma gota colocada sobre o cristal de um refratômetro digital da marca Mettler-Toledo (modelo Refracto 30GS, Greifensee, Suíça).

#### 4.2.3.2. Determinação do tempo de indução da oxidação lipídica e correlação com a estabilidade oxidativa

O período de indução da oxidação lipídica, que expressa a estabilidade oxidativa dos biodieseis, foi determinado seguindo o procedimento da norma EN14112 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003), num equipamento Biodiesel Rancimat da Metrohm AG (modelo 873, Herisau, Suíça). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. As análises consistiram em usar 3 g de amostra de biodiesel que foi aquecido até 110 °C e mantido a esta temperatura, sob um fluxo de ar constante de 10 L.h<sup>-1</sup>.

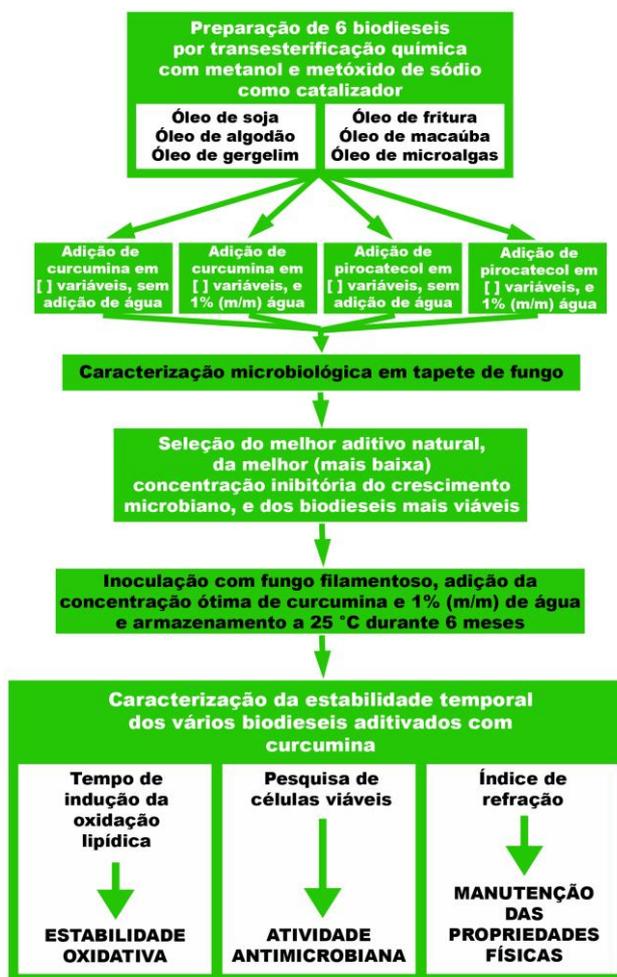
#### 4.2.3.3. Avaliação da manutenção da atividade antimicrobiana do biodiesel

Os biodieseis armazenados foram analisados quanto à manutenção de um ambiente desfavorável para o crescimento microbiano, através da determinação da presença de células viáveis de *Paecilomyces variotii* Bainier. A intervalos de tempo pré-determinados, amostras de 100 µL de cada biodiesel adicionado com curcumina e água e inicialmente inoculado com o fungo filamentosos foram removidas dos frascos de vidro âmbar em capela de fluxo laminar (da marca TROX TECHNIK, modelo FLV-II, São Paulo SP, Brasil) e introduzidas e devidamente espalhadas em placas de Petri contendo agar sólido Sabouraud Dextrose Agar, usando uma alça de Drigalski flamejada, após o que as placas de Petri foram incubadas durante 48 h a 25 °C numa estufa de incubação da marca QUIMIS (modelo Q-316-14, Diadema, SP, Brasil). Após o período de incubação, as placas de Petri foram observadas para a presença de crescimento fúngico e quaisquer (se existentes) UFCs devidamente contadas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O biodiesel é visto cada vez mais como uma alternativa viável ao combustível diesel derivado do petróleo, sendo muito menos poluente e produzido a partir de fontes renováveis. O trabalho de pesquisa aqui apresentado objetivou o estudo da adição de compostos naturais a biodieseis produzidos a partir de diversas fontes vegetais, com o intuito de aumentar a estabilidade oxidativa e microbiana deste combustível. Neste sentido, o trabalho de pesquisa desenvolvido exigiu a realização de diversas etapas sequenciais tanto para a determinação da mínima concentração de aditivo capaz de transformar o biodiesel num ambiente hostil para o crescimento microbiano, como para a caracterização da estabilidade oxidativa e microbiana do mesmo ao longo de um período alargado de armazenamento. A Figura 14 apresenta resumidamente as etapas envolvidas no presente trabalho de pesquisa.

Figura 15. Diagrama de seqüências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.



Fonte: Elaboração própria.

Um dos principais problemas com o biodiesel está relacionado com a sua estabilidade, sendo que os fatores mais significativos para a sua degradação incluem a exposição ao ar e/ou luz solar, altas temperaturas e mesmo a presença de metais que podem eventualmente atuar como catalizadores no processo da sua oxidação. A presença de microrganismos foi também relatada como sendo um fator que promove a degradação do biodiesel, com uma queda significativa na sua qualidade (DODOS *et al.*, 2012; PASSMAN, 2013; BORSATO *et al.*, 2014). Assim, para minimizar este problema, o trabalho de pesquisa realizado almejou estudar os efeitos da adição ao biodiesel de substâncias naturais com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Neste sentido, o trabalho de pesquisa realizado foi dividido em duas etapas principais, a primeira das quais almejou determinar as mais baixas concentrações de curcumina e/ou pirocatecol exercendo atividades antimicrobiana e/ou antioxidante em biodieseis produzidos a partir de óleos de diferentes origens vegetais, em diferentes condições de hidratação dos biodieseis, para seleção do aditivo mais eficiente. A segunda etapa almejou seguir, durante um período de tempo de armazenamento relativamente longo, o efeito do aditivo natural selecionado na manutenção das propriedades e qualidade do biodiesel.

Não sendo aconselhável a manutenção em armazenamento de combustíveis diesel acima de 3 meses (PETROBRAS, 2014), e considerando a adição de 6% a 7% (v/v) de biodiesel ao diesel derivado do petróleo, recomenda-se cuidado ainda mais rigoroso do que aquele dispensado ao diesel derivado do petróleo, em função da maior higroscopicidade e biodegradabilidade do biodiesel. Neste sentido, o período de tempo do estudo aqui descrito (6 meses) foi duas vezes superior àquele recomendado para a manutenção do diesel em condições de armazenamento.

### **5.1. *Screening* para determinação da mínima concentração de curcumina e pirocatecol capaz de produzir efeito fungistático no biodiesel**

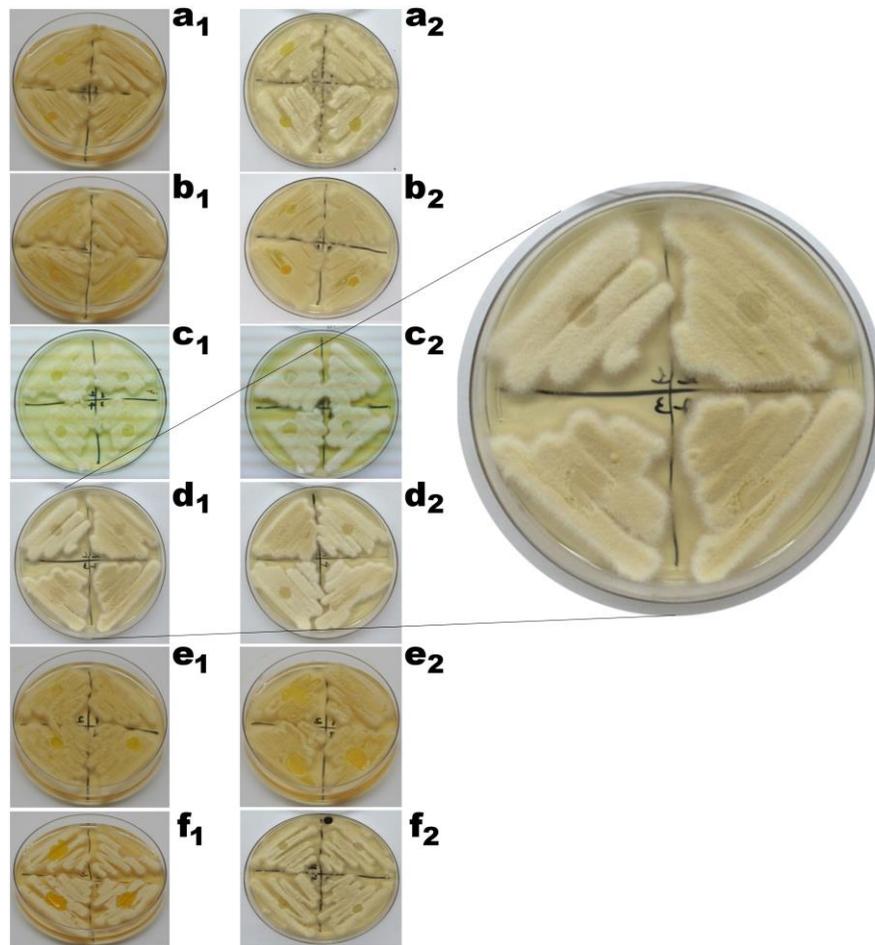
Todos os biodieseis recém-preparados foram analisados quanto à carga microbiana, tendo todos produzidos resultados negativos, o que está em clara concordância com as condições processuais que levam a produção deste biocombustível (DODOS *et al.*, 2012).

Para testar o potencial da adição de substâncias naturais tais como a curcumina e/ou o pirocatecol ao biodiesel, com o objetivo de prevenir e/ou controlar a contaminação microbiana e a oxidação lipídica, decidiu-se inocular todos os biodieseis recém-preparados com um microrganismo ubíquo capaz de subsistir nas condições prevalentes em tal meio e,

ao mesmo tempo, capaz de florescer nele. O microrganismo escolhido foi o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* Bainier, devido ao fato de este ser um agente contaminante comum em combustíveis diesel (PASSMAN, 2013) e também devido à disponibilidade de aquisição de uma cepa de origem garantida. A presença de água como facilitadora ou inibidora da atividade do(s) agente(s) antimicrobiano(s) adicionado(s) foi também avaliada e, para tal, todos os biodieseis recém-preparados foram adicionados com 1% (m/m) de água ultrapura, com o objetivo de simular a hidratação do biodiesel durante o armazenamento, um valor até vinte vezes o máximo de água permitido legalmente (500 ppm) pela norma brasileira ANP 42/2004 (ANP, 2004).

Em condições reais de armazenamento, o biodiesel pode sofrer contaminação acidental com água de infiltrações (p.ex. chuva, lavagem dos pontos de abastecimento, microfendas nos tanques de armazenamento) e por microrganismos e, neste sentido, foi considerado importante definir as condições de armazenamento tão próximas quanto possível das condições reais. Os resultados dos ensaios de inibição do crescimento microbiano obtidos para todas as amostras de biodiesel adicionadas ou com curcumina ou com pirocatecol, na presença de 1% (m/m) água adicionada ou na sua ausência, encontram-se na Figura 16 para a curcumina e na Figura 17 para o pirocatecol.

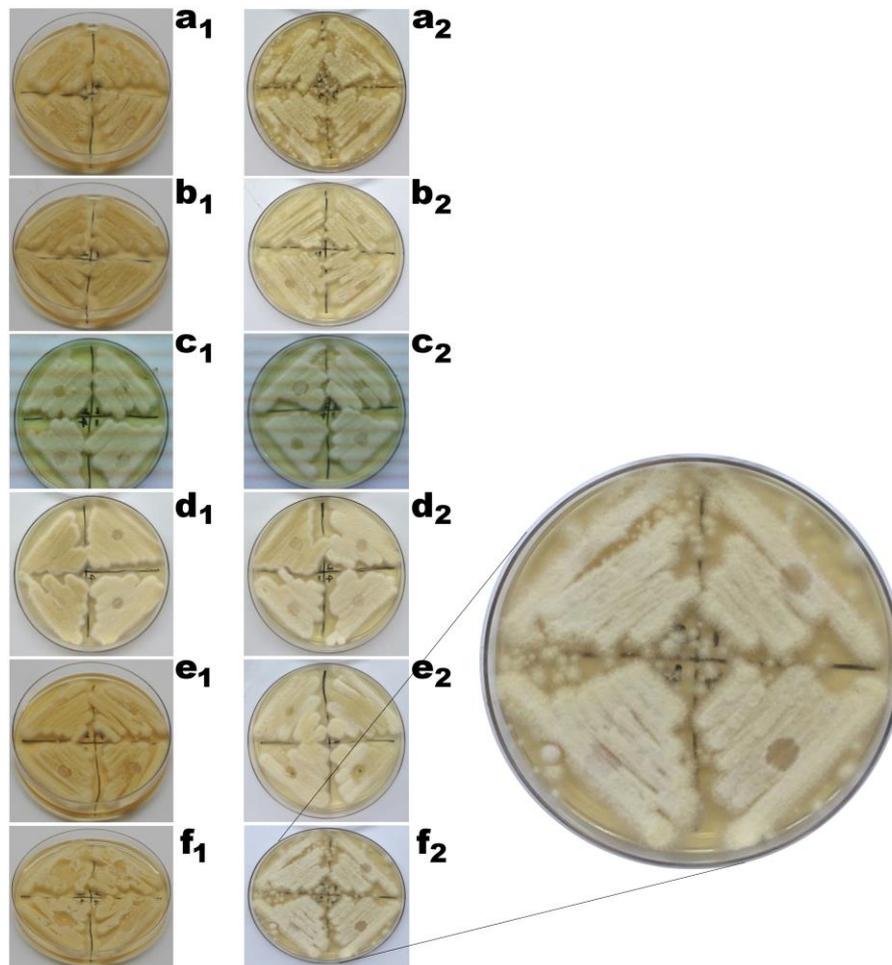
**Figura 16.** Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana de amostras de biodiesel adicionadas com quantidades variáveis de curcumina.



**Legenda:** **a1:** biodiesel de óleo residual de fritura sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; **a2:** biodiesel de óleo residual de fritura com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; **b1:** biodiesel de óleo de soja sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; **b2:** biodiesel de óleo de soja com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) curcumina; **c1:** biodiesel de óleo de semente de algodão sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) curcumina; **c2:** biodiesel de óleo de semente de algodão com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; **d1:** biodiesel de óleo de semente de gergelim sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) curcumina; **d2:** biodiesel de óleo de semente de gergelim com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) curcumina; **e1:** biodiesel de óleo de amêndoa de macaúba sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) curcumina; **e2:** biodiesel de óleo de amêndoa de macaúba com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; **f1:** biodiesel de óleo de microalgas sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina; **f2:** biodiesel de óleo de microalgas com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) curcumina; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) curcumina; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) curcumina; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) curcumina.

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 17.** Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana de amostras de biodiesel adicionadas com quantidades variáveis de pirocatecol.



**Legenda:** **a1:** biodiesel de óleo residual de fritura sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) pirocatecol; **a2:** biodiesel de óleo residual de fritura com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **b1:** biodiesel de óleo de soja sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **b2:** biodiesel de óleo de soja com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **c1:** biodiesel de óleo de semente de algodão sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **c2:** biodiesel de óleo de semente de algodão com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **d1:** biodiesel de óleo de semente de gergelim sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **d2:** biodiesel de óleo de semente de gergelim com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **e1:** biodiesel de óleo de amêndoa de macaúba sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **e2:** biodiesel de óleo de amêndoa de macaúba com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 1,0% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 1,5% (m/m) pirocatecol; **f1:** biodiesel de óleo de microalgas sem água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol; **f2:** biodiesel de óleo de microalgas com 1% (m/m) de água adicionada, quadrante superior direito, 0% (m/m) pirocatecol; quadrante superior esquerdo, 0,1% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior direito, 0,2% (m/m) pirocatecol; quadrante inferior esquerdo, 0,5% (m/m) pirocatecol.

**Fonte:** Elaboração própria.

Como pode ser observado por inspeção das Figuras 16 e 17, quando não houve adição de curcumina ou pirocatecol, o micélio cresceu e emaranhou-se acima da gotícula de biodiesel, produzindo uma “falsa” zona de inibição. Para permitir uma melhor comparação dos halos produzidos nas diferentes situações, para cada biodiesel testado os halos produzidos foram normalizados pela dimensão da zona de inibição produzida unicamente pelo biodiesel (i.e., sem qualquer adição ou de curcumina ou de pirocatecol). Uma inspeção atenta dos resultados exibidos na Quadro 3, na forma de diâmetros de halos de inibição de crescimento normalizados, permite retirar como conclusão geral que a adição combinada de 1% (m/m) de água ultrapura e uma baixa concentração mássica de curcumina (i.e., 0,2% (m/m) para o biodiesel de óleo residual de fritura, 0,5% (m/m) para o biodiesel de óleo de soja, 0,1% (m/m) para o biodiesel de óleo de semente de algodão, 0,5% (m/m) para o biodiesel de óleo de semente de gergelim, 0,2% (m/m) para o biodiesel de óleo de amêndoa de macaúba, e 0,2% (m/m) para o biodiesel de óleo de microalgas) foram aquelas variáveis processuais que promoveram a melhor inibição do crescimento microbiano (ver Quadros 3 e 4).

**Quadro 3.** Halos de inibição de crescimento normalizados, produzidos utilizando o fungo filamentososo *Paecilomyces variotii* Bainier e biodieseis de diferentes origens vegetais adicionados com percentagens mássicas variáveis de curcumina ou pirocatecol.

ORIGEM DO BODIESEL	Aditivo adicionado ao biodiesel (% <sub>v</sub> , m/m)	Halos de inibição de crescimento normalizados			
		Com curcumina / Sem água	Com curcumina / Com água	Com pirocatecol / Sem água	Com pirocatecol / Com água
Óleo residual de fritura	0	8/8 = 1,000	7/7 = 1,000	10/10 = 1,000	10/10 = 1,000
	0,1	10/8 = 1,250	10/7 = 1,429	10/10 = 1,000	10/10 = 1,000
	0,2	7/8 = 0,875	10/7 = 1,429	7/10 = 0,700	8/10 = 0,800
	0,5	8/8 = 1,000	8/7 = 1,143	8/10 = 0,800	10/10 = 1,000
	1,0	8/8 = 1,000	6/7 = 0,857	12/10 = 1,200	9/10 = 0,900
	1,5	8/8 = 1,000	7/7 = 1,000	12/10 = 1,200	5/10 = 0,500
Óleo de soja	0	10/10 = 1,000	10/10 = 1,000	9/9 = 1,000	7/7 = 1,000
	0,1	10/10 = 1,000	9/10 = 0,900	11/9 = 1,222	6/7 = 0,857
	0,2	16/10 = 1,600	7/10 = 0,700	10/9 = 1,111	8/7 = 1,143
	0,5	12/10 = 1,200	10/10 = 1,000	10/9 = 1,111	7/7 = 1,000
	1,0	8/10 = 0,800	6/10 = 0,600	10/9 = 1,111	5/7 = 0,714
	1,5	8/10 = 0,800	8/10 = 0,800	9/9 = 1,000	5/7 = 0,714
Óleo de semente de algodão	0	11/11 = 1,000	13/13 = 1,000	11/11 = 1,000	7/7 = 1,000
	0,1	9/11 = 0,818	14/13 = 1,077	10/11 = 0,909	11/7 = 1,571
	0,2	9/11 = 0,818	12/13 = 0,923	8/11 = 0,727	9/7 = 1,286
	0,5	9/11 = 0,818	10/13 = 0,769	7/11 = 0,636	8/7 = 1,143
	1,0	9/11 = 0,818	8/13 = 0,615	9/11 = 0,818	1/7 = 0,143
	1,5	11/11 = 1,000	13/13 = 1,000	10/11 = 0,909	0/7 = 0,000
Óleo de semente de gergelim	0	7/7 = 1,000	8/8 = 1,000	8/8 = 1,000	7/7 = 1,000
	0,1	8/7 = 1,143	7/8 = 0,875	7/8 = 0,875	9/7 = 1,286
	0,2	8/7 = 1,143	9/8 = 1,125	8/8 = 1,000	9/7 = 1,286
	0,5	9/7 = 1,286	10/8 = 1,250	8/8 = 1,000	9/7 = 1,286
	1,0	10/7 = 1,429	7/8 = 0,875	0/8 = 0,000	7/7 = 1,000
	1,5	11/7 = 1,571	9/8 = 1,125	7/8 = 0,875	9/7 = 1,286
Óleo de amêndoa de macaúba	0	8/8 = 1,000	10/10 = 1,000	13/13 = 1,000	11/11 = 1,000
	0,1	9/8 = 1,125	11/10 = 1,100	10/13 = 0,769	8/11 = 0,727
	0,2	11/8 = 1,375	15/10 = 1,500	10/13 = 0,769	10/11 = 0,909
	0,5	12/8 = 1,500	11/10 = 1,100	8/13 = 0,615	12/11 = 1,091
	1,0	8/8 = 1,000	10/10 = 1,000	10/13 = 0,769	7/11 = 0,636
	1,5	10/8 = 1,250	8/10 = 0,800	10/13 = 0,769	6/11 = 0,545
Óleo de microalgas	0	8/8 = 1,000	8/8 = 1,000	13/13 = 1,000	9/9 = 1,000
	0,1	12/8 = 1,500	8/8 = 1,000	12/13 = 0,923	0/9 = 0,000
	0,2	11/8 = 1,375	9/8 = 1,125	9/13 = 0,692	9/9 = 1,000
	0,5	9/8 = 1,125	9/8 = 1,125	10/13 = 0,769	8/9 = 0,889
	1,0	9/8 = 1,125	6/8 = 0,750	8/13 = 0,615	7/9 = 0,778
	1,5	8/8 = 1,000	6/8 = 0,750	8/13 = 0,615	6/9 = 0,667

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 4.** Concentrações mínimas de curcumina que produziram os maiores halos de inibição de crescimento do fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* Bainier nos diferentes biodieseis.

