

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE BIODIESEL VEGETAL EM ORGANISMOS AQUÁTICOS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA

TOXICITY ASSESSMENT OF VEGETABLE BIODIESEL IN AQUATIC ORGANISMS: A COMPARATIVE ANALYSIS

Gabriel Marcos da Silva¹; Paloma Kachel Gusso-Choueri¹, Vitor da Silva Rosa².

¹Universidade Santa Cecília, Laboratório de Ecotoxicologia.

²Universidade Santa Cecília, Laboratório de Operações Unitárias.

E-mail para contato: gabrielmarcosgms@gmail.com

*RESUMO – A emergente inclusão de combustíveis sustentáveis na Matriz Energética Mundial implica na avaliação da toxicidade destes compostos como meio de proteger o meio ambiente. O trabalho determina a toxicidade de duas formulações de biodiesel produzidos em laboratório a partir de óleos vegetais de amendoim e soja. Para tanto realizou-se a extração dos grãos com hexano e produção de biodiesel via transesterificação metílica. A toxicidade foi testada por meio do crustáceo de água doce *Daphnia similis*. Os resultados foram comparados estatisticamente e pela concentração de efeito capaz de imobilizar 50% dos organismos (EC50). O estudo permitiu inferir que a matéria-prima influencia na carga tóxica de biocombustíveis, possivelmente por composição química do grão e aspectos produtivos.*

Palavras-chave: Biodiesel, óleo vegetal, *Daphnia similis*, ecotoxicologia, transesterificação.

*ABSTRACT – The emerging inclusion of sustainable fuels in the Global Energy Matrix implies the need to assess the toxicity of these compounds as a mean of protecting the environment. This study determines the toxicity of two biodiesel formulations lab-produced from peanut and soybean vegetable oils. Thus, the grains were extracted with hexane, and biodiesel was produced via methyl transesterification. Toxicity was tested using the freshwater crustacean *Daphnia similis*. The results were statistically compared and evaluated based on the effect concentration capable of immobilizing 50% of the organisms (CE50). The study allowed inferencing that the raw material influences the toxic load of biofuels, possibly due to the chemical composition of the grain and production aspects.*

Keywords: Biodiesel, vegetable oil, *Daphnia similis*, ecotoxicology, transesterification.

1 INTRODUÇÃO

A Matriz Energética Mundial (MEM) revela um cenário preocupante pela forte dependência de combustíveis fósseis. Em 2021, petróleo e carvão corresponderam a 56,7% da composição global (IEA, 2023), proporção considerada alarmante diante dos impactos ambientais associados. A combustão de cada galão desses derivados libera cerca de 2,5 kg de CO₂ na atmosfera, intensificando o “efeito estufa” e desencadeando consequências como elevação do nível do mar e aumento das temperaturas globais (Rattner, 2011). Nesse contexto, a substituição parcial ou total desses combustíveis por fontes renováveis mostra-se imprescindível. Os biocombustíveis destacam-se por reduzir significativamente a emissão de gases poluentes e contribuir para a mitigação do aquecimento global (Urquiaga; Alves; Boodey, 2005).

Entre as rotas de produção de biocombustíveis, a transesterificação ocupa posição de destaque. O processo consiste na substituição da glicerina dos óleos vegetais por um álcool (metanol ou etanol) em três reações consecutivas, que convertem triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, liberando ésteres metílicos ou etílicos, conhecidos como biodiesel. A reação, catalisada por ácidos ou bases, é eficiente e amplamente empregada, tendo seu biodiesel resultante apresentando características adequadas ao uso em motores a diesel convencionais, com menor viscosidade, excelente lubrificidade, biodegradabilidade e emissões reduzidas de compostos de enxofre e CO₂, contribuindo assim para a mitigação do efeito estufa (Quessada et al., 2010).

Contudo, a sustentabilidade do biodiesel não exclui preocupações quanto à sua toxicidade. Nesse ponto a Ecotoxicologia assume papel essencial ao avaliar os efeitos de contaminantes em ecossistemas, sobretudo aquáticos (Bownik, 2017; Zagatto, 1988). Integrando conhecimentos de diversas áreas, a Ecotoxicologia utiliza ensaios padronizados capazes de prever impactos ambientais e auxiliar na preservação dos recursos naturais. Entre os organismos-teste mais utilizados está a *Daphnia similis*, microcrustáceo de água doce amplamente empregado devido à sua elevada sensibilidade, facilidade de cultivo e aplicabilidade em ensaios de toxicidade baseados em EC50 e LC50 (Bownik, 2017; Zagatto, 1988). Considerada uma espécie bioindicadora por reagir rapidamente a alterações ambientais

e possuir ciclo de vida curto, a espécie consolidou-se como modelo experimental (Amorim, 2003; Lee et al., 2015).

Assim, investigações comparativas sobre a toxicidade de biodieseis produzidos a partir de diferentes matérias-primas tornam-se fundamentais, permitindo identificar alternativas menos agressivas ao meio ambiente e fortalecendo a busca por uma matriz energética mais sustentável.

O presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar a toxicidade de duas formulações de biodiesel produzido em laboratório a partir de óleos vegetais para o organismo aquático *Daphnia similis*, sendo o primeiro biocombustível proveniente do óleo de amendoim e o segundo do óleo de soja.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para os biocombustíveis de soja e amendoim, o presente estudo experimental foi conduzido em três etapas principais: I) extração dos óleos vegetais; II) produção do biodiesel; III) avaliação da toxicidade aguda utilizando *Daphnia similis*. As atividades foram realizadas em parceria entre os laboratórios de Operações Unitárias e de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, em Santos, responsáveis pela disponibilização de instrumentos, reagentes e organismos necessários.

Para estimar a quantidade de matéria-prima, foram considerados os teores médios de óleo presentes nos grãos de amendoim e soja, de 47,5% e 19%, respectivamente (Quessada et al., 2010). Assim, para a obtenção de 100 mL de biodiesel de cada oleaginosa, admitindo densidade do biodiesel de 0,877 g/mL a 25 °C (Geris et al., 2007), estimou-se a necessidade de aproximadamente 41,66 g de grãos de amendoim e 16,66 g de grãos de soja. Portanto, para que não houvesse falta durante a execução, foram pesados em balança comum 50g de soja e 86g de amendoim. As sementes passaram por um pré-tratamento consistido em lavagem com água destilada, secagem em estufa por duas horas, moagem em liquidificador e armazenamento em geladeira, de modo a adequá-las ao processo e reduzir possíveis contaminações (Oliveira et al., 2021; Potrich, 2019)

A extração dos óleos foi realizada pelo método Soxhlet com solvente hexano, técnica amplamente utilizada devido ao seu elevado rendimento (Abdelmahmoud; Alhussein; Gasmelseed, 2024). Após o processo, o solvente foi removido por destilação, considerando seu baixo ponto de ebulição de 69 °C (“FISPQ-Hexano-6”, 2016), e o óleo obtido foi submetido a filtração para eliminação de resíduos sólidos (Potrich, 2019). Tal procedimento foi executado até a obtenção de ao menos 60 ml de cada produto.

A produção do biodiesel foi conduzida via transesterificação metílica em meio ácido, empregando metanol como reagente e ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador. Este foi adicionado em cerca de 0,5% da massa de metanol, podendo ter sido ajustado o percentual para evitar a formação de sabões indesejados por saponificação (Quessada et al., 2010). A proporção de 3 mol de metanol para cada mol de triglicerídeo foi levada em conta, mas dada a evidente reversibilidade da reação o álcool foi posto em excesso (Geris et al., 2007). O processo ocorreu em balão de 3 bocas sob temperatura de 65 °C a 70 °C por 2 horas com agitação. Ao final, a separação do biodiesel e do glicerol foi realizada em funil de decantação, em razão da maior densidade do glicerol, que foi removido pela parte inferior (Quessada et al., 2010). Quanto aos valores da parte experimental, tivemos 60,5g de óleo de amendoim reagindo com 61,7g de metanol e 1,8g de ácido sulfúrico; e 61g do óleo de soja misturados com 63g do mesmo álcool e 1,9g do mesmo ácido.