ORIGEM DO BIODIESEL	CONDIÇÃO EXPERIMENTAL
Óleo residual de fritura	0,2% (m/m) de curcumina, com adição de 1% (m/m) de água ultrapura
Óleo de soja	0,5% (m/m) de curcumina, com adição de 1% (m/m) de água ultrapura
Óleo de semente de algodão	0,1% (m/m) de curcumina, com adição de 1% (m/m) de água ultrapura
Óleo de semente de gergelim	0,5% (m/m) de curcumina, com adição de 1% (m/m) de água ultrapura
Óleo de amêndoa de macaúba	0,2% (m/m) de curcumina, com adição de 1% (m/m) de água ultrapura
Óleo de microalgas	0,2% (m/m) de curcumina, com adição de 1% (m/m) de água ultrapura

**Fonte:** Elaboração própria.

Devido a restrições legais, a quantidade de qualquer aditivo adicionado ao biodiesel tem de ser mantida a um mínimo. Para todos os biodieseis produzidos a partir de diferentes fontes vegetais e adicionados com 1% (m/m) de água, a curcumina e o pirocatecol produziram resultados bastante similares na prevenção do crescimento microbiano. No entanto, devido à facilidade de disponibilidade de curcumina em comparação com o pirocatecol, a primeira foi escolhida para o trabalho de pesquisa subsequente. Adicionalmente, os halos de inibição de crescimento produzidos pela curcumina foram em geral muito maiores do que aqueles promovidos pelo pirocatecol (ver Quadro 3 e Figuras 16 e 17).

## **5.2. Avaliação do potencial de atividade antioxidante da curcumina quando adicionada ao biodiesel**

O potencial efeito antioxidante da curcumina em todos os biodieseis adicionados com 1% (m/m) de água ultrapura foi também avaliado. Como pode ser observado por inspeção da Tabela 5, os tempos de indução da oxidação lipídica (médias de três determinações e desvios padrões associados) dos biodieseis adicionados com quantidades variáveis

(mínimas) de curcumina e 1% (m/m) de água (ver seção 5.1.) sofreram um aumento generalizado quando comparados com os dos seus homólogos puros (ver Tabela 5). Exceto para o biodiesel produzido a partir de óleo de soja, que sofreu uma redução de 16% no tempo de indução da oxidação lipídica após adição de curcumina, significando que este biodiesel foi mais suscetível à oxidação após a adição combinada de água e curcumina, todos os outros biodieseis provaram ser mais resistentes à oxidação, com aumentos significativos nos seus tempos de indução da oxidação lipídica (ver Quadro 5).

Adicionalmente, o biodiesel puro produzido a partir do óleo de amêndoa de macaúba provou ser muito resistente à oxidação, exibindo períodos de indução da oxidação lipídica superiores a 60 h, tornando irrelevante a adição de qualquer antioxidante. Ainda mais, a adição de curcumina a este biodiesel catapultou a indução da oxidação lipídica para mais de 140 h. Assim, este biodiesel foi descontinuado dos estudos subsequentes.

O mesmo aconteceu ao biodiesel produzido a partir de óleo de microalgas, devido à dificuldade de obtenção em grandes quantidades deste biodiesel ainda experimental. Mas para os biodieseis remanescentes (ver Quadro 5), e exceto para o biodiesel produzido a partir de óleo de soja, os tempos de indução da oxidação lipídica sofreram grandes aumentos, de cerca de 28% no caso do biodiesel produzido a partir de óleo de semente de gergelim para cerca de 41% no caso do biodiesel produzido a partir de óleo residual de fritura. Estes resultados demonstram o potencial da adição da curcumina a biodieseis na prevenção tanto da oxidação como do crescimento microbiano.

**Quadro 5.** Tempos de indução da oxidação lipídica para os vários biodieseis estudados, antes e depois da adição de curcumina na presença de água adicionada.

ORIGEM DO BODIESEL	Densidade @ 25 °C (g/mL)	Índice de refração @ 25 °C	Curcumina adicionada (% m/m)	Tempos médios (n=3) de indução da oxidação lipídica (hr ± σ)		Variação (%)
				Biodiesel puro	Biodiesel adicionado com curcumina e 1% (m/m) de água ultrapura	
Óleo residual de fritura	0,8669	1,4572	0,2	7,12 ± 0,02	10,01 ± 0,21	+ 40,59
Óleo de soja	0,8681	1,4561	0,5	6,01 ± 0,20	5,03 ± 0,85	- 16,31
Óleo de semente de algodão	0,8714	1,4531	0,1	3,06 ± 0,06	4,10 ± 0,04	+ 33,99
Óleo de semente de gergelim	0,8692	1,4522	0,5	8,70 ± 0,12	11,13 ± 0,12	+ 27,93
Óleo de amêndoa de macaúba	0,8666	1,4351	0,2	60,84 ± 5,40	141,26 ± 2,18	+ 132,18
Óleo de microalgas	0,8609	1,4509	0,2	7,58 ± 0,07	8,79 ± 0,52	+ 15,96

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3. Avaliação da manutenção da estabilidade oxidativa e antimicrobiana dos biodieseis ao longo do período de armazenamento

Indubitavelmente, os maiores problemas enfrentados pelo biodiesel estão relacionados com a sua estabilidade. Para além da exposição ao ar, luz solar, altas temperaturas e mesmo a presença de metais, os fatores mais significativos para a degradação dos biodieseis (com uma quebra significativa na qualidade) incluem a presença de microrganismos (contaminantes) (DODOS *et al.*, 2012; PASSMAN, 2013; BORSATO *et al.*, 2014). A segunda parte deste trabalho de pesquisa almejou estudar os efeitos da adição ao

biodiesel do aditivo natural selecionado (curcumina) na sua estabilidade oxidativa, ao mesmo tempo que confere ao biodiesel características de ambiente hostil para prevenir o crescimento microbiano. Assim, a segunda parte deste trabalho de pesquisa almejou seguir ao longo de um período de tempo de armazenamento relativamente longo, o efeito da adição de curcumina na manutenção das propriedades e qualidade do biodiesel. Em primeiro lugar, os biodieseis recém-preparados foram examinados quanto à presença de carga microbiana, mas todos produziram resultados negativos, o que está claramente de acordo com as condições processuais que levam à sua produção (DODOS *et al.*, 2012).

### 5.3.1. Avaliação da manutenção da estabilidade oxidativa dos biodieseis adicionados com curcumina

Os tempos de indução da oxidação lipídica dos vários biodieseis estudados, antes e depois da adição de curcumina e 1% (m/m) de água ultrapura, e ao longo de um período de armazenamento de seis meses na presença de água, podem ser encontrados no Quadro 6 e na Figura 18 como valores médios de três replicatas e desvios padrões associados.

Como pode ser visto na Figura 18 e por observação dos resultados do Quadro 6, os tempos de indução da oxidação lipídica dos biodieseis adicionados com curcumina na presença de 1% (m/m) de água sofreram um aumento generalizado imediatamente após a adição de curcumina, exceto no caso do biodiesel produzido a partir de óleo de soja, que sofreu uma redução de 16% no tempo de indução da oxidação lipídica, significando que este biodiesel foi mais suscetível à oxidação após a adição combinada de água e curcumina.

No entanto, após o primeiro mês de armazenamento a 25 °C, o biodiesel produzido a partir de óleo de soja manteve-se relativamente estável do ponto de vista da oxidação (ver Figura 18). Exceto para o biodiesel produzido a partir de óleo residual de fritura (ver Figura 18), no qual se verificou uma marcada diminuição na estabilidade oxidativa ao longo de todo o período de armazenamento, todos os outros biodieseis provaram ser mais resistentes à oxidação após a adição de curcumina, exibindo apenas ligeiros decréscimos ao longo do tempo nos seus tempos de indução da oxidação lipídica (ver Quadro 6 e Figura 18). O biodiesel produzido a partir de óleo de semente de gergelim exibiu uma elevada estabilidade oxidativa, que se manteve ao longo de todo o período de armazenamento. Estes resultados demonstram que o potencial da adição de curcumina aos biodieseis na manutenção (e, em alguns casos, no aumento) da sua estabilidade oxidativa é promissor.

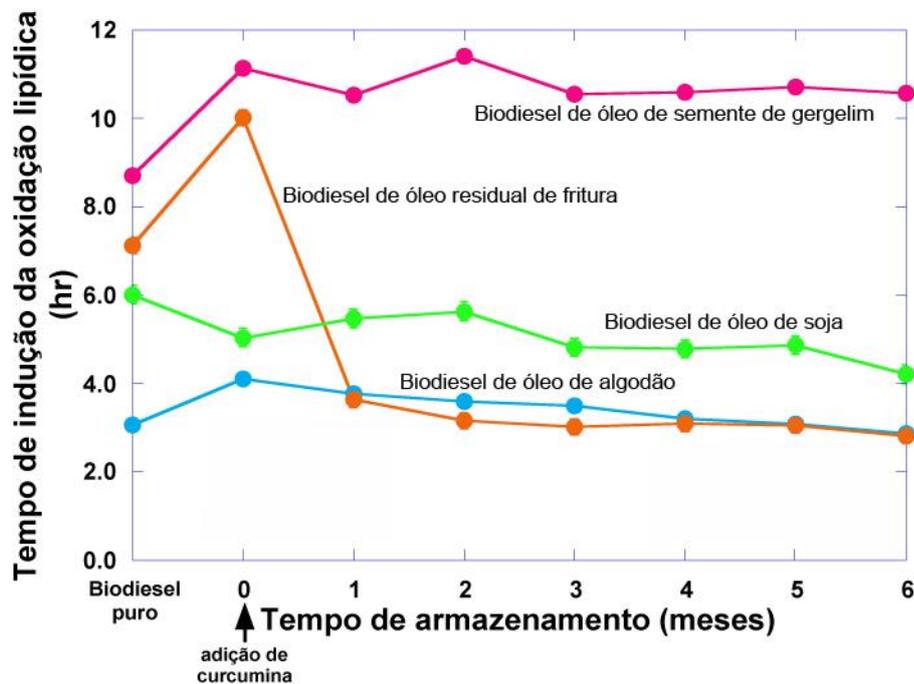
**Quadro 6.** Tempos de indução da oxidação lipídica, índice de refração e número de Unidades Formadoras de Colônias dos vários biodieseis estudados, antes e depois da adição de curcumina na presença de água, ao longo de um período de armazenamento de seis meses.

ORIGEM DO BODIESEL	CC (% m/m)	$\rho$ @ 25 °C (g/mL)	Parâmetro avaliado	Óleo puro / Biodiesel puro	Biodiesel adicionado com curcumina e (1%, m/m) de água ultrapura, e inoculado com o fungo filamentosso <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier						
					Tempo de armazenamento @ 25 °C (meses)						
					0	1	2	3	4	5	6
Óleo residual de fritura	0,2	0,8669	Tempo de indução médio (n=3) da oxidação lipídica (hr $\pm$ $\sigma$ )	7,12 $\pm$ 0,02	10,01 $\pm$ 0,21	3,63 $\pm$ 0,80	3,15 $\pm$ 0,07	3,01 $\pm$ 0,02	3,09 $\pm$ 0,01	3,05 $\pm$ 0,10	2,81 $\pm$ 0,03
			Índice de refração @ 25 °C	1,4800 / 1,4572	1,4531	1,4553	1,4536	1,4571	1,4522	1,4575	1,4571
			Número de UFC's após incubação @ 25 °C	0	0	0	0	0	0	0	
Óleo de soja	0,5	0,8681	Tempo de indução médio (n=3) da oxidação lipídica (hr $\pm$ $\sigma$ )	6,01 $\pm$ 0,20	5,03 $\pm$ 0,85	5,47 $\pm$ 0,03	5,63 $\pm$ 0,15	4,81 $\pm$ 0,03	4,78 $\pm$ 0,07	4,86 $\pm$ 0,08	4,20 $\pm$ 0,25
			Índice de refração @ 25 °C	1,4743 / 1,4561	1,4553	1,4552	1,4557	1,4576	1,4555	1,4579	1,4576
			Número de UFC's após incubação @ 25 °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Óleo de semente de algodão	0,1	0,8714	Tempo de indução médio (n=3) da oxidação lipídica (hr $\pm$ $\sigma$ )	3,06 $\pm$ 0,06	4,10 $\pm$ 0,04	3,76 $\pm$ 0,16	3,59 $\pm$ 0,02	3,49 $\pm$ 0,07	3,20 $\pm$ 0,04	3,08 $\pm$ 0,02	2,86 $\pm$ 0,08
			Índice de refração @ 25 °C	1,4620 / 1,4531	1,4530	1,4540	1,4523	1,4547	1,4558	1,4557	1,4555
			Número de UFC's após incubação @ 25 °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Óleo de semente de gergelim	0,5	0,8692	Tempo de indução médio (n=3) da oxidação lipídica (hr $\pm$ $\sigma$ )	8,70 $\pm$ 0,12	11,13 $\pm$ 0,12	10,52 $\pm$ 0,12	11,40 $\pm$ 0,25	10,54 $\pm$ 0,10	10,59 $\pm$ 0,05	10,71 $\pm$ 0,04	10,57 $\pm$ 0,15
			Índice de refração @ 25 °C	1,4740 / 1,4522	1,4528	1,4518	1,4532	1,4543	1,4538	1,4546	1,4545
			Número de UFC's após incubação @ 25 °C	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nota:** CC = Curcumina;  $\rho$  = densidade; UFCs = Unidades Formadoras de Colônias

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 18.** Evolução ao longo do tempo de armazenamento (25 °C) da estabilidade oxidativa dos vários biodieseis produzidos, após adição de 1% (m/m) de água ultrapura e percentagens mássicas variáveis de curcumina, e inoculação com o fungo filamentosso ubíquo *Paecilomyces variotii* Bainier.

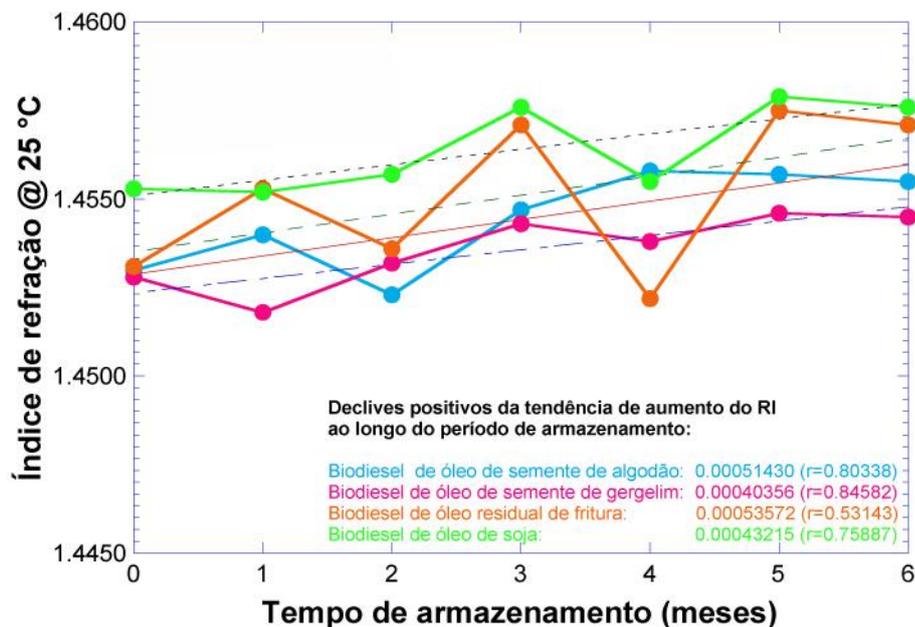


Fonte: Elaboração própria.

No entanto, apenas o biodiesel produzido a partir de óleo de semente de gergelim exibiu um período de indução da oxidação lipídica acima do mínimo de 8 h preconizado pela ANP, ao longo de todo o período de armazenamento. Todos os outros biodieseis se mantiveram relativamente estáveis do ponto de vista da oxidação lipídica, porém exibindo tempos de indução da oxidação lipídica abaixo do valor mínimo preconizado pela ANP.

Os resultados obtidos para a evolução do índice de refração (IR) dos vários biodieseis ao longo do período de armazenamento encontram-se exibidos no Quadro 6 e graficamente na Figura 19. Como pode ser observado por inspeção desta figura existiu uma tendência de aumento generalizado (ainda que ligeira) do índice de refração de todos os biodieseis adicionados com curcumina e 1% (m/m) de água, ao longo do período de armazenamento. Esta tendência foi confirmada através de ajustes lineares aos dados de índices de refração de cada biodiesel, produzindo declives positivos, isto é,  $5,1 \times 10^{-4}$  para o biodiesel produzido a partir de óleo de semente de algodão,  $4,0 \times 10^{-4}$  para o biodiesel produzido a partir de óleo de semente de gergelim,  $5,4 \times 10^{-4}$  para o biodiesel produzido a partir de óleo residual de fritura, e  $4,3 \times 10^{-4}$  para o biodiesel produzido a partir de óleo de soja (ver Figura 19).

**Figura 19.** Evolução ao longo do tempo de armazenamento (25 °C) do índice de refração dos vários biodieseis produzidos, após adição de 1% (m/m) de água ultrapura e percentagens mássicas variáveis de curcumina, e inoculação com o fungo filamentosso ubíquo *Paecilomyces variotii* Bainier.



Fonte: Elaboração própria.

O índice de refração é uma propriedade física que é sensível aos efeitos da oxidação dos ácidos graxos, e está relacionada com a permissividade dielétrica de um material, com materiais com elevados índices de refração a serem considerados meios altamente dispersivos (tais como óleos vegetais puros) em comparação com materiais com índices de refração mais baixos (tais como biodieseis) (SADROLHOSSEINI *et al.*, 2011; WAZILEWSKI *et al.*, 2013). Em geral, o índice de refração de um óleo vegetal reduz-se tremendamente após o processo de transesterificação que conduz ao biodiesel, indicando que moléculas mais pesadas/complexas foram convertidas em moléculas mais leves/simples, permitindo a detecção da interface, melhorando a lubricidade e aumentando a funcionalidade do combustível (ALIYU; NWAEDOZIE; ADAMS, 2013). E isto foi na verdade observado no trabalho de pesquisa aqui descrito, isto é, o índice de refração foi reduzido de 1,4743 (óleo de soja, puro) para 1,4561 (biodiesel produzido a partir de óleo de soja, ver Tabela 6), de 1,4620 (óleo de semente de algodão, puro) para 1,4531 (biodiesel produzido a partir de óleo de semente de algodão, ver Tabela 6), de 1,4740 (óleo de semente de gergelim, puro) para 1,4522 (biodiesel produzido a partir de óleo de semente de gergelim, ver Tabela 6), e de 1,4800 (óleo residual de fritura, puro) para 1,4572 (biodiesel produzido a partir de óleo residual de fritura, ver Tabela 6). Os resultados obtidos estão, portanto, em clara

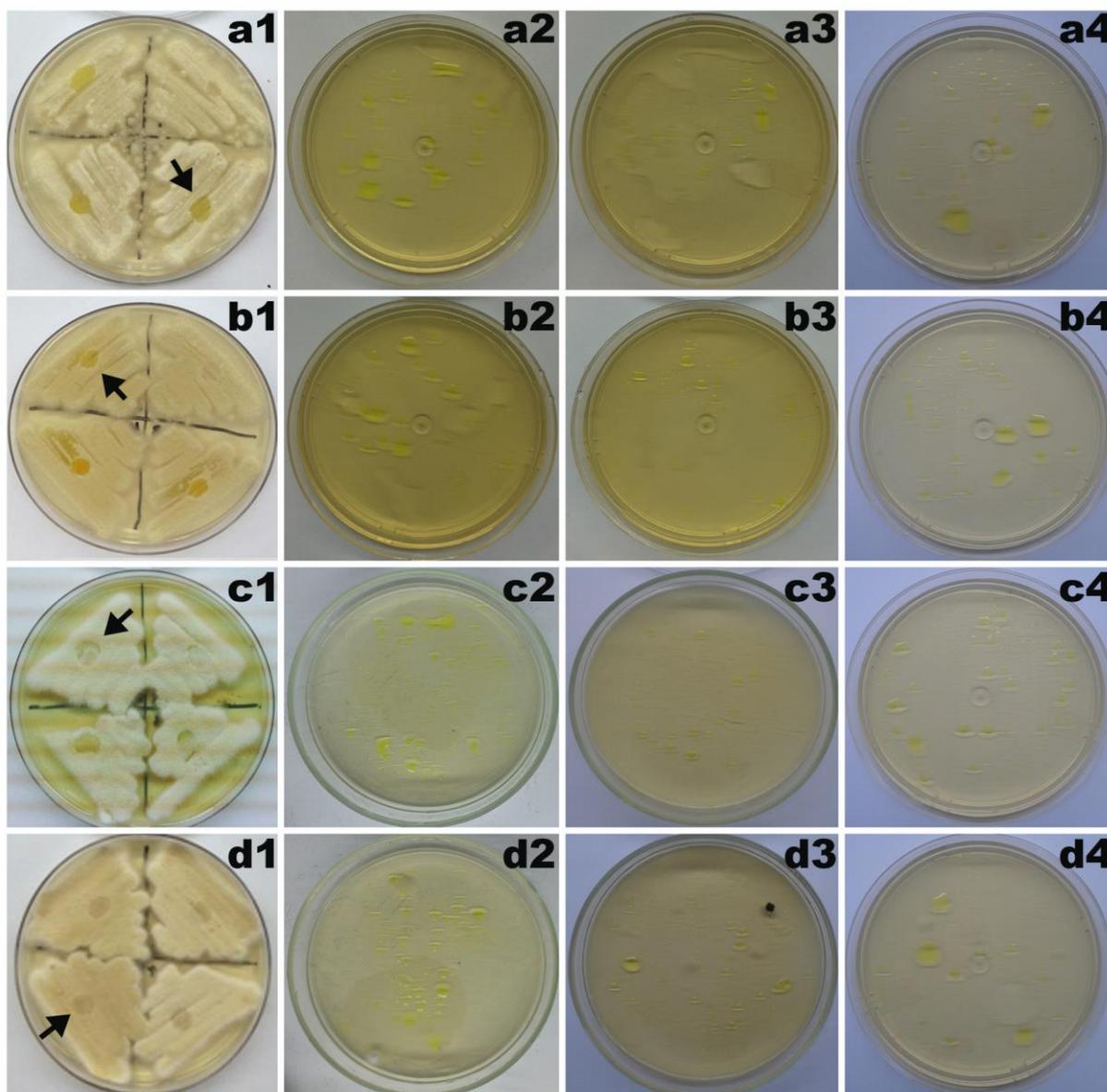
concordância com o que se encontra descrito na literatura da especialidade. No entanto, a ligeira/marginal tendência de aumento do índice de refração durante o armazenamento dos vários biodieseis reflete a manutenção das suas propriedades físicas, o que é confirmado pela estabilidade oxidativa atingida após a adição de curcumina a todos os biocombustíveis, em clara concordância com resultados publicados por Botella e colaboradores (BOTELLA *et al.*, 2014).