Com o biodiesel disponível, a avaliação da toxicidade seguiu a norma ABNT NBR 12713 (2016), com utilização de neonatas de *Daphnia similis* com 24h de vida, cultivadas em água reconstituída com pH entre 7,0 e 7,6, dureza de 40 a 48 mg $CaCO_3/L$ e temperatura de 20 °C. Considerando a viscosidade do biodiesel, empregou-se a técnica de fração solúvel em água (FSA), conforme NBR 15469. Tal técnica consiste na mistura de uma parte de biodiesel em nove partes de água de diluição, mantida sob agitação contínua por 20 horas em ausência de luz, seguida de repouso por 60 minutos em funil de decantação. A fração solúvel obtida foi utilizada para a preparação dos ensaios (ABNT NBR 15469, 2021).

A priori dos ensaios com os biocombustíveis, foram realizados ensaios de sensibilidade com substância referência cloreto de potássio para atestar a viabilidade dos organismos. Foram então, realizados dois ensaios distintos, um para o biodiesel de amendoim e outro para o de

soja, cada qual com diversas concentrações obtidas a partir de fator de diluição. As soluções foram distribuídas em tubos de ensaio de igual volume, contendo cinco organismos por réplica, totalizando quatro réplicas por concentração. Os ensaios foram mantidos em condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C) e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro). Após 48 horas, foi contabilizado o número de organismos imóveis em cada réplica, conforme (ABNT NBR 12713, 2016). Os resultados obtidos permitiram a determinação do EC50 de cada biodiesel, valor que representa a concentração capaz de afetar 50% dos organismos expostos (ABNT NBR 12713, 2016). A análise estatística foi realizada pelo método de Spearman-Kärber, amplamente aplicado em ensaios ecotoxicológicos. Adicionalmente, os valores de EC50 foram convertidos em Unidades Tóxicas agudas (UTa), segundo a relação proposta por Hamilton, Russo e Thurston (Hamilton; Russo; Thurston, 2002):

$$UTa = \frac{100}{EC(L)_{50}} \quad (1)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizados os testes de toxicidade em ambos os biodieseis, foi avaliada após 48 horas a mortalidade de organismos em cada concentração. Os resultados com relação ao número de indivíduos mortos ou imóveis estão apresentados nas tabelas 1 para soja e 2 para amendoim; enquanto as respectivas porcentagens de mortalidade estão representadas nas figuras 1 para soja e 2 para amendoim. Tais dados tornam possíveis o cálculo de EC50, toxicidade do produto e análise comparativa entre as substâncias avaliadas.

Os resultados do ensaio de sensibilidade realizado com o lote de organismos utilizados no presente estudo (CE50 48 horas = 411 mg/L) encontram-se dentro dos limites estabelecidos na carta-controle do laboratório (faixa de sensibilidade aceitável: 249,0 mg/L a 410,36 mg/L de KCl).

Tabela 1: Tabela de resultados do teste com biodiesel de soja, número de organismos mortos ou imóveis por concentração e por réplica.

Concentrações	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Média	Desvio Padrão
Controle	0	0	0	0	0,00	0,00
100,00%	5	5	5	5	5,00	0,00
50,00%	5	5	5	5	5,00	0,00
25,00%	4	3	4	4	3,75	0,50
12,50%	4	2	4	5	3,75	1,26
6,25%	4	0	1	2	1,75	1,71
3,13%	1	0	2	2	1,25	0,96
1,56%	0	3	2	4	2,25	1,71
0,78%	1	1	2	3	1,75	0,96
0,39%	2	0	0	2	1,00	1,15
0,20%	1	1	0	1	0,75	0,50

Figura 1: Gráfico de percentual de mortalidade de organismos por concentração de biodiesel de soja.

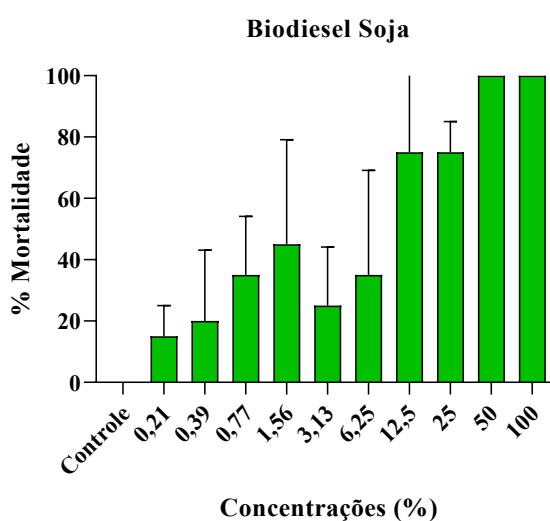
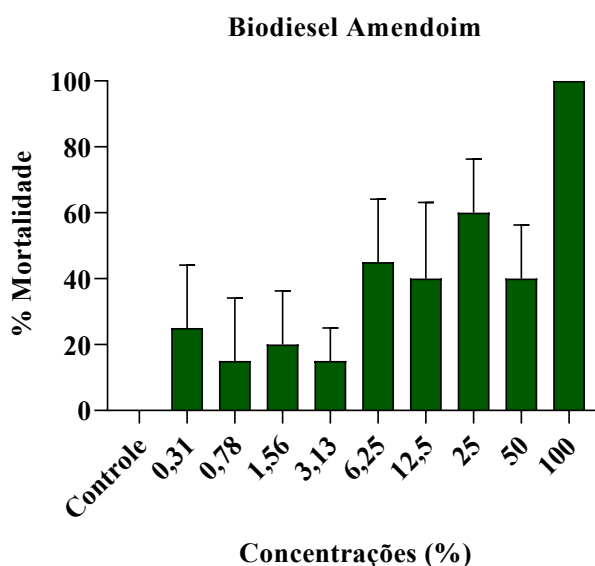


Tabela 2: Tabela de resultados do teste com biodiesel de amendoim, número de organismos mortos ou imóveis por concentração e por réplica.

Concentrações	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Média	Desvio Padrão
Controle	0	0	0	0	0,00	0,00
100,00%	5	5	5	5	5,00	0,00
50,00%	2	1	3	1	1,75	0,96
25,00%	4	2	3	3	3,00	0,82
12,50%	3	3	1	1	2,00	1,15
6,25%	3	1	2	3	2,25	0,96
3,13%	1	1	1	0	0,75	0,50
1,56%	2	1	0	1	1,00	0,82
0,78%	2	0	1	0	0,75	0,96
0,39%	0	2	1	2	1,25	0,96

Figura 2: Gráfico de percentual de mortalidade de organismos por concentração de biodiesel de amendoim.



A análise dos resultados evidencia diferenças significativas quanto à toxicidade dos biocombustíveis avaliados. O biodiesel de soja apresentou valores de EC50 de 6,12% de FSA, enquanto o biodiesel de amendoim, apresentou EC50 de 8,6% de FSA. Ressalta-se que quanto menor o valor numérico da concentração de efeito, mais tóxica é considerada a substância em análise, pois logicamente foi necessária menor concentração para atingir 50% da mortalidade ou imobilização dos organismos.

A conversão em unidades tóxicas, conforme a equação (1), resultou em valores de UTA de 16,34 UT para o biodiesel de soja e 11,63 UT para o biodiesel de amendoim. Esses resultados evidenciam, de forma mais clara, a diferença entre as cargas tóxicas das duas formulações de biocombustíveis, permitindo uma comparação mais precisa de seus potenciais impactos ambientais.

Embora os valores máximos e mínimos calculados estejam muito próximos, se observa que o biodiesel provindo da soja é mais tóxico, determinando que sim, a matéria-prima vegetal escolhida para produção de biocombustíveis que passaram pelo exato mesmo processo de fabricação influencia no impacto tóxico causado pelo produto.

Motivos para tal diferença de toxicidade podem provir da composição de ácidos graxos dos grãos, já que a soja é rica em ácido linoleico (Government of Canada, 2021) e o amendoim por natureza é rico em ácido oleico (Davis et al., 2016). Tal fator poderia vir a ser determinante para os efeitos de mortalidade causados nas *Daphnia similis*, dado que os ácidos são importantes para o corrimento da reação química de produção.

Deve-se investigar também as condições de cultivo desses vegetais, uma vez que as diferenças químicas podem ter origem na aplicação de aditivos ao solo. A soja