### 5.3.2. Avaliação da manutenção das propriedades antimicrobianas dos biodieseis adicionados com curcumina

Os biodieseis adicionados com curcumina mantiveram um ambiente hostil que impediu o crescimento microbiano, o que foi confirmado através da pesquisa microbiológica para a presença de células microbianas viáveis ao longo de todo o período de armazenamento. Todos os biodieseis produziram resultados negativos quanto à presença de quaisquer células microbianas viáveis, como pode ser observado por inspeção da Tabela 6. A adição de água ao biodiesel, acoplada às fontes de carbono prevalentes em tais meios, deveria permitir o florescimento de microrganismos ubíquos tais como o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* Bainier, um agente contaminante comum em combustíveis diesel de acordo com PASSMAN (2013). No entanto, a adição de curcumina aos vários biodieseis provou ser eficaz impedindo completamente o crescimento microbiano durante todo o período de armazenamento estudado, o que foi efetivamente comprovado no presente trabalho de pesquisa.

A Figura 20 abaixo ilustra a ação comprovada da curcumina nas mínimas concentrações produtoras de efeito fungistático para os diferentes biodieseis (ver Tabelas 4 e 6), no início, no meio e no final do período de armazenamento estudado.

**Figura 20.** Demonstração da capacidade fungistática da curcumina nos biodiesel de óleo residual de fritura (a), de óleo de soja (b), de óleo de semente de algodão (c) e de óleo de semente de gergelim (d). (Legenda: **a1,b1,c1,d1** - halo de inibição de crescimento produzido pela concentração mínima ótima de curcumina na presença de 1% (m/m) de água ultrapura, indicado pela seta); **a2,b2,c2,d2** - resultado da pesquisa de células viáveis de fungo filamentososo em agar sólido Sabouraud Dextrose no início do período de armazenamento; **a3,b3,c3,d3** - resultado da pesquisa de células viáveis de fungo filamentososo em agar sólido Sabouraud Dextrose no final do terceiro mês de armazenamento; **a4,b4,c4,d4** - resultado da pesquisa de células viáveis de fungo filamentososo em agar sólido Sabouraud Dextrose no final do sexto mês de armazenamento.)



Segundo NEGRONI (2009), atividade microbicida de um composto significa a morte de microrganismos por ele causada enquanto atividade microbiostática significa a inibição de

seu desenvolvimento. Considerando esta afirmação, pelos resultados obtidos neste trabalho de pesquisa pode afirmar-se que a curcumina apresenta atividade microbiostática nos diferentes biodieseis, dado que durante a etapa de *screening* a aplicação de biodiesel com curcumina e água sobre meio inoculado por espalhamento com o fungo não impediu o seu crescimento, enquanto a inibição do desenvolvimento do fungo filamentososo durante o período de armazenamento se deveu ao fato de que os biodieseis foram adicionados com água (aumentando a atividade de água do meio e propiciando condições favoráveis à proliferação do fungo) e curcumina.

## 6. CONCLUSÕES

Um dos maiores problemas enfrentados pelo biodiesel diz respeito à alteração da sua estabilidade, tanto oxidativa como microbiana, por armazenamento em condições inadequadas e/ou contaminadas adventiciamente.

Pela análise dos resultados alcançados no trabalho de pesquisa desenvolvido, pode concluir-se que as substâncias naturais (curcumina e pirocatecol) adicionadas aos vários biodieseis produzidos a partir de diferentes fontes vegetais apresentaram características fungistáticas tendo sido capazes de impedir o crescimento do microrganismo ubíquo selecionado para o trabalho de pesquisa. No entanto, das duas substâncias naturais testadas, a curcumina foi selecionada para trabalhos de pesquisa posteriores devido não apenas à facilidade da sua aquisição mas também à sua maior atividade fungistática.

Adicionalmente, a curcumina foi capaz de aumentar substancialmente os tempos de indução da oxidação lipídica de todos os biodieseis testados. Assim, a curcumina revelou-se uma boa promessa para uso como aditivo em baixas concentrações mássicas para ser usada no controle da qualidade de biodieseis produzidos a partir de diferentes fontes vegetais, tanto do ponto de vista antimicrobiano como antioxidante.

Todos os biodieseis sofreram alterações mínimas nos seus índices de refração ao longo do período de armazenamento, tendo sido observada uma suave tendência de aumento no quarto algarismo significativo dos valores dos índices de refração, o que permite afirmar que as características iniciais dos vários biodieseis se mantiveram preservadas após a adição de curcumina e água.

Os ensaios de atividade antimicrobiana realizados aos vários biodieseis aditivados com curcumina revelaram a manutenção de ambientes hostis para fungos filamentosos contaminantes de distribuição ubíqua, como é o caso do *Paecilomyces variotii* Bainier. Adicionalmente, a curcumina foi capaz de providenciar estabilidade oxidativa a todos os biodieseis, à exceção daquele produzido a partir de óleo residual de fritura, o qual sofreu um decréscimo substancial na sua estabilidade oxidativa após apenas o mês de armazenamento à temperatura ambiente (25 °C) e na presença de condições de hidratação. No entanto, a manutenção generalizada da estabilidade oxidativa dos vários biodieseis foi suportada pela tendência observada nos seus tempos de indução da oxidação lipídica. Assim, pode concluir-se que a curcumina é um aditivo natural com propriedades antioxidante e antimicrobiana, promissor para uso em baixas concentrações mássicas, que permite que biodieseis produzidos a partir de diferentes fontes vegetais mantenham a sua

qualidade mesmo durante períodos prolongados de armazenamento à temperatura ambiente normal.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. **Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies**. *Anticancer res*, v. 23, n. 1A, p. 363-398, 2003.

AGGARWAL, B. B. **Prostate cancer and curcumin: add spice to your life**. *Cancer biology & therapy*. v. 7, n. 9, p. 1436-1440, 2008.

AGUIAR, R. T. **Caracterização física, química e microbiológica do diesel, biodiesel e suas misturas durante a logística de distribuição**. Universidade Federal da Paraíba. Programa de Pós-graduação em Química. João Pessoa. Dissertação de Mestrado. 2013.

ALIYU, A. O.; NWAEDOZIE, J. M.; ADAMS, Ahmed. **Quality Parameters of Biodiesel Produced from Locally Sourced Moringa oleifera and Citrullus colocynthis L. Seeds Found in Kaduna, Nigeria**. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*. v. 3, p. 377-390, 2013.

ANP – Agência Nacional do Petróleo [Brazilian National Petroleum Agency]. ANP Resolution 42/2004. Available at [www.anp.gov.br/petro/legis\\_qualidade.asp](http://www.anp.gov.br/petro/legis_qualidade.asp). 2004.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis [*Brazilian National Petroleum Agency*]. **ANP Resolution 9/2015**. Disponível em [www.anp.gov.br/petro/legis\\_qualidade.asp](http://www.anp.gov.br/petro/legis_qualidade.asp), 2015, Acesso em 21/04/2015.

ARICETTI, J. A. **Metodos titulométricos alternativos para a avaliação da qualidade do biodiesel**. Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de Mestrado ligado ao Departamento de Química e Analítica. Instituto de química da UNICAMP 2010.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). ASTM E519:. Standard test method for diagonal tension (shear) in masonry assemblages. 2007.

BACOVSKY, D.; KORBITZ, W.; MITTELBACH, M.; WORGETTER, M. **Biodiesel Production: Technologies and European Providers**. IEA task. v.39, p: 104, 2007.

BACHMEIER, B. E; MOHRENZ, I. V; MIRISOLA, V.; SCHLEICHER, E.; ROMEO, F.; HÖHNEKE, C.; JOCHUM, M.; NERLICH, A. G.; PFEFFER, U. **Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and-2 in breast cancer cells via NFκB**. Carcinogenesis, v. 29, n. 4, p. 779-789, 2008.

BAJPAI, D.; TYAGI, V. K. **Biodiesel: source, production, composition, properties and its benefits**. Journal of Oleo Science, v. 55, n. 10, p. 487-502, 2006.

BALCÃO, V. M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MALCATA, F. X.; GUISÁN, J. M. **Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multi-subunit immobilization onto highly activated supports**, Biotechnology Progress. v.17, n. 3, p. 537-542, 2001.

BALCÃO, V. M.; OLIVEIRA, T. A.; MALCATA, F. X. **Stability of a commercial lipase from *Mucor javanicus*: kinetic modelling of pH and temperature dependencies**. Biocatalysis and Biotransformation. v. 16, n. 1, p. 45-66, 1998.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. **Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues**. Enzyme and Microbial Technology, v. 22, n. 6, p. 511-519, 1998.

BALCÃO, V. M.; KEMPPINEN, A.; MALCATA, F. X.; KALO, P. **Lipase-catalyzed acidolysis of butterfat with oleic acid: characterization of process and product**. Enzyme and microbial technology, v. 23, n. 1, p. 118-128, 1998a.

BALCÃO, V. M.; KEMPPINEN, A.; MALCATA, F. X.; KALO, P. **Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: process and product characterization**. Journal of the American Oil Chemists' Society. v. 75, n. 10, p. 1347-1358, 1998b.

BARROS, R. M.; EXTREMINA, C. I.; GONÇALVES, I. C.; BRAGA, B. O.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. **Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by Cardosin A immobilized on highly activated supports.** Enzyme and Microbial Technology v. 33, n. 7, p. 908-916, 2003.

BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; VERONESE, S.; SALA, M. **Storage stability of biodiesel.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 72, n. 6, p. 699-702, 1995.

BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; DELLA BELLA, L. TAGLIABEU, S.; TOSO, G. **Biodiesel stability under commercial storage conditions over one year.** European Journal of Lipid Science and Technology, v. 105, n. 12, p. 735-741, 2003.

BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; DELLA BELLA, L.; TAGLIABUE, S.; LACOSTE, F.; LAGARDÈRE, L. **The prediction of biodiesel storage stability. Proposal for a quick test.** European journal of lipid science and technology, v. 106, n. 12, p. 822-830, 2004.

BORSATO, D.; MAIA, E. C. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; DA SILVA, H. C.; PEREIRA, J. L. **Cinética da oxidação de biodiesel de óleo de soja em mistura com TBHQ: determinação do tempo de estocagem.** Química Nova. v. 35, n. 4, p. 733-737, 2012.

BORSATO, D.; CINI, J. R. M.; DA SILVA, H. C.; COPPO, R. L.; ANGILELLI, K. G.; MOREIRA, I.; MAIA, E. C. R. **Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy.** Fuel Processing Technology. v. 127. p. 111–116, 2014.

BOTELLA, L.; BIMBELA, F.; MARTÍN, L.; ARAUZO, J.; SÁNCHEZ, J. L. **Oxidation stability of biodiesel fuels and blends using the Rancimat and PetroOXY methods. Effect of 4-allyl-2, 6-dimethoxyphenol and catechol as biodiesel additives on oxidation stability.** Frontiers in chemistry, v. 2, 2014.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **Production of biodiesel from bioethanol and Brassica carinata oil: oxidation stability study**. Bioresource Technology. v. 100. e. 7. p. 2234-2239, 2009.

BÜCKER, F. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas**. Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação de mestrado, 2009.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. **Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids**. Transactions-American Society of Agricultural Engineers, v. 44, n. 6, p. 1429-1436, 2001.

CASTRO, A. G. **Estudo da influência da curcumina na estabilidade oxidativa de biodieseis e óleos vegetais**. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado. 2013.

CHASSAGNEZ, A. L. M.; CORRÊA, N. F.; MEIRELES, M. A. A. **Extração de oleoresina de cúrcuma (curcuma longa L) com CO<sub>2</sub> supercrítico**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.17, e. 4, p. 399-404.1997.

CLSI **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement: CLSI document M100-S21**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institutue, 2011.

CUI, J.; YU, Z.; ZHAO, Y.; ZHU, W.; LI, H.; LOU, H.; ZHAI, G. **Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems**. International Journal of Pharmaceutics, v. 371, n. 1, p. 148-155, 2009.

DANTAS, M. B.; ALBUQUERQUE, A. R.; BARROS, A. K.; RODRIGUES FILHO, M. G.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SINFRÔNIO, F. S. M.; ROSENHAIM, R.; SOLEDADE, L. E. B.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA A. G. **Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel**. Fuel, v. 90, n. 2, p. 773-778, 2011.

DE FELIPPE JUNIOR, J. Curcumina e Câncer: antiproliferativo, antiapoptótico, antiangiogênico e antimetastático. 2008. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br/farmacologia/artigos/3893/curcumina-e-cancer-antiproliferativo-antiapoptotico-antiangiogenico-e-antimet>> [acesso em 05 de Setembro de 2015].

DE PAIVA MENEZES, C. G.; FIDALGO, J. L. G.; SILVA, T. D. **Produção de biodiesel a partir de óleos residuais de fritura: sustentabilidade e maior demanda energética.** Bolsista de Valor, v. 1, n. 1, p. 279-284, 2010.

DERMIBAS, A. **Relationships derived from physical properties of vegetable oil and biodiesel fuels.** Fuel. v. 87. e. 8-9. p. 1743-1748, 2008.

DINKOV, R.; HRISTOV, G.; STRATIEV, D.; ALDAYRI, V. B.; **Effect of commercially available antioxidants over biodiesel/diesel blends stability.** Fuel . v. 88, e. 4, p. 732-737, 2008.

DODOS, G. S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S.; ZANNIKOS, F. **Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels.** Global NEST Journal. v.14, e. 2, p. 175-182, 2012.

DOU (Diário Oficial da União); nº 185, seção 1, de 25 de Setembro de 2014, ISSN: 1677-7042, 2014. Disponível em: <[http://bibliotecadigital.mpf.mp.br/bdmpf/bitstream/handle/123456789/56621/DOU1\\_2014\\_09\\_25.pdf?sequence=1](http://bibliotecadigital.mpf.mp.br/bdmpf/bitstream/handle/123456789/56621/DOU1_2014_09_25.pdf?sequence=1)>, [acesso em 05 de Setembro de 2015].

DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D. **Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 79, n. 3, p. 331-337, 2008.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. **Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol.** Energy & fuels. v. 16, n. 2, p. 443-450, 2002.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN). **Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME), Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test).** European Committee for Standards (CEN), Belgium, 2003.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S., SCABIO, A. **Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia.** Química nova. V. 28, e. 1, p. 19-23, 2005.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. **Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes.** Química Nova. v. 32, e. 1, 2009.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. **A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification.** Biotechnology and Bioengineering. v. 102, e. 5, p. 1298-1315, 2009.

GARDNER, R.; KAZI, S.; ELLIS, E. M. **Detoxication of the environmental pollutant acrolein by a rat liver aldo-keto reductase.** Toxicology letters. v. 148, n. 1, p. 65-72, 2004.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. **Biodiesel de soja – reação de transterificação para as aulas práticas de química orgânica.** Química Nova. v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GOLDANI, E. B. L. A. B.; FRANKENBERG, C. L. C.; CANTELLI, M. **Tratamento físico-químico dos efluentes líquidos provenientes da purificação do biodiesel,** 2008.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. **Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.

HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**, Brasília: Câmara dos Deputados, **Coordenação de Publicações**. Série Cadernos de altos estudos, n. 1, 2004. Disponível em: <[www.camara.gov.br/caeat](http://www.camara.gov.br/caeat)>

JEONG, G. T.; PARK, D. H. **Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol**. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press. p. 649-657, 2008.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do biodiesel**., 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KNOTHE, G. **Some aspects of biodiesel oxidative stability**. *Fuel Processing Technology*, v. 88, n. 7, p. 669-677, 2007.

LAMAS, E. M.; BARROS, R. M.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. **Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, n. 7, p. 642-652, 2001.

LEUNG, D. Y. C.; GUO, Y. **Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production**. *Fuel Processing Technology*, v. 87, n. 10, p. 883-890, 2006.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. **A review on biodiesel production using catalyzed transesterification**. *Applied Energy*. v. 87, n. 4, p.1083-1095, 2010.

LIMA, D. O.; SOGABE, V. P.; CALARGE, T. C. C. **Uma análise sobre o mercado mundial do biodiesel**. In: 46th Congress, July 20-23, Rio Branco, Acre, Brasil. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), 2008.

LIN, S. S. Fats and oils oxidation. In: Wan, O. J. (Ed.). **Introduction to fats and oils technology**. Champaign: AOCS. ch.12, p. 211-231, 1991.

LIRA, L. F. B.; ALBUQUERQUE, M. S.; PACHECO, J. G. A.; FONSECA, T. M.; CAVALCANTI, E. H. S.; STRAGEVITCH, L. **Infrared spectroscopy and multivariate calibration to monitor stability quality parameters of biodiesel**. Microchemical Journal. v. 96, n. 1, p. 126-131, 2010.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G.; **Synthesis of biodiesel via acid catalysis**. Industrial & engineering chemistry research, v. 44, n. 14, p. 5353-5363, 2005.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. **Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats**. International journal of pharmaceutics, v. 330, n. 1, p. 155-163, 2007.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. **Techno-economic study of diferente alternatives for biodiesel production**. Fuel Processing Technology. v.89, n. 8, p 740-748, 2008.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. **Critical review on analytical methods for biodiesel characterization**. Talanta. v. 77. n. 2. p. 593-605, 2008.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. **The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions**. Biomass & Bioenergy, v. 20, n.4, p.317-325, 2001.

MOSER, B. R. **Biodiesel production, properties, and feedstocks**. In: Biofuels. Springer New York. p. 285-347, 2011.

MUKERJEE, A.; VISHWANATHA, J. K. **Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy**. Anticancer research, v. 29, n. 10, p. 3867-3875, 2009.

NARASIMHARAO, K.; LEE, A.; WILSON, K. **Catalysts in production of biodiesel: A review.** Journal of Biobased Materials and Bioenergy. v.1, n.1, p. 19-30, 2007.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P.R.; MAZZUCO, L. M. **Biotransformação de óleos e gorduras: utilização de lipases para obtenção de biocombustível.** Revista Biotecnologia de Ciência & Desenvolvimento, v.19, p. 28-31, 2001.

NEGRONI, M. **Microbiologia estomatológica: fundamentos y guía práctica.** 2ª edição. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009.

NIGAM, S.; MEHROTRA, S.; VANI, B.; MEHROTRA, R. **Lipase Immobilization Techniques for Biodiesel Production: An Overview.** International Journal of Renewable Energy & Biofuels, Vol. 2014, 2014.

NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.; MEDIKONDURU, V. **A continuous process for the conversion of vegetable oils into methyl esters of fatty acids,** Journal of the American Oil Chemists's Society. v. 75, n. 12, p. 1775-1783, 1998.

ONOUE, S.; TAKAHASHI, H.; KAWABATA, Y.; SETO, Y.; HATANAKA, J.; TIMMERMANN, B.; YAMADA, S. **Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability.** Journal of pharmaceutical sciences, v. 99, n. 4, p. 1871-1881, 2010.

PASSMAN, F. J. **Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980: a review.** International Biodeterioration & Biodegradation v. 81, p. 88-104, 2013.

PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C. C.; NUNAN, E. A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. **Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da Curcuma longa L.** Ciências e Agrotecnologia. v. 32, n. 3, p. 875-881, 2008.

PÉRET-ALMEIDA, L.; CHERUBINO, A. P. F.; ALVES, R. J.; GLÓRIA. M. B. A. **Separation and determination of the physico- chemical characteristics of curcumin, demethoxy curcumin and bisdemethoxycurcumin**, Food Research International, v. 38, n. 8, p. 1039-1044, 2005.

PETROBRAS, **Manual Técnico Diesel S-10**, versão 1.3, Assistência Técnica, pp. 1-17, Agosto, disponível em [http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/public/downloads/manual\\_tecnico\\_diesel-10\\_assistencia\\_tecnica\\_petrobras.pdf](http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/public/downloads/manual_tecnico_diesel-10_assistencia_tecnica_petrobras.pdf), 2014.

PETROBRAS, **Manual Técnico Diesel S-10**, Assistência Técnica, pp. 1-14 Agosto, disponível em <http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/bbf8ea004de4797c8e8adf73cb9b3dc7/manual-tecnico-diesel-s-10.pdf?MOD=AJPERES>, 2012.

PISANO, M.; PAGNAN, G.; LOI, M.; MURA, M. E.; TILOCCA, M. G.; PALMIERI, G.; FABBRI, D.; DETTORI, M. A.; Delogu, G.; PONZONI, M.; ROZZO, C. **Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells**. Molecular cancer, v. 6, n. 1, p. 8, 2007.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRIGUES, L.; PÉREZ, Á. **Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties**. Bioresource Technology. v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. **Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral**. Química Nova. v. 30, e. 5, p. 1374-1380, 2007.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZALES-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L; MOLINA-GRIMA, E. **Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production** Biotechnology advances. v. 27: n.4, p. 398-408, 2009.

SADROLHOSSEINI, A. R.; MOKSIN, M. M.; YUNUS, W. M. M.; TALIB, Z. A.; ABDI, M. M. **Surface plasmon resonance detection of copper corrosion in biodiesel using polypyrrole-chitosan layer sensor**, *Optical Review*, v. 18, n. 4, p. 331-337, 2011.

SANTOS, A. P. B.; PINTO, A. C. **Biodiesel: Uma Alternativa de Combustível Limpo**, *Química Nova na Escola*, v. 31, n. 1, p.58-62, 2009.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R; VARGAS, R. M. **Transesterification of vegetable oils: a review**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; RAVI KUMAR, M. N. V. **Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 3, p. 223-230, 2009.

SHUKLA, Y.; ARORA, A. **Suppression of altered hepatic foci development by curcumin in wistar rats**. *Nutrition and cancer*, v. 45, n. 1, p. 53-59, 2003.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. **Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante**. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

DA SILVA, W. L. G.; SOUZA, P. T.; SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M. **Separation of the Glycerol-Biodiesel Phases in an Ethyl Transesterification Synthetic Route Using Water**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 9, p. 1745-1750, 2015.

SILVA, R. C.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; BALCÃO, V. M.; DE ALMEIDA, D. B.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A. **The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil**, *LWT-Food Science and Technology*, v. 42, n. 7, p. 1275-1282, 2009.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes**, Revista de Nutrição.v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SRIRANGSAN, A.; ONGWANDEE, M.; CHAVALPARIT, O.; **Treatment of biodiesel wastewater by electrocoagulation process**. In: Actas de Proceedings of the International Symposium on Environmental Management: Hazardous-Environmental Management Toward Sustainability. p. 26-27, 2009

SUEHARA, K. I., KAWAMOTO, Y., FUJII, E., KOHDA, J., NAKANO, Y., YANO, T. **Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification**. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 100, n. 4, p. 437-442, 2005.

TAMLAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. **Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized whole cell and commercial lipases as biocatalyst**. Biochemistry Engineering Journal, v. 39, n. 1, p. 185-189, 2008.

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. **Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles**. International Journal of Pharmaceutics. v. 337, n. 1-2, p. 299-306, 2007.

WAZILEWSKI, W. T.; BARICCATTI, R. A.; MARTINS, G. I.; SECCO, D.; DE SOUZA, S. N. M.; ROSA, H. A.; CHAVES, L. I. **Study of the methyl crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability**. Industrial Crops and Products. v. 43, p. 207-212, 2013.

XIN, J.; IMAHARA, H.; SAKA, S. **Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidant**. Fuel. v. 88, n. 2, p 282-286, 2009.

ZIMMER, A.; CAZAROLLI, J.; TEIXEIRA, R. M.; VISCARDI, S. L. C.; CAVALCANTI, E. S. H.; GERBASE, A. E.; FERRÃO, M. F.; PIATNICKI, C. M. F.; BENTO, F. M. **Monitoring of**

**efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). Fuel. v. 112: p. 153–162, 2013.**

## ANEXOS

**ANEXO A** - Certificado de apresentação do trabalho científico intitulado "*Curcumin and biodiesel: a fruitful relationship for preventing biodiesel oxidation?*", no **I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental**.

**I Simpósio em Tecnologia,  
Inovação e Sustentabilidade Ambiental**

**Certificado de Menção Honrosa**

Certificamos que o trabalho:

**Curcumin and biodiesel: a fruitful relationship for preventing biodiesel oxidation?**

de autoria de: Santos G.A., Dezzotti B., Vila M.M.D.C., Chaud M.V., Tubino M., Balcão V.M.

recebeu menção honrosa por ter sido classificado entre os 3 melhores trabalhos na categoria pôster

no **I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental**,

realizado nos dias 26, 27 e 28 de novembro de 2014, no Parque Tecnológico, em Sorocaba-SP.

*[Signature]*  
Programa de Pós-graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais  
UNISO - Universidade de Sorocaba

*Elaine C. M. Silva Zacarin*  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental  
UFSCAR - Câmpus Sorocaba

*Leonardo Senador Fructo*  
Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais  
Unesp - Câmpus de Sorocaba

ORGANIZAÇÃO:

ufscar UNISO unesp

APOIO:

PROPG ColdLab Malvern Instituto Brasileiro de Tecnologia IBTEC - BRASIL Waters THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE® PerkinElmer For the Better Leica

**ANEXO B** - Certificado de apresentação do trabalho científico intitulado " *Curcumina, pirocatecol e biodiesel: um relacionamento frutífero para a prevenção da degradação microbiana do biodiesel?*", na **38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**.

#LuzQuímicaAção

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química



Águas de Lindóia, 25 a 28 de maio de 2015

**ATESTADO**

Atestamos que o trabalho "Curcumina, pirocatecol e biodiesel: um relacionamento frutífero para prevenção da degradação microbiana do biodiesel?", autoria de Santos, G. A.; Dezzotti, B.; Vila, M. M. D. C.; Chaud, M. V.; Tubino, M.; Balcão, V. M. foi apresentado na forma de pôster durante a 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Águas de Lindóia, 28 de maio de 2015.

**Adriano D. Andricopulo**  
Presidente da SBQ  
38ª Reunião Anual da SBQ

**Luiz F. Silva Jr**  
Presidente da Comissão Organizadora  
38ª Reunião Anual da SBQ

# I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental

## Certificado de Menção Honrosa

Certificamos que o trabalho:

**Curcumin and biodiesel: a fruitful relationship for preventing biodiesel oxidation?**

de autoria de: Santos G.A., Dezzotti B., Vila M.M.D.C., Chaud M.V., Tubino M., Balcão V.M.

recebeu menção honrosa por ter sido classificado entre os 3 melhores trabalhos na categoria pôster

no **I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental,**

realizado nos dias 26, 27 e 28 de novembro de 2014, no Parque Tecnológico, em Sorocaba-SP.



Programa de Pós-graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais  
UNISO - Universidade de Sorocaba



Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental  
UFSCAR - Câmpus Sorocaba



Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais  
Unesp - Câmpus de Sorocaba

ORGANIZAÇÃO:



unesp



Waters  
THE SCIENCE OF  
WHAT'S POSSIBLE™



Águas de Lindóia, 25 a 28 de maio de 2015

### ATESTADO

Atestamos que o trabalho "Curcumina, pirocatecol e biodiesel: um relacionamento frutífero para prevenção da degradação microbiana do biodiesel?", autoria de Santos, G. A.; Dezzotti, B.; Vila, M. M. D. C.; Chaud, M. V.; Tubino, M.; Balcão, V. M. foi apresentado na forma de pôster durante a 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.



**Adriano D. Andricopulo**

Presidente da SBQ

38ª Reunião Anual da SBQ



**Luiz F. Silva Jr**

Presidente da Comissão Organizadora

38ª Reunião Anual da SBQ

Águas de Lindóia, 28 de maio de 2015.

**ANEXO C** - Artigo científico submetido para publicação na revista científica internacional indexada com arbitragem por pares "FUEL", intitulado: **"Curcumin or pyrocatechol in the prevention of biodiesel degradation. Part I: antimicrobial and antioxidant screening"**.

Elsevier Editorial System(tm) for Fuel  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Curcumin or pyrocatechol in the prevention of biodiesel degradation. Part I: antimicrobial and antioxidant screening

Article Type: Original Research Paper

Keywords: Biodiesel; Curcumin; Pyrocatechol; Antimicrobial activity; Oxidative stability

Corresponding Author: Prof. Victor M. Balcão, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Sorocaba

First Author: Gustavo A Santos, M.Sc.

Order of Authors: Gustavo A Santos, M.Sc.; Bruna A Dezzotti, B.Sc.; Marta M Vila, Ph.D.; Marco V Chaud, Ph.D.; Willian L Silva, Ph.D.; Adriano G de Castro, Ph.D.; José M Oliveira Júnior, Ph.D.; Matthieu Tubino, Ph.D.; Victor M. Balcão, Ph.D.

Abstract: Biodiesel is a good substitute for fossil oil and diesel, because of its better biodegradability and low carbon dioxide emissions. Owing to its hygroscopicity biodiesel may accumulate water during storage, which becomes favorable to the growth of microorganisms. In order to control microbial contamination, it has been observed the use of various biocides. However, the addition of a natural substance simultaneously with antioxidant and antimicrobial activity could prove advantageous. Curcumin and pyrocatechol are antioxidant agents, which also exhibit antimicrobial activity. In this sense, this research effort aimed at evaluating the addition of curcumin and/or pyrocatechol to biodiesel produced from various vegetable sources (waste frying oil, soybean oil, cottonseed oil, sesame oil, macauba almond oil and microalgae oil). Curcumin and/or pyrocatechol, with weight percentages ranging from 0-1.5%, were added to biodiesel (in the presence or absence of water) so as to determine the minimum concentration of curcumin producing fungistatic and antioxidant effects. As contaminating microorganism, one used the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier. Biodiesel samples containing the added (natural) antimicrobial agents in different mass proportions were immediately dropped on Petri plates containing solid Sabouraud Dextrose nutrient medium inoculated by spreading with the target mold. The plates were incubated at 25 °C for 48 h, time after which the presence of any zones of inhibition of growth (inhibition halos) was verified, with the results obtained allowing to draw conclusions about the presence or absence of fungistatic activity of these natural compounds in the different biodiesels studied. The antioxidant properties of (selected) curcumin was also evaluated.

Suggested Reviewers: Luiz B Carvalho Junior Ph.D.  
Full Professor, LIKA, Federal University of Pernambuco  
lbcj.br@gmail.com  
Expert researcher working with enzyme catalysis.

Eugénio Ferreira Ph.D.  
Full Professor, Department of Biological Engineering, University of Minho  
ecferreira@deb.uminho.pt  
Expert researcher working with enzyme catalysis and biofuel production.

Luiz A Gioielli Ph.D.

Full Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo

lagio@usp.br

Expert researcher working with lipid technology and transesterification reactions.

Marcus T Cicerone Ph.D.

Professor and Researcher, Biosystems and Biomaterials Division, NIST

marcus.cicerone@nist.gov

Expert researcher working with biosystems and biofuel production.

Joaquim M Sampaio Cabral Ph.D.

Full Professor, Institute for Biotechnology and Bioengineering, Instituto Superior Técnico (IST)

joaquim.cabral@ist.utl.pt

Researcher working with biosystems and biotechnology.

Regional Editor  
*Fuel*

Sorocaba, São Paulo, Brazil, August 06th, 2015

Dear Professor J. Patrick:

Enclosed please find an original manuscript, entitled **Curcumin or pyrocatechol in the prevention of biodiesel degradation. Part I: antimicrobial and antioxidant screening** by Santos, Dezzotti, Vila, Chaud, Silva, Oliveira Junior, Castro, Tubino and myself, which I do hereby submit for publication in *Fuel* as a Full-Length Research Paper.

I hope that this manuscript is suitable for publication in *Fuel*.

Please acknowledge receipt of this material to my current campus address:

Dr. Victor Manuel Balcão, Professor  
LaBNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory  
**i(bs)<sup>2</sup>** – Intelligent **b**iosensing and **b**iomolecule **s**tabilization research group  
University of Sorocaba  
Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rod. Raposo Tavares km 92.5  
CEP 18023-000 Sorocaba, São Paulo  
BRAZIL

or to my E-mail address:

[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br)

at your earliest convenience.

I look forward to hearing from you.

Yours sincerely,

Victor Manuel Balcão, Ph.D.  
Professor at the University of Sorocaba

*encl.*

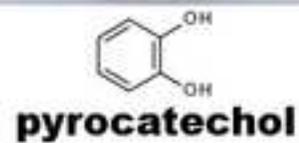
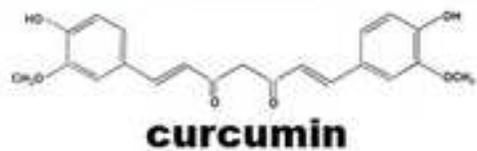
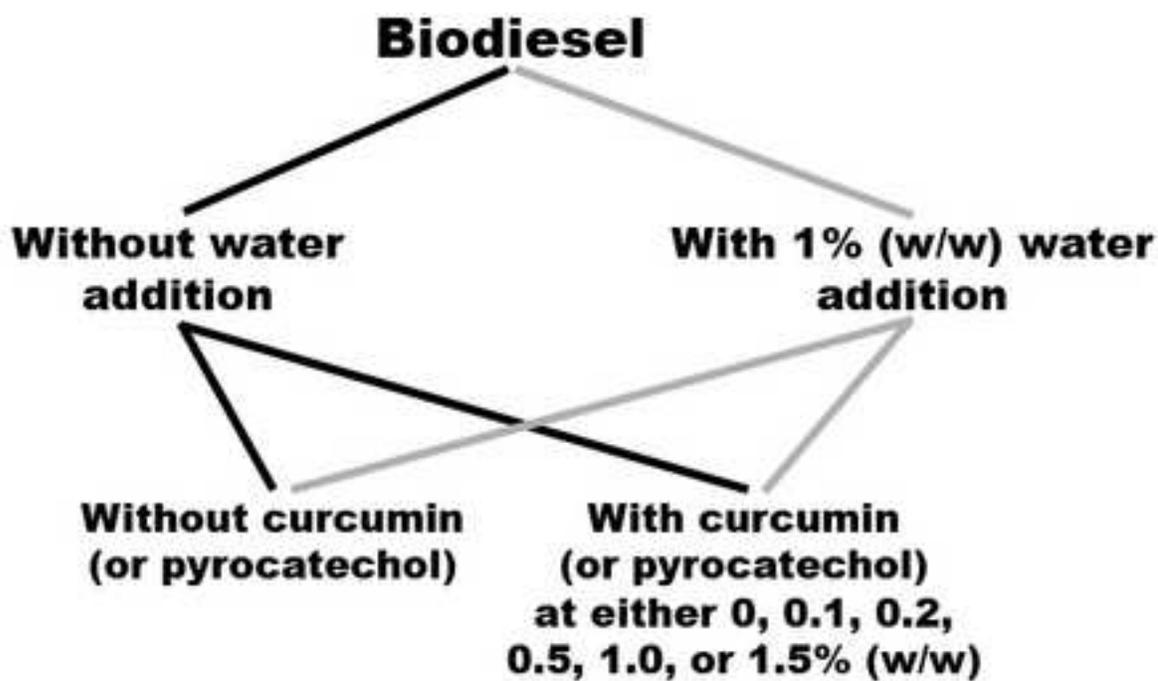
1

2 The natural substances added to biodiesel (curcumin and pyrocatechol) presented fungistatic characteristics  
3 and were able to prevent the growth of the selected microorganism. However, from those two natural  
4 substances, curcumin was selected for further work due not only to its ease of acquisition but also to its  
5 higher fungistatic activity.

6

7 Additionally, curcumin was able to substantially increase the lipid oxidation induction times of all biodiesels  
8 tested. Hence, curcumin shows great promise for use as additive in low mass concentrations to be used in  
9 the control of the quality of biodiesels from different plant sources, both from the antimicrobial and  
10 antioxidant points of view.

11



# Curcumin or pyrocatechol in the prevention of biodiesel degradation. Part I: antimicrobial and antioxidant screening

Gustavo A. Santos<sup>1</sup>, Bruna A. Dezzotti<sup>1</sup>, Marta M. D. C. Vila<sup>1,2</sup>, Marco V. Chaud<sup>1</sup>,  
Willian L. Silva<sup>2</sup>, Adriano G. de Castro<sup>2</sup>, José M. de Oliveira Jr<sup>1</sup>,  
Matthieu Tubino<sup>2</sup> and Victor M. Balcão<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> LaBNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, **i(bs)**<sup>2</sup> – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil [[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br)].

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas/SP, Brazil.

<sup>3</sup> CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.

**Abstract:** Biodiesel is a good substitute for fossil oil and diesel, because of its better biodegradability and low carbon dioxide emissions. Owing to its hygroscopicity biodiesel may accumulate water during storage, which becomes favorable to the growth of microorganisms. In order to control microbial contamination, it has been observed the use of various biocides. However, the addition of a natural substance simultaneously with antioxidant and antimicrobial activity could prove advantageous. Curcumin and pyrocatechol are antioxidant agents, which also exhibit antimicrobial activity. In this sense, this research effort aimed at evaluating the addition of curcumin and/or pyrocatechol to biodiesel produced from various vegetable sources (waste frying oil, soybean oil, cottonseed oil, sesame oil, macauba almond oil and microalgae oil). Curcumin and/or pyrocatechol, with weight percentages ranging from 0-1.5%, were added to biodiesel (in the presence or absence of water) so as to determine the minimum concentration of curcumin producing fungistatic and antioxidant effects. As contaminating microorganism, one used the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier. Biodiesel samples containing the added (natural) antimicrobial agents in different mass proportions were immediately dropped on Petri plates containing solid Sabouraud Dextrose nutrient medium inoculated by spreading with the target mold. The plates were incubated at 25 °C for 48 h, time after which the presence of any zones of inhibition of growth (inhibition halos) was verified, with the results obtained allowing to draw conclusions about the presence or absence of fungistatic activity of these natural compounds in the different biodiesels studied. The antioxidant properties of (selected) curcumin was also evaluated.

**Keywords:** Biodiesel; Curcumin; Pyrocatechol; Antimicrobial activity; Oxidative stability

\*Author to whom all correspondence should be addressed at *Universidade de Sorocaba (UNISO), Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rod. Raposo Tavares km 92.5, CEP 18023-000 Sorocaba/SP, São Paulo, Brazil* [[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br); Tel.: 00 55 (11) 986 000 996; Fax: 00 55 (15) 2101 7000].

This manuscript has been submitted for publication in *Fuel*.

It is not to be reproduced or cited without the written permission from the authors.

## 42 **1. Introduction**

43 Biodiesel is a fuel derived from renewable sources such as vegetable oils and animal fat, and is a good  
44 alternative to fossil oil and diesel oil. Biodiesel has been used by several countries to minimize the effects of  
45 greenhouse gas emissions (Zimmer et al., 2013). The CO<sub>2</sub> released in the combustion of biodiesel is equal to  
46 that captured by plants during photosynthesis and, thus, it does not promote the increase of CO<sub>2</sub> in the  
47 atmosphere (Naik et al., 2010). Biodiesel is composed of a mixture of alkyl esters (methyl, ethyl or propyl)  
48 obtained in the transesterification of triglycerides from vegetable oils and animal fats, which is a  
49 conventional method for obtaining biodiesel. The triglycerides react with a low molecular weight alcohol,  
50 usually methanol or ethanol, resulting in the formation of fatty acid esters and releasing glycerol as a  
51 byproduct. The reaction is catalyzed by acids, bases or enzymes. Considering the costs involved, sodium and  
52 potassium hydroxides promote satisfactory yields and have been widely used (Botella et al., 2006).  
53 Microbial contamination of fuels has been reported for more than a century, since it can be spread  
54 throughout the storage and distribution systems with serious economical damages (Dodos et al., 2012;  
55 Passman, 2013). Although the distillation process involved in the production of biodiesel is able to sterilize  
56 the biofuel, water, dust and microorganisms can easily enter the system through the storage and transport of  
57 the fuel (Dodos et al., 2012). Furthermore, due to its hygroscopicity water can accumulate during storage of  
58 biodiesel, creating a favorable condition for the proliferation of microorganisms (Zimmer et al., 2013).  
59 Microbial contamination may gradually degrade the quality of the fuel, favoring the loss of chemical  
60 stability. Contaminated biodiesel favors the formation of bio-sludge, causing clogging of filters, accelerates  
61 the corrosion of various components and features turbidity and unpleasant odor (Dodos et al., 2012; Zimmer  
62 et al., 2013). For the prevention or control of biofouling, monitoring and cleaning measures are required,  
63 together with the use of chemicals (biocides) capable of inhibiting and controlling microbial growth.  
64 Bacteria and fungi are able to proliferate in biofuels, being metabolically more active in interfaces within  
65 fuel systems (Passman, 2013). Microorganisms that have been detected in fuel storage systems include  
66 fungi, yeasts, and aerobic and anaerobic bacteria (Cazarolli et al., 2014). A good biocide should be able to  
67 act both on the oil and water phases, exhibit a broad spectrum activity, maintain its inhibitory effect in the  
68 presence of other substances, not be corrosive to the system, be inexpensive and safe to use, and have a low  
69 environmental impact (Bücker et al., 2011; Zimmer et al., 2013). Another problem that biodiesels feature is  
70 susceptibility to oxidation (Castro, 2013). Biodiesels are unstable, particularly when exposed to moisture  
71 and atmospheric oxygen, due to their own chemical structure, degrading over time (Zimmer et al., 2013).  
72 Typically, vegetable oils have natural components with antioxidant capacity such as, for example,  
73 tocopherols. However, in the (chemical) process of obtaining biodiesels these substances are lost. Thus,  
74 addition of chemical substances with antioxidant capacity is a common practice, aiming at maintaining the  
75 quality of biodiesel (Castro, 2013; Serrano et al., 2013). Some natural substances, such as curcumin and  
76 pyrocatechol, have antimicrobial and antioxidant activities. In this regard, it may be interesting to add any of  
77 these substances to biodiesels so as to minimize both microbial contamination and oxidation. Curcumin  
78 [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] is a naturally occurring polyphenol in  
79

80 turmeric (*Curcuma longa* Linn) (Shaikh *et al.*, 2009) possessing several properties, including anti-  
81 inflammatory, analgesic, antioxidant (Castro, 2013) and antimicrobial (Akram *et al.*, 2010; Shrishail *et al.*,  
82 2013). Pyrocatechol (benzene-1,2-diol) is a phenolic compound present in several plant species  
83 (Kocacaliskana *et al.*, 2006), presenting antimicrobial (Schweigert *et al.*, 2001) antioxidant (Basile *et al.*,  
84 2005; Perron and Brumaghim, 2009) properties. The mechanisms responsible for microbial toxicity include  
85 enzyme inhibition possibly by reaction with hydrogen sulfide groups, or by non-specific reactions with  
86 proteins (Coawn, 1999). Considering all the aforementioned facts, the major goal of the research effort  
87 entertained herein was to evaluate the use of curcumin and/or pyrocatechol in biodiesels as antimicrobial  
88 and antioxidant agents.

## 89 **2. Materials and methods**

90

### 91 **2.1. Materials**

92

93 **2.1.1. Chemicals.** The reagents utilized in this research work were all of analytical grade or better, and  
94 were used without any type of additional purification. Tap water was purified in a Milli-Q Elga Purelab  
95 system (Molsheim, France) to a final conductivity of ca.  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ . Curcumin was purchased from  
96 Merck (Hohenbrunn, Germany), whereas pyrocatechol was acquired from Fluka (Buchs SG, Switzerland).  
97 For the microbiological assays, nutritive medium Sabouraud Dextrose Agar was purchased from Promidol  
98 Biotecnologia (Belo Horizonte MG, Brazil) and disposable sterile Petri plates were acquired from J. Prolab  
99 (São José dos Pinhais, PR, Brazil). The microorganism utilized in all biodiesel inoculation experiments was  
100 the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier (code CMMAI 0543), acquired from the Brazilian  
101 Collection of Environment and Industry Microorganisms (CBMAI) of the Multidisciplinary Center for  
102 Chemical, Biological and Agricultural Research at the Campinas State University (CPQBA/UNICAMP,  
103 Campinas, SP, Brazil). To synthesize the various biodiesels utilized in this research effort, refined soybean  
104 oil was acquired at the local commerce in the city of Campinas (Campinas, SP, Brazil), spent frying oil was  
105 collected through the Selective Waste Collection Program of the Environment Division of the State  
106 University of Campinas, cotton seed oil and microalgae oil was a kind gift from EXTRAE/FEA/UNICAMP,  
107 sesame seed oil was a kind gift from Sésamo Real Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda.  
108 (Valinhos, SP, Brazil), and macaúba almond oil was acquired from Community Association of Small  
109 Farmers of Dantas Creek and Montes Claros adjacencies (Minas Gerais MG, Brazil). The reagents utilized  
110 to prepare the different biodiesels were absolute methanol, purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil), and  
111 sodium methoxide solution at 30% (w/w) in methanol, purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil),  
112 used as catalyst for the transesterification reactions.

113

114 **2.1.2. Analytical equipment.** The lipid oxidation induction times of the several biodiesels studied were  
115 determined in a Biodiesel Rancimat from Metrohm AG (model 873, Herisau, Switzerland). All refractive  
116 index measurements were carried out in a Digital Refractometer from Mettler-Toledo (model Refracto  
117 30GS, Greifensee, Switzerland).

118

119

## 120 **2.2. Experimental procedures**

121

122 **2.2.1. Preparation of biodiesel.** The syntheses of biodiesels were carried out in three sequential steps. In  
123 the first step one added, relative to the initial mass of oil, 16% (w/w) methanol and 0.58% (w/w) of  
124 methanolic solution of sodium methoxide (at 30%, w/w). This mixture was maintained at 60 °C with reflux,  
125 under mechanical stirring at 900 rpm, during 1 hr. Subsequently, the reaction mixture was transferred into a  
126 separatory funnel for decantation, separation and removal of glycerol. After removal of the glycerol, one  
127 continued to the second reaction step with the addition of an extra 4% (w/w) of ethanol and 0.14% (w/w) of  
128 methanolic solution of sodium methoxide (at 30%, w/w), percentages relative to the initial mass of oil,  
129 under the same experimental conditions of stirring, temperature, time and reflux. In the third stage, the  
130 biodiesel produced was washed with 5x50 mL of water at 60 °C, dried in an oven set at 100 °C during 1  
131 hour and purified on a column packed with ion exchange resin (Amberlite BD10 DRY, from Dow Chemical  
132 Brazil, São Paulo, SP, Brazil), employing ca. 180 g of resin per liter of biodiesel and a biodiesel flow rate of  
133 4 mL min<sup>-1</sup>.

134

135 **2.2.2. Preparation of biodiesel samples.** Biodiesel samples were added with curcumin or pyrocatechol  
136 at variable weight percentages of 0%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1.0%, and 1.5% (w/w). The presence of water was  
137 also evaluated, with addition of 1% water (w/w) to biodiesel samples containing added curcumin or  
138 pyrocatechol. Figure 1 presents the experimental design utilized. All biodiesel samples added with curcumin  
139 or pyrocatechol, in the absence or presence of 1% (w/w) added water, were stored in amber glass bottles and  
140 kept at 4 °C until use.

141

142

**Insert Figure 1 here**

143

144 **2.2.3. Evaluation of the potential antimicrobial activity of curcumin and pyrocatechol in**  
145 **biodiesel.** For determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of curcumin and  
146 pyrocatechol in the biodiesels studied, one utilized the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier. The  
147 microorganism (in the form of a lyophilized pellet) was reactivated by the addition of ca. 5 mL of sterile  
148 saline solution (at 0.9% NaCl (w/w) in ultrapure water). After complete rehydration of the pellet, the  
149 solution was gently shaken and poured into Petri plates containing solid Sabouraud Dextrose Agar, and the  
150 plates incubated during 48 hr at 25 °C in an incubation chamber from QUIMIS (model Q-316-14, Diadema,  
151 SP, Brazil). After incubation, a colony forming unit (CFU) was selected and withdrawn using a flamed  
152 metallic loop, and suspended in sterile liquid nutritive broth, after which the tube was incubated during 48 hr  
153 at 25 °C. After this time period, and following homogenization of the inoculum, a sterile *swab* was  
154 introduced and submerged in the liquid culture suspension, the excess solution was withdrawn via gentle  
155 compression against the tube walls, and the surface of the Sabouraud Dextrose Agar in Petri plates was  
156 inoculated in the form of striae in three directions, in each (previously marked) quadrant. Immediately after

157 inoculation, 20  $\mu$ L of each biodiesel sample with a given weight percentage of curcumin or pyrocatechol  
158 (with and without added water) were poured in the centre of each quadrant in the form of a simple (tiny)  
159 drop, using sterile tips and a Gilson automatic pipette. For each biodiesel, samples added with either  
160 curcumin or pyrocatechol were poured into four Petri plates with solid Sabouraud Dextrose Agar using the  
161 following sequence: Petri plate #1: top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.1% (w/w)  
162 curcumin; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; Petri  
163 plate #2: top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; bottom right  
164 quadrant, 1.0% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 1.5% (w/w) curcumin; Petri plate #3: top right  
165 quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2%  
166 (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; Petri plate #4: top right quadrant, 0%  
167 (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 1.0% (w/w)  
168 pyrocatechol; bottom left quadrant, 1.5% (w/w) pyrocatechol. All Petri plates were incubated at 25 °C  
169 during 48 hr, after which they were visually inspected for the presence of growth inhibition halos.  
170 Measurement of halo diameters was carried out using a caliper rule and reflected light to illuminate the Petri  
171 plates (in inverted position) placed on a black and opaque background. All procedures were carried out  
172 under aseptic conditions in a laminar flow chamber from Trox Technik (model FLV-II, Sorocaba, SP,  
173 Brazil). The Petri plates containing solid culture medium were prepared according to procedures from the  
174 manufacturers and following instructions from CLSI (2011).

175  
176 **2.2.4. Evaluation of the potential antioxidant activity of curcumin and pyrocatechol in**  
177 **biodiesel.** The induction period that expresses the oxidative stability was determined by following the  
178 procedure of the norm EN 14112 (European Committee for Standardization, 2003), in a Biodiesel Rancimat  
179 from Metrohm AG (model 873, Herisau, Switzerland). All measurements were performed in triplicate. This  
180 method consists in using 3 gr of biodiesel which are heated up to 110 °C, and maintained at this  
181 temperature, under a constant air flow of 10 L•h<sup>-1</sup>.

182

### 183 **3. Results and discussion**

184  
185 One of the biggest problems with biodiesel is related to its stability, and the most significant factors for its  
186 degradation include exposure to air and/or light, high temperatures and even to the presence of metals that  
187 can eventually act as catalysts in the process of its oxidation. The presence of microorganisms has also been  
188 reported as a factor that promotes biodiesel degradation, with a significant drop in its quality (Dodos et al.,  
189 2012; Passman, 2013; Borsato et al., 2014). Hence, to minimize this problem, the research work entertained  
190 herein aimed at studying the effects of the addition to biodiesel of natural substances with antimicrobial and  
191 antioxidant properties. Thus, the research work undertaken was divided into two major parts, the first of  
192 which is described in this manuscript, and aimed at determining the lowest concentrations of pyrocatechol  
193 and/or curcumin exercising antimicrobial and/or antioxidant activities in biodiesels produced from oils from

194 different plant origins. The second part, which will be the subject of a forthcoming (part II) paper, aimed at  
195 following over a relatively long storage time, the effect of such natural additives in the maintenance of the  
196 properties and quality of biodiesel. All newly prepared biodiesels were screened for microbial loads, but all  
197 produced negative results, which is in clear agreement with the processing conditions leading to the  
198 production of this biofuel (Dodos et al., 2012).

199  
200 **3.1. Evaluation of the potential antimicrobial activity of curcumin and pyrocatechol in**  
201 **biodiesel.** To test the potential of the addition of natural substances such as curcumin and/or pyrocatechol  
202 to biodiesel, in preventing and/or controlling microbial contamination and oxidation, one decided to  
203 inoculate all newly prepared biodiesels with a microorganism able to withstand the prevailing conditions in  
204 such a medium and at the same time able to thrive in them. The microorganism chosen was the filamentous  
205 mold *Paecilomyces variotii* Bainier, due to the fact that it is a common contaminating agent in diesel fuels  
206 (Passman, 2013) and also because of the availability to acquire a strain of guaranteed origin. The presence of  
207 water as a facilitator or inhibitor of the activity of the added antimicrobial agent(s) was also evaluated and,  
208 for this, all newly prepared biodiesels were added with 1% (w/w) ultrapure water, aiming at simulating  
209 biodiesel hydration during storage up to twenty times the maximum legally permitted water level (500 ppm)  
210 (ANP 42/2004). In real conditions of storage, biodiesel can suffer accidental contamination with water from  
211 infiltrations (e.g. rain, washing of the refueling points, microcracks in the storage tanks) and, in this sense, it  
212 was considered important to define the microbial growth inhibition properties the closest as possible to the  
213 real conditions. The results of the microbial growth inhibition trials obtained for all biodiesel samples added  
214 with either curcumin or pyrocatechol, in the presence of 1% (w/w) added water or in its absence, are  
215 displayed in Figure 2 for curcumin and in Figure 3 for pyrocatechol.

216

217 **Insert Figure 2 here**

218

219 **Insert Figure 3 here**

220

221 As can be seen from inspection of Figures 2 and 3, when no curcumin or pyrocatechol were added, the  
222 mycellium grew and entangled above the biodiesel droplet, producing a “fake” inhibition zone. To allow a  
223 better comparison of the halos produced in the different situations, for every biodiesel tested the halos  
224 produced were normalized by the dimension of the inhibition zone produced solely by biodiesel (i.e., without  
225 any addition of either curcumin or pyrocatechol). A close inspection of the results depicted in Table 1, in the  
226 form of normalized growth inhibition halo diameters, allows to draw as a general conclusion that the  
227 combined addition of 1% (w/w) water and a low mass concentration of curcumin (viz. 0.2% (w/w) for  
228 biodiesel from spent frying oil, 0.5% (w/w) for biodiesel from soybean oil, 0.1% (w/w) for biodiesel from  
229 cotton seed oil, 0.5% (w/w) for biodiesel from sesame seed oil, 0.2% (w/w) for biodiesel from macaúba  
230 almond oil, and 0.2% (w/w) for biodiesel from microalgae oil) were those processing variables that  
231 promoted the best microbial growth inhibition (see Table 1).

232

233

**Insert Table 1 here**

234

235 Due to legal restrictions, the amount of any additive added to biodiesel must be kept to a minimum. For all  
236 biodiesels produced from different vegetable sources and added with 1% (w/w) water, curcumin and  
237 pyrocatechol produced quite similar results in preventing microbial growth. However, due to the ease of  
238 curcumin availability, compared to pyrocatechol, the former was chosen for further work. Additionally, the  
239 growth inhibition halos produced by curcumin were in general much larger than those promoted by  
240 pyrocatechol (see Table 1).

241

242 **3.2. Evaluation of the potential antioxidant activity of curcumin and pyrocatechol in**

243 **biodiesel.** The potential antioxidant effect of curcumin in all biodiesels added with 1% (w/w) ultrapure  
244 water was also evaluated. As can be seen in Table 2, lipid oxidation induction times (average of three  
245 determinations and associated standard deviations) of biodiesels added with (minimum) variable amounts of  
246 curcumin and 1% (w/w) water (see section 3.1.) suffered a generalized increase when compared with their  
247 pure counterparts (see Table 2). Except for the biodiesel produced from soybean oil, which suffered a 16%  
248 reduction in the lipid oxidation induction time, meaning that this biodiesel was more prone to oxidation after  
249 the combined addition of water and curcumin, all other biodiesels proved to be more resistant to oxidation,  
250 with significant increases in their lipid oxidation induction times (see Table 2). Additionally, plain biodiesel  
251 produced from macaúba almond oil proved to be very resistant to oxidation, exhibiting a lipid oxidation  
252 induction timeframe of more than 60 h, making irrelevant the addition of any antioxidant. Even more, the  
253 addition of curcumin to this biodiesel catapulted the induction of lipid oxidation to more than 140 h. Thus,  
254 this biodiesel was discontinued from further studies. The same happened to biodiesel produced from  
255 microalgae oil, due to the difficulty in obtaining this still experimental biodiesel in large amounts. But for  
256 the remaining biodiesels (see Table 2), and except for the biodiesel produced from soybean oil, lipid  
257 oxidation induction times suffered large increases, from ca. 28% in the case of biodiesel produced from  
258 sesame seed oil to ca. 41% in the case of biodiesel produced from spent frying oil. These results clearly  
259 demonstrate the potential of the addition of curcumin to biodiesels in preventing both oxidation and  
260 microbial growth.

261

262

**Insert Table 2 here**

263

## 264 **4. Conclusions**

265

266 An analysis of the results obtained in the research effort described herein allows to conclude that the natural  
267 substances added to biodiesel (curcumin and pyrocatechol) presented fungistatic characteristics and were  
268 able to prevent the growth of the selected microorganism. However, from those two natural substances,  
269 curcumin was selected for further work due not only to its ease of acquisition but also to its higher  
270 fungistatic activity. Additionally, curcumin was able to substantially increase the lipid oxidation induction  
271 times of all biodiesels tested. Hence, curcumin shows great promise for use as additive in low mass  
272 concentrations to be used in the control of the quality of biodiesels from different plant sources, both from  
273 the antimicrobial and antioxidant points of view.  
274

275

## 276 **5. Acknowledgements**

277

278 Project funding by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - Brazil) (**CNPq**  
279 **Ref. No. 404808/2013-1, Project “Studies on Biodiesel: Development of analytical methods for the**  
280 **characterization and quality control, and research of new natural additives to improve the quality of**  
281 **this biofuel”**), is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq in the form  
282 of Productivity in Research (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão and Marco V. Chaud. The authors  
283 have no conflicts of interest whatsoever to declare.

284

285

286

## 287 **6. References**

288

289 Akram, M.; Uddin, S.; Ahmed, A.; Usmanghani, K.; Hannan, A.; Mohiuddin, E.; Asif, M. (2010) *Curcuma*  
290 *longa* and curcumin: a review article. *Rom. J. Biol. – Plant Biol.* **55** (2): 65-70.

291

292 ANP – Agência Nacional do Petróleo [*Brazilian National Petroleum Agency*]. 2004. ANP Resolution  
293 42/2004. Available at [www.anp.gov.br/petro/legis\\_qualidade.asp](http://www.anp.gov.br/petro/legis_qualidade.asp).

294

295 Basile, A.; Ferrara, L.; del Pezzo, M.; Mele, G.; Sorbo, S.; Bassi, P.; Montesano, D. (2005) Antibacterial  
296 and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J. Ethnopharm.* **102**: 32–36.

297

298 Botella, L.; Bimbela, F.; Martín, L.; Arauzo, J.; Sánchez, J. L. (2006) Oxidation stability of biodiesel fuels  
299 and blends using the Rancimat and PetroOXY methods. Effect of 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol and catechol  
300 as biodiesel additives on oxidation stability. *Frontiers on Chemistry* **2** (43): 1-9.

301

302 Borsato, D.; Cini, J. R. M.; Silva, H. C.; Coppo, R. L.; Angilelli, K. G.; Moreira, I.; Maia, E. C. R. (2014)  
303 Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ:  
304 Determination of activation energy. *Fuel Processing Technology* **127**: 111–116.

305

306 Bücker, F.; Santestevan, N. A.; Roesch, L. F.; Jacques, R. J. S.; Beralba, M. C. R.; Camargo, F. A. O.;  
307 Bento, F. M. (2011) Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int.*  
308 *Biodeterioration & Biodegradation* **65**: 172-178.

309

310 Castro, A. G. (2013) Study of Curcumin Influence in the Oxidative Stability of Biodiesel and Vegetable Oil  
311 [*Estudo da Influência da Curcumina na Estabilidade Oxidativa de Biodieseis e Óleos Vegetais*]. Ph.D.  
312 Thesis. Institute of Chemistry of the State University of Campinas, Campinas SP, Brazil.

313

314 Cazarolli, J. C.; Guzzatto, R.; Samios, D.; Peralba, M. C. R.; Cavalcanti, E. H. S.; Bento, F. M. (2014)  
315 Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria*  
316 *boydii*. *Int. Biodeterioration & Biodegradation* **95**: 364 -372.

317

Coawn, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (4): 564–582.

318

319 CLSI (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational  
320 Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

321

322 European Committee for Standardization (2003); EN 14112: 2003 - Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid  
323 Methyl Esters (FAME), *Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)*, European  
324 Committee for Standards (CEN), Belgium, 2003.

325

326 Dodos, G. S.; Konstantakos, T.; Longinos, S.; Zannikos, F. (2012) Effects of microbiological contamination  
327 in the quality of biodiesel fuels. *Global NEST Journal* **14** (2): 175-182.

328

329 Kocacaliskana, I.; Talanb, I.; Terzic, I. (2006) Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as  
330 allelochemicals. *Z. Naturforsch.* **61**: 639-642.

331

332 Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K.; Dalai, A. K. (2010) Production of first and second generation  
333 biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 578–597.

334

335 Passman, F. J. (2013) Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980: a  
336 review. *International Biodeterioration & Biodegradation* **81**: 88-104.

337

338 Perron, N. R.; Brumaghim, J.L. A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related  
339 to iron binding. *Cell Biochem Biophys* v. 53, p. 75–100, 2009

340

341 Schweigert, N.; Zehnder, A. J. B.; Eggen, E. I. L. (2001) Chemical properties of catechols and their  
342 molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiol.* **3**  
343 (2): 81-91.

344

345 Shaikh, J.; Ankola, D. D.; Beniwal, V.; Singh, D.; Ravi Kumar, M. N. V. (2009) Nanoparticle encapsulation  
346 improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with  
347 piperine as absorption enhancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**: 223-230.

348

349 Shrishail, D.; Harishk H., Ravichandra, H.; Tulsianand, G.; Shruthi, S. D. (2013) Turmeric: nature's  
350 precious medicine. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **6** (3): 10-16.

351

352 Serrano, M.; Bouaid, A.; Martinez, M.; Aracil, J. (2013) Oxidation stability of biodiesel from different  
353 feedstocks: Influence of commercial additives and purification step. *Fuel* **113**: 50–58.

354

355

356 Zimmer, A.; Cazarolli, J.; Teixeira, R. M.; Viscardi, S. L. C.; Cavalcanti, E. S. H.; Gerbase, A. E.; Ferrão,  
357 M. F.; Piatnicki, C. M. F.; Bento, F. M. (2013) Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60  
358 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *Fuel* **112**: 153–162.

359 **FIGURE CAPTIONS**

360

361 Figure 1: Experimental design for assessing the effect of curcumin or pyrocatechol as antimicrobial  
362 and/or antioxidant agents in biodiesel samples, in the presence or absence of added water.

363

364 Figure 2: Results obtained for the antimicrobial activity of biodiesel samples added with variable  
365 amounts of curcumin. **a1**: biodiesel from spent frying oil without added water, top right  
366 quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.1% (w/w) curcumin; bottom right  
367 quadrant, 0.2% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; **a2**: biodiesel  
368 from spent frying oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top  
369 left quadrant, 0.1% (w/w) curcumin; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) curcumin; bottom  
370 left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; **b1**: biodiesel from soybean oil without added water, top  
371 right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.1% (w/w) curcumin; bottom right  
372 quadrant, 0.2% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; **b2**: biodiesel  
373 from soybean oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left  
374 quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; bottom right quadrant, 1.0% (w/w) curcumin; bottom left  
375 quadrant, 1.5% (w/w) curcumin; **c1**: biodiesel from cotton seed oil without added water, top  
376 right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; bottom right  
377 quadrant, 1.0% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 1.5% (w/w) curcumin; **c2**: biodiesel  
378 from cotton seed oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top  
379 left quadrant, 0.1% (w/w) curcumin; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) curcumin; bottom  
380 left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; **d1**: biodiesel from sesame seed oil without added water,  
381 top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; bottom right  
382 quadrant, 1.0% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 1.5% (w/w) curcumin; **d2**: biodiesel  
383 from sesame seed oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w) curcumin;  
384 top left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; bottom right quadrant, 1.0% (w/w) curcumin; bottom  
385 left quadrant, 1.5% (w/w) curcumin; **e1**: biodiesel from macauba palm oil without added  
386 water, top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin;  
387 bottom right quadrant, 1.0% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 1.5% (w/w) curcumin; **e2**:  
388 biodiesel from macauba palm oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w)  
389 curcumin; top left quadrant, 0.1% (w/w) curcumin; bottom right quadrant, 0.2% (w/w)  
390 curcumin; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin; **f1**: biodiesel from microalgae oil  
391 without added water, top right quadrant, 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.1% (w/w)  
392 curcumin; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 0.5% (w/w)  
393 curcumin; **f2**: biodiesel from microalgae oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant,  
394 0% (w/w) curcumin; top left quadrant, 0.1% (w/w) curcumin; bottom right quadrant, 0.2%  
395 (w/w) curcumin; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) curcumin.

396

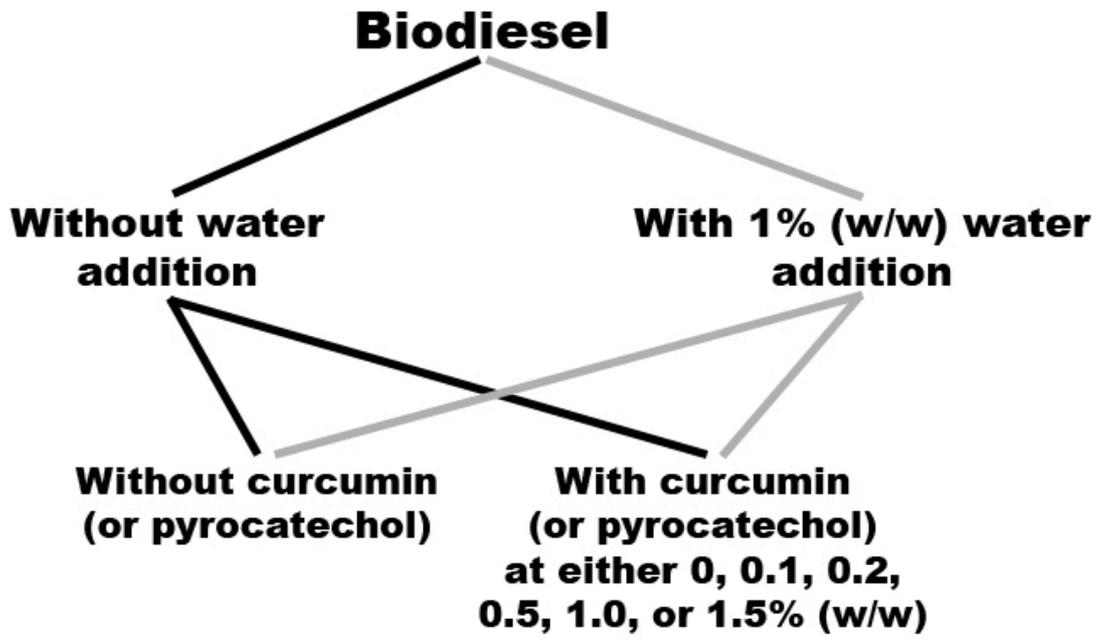
397 Figure 3: Results obtained for the antimicrobial activity of biodiesel samples added with variable  
398 amounts of pyrocatechol. **a1**: biodiesel from spent frying oil without added water, top right  
399 quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; bottom right  
400 quadrant, 1.0% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 1.5% (w/w) pyrocatechol; **a2**:  
401 biodiesel from spent frying oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w)  
402 pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2% (w/w)  
403 pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; **b1**: biodiesel from soybean oil  
404 without added water, top right quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1%  
405 (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant,  
406 0.5% (w/w) pyrocatechol; **b2**: biodiesel from soybean oil with 1% (w/w) added water, top  
407 right quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom  
408 right quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; **c1**:  
409 biodiesel from cotton seed oil without added water, top right quadrant, 0% (w/w)  
410 pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2% (w/w)  
411 pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; **c2**: biodiesel from cotton seed  
412 oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant,  
413 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left  
414 quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; **d1**: biodiesel from sesame seed oil without added water,  
415 top right quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol;  
416 bottom right quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w)  
417 pyrocatechol; **d2**: biodiesel from sesame seed oil with 1% (w/w) added water, top right  
418 quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right  
419 quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; **e1**:  
420 biodiesel from macauba palm oil without added water, top right quadrant, 0% (w/w)  
421 pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2% (w/w)  
422 pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; **e2**: biodiesel from macauba  
423 palm oil with 1% (w/w) added water, top right quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left  
424 quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol; bottom right quadrant, 1.0% (w/w) pyrocatechol; bottom  
425 left quadrant, 1.5% (w/w) pyrocatechol; **f1**: biodiesel from microalgae oil without added  
426 water, top right quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w)  
427 pyrocatechol; bottom right quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5%  
428 (w/w) pyrocatechol; **f2**: biodiesel from microalgae oil with 1% (w/w) added water, top right  
429 quadrant, 0% (w/w) pyrocatechol; top left quadrant, 0.1% (w/w) pyrocatechol; bottom right  
430 quadrant, 0.2% (w/w) pyrocatechol; bottom left quadrant, 0.5% (w/w) pyrocatechol.  
431

Table 1. Normalized growth inhibition halos produced using the filamentous fungi *Paecilomyces variotii* Bainier and biodiesels from different vegetable origins added with variable weight percentages of either curcumin or pyrocatechol.

BODIESEL ORIGIN	Additive added to biodiesel (% w/w)	Normalized inhibition halos produced			
		With curcumin / Without water	With curcumin / With water	With pyrocatechol / Without water	With pyrocatechol / With water
Spent frying oil	0	8/8 = 1.000	7/7 = 1.000	10/10 = 1.000	10/10 = 1.000
	0.1	10/8 = 1.250	10/7 = 1.429	10/10 = 1.000	10/10 = 1.000
	0.2	7/8 = 0.875	10/7 = 1.429	7/10 = 0.700	8/10 = 0.800
	0.5	8/8 = 1.000	8/7 = 1.143	8/10 = 0.800	10/10 = 1.000
	1.0	8/8 = 1.000	6/7 = 0.857	12/10 = 1.200	9/10 = 0.900
	1.5	8/8 = 1.000	7/7 = 1.000	12/10 = 1.200	5/10 = 0.500
Soybean oil	0	10/10 = 1.000	10/10 = 1.000	9/9 = 1.000	7/7 = 1.000
	0.1	10/10 = 1.000	9/10 = 0.900	11/9 = 1.222	6/7 = 0.857
	0.2	16/10 = 1.600	7/10 = 0.700	10/9 = 1.111	8/7 = 1.143
	0.5	12/10 = 1.200	10/10 = 1.000	10/9 = 1.111	7/7 = 1.000
	1.0	8/10 = 0.800	6/10 = 0.600	10/9 = 1.111	5/7 = 0.714
	1.5	8/10 = 0.800	8/10 = 0.800	9/9 = 1.000	5/7 = 0.714
Cotton seed oil	0	11/11 = 1.000	13/13 = 1.000	11/11 = 1.000	7/7 = 1.000
	0.1	9/11 = 0.818	14/13 = 1.077	10/11 = 0.909	11/7 = 1.571
	0.2	9/11 = 0.818	12/13 = 0.923	8/11 = 0.727	9/7 = 1.286
	0.5	9/11 = 0.818	10/13 = 0.769	7/11 = 0.636	8/7 = 1.143
	1.0	9/11 = 0.818	8/13 = 0.615	9/11 = 0.818	1/7 = 0.143
	1.5	11/11 = 1.000	13/13 = 1.000	10/11 = 0.909	0/7 = 0.000
Sesame seed oil	0	7/7 = 1.000	8/8 = 1.000	8/8 = 1.000	7/7 = 1.000
	0.1	8/7 = 1.143	7/8 = 0.875	7/8 = 0.875	9/7 = 1.286
	0.2	8/7 = 1.143	9/8 = 1.125	8/8 = 1.000	9/7 = 1.286
	0.5	9/7 = 1.286	10/8 = 1.250	8/8 = 1.000	9/7 = 1.286
	1.0	10/7 = 1.429	7/8 = 0.875	0/8 = 0.000	7/7 = 1.000
	1.5	11/7 = 1.571	9/8 = 1.125	7/8 = 0.875	9/7 = 1.286
Macauba almond oil	0	8/8 = 1.000	10/10 = 1.000	13/13 = 1.000	11/11 = 1.000
	0.1	9/8 = 1.125	11/10 = 1.100	10/13 = 0.769	8/11 = 0.727
	0.2	11/8 = 1.375	15/10 = 1.500	10/13 = 0.769	10/11 = 0.909
	0.5	12/8 = 1.500	11/10 = 1.100	8/13 = 0.615	12/11 = 1.091
	1.0	8/8 = 1.000	10/10 = 1.000	10/13 = 0.769	7/11 = 0.636
	1.5	10/8 = 1.250	8/10 = 0.800	10/13 = 0.769	6/11 = 0.545
Microalgae oil	0	8/8 = 1.000	8/8 = 1.000	13/13 = 1.000	9/9 = 1.000
	0.1	12/8 = 1.500	8/8 = 1.000	12/13 = 0.923	0/9 = 0.000
	0.2	11/8 = 1.375	9/8 = 1.125	9/13 = 0.692	9/9 = 1.000
	0.5	9/8 = 1.125	9/8 = 1.125	10/13 = 0.769	8/9 = 0.889
	1.0	9/8 = 1.125	6/8 = 0.750	8/13 = 0.615	7/9 = 0.778
	1.5	8/8 = 1.000	6/8 = 0.750	8/13 = 0.615	6/9 = 0.667

Table 2. Lipid oxidation induction times of the several biodiesels studied, before and after addition of curcumin in the presence of water.

BIODIESEL ORIGIN	Density @ 25 °C (g/mL)	Refractive index @ 25 °C	Average (n=3) lipid oxidation induction time (hr ± σ)		Curcumin added (% w/w)	Variation (%)
			Pure biodiesel	Biodiesel added with curcumin and 1% (w/w) water		
Spent frying oil	0.8669	1.4572	7.12 ± 0.02	10.01 ± 0.21	0.2	+ 40.59
Soybean oil	0.8681	1.4561	6.01 ± 0.20	5.03 ± 0.85	0.5	- 16.31
Cotton seed oil	0.8714	1.4531	3.06 ± 0.06	4.10 ± 0.04	0.1	+33.99
Sesame seed oil	0.8692	1.4522	8.70 ± 0.12	11.13 ± 0.12	0.5	+ 27.93
Macauba almond oil	0.8666	1.4351	60.84 ± 5.40	141.26 ± 2.18	0.2	+ 132.18
Microalgae oil	0.8609	1.4509	7.58 ± 0.07	8.79 ± 0.52	0.2	+ 15.96



*Figure 1*

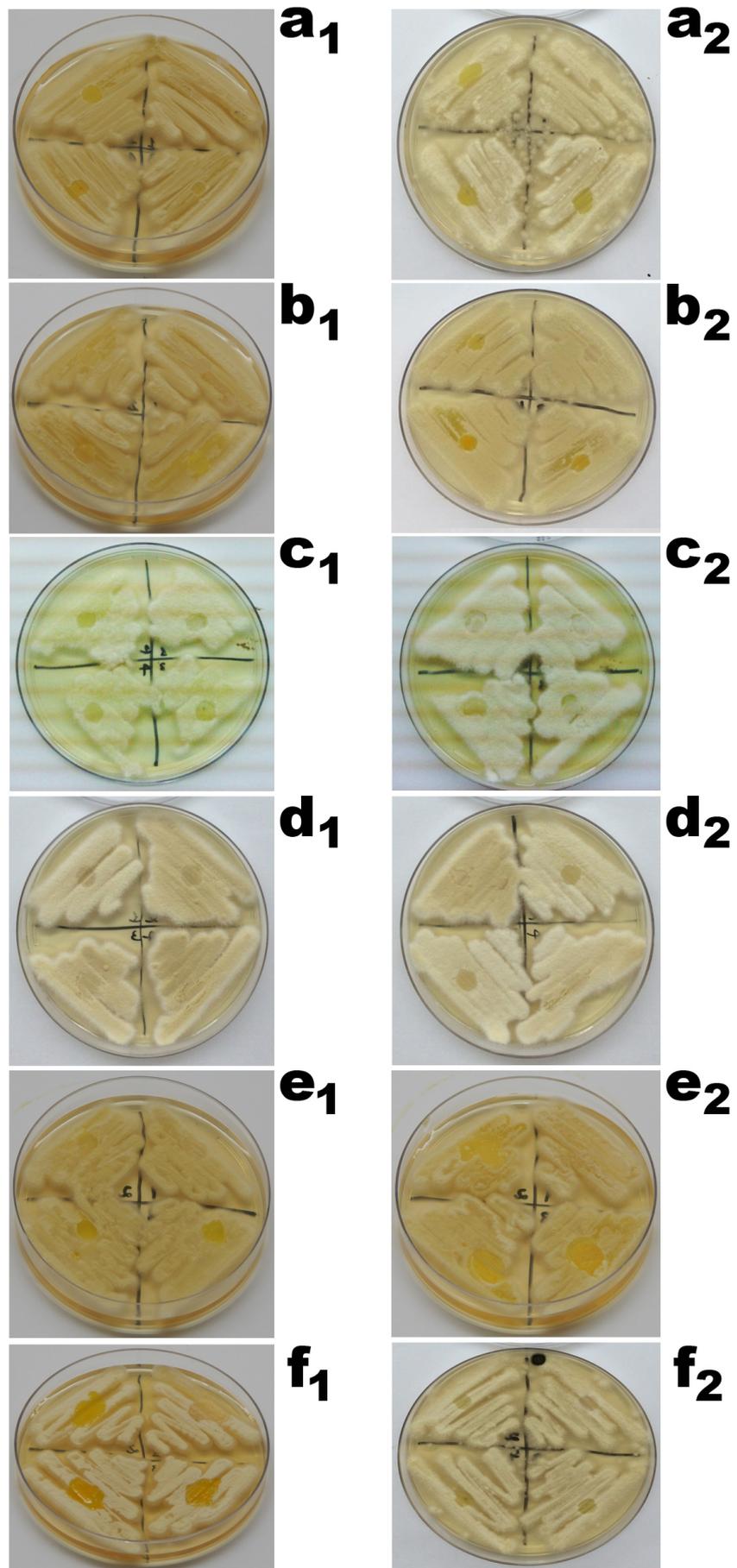


Figure 2

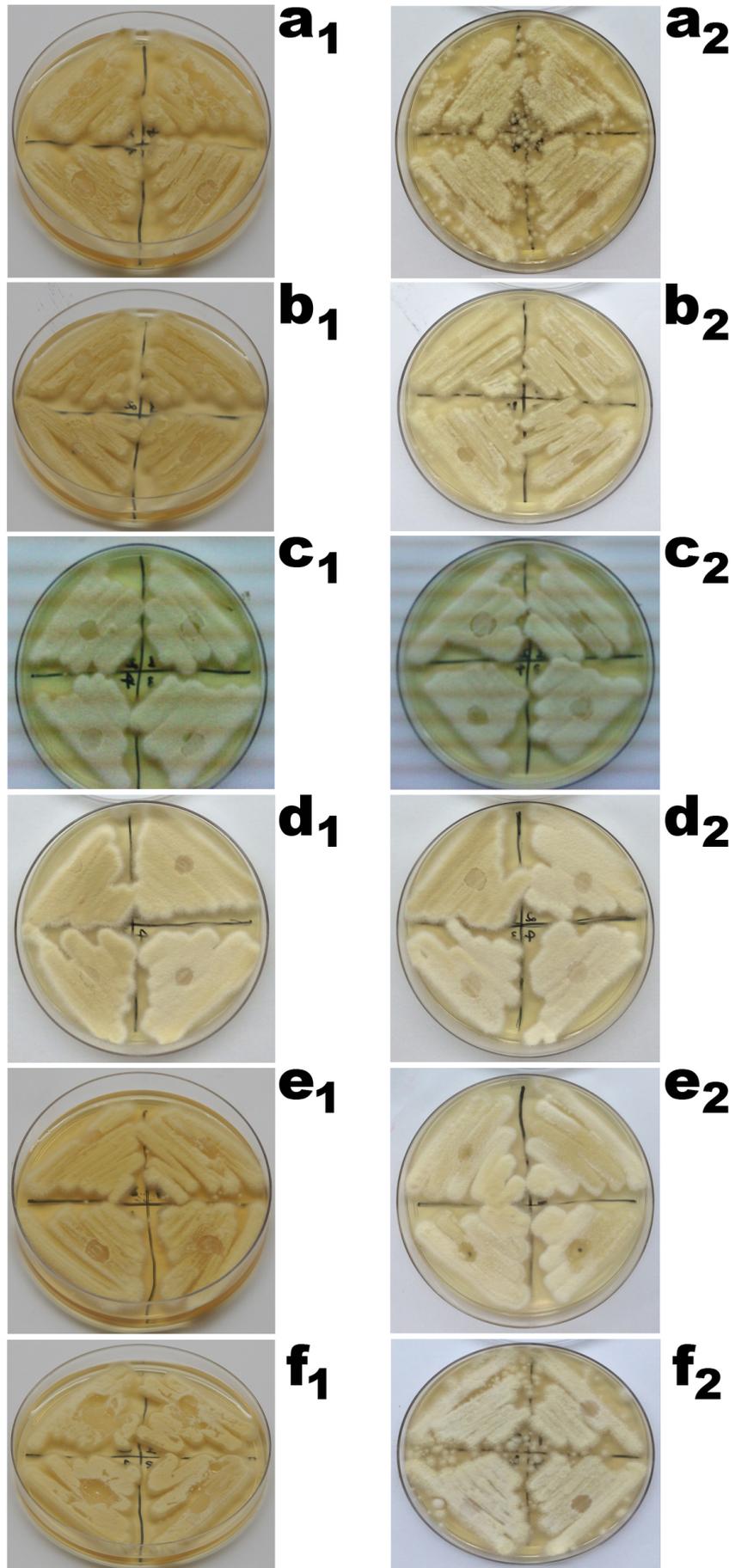


Figure 3

**ANEXO D** - Artigo científico submetido para publicação na revista científica internacional indexada com arbitragem por pares "FUEL", intitulado: **"Curcumin in the prevention of biodiesel degradation. Part II: oxidative stability and antimicrobial properties.**

Manuscript Number:

Title: Curcumin in the prevention of biodiesel degradation. Part II: oxidative stability and antimicrobial properties

Article Type: Original Research Paper

Keywords: Biodiesel; Curcumin; Oxidative stability; Refractive index; Antimicrobial activity

Corresponding Author: Prof. Victor M. Balcão, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Sorocaba

First Author: Gustavo A Santos, M.Sc.

Order of Authors: Gustavo A Santos, M.Sc.; Marta M Vila, Ph.D.; Marco V Chaud, Ph.D.; Willian L Silva, M.Sc.; José M Oliveira Júnior, Ph.D.; Matthieu Tubino, Ph.D.; Victor M. Balcão, Ph.D.

Abstract: Biodiesel may accumulate water during storage, much owing to its hygroscopicity. Such characteristic turns biodiesel into a favorable environment for the growth of microorganisms. The addition of a natural substance exhibiting, simultaneously, antioxidant and antimicrobial activities, could prove advantageous in the prevention of biodiesel oxidation and microbial contamination. Curcumin is a natural antioxidant agent, also exhibiting antimicrobial activity. In this sense, this research effort aimed at evaluating both the oxidative stability and the maintenance of an unfavorable environment for microbial growth in biodiesel stored for a prolonged timeframe, following addition of 1% water (w/w) and (previously optimized) variable amounts of curcumin to biodiesels produced from various vegetable sources (waste frying oil, soybean oil, cottonseed oil and sesame seed oil), and further inoculated with the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier. All biodiesels were then stored under controlled conditions of temperature (set at 25 °C) and in the absence of any light. The natural substance added to biodiesel (curcumin) presented apparent fungistatic characteristics and was able to provide biodiesel with a harsh environment for contaminating fungi. Additionally, curcumin was able to provide oxidative stability to the biodiesels produced.

Suggested Reviewers: Luiz B Carvalho Junior Ph.D.

Professor and Researcher, LIKA, Federal University of Pernambuco  
lbcj.br@gmail.com

Researcher active in the field of industrial utilisation of biomass from renewable sources.

Eugénio C Ferreira Ph.D.

Professor and Researcher, Centre of Biological Engineering, University of Minho

ecferreira@deb.uminho.pt

Researcher active in the field of industrial utilisation of biomass from renewable sources.

Marcus T Cicerone Ph.D.  
Professor and Researcher, Biosystems and Biomaterials Division, NIST  
marcus.cicerone@nist.gov  
Researcher active in the field of industrial utilisation of biomass from  
renewable sources.

Leonard Sagis Ph.D.  
Professor and Researcher, Physics and Physical Chemistry of Foods,  
Wageningen University  
leonard.sagis@wur.nl  
Researcher active in the field of industrial utilisation of biomass from  
renewable sources.

João Miguel F Rocha Ph.D.  
Researcher, Laboratory for Process Engineering, Environment,  
Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto  
jmfrocha@fe.up.pt  
Researcher active in the field of industrial utilisation of biomass from  
renewable sources.

Principal Editor  
*Fuel*

Sorocaba, São Paulo, Brazil, October 07th, 2015

Dear Dr. Eric Suuberg:

Enclosed please find an original manuscript, entitled **Curcumin in the prevention of biodiesel degradation. Part II: oxidative stability and antimicrobial properties** by Santos, Vila, Chaud, Silva, Oliveira Junior, Tubino and myself, which I do hereby submit for publication in *Fuel* as a Full-Length Research Paper.

I hope that this manuscript is suitable for publication in *Fuel*.

Please acknowledge receipt of this material to my current campus address:

Dr. Victor Manuel Balcão, Professor  
LaBNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory  
**i(bs)<sup>2</sup>** – Intelligent **b**iosensing and **b**iomolecule **s**tabilization research group  
University of Sorocaba  
Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rod. Raposo Tavares km 92.5  
CEP 18023-000 Sorocaba, São Paulo  
BRAZIL

or to my E-mail address:

[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br)

at your earliest convenience.

I look forward to hearing from you.

Yours sincerely,

Victor Manuel Balcão, Ph.D.  
Professor at the University of Sorocaba

*encl.*

1

2 The natural substance added to biodiesel (curcumin) presented apparent fungistatic characteristics and was  
3 able to provide biodiesel with a harsh environment for contaminating fungi. Additionally, curcumin was  
4 able to provide oxidative stability to the biodiesels produced.

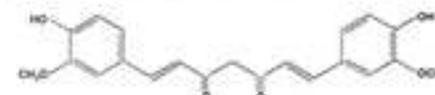
5

6

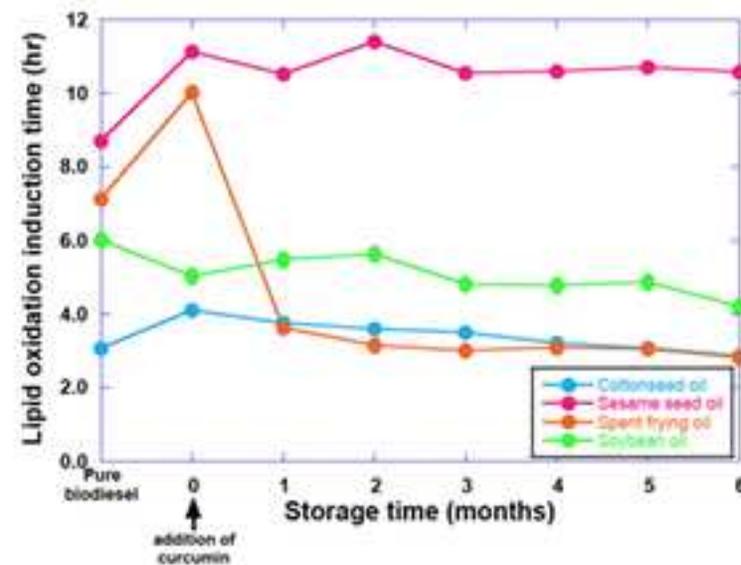
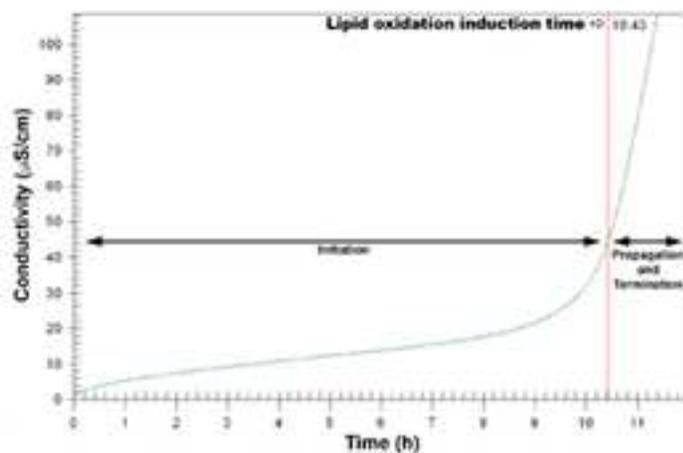
7 Curcumin appears as a promising natural additive with antioxidant and fungal growth inhibition abilities for  
8 use in low mass concentrations that allows biodiesels produced from different plant sources to maintain their  
9 quality even during prolonged storage at normal ambient temperature.

10

# Biodiesel +



curcumin



## Curcumin in the prevention of biodiesel degradation. Part II: oxidative stability and antimicrobial properties

Gustavo A. Santos<sup>1</sup>, Marta M. D. C. Vila<sup>1,2</sup>, Marco V. Chaud<sup>1</sup>, Willian L. Silva<sup>2</sup>, José M. de Oliveira Jr<sup>1</sup>, Matthieu Tubino<sup>2</sup> and Victor M. Balcão<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> LaBNUS – Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, **i(bs)**<sup>2</sup> – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil [[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br)].

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas/SP, Brazil.

<sup>3</sup> CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.

**Abstract:** Biodiesel may accumulate water during storage, much owing to its hygroscopicity. Such characteristic turns biodiesel into a favorable environment for the growth of microorganisms. The addition of a natural substance exhibiting, simultaneously, antioxidant and antimicrobial activities, could prove advantageous in the prevention of biodiesel oxidation and microbial contamination. Curcumin is a natural antioxidant agent, also exhibiting antimicrobial activity. In this sense, this research effort aimed at evaluating both the oxidative stability and the maintenance of an unfavorable environment for microbial growth in biodiesel stored for a prolonged timeframe, following addition of 1% water (w/w) and (previously optimized) variable amounts of curcumin to biodiesels produced from various vegetable sources (waste frying oil, soybean oil, cottonseed oil and sesame seed oil), and further inoculated with the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier. All biodiesels were then stored under controlled conditions of temperature (set at 25 °C) and in the absence of any light. The natural substance added to biodiesel (curcumin) presented apparent fungistatic characteristics and was able to provide biodiesel with a harsh environment for contaminating fungi. Additionally, curcumin was able to provide oxidative stability to the biodiesels produced.

**Keywords:** Biodiesel; Curcumin; Oxidative stability; Refractive index; Antimicrobial activity

\*Author to whom all correspondence should be addressed at *Universidade de Sorocaba (UNISO), Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, Rod. Raposo Tavares km 92.5, CEP 18023-000 Sorocaba/SP, São Paulo, Brazil* [[victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br); Tel.: 00 55 (11) 986 000 996; Fax: 00 55 (15) 2101 7000].

This manuscript has been submitted for publication in *Fuel*.

It is not to be reproduced or cited without the written permission from the authors.

## 38 **1. Introduction**

39

40 Biodiesel is being used by several countries to minimize the effects of greenhouse gas emissions (Zimmer et  
41 al., 2013). Since the amount of CO<sub>2</sub> released in the combustion of biodiesel is equal to that captured by  
42 plants during photosynthesis, the use of biodiesel does not lead to an increase in the levels of CO<sub>2</sub> in the  
43 atmosphere (Naik et al., 2010). In the (either chemical or enzymatic) transesterification of triglycerides from  
44 vegetable oils and animal fats, the net result is a mixture of alkyl esters (either methyl, ethyl or propyl)  
45 commonly known as biodiesel. Microbial contamination of fuels can be spread throughout both storage and  
46 distribution systems, with serious economical consequences (Dodos et al., 2012; Passman, 2013), since due  
47 to the hygroscopicity of biodiesels, water can accumulate during its storage and create a favorable condition  
48 for the proliferation of contaminating microorganisms (Dodos et al., 2012; Zimmer et al., 2013). When  
49 biodiesel becomes contaminated with microorganisms, degradation of the quality of the biofuel and  
50 concomitant loss of chemical stability eventually favors the formation of bio-sludge, clogging filters and  
51 accelerating the corrosion of various motor components, featuring turbidity and unpleasant odor (Dodos et  
52 al., 2012; Zimmer et al., 2013). The use of chemical biocides in biofuels, able to inhibit and control  
53 microbial growth is usually an option for the prevention and/or attenuation of biofouling (Bücker et al.,  
54 2011; Zimmer et al., 2013), since bacteria and filamentous fungi are metabolically more active in interfaces  
55 (namely those promoted by biodiesel hydration) within fuel systems (Passman, 2013) and are able to  
56 proliferate under such conditions (Cazarolli et al., 2014). A good biocide should be able to act both on the  
57 oil and water phases, exhibit a broad spectrum activity, maintain its inhibitory effect in the presence of other  
58 biofuel components, and have a low environmental impact (Bücker et al., 2011; Zimmer et al., 2013). On the  
59 other hand, due to their own lipidic structure, biodiesels are particularly unstable when exposed to moisture  
60 and atmospheric oxygen, featuring susceptibility to oxidation and degrading throughout storage time  
61 (Castro, 2013; Zimmer et al., 2013). Hence, addition of chemical antioxidants to biodiesel is a common  
62 practice, aiming at maintaining its quality (Castro, 2013; Serrano et al., 2013). In a previous research effort,  
63 addition of curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, a naturally occurring  
64 polyphenol) and pyrocatechol (benzene-1,2-diol, a phenolic compound present in several plants) (natural  
65 substances) to biodiesel was investigated aiming at determining the lowest concentration that allowed to

66 maintain their antimicrobial and antioxidant activities (Shaikh *et al.*, 2009; Akram *et al.*, 2010; Shrishail *et*  
67 *al.*, 2013; Kocacaliskana *et al.*, 2006; Schweigert *et al.*, 2001; Basile *et al.*, 2005; Perron and Brumaghim,  
68 2009). These natural substances may exert their toxicity to microbial cells possibly by mechanisms  
69 involving intracytoplasmatic enzyme inhibition (Coawn, 1999). Hence, in the research effort entertained  
70 herein, the long-term effects of the addition of curcumin to several different biodiesels was studied, in terms  
71 of the maintenance of both their oxidative stability and harsh environment for microbial growth.  
72

## 73 **2. Materials and methods**

74

### 75 **2.1. Materials**

76

77 **2.1.1. Chemicals.** The reagents utilized in this research work were all of analytical grade or better, and  
78 were used without any type of additional purification. Tap water was purified in a Milli-Q Elga Purelab  
79 system (Molsheim, France) to a final conductivity of ca. 18.2 MΩ.cm<sup>-1</sup>. Curcumin was purchased from  
80 Merck (Hohenbrunn, Germany). For the microbiological assays, nutritive medium Sabouraud Dextrose Agar  
81 was purchased from Promidol Biotecnologia (Belo Horizonte MG, Brazil) and disposable sterile Petri plates  
82 were acquired from J. Prolab (São José dos Pinhais, PR, Brazil). The microorganism utilized in all biodiesel  
83 inoculation experiments was the filamentous mold *Paecilomyces variotii* Bainier (code CMMAI 0543),  
84 acquired from the Brazilian Collection of Environment and Industry Microorganisms (CBMAI) of the  
85 Multidisciplinary Center for Chemical, Biological and Agricultural Research at the Campinas State  
86 University (CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil). The various biodiesels utilized in this research  
87 effort were synthesized at the Institute of Chemistry of the State University of Campinas (Campinas, Brazil),  
88 from refined soybean oil, spent frying oil, cotton seed oil and sesame seed oil, as described in detail in a  
89 previous research effort.

90

91 **2.1.2. Analytical equipment.** The lipid oxidation induction times of the several biodiesels studied were  
92 determined in a Biodiesel Rancimat from Metrohm AG (model 873, Herisau, Switzerland). All refractive  
93 index measurements were carried out in a Digital Refractometer from Mettler-Toledo (model Refracto  
94 30GS, Greifensee, Switzerland).

95

96

## 97 **2.2. Experimental procedures**

98

99 **2.2.1. Preparation of biodiesel samples.** Biodiesels were added with curcumin at variable (previously  
100 optimized) weight percentages of 0.1% (w/w) (biodiesel from cotton seed oil), 0.2% (w/w) (biodiesel from  
101 spent frying oil), and 0.5% (w/w) (biodiesels from sesame seed oil and soybean oil). All four biodiesels  
102 added with curcumin were also added with 1% water (w/w) and further inoculated with a sterile Drigalski  
103 loop full with mycelium from *Paecilomyces variotii* Bainier previously grown in solid nutritive medium  
104 Sabouraud Dextrose Agar in a Petri dish. All biodiesels were subsequently stored in amber glass bottles and  
105 stored during six months at 25 °C. At pre-determined time intervals (0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days),  
106 aliquots of all biodiesels were withdrawn and analyzed for refractive index (always at 25 °C), lipid oxidation  
107 induction times and presence of viable cells of *Paecilomyces variotii* Bainier. Plain biodiesel samples were  
108 also evaluated for refractive index and lipid oxidation induction time.

109

110 **2.2.2. Evaluation of the oxidative stability of biodiesels added with curcumin.** The induction  
111 period that expresses the oxidative stability was determined by following the procedure of the norm EN  
112 14112 (European Committee for Standardization, 2003), in a Biodiesel Rancimat from Metrohm AG (model  
113 873, Herisau, Switzerland). All measurements were performed in triplicate. The methodology consisted in  
114 using 3 gr of biodiesel which were heated up to 110 °C, and maintained at this temperature, under a constant  
115 air flow of 10 L•h<sup>-1</sup>.

116

117 **2.2.3. Evaluation of the antimicrobial properties of biodiesels added with curcumin.** All  
118 biodiesels prepared according to the procedure described in section 2.2.1. were screened for the presence of  
119 viable cells of *Paecilomyces variotii* Bainier. At pre-determined time intervals, 100 µL samples of each  
120 biodiesel added with curcumin and water and further inoculated with the filamentous mold were withdrawn  
121 and poured and duly spread into Petri plates containing solid Sabouraud Dextrose Agar, using a sterile  
122 Drigalski loop, with the plates being incubated during 48 hr at 25 °C in an incubation chamber from  
123 QUIMIS (model Q-316-14, Diadema, SP, Brazil). After the incubation period, all Petri plates were observed  
124 for the presence of fungal growth and any (if existing) colony forming units (CFUs) duly counted. All

125 procedures were carried out under aseptic conditions in a laminar flow chamber from Trox Technik (model  
126 FLV-II, Sorocaba, SP, Brazil). The Petri plates containing solid culture medium were prepared according to  
127 procedures from the manufacturers and following instructions from CLSI (2011).

128

### 129 **3. Results and discussion**

130

131 Undoubtedly, the major problems faced by biodiesel are related to stability. Besides exposure to air, light,  
132 high temperatures and even to the presence of metals, the most significant factors for the degradation of  
133 biodiesels (with a significant drop in quality) include the presence of (contaminating) microorganisms  
134 (Dodos et al., 2012; Passman, 2013; Borsato et al., 2014). The research work entertained herein aimed at  
135 studying the effects of the addition of curcumin to biodiesel in its oxidative stability, at the same time that  
136 maintains biodiesel as a harsh environment to prevent microbial growth. Thus, the research work undertaken  
137 aimed at following over a relatively long storage time, the effect of the addition of curcumin in the  
138 maintenance of the properties and quality of biodiesel. Firstly, recently prepared biodiesels were screened  
139 for microbial loads, but all produced negative results which is in clear agreement with the processing  
140 conditions leading to their production (Dodos et al., 2012).

141

142 **3.1. Evaluation of the oxidative stability of biodiesels added with curcumin.** Lipid oxidation  
143 induction times of the several biodiesels studied, before and after addition of curcumin and 1% (w/w) water  
144 and throughout a storage timeframe of six months, in the presence of water, can be found in Table 1 and  
145 Figure 1 as average values of three replicates and associated standard deviations. As can be seen in Figure 1  
146 and Table 1, lipid oxidation induction times (average of three determinations and associated standard  
147 deviations) of biodiesels added with curcumin in the presence of 1% (w/w) water suffered a generalized  
148 increase immediately after addition of curcumin, except in the case of biodiesel produced from soybean oil,  
149 which suffered a 16% reduction in the lipid oxidation induction time, meaning that this biodiesel was more  
150 prone to oxidation after the combined addition of water and curcumin. However, after the first month of  
151 storage, the biodiesel produced from soybean oil was relatively stable from the oxidation point of view.  
152 Except for biodiesel produced from spent frying oil (see Figure 1), where a marked decrease in oxidative

153 stability was observed throughout storage, all other biodiesels proved to be more resistant to oxidation  
154 following addition with curcumin, with only slight decreases over time in their lipid oxidation induction  
155 times (see Table 1 and Figure 1). Biodiesel produced from sesame seed oil exhibited a high oxidative  
156 stability, which was kept throughout all storage timeframe. Except for the biodiesel produced from soybean  
157 oil, lipid oxidation induction times suffered large increases, from ca. 28% in the case of biodiesel produced  
158 from sesame seed oil to ca. 41% in the case of biodiesel produced from spent frying oil, when comparing the  
159 lipid oxidation induction times of biodiesels added with curcumin with their plain counterparts (see Figure  
160 1). These results clearly demonstrate the potential of the addition of curcumin to biodiesels in maintaining  
161 (and in some cases, increasing) their oxidative stability.

162

163

**Insert Table 1 here**

164

165

**Insert Figure 1 here**

166

167 The results obtained for the Refractive Index (RI) of the several biodiesels throughout storage time are  
168 displayed in Figure 2.

169

170

**Insert Figure 2 here**

171

172 As can be observed from inspection of this Figure, an increase (although slight) of the Refractive Index of  
173 all biodiesels added with curcumin and 1% (w/w) water can be noticed throughout storage time. This trend  
174 was confirmed by performing linear adjusts to the Refractive Index data of each biodiesel, producing  
175 positive slopes, viz. 0.00051430 for biodiesel produced from cottonseed oil, 0.00040356 for biodiesel  
176 produced from sesame seed oil, 0.00053572 for biodiesel produced from spent frying oil, and 0.00043215  
177 for biodiesel produced from soybean oil (see Figure 2). The Refractive Index is a physical property that is  
178 sensitive to the effects of fatty acid oxidation, and is related to the dielectric permittivity of a material, with  
179 higher RI materials being considered highly dispersive media (such as plain vegetable oils) as compared to  
180 lower RI materials (such as biodiesels) (Sadrolhosseini et al., 2011; Wazilewski et al., 2013). In general, the  
181 refractive index of a vegetable oil reduces tremendously after the transesterification process that leads to

182 biodiesel, indicating that heavier molecules have been converted into lighter ones, enabling interface  
183 detection, enhancing lubricity and increasing functionality of the fuel oil (Raja et al., 2011; Aliyu et al.,  
184 2013). This was actually observed in the research effort described herein, viz. the Refractive Index was  
185 reduced from 1.4743 (plain soybean oil, data not shown) to 1.4561 (biodiesel produced from soybean oil,  
186 see Table 1), from 1.4620 (plain cottonseed oil, data not shown) to 1.4531 (biodiesel produced from  
187 cottonseed oil, see Table 1), from 1.4740 (plain sesame seed oil, data not shown) to 1.4522 (biodiesel  
188 produced from sesame seed oil, see Table 1), and from 1.4800 (plain spent frying oil, data not shown) to  
189 1.4572 (biodiesel produced from spent frying oil, see Table 1). Our results are, therefore, in clear agreement  
190 to what is described in the specialty literature. However, the slightly marginal trend of increase of the  
191 Refractive Index during storage reflects the maintenance of the physical properties of the several biodiesels,  
192 which is confirmed by the oxidative stability attained following addition of curcumin to all biofuels, in clear  
193 agreement with results published elsewhere (Botella *et al.*, 2006).

194

195 **3.2. Evaluation of the antimicrobial properties of biodiesels added with curcumin.** Biodiesels  
196 added with curcumin maintained a harsh environment that prevented microbial growth, which was  
197 confirmed by the screening of biodiesels for viable microbial cells throughout all storage timeframe, but all  
198 produced negative results (see Table 1 and Figure 3).

199

200

**Insert Figure 3 here**

201

202 Addition of water to biodiesel, coupled to the prevailing carbon sources in such a medium, would allow  
203 ubiquitous microorganisms (such as *Paecilomyces variotii* Bainier, a common contaminating agent in diesel  
204 fuels according to Passman (2013)) to thrive in them. However, addition of curcumin to biodiesel proved to  
205 be successful in fully preventing microbial growth (see Figure 3), which was confirmed by the research  
206 effort undertaken.

207

208

209

210

211

## 212 **4. Conclusions**

213

214 An analysis of the results obtained in the research effort described herein allows to conclude that the natural  
215 substance added to biodiesel (curcumin) presented fungistatic characteristics and was able to provide  
216 biodiesel with a harsh environment for contaminating fungi. Additionally, curcumin was able to provide  
217 oxidative stability to biodiesels produced, except for the one produced from spent frying oil which suffered  
218 a substantial decrease in its oxidative stability after only the first month of storage at room temperature. The  
219 generalized maintenance of the oxidative stability of biodiesels was supported by the observed trend in their  
220 lipid oxidation induction times. Therefore, curcumin appears as a promising antioxidant and antimicrobial  
221 natural additive for use in low mass concentrations that allows biodiesels produced from different plant  
222 sources to maintain their quality even during prolonged storage at normal ambient temperature.

223

224

## 225 **5. Acknowledgements**

226

227 Project funding by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - Brazil) (**CNPq**  
228 **Ref. No. 404808/2013-1, Project “Studies on Biodiesel: Development of analytical methods for the**  
229 **characterization and quality control, and research of new natural additives to improve the quality of**  
230 **this biofuel”**), is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq in the form  
231 of Productivity in Research (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão and Marco V. Chaud. The authors  
232 have no conflicts of interest whatsoever to declare.

233

234

235

## 236 **6. References**

237

238 Akram, M.; Uddin, S.; Ahmed, A.; Usmanghani, K.; Hannan, A.; Mohiuddin, E.; Asif, M. (2010) *Curcuma*  
239 *longa* and curcumin: a review article. *Rom. J. Biol. – Plant Biol.* **55** (2): 65-70.

240

241 Aliyu, A. O.; Nwaedozie, J. M.; Adams, A. (2013) Quality Parameters of Biodiesel Produced from Locally  
242 Sourced *Moringa oleifera* and *Citrullus colocynthis* L. Seeds Found in Kaduna, Nigeria, *International*  
243 *Research Journal of Pure & Applied Chemistry* **3** (4): 377-390.

244

245 Basile, A.; Ferrara, L.; del Pezzo, M.; Mele, G.; Sorbo, S.; Bassi, P.; Montesano, D. (2005) Antibacterial  
246 and antioxidant

247 Botella, L.; Bimbela, F.; Martín, L.; Arauzo, J.; Sánchez, J. L. (2006) Oxidation stability of biodiesel fuels  
248 and blends using the Rancimat and PetroOXY methods. Effect of 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol and catechol  
249 as biodiesel additives on oxidation stability. *Frontiers on Chemistry* **2** (43): 1-9.

250

251 activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J. Ethnopharm.* **102**: 32–36.

252 Borsato, D.; Cini, J. R. M.; Silva, H. C.; Coppo, R. L.; Angilelli, K. G.; Moreira, I.; Maia, E. C. R. (2014)  
253 Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ:  
254 Determination of activation energy. *Fuel Processing Technology* **127**: 111–116.

255

256 Bücken, F.; Santestevan, N. A.; Roesch, L. F.; Jacques, R. J. S.; Beralba, M. C. R.; Camargo, F. A. O.;  
257 Bento, F. M. (2011) Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int.*  
258 *Biodeterioration & Biodegradation* **65**: 172-178.

259

260 Castro, A. G. (2013) Study of Curcumin Influence in the Oxidative Stability of Biodiesel and Vegetable Oil  
261 [*Estudo da Influência da Curcumina na Estabilidade Oxidativa de Biodieseis e Óleos Vegetais*]. Ph.D.  
262 Thesis. Institute of Chemistry of the State University of Campinas, Campinas SP, Brazil.

263

264 Cazarolli, J. C.; Guzzato, R.; Samios, D.; Peralba, M. C. R.; Cavalcanti, E. H. S.; Bento, F. M. (2014)

265 Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria*

266 *boydii*. *Int. Biodeterioration & Biodegradation* **95**: 364 -372.

267 Coawn, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (4): 564–582.

268

269 CLSI (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational

270 Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

271

272 Dodos, G. S.; Konstantakos, T.; Longinos, S.; Zannikos, F. (2012) Effects of microbiological contamination

273 in the quality of biodiesel fuels. *Global NEST Journal* **14** (2): 175-182.

274

275 European Committee for Standardization (2003); EN 14112: 2003 - Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid

276 Methyl Esters (FAME), *Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)*, European

277 Committee for Standards (CEN), Belgium, 2003.

278

279 Kocacaliskana, I.; Talanb, I.; Terzic, I. (2006) Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as

280 allelochemicals. *Z. Naturforsch.* **61**: 639-642.

281

282 Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K.; Dalai, A. K. (2010) Production of first and second generation

283 biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 578–597.

284

285 Passman, F. J. (2013) Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980: a

286 review. *International Biodeterioration & Biodegradation* **81**: 88-104.

287

288 Perron, N. R.; Brumaghim, J.L. (2009) A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds

289 related to iron binding, *Cell Biochem. Biophys.* **53**: 75–100.

290

291 Raja, A. S.; Smart, R. D. S.; Lee, L. C. R. (2011) Biodiesel production from jatropha oil and its  
292 characterization, *Res. J. Chem. Sci.* **1** (1): 81-87.

293

294 Sadrolhosseini, A. R.; Moxsin, M. M.; Nang, H. L. L.; Norozi, M.; Yunus, W. M. M.; Zakaria, A. (2011)  
295 Physical Properties of Normal Grade Biodiesel and Winter Grade Biodiesel, *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 2100-2111  
296 (doi:10.3390/ijms12042100).

297

298 Schweigert, N.; Zehnder, A. J. B.; Eggen, E. I. L. (2001) Chemical properties of catechols and their  
299 molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiol.* **3**  
300 (2): 81-91.

301

302 Shaikh, J.; Ankola, D. D.; Beniwal, V.; Singh, D.; Ravi Kumar, M. N. V. (2009) Nanoparticle encapsulation  
303 improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with  
304 piperine as absorption enhancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**: 223-230.

305

306 Shrishail, D.; Harishk H., Ravichandra, H.; Tulsianand, G.; Shruthi, S. D. (2013) Turmeric: nature's  
307 precious medicine. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **6** (3): 10-16.

308

309 Serrano, M.; Bouaid, A.; Martinez, M.; Aracil, J. (2013) Oxidation stability of biodiesel from different  
310 feedstocks: Influence of commercial additives and purification step. *Fuel* **113**: 50–58.

311

312 Wazilewski, W., T.; Bariccatti, R. A.; Martins, G. I.; Secco, D.; de Souza, S. N. M.; Rosa, H. A.; Chaves, L.  
313 I. (2013) Study of the methyl crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability,  
314 *Industrial Crops and Products* **43**: 207–212.

315

316 Zimmer, A.; Cazarolli, J.; Teixeira, R. M.; Viscardi, S. L. C.; Cavalcanti, E. S. H.; Gerbase, A. E.; Ferrão,  
317 M. F.; Piatnicki, C. M. F.; Bento, F. M. (2013) Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60  
318 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *Fuel* **112**: 153–162.

319 **FIGURE CAPTIONS**

320

321 Figure 1: Oxidative stability of the several biodiesels produced, following addition with 1% water  
322 (w/w) and variable mass percentages of curcumin, and further inoculated with the ubiquitous  
323 filamentous fungi *Paecilomyces variotii* Bainier.

324

325 Figure 2: Evolution of the Refractive Index of the several biodiesels added with 1% water (w/w) and  
326 variable mass percentages of curcumin, and further inoculated with the ubiquitous  
327 filamentous fungi *Paecilomyces variotii* Bainier, throughout storage time.

328

329 Figure 3: Demonstration of the fungistatic properties of curcumin upon addition to biodiesels produced  
330 from spent frying oil (**a<sub>i</sub>**), soybean oil (**b<sub>i</sub>**), cotton seed oil (**c<sub>i</sub>**) and sesame seed oil (**d<sub>i</sub>**).  
331 (Legend: **a1**, **b1**, **c1**, **d1** - growth inhibition halo produced by the optimum minimum  
332 concentration of curcumin in the presence of 1% (w/w) ultrapure water, indicated by the  
333 inserted arrow); **a2**, **b2**, **c2**, **d2** - results from the screening for viable cells of the filamentous  
334 fungi in solid Sabouraud Dextrose Agar at the beginning of the storage timeframe; **a3**, **b3**, **c3**,  
335 **d3** - results from the screening for viable cells of the filamentous fungi in solid Sabouraud  
336 Dextrose Agar at the end of the third month of storage; **a4**, **b4**, **c4**, **d4** - results from the  
337 screening for viable cells of the filamentous fungi in solid Sabouraud Dextrose Agar at the  
338 end of the sixth month of storage.)

339

340

341



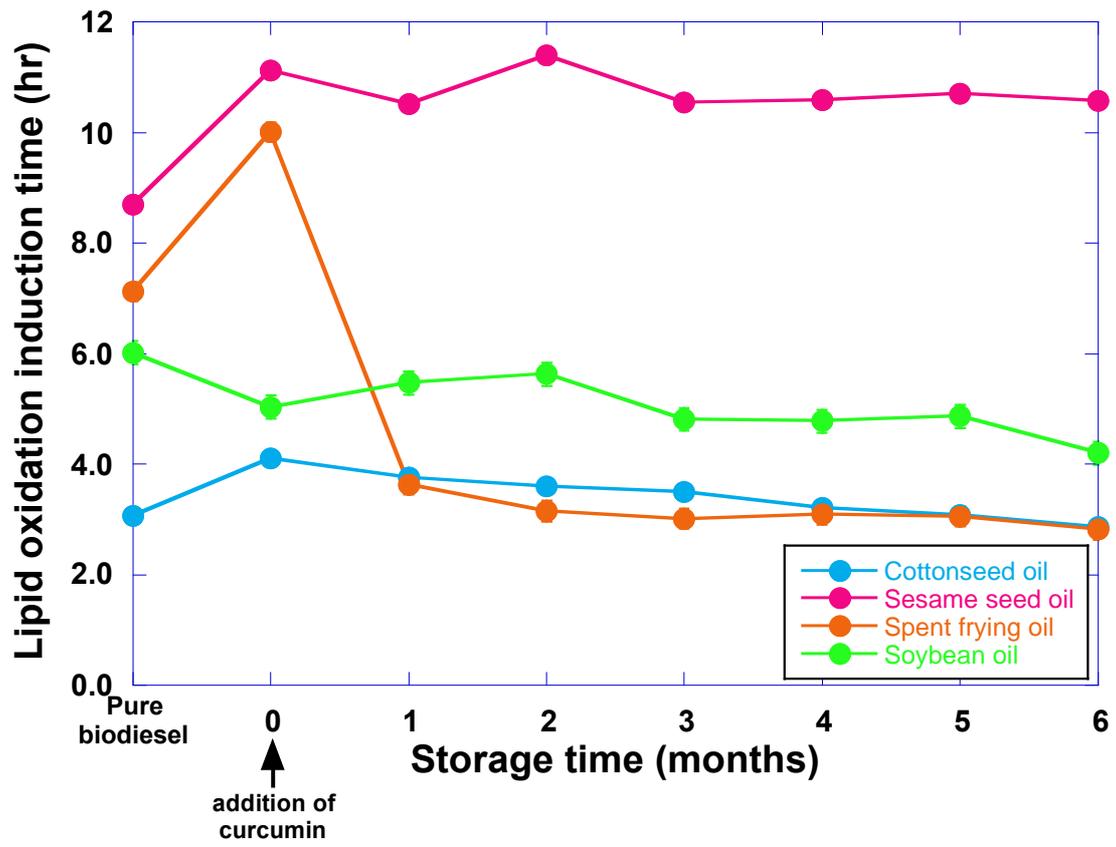


Figure 1

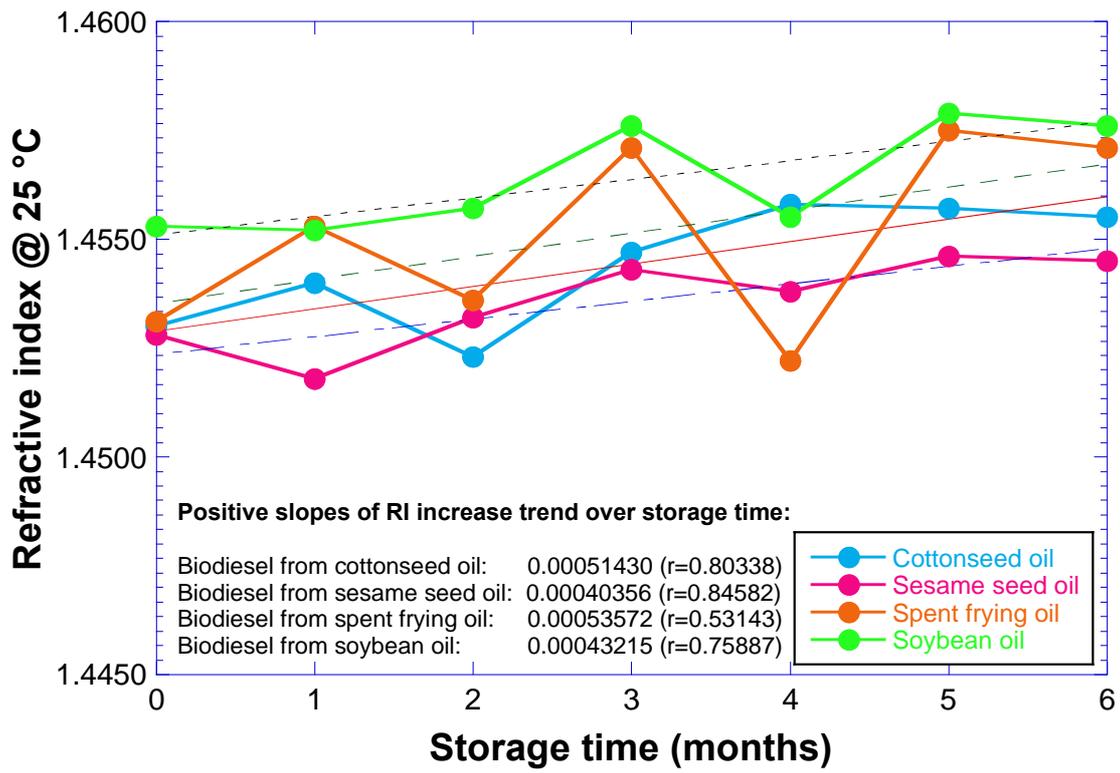
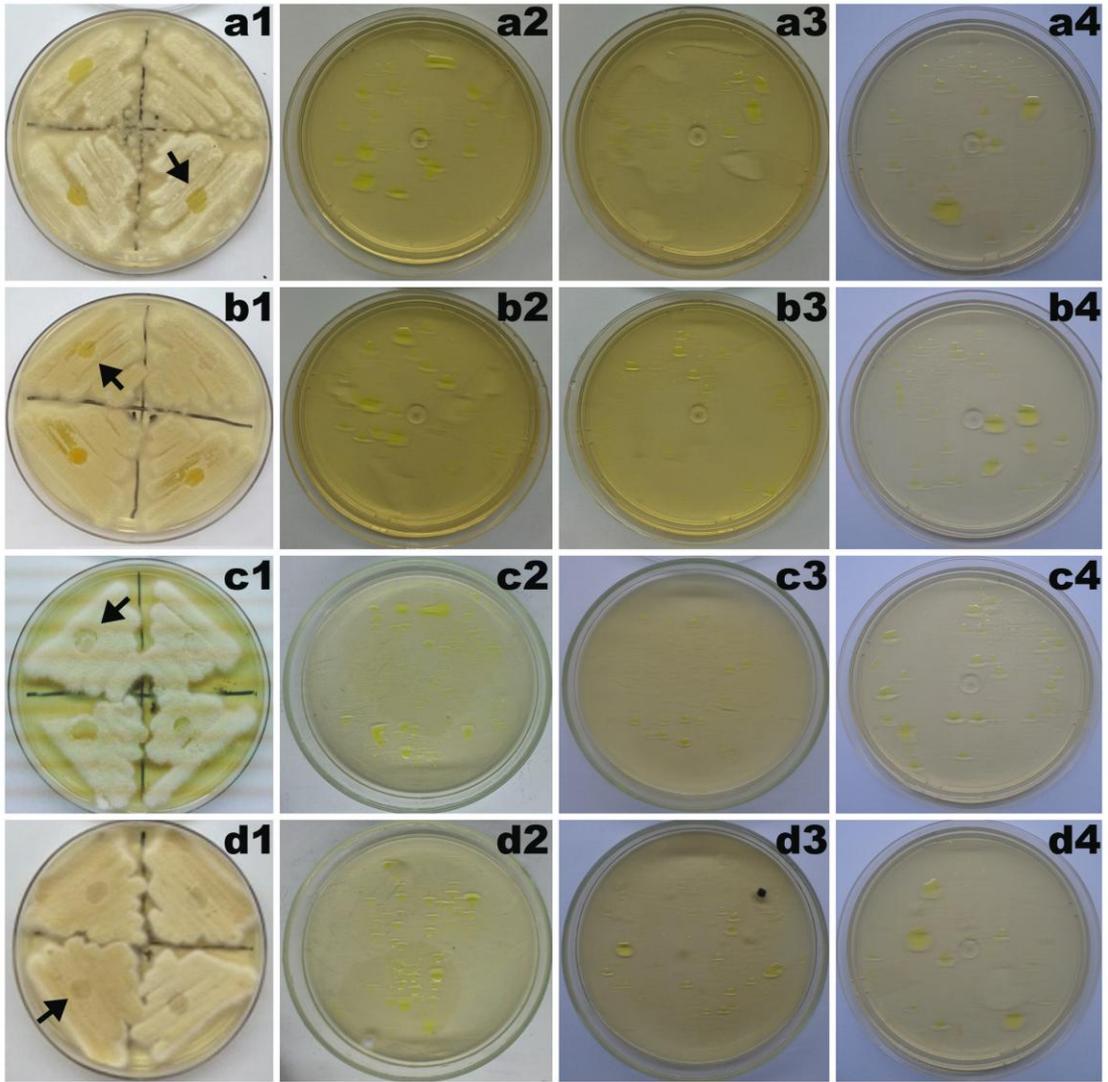


Figure 2



*Figure 3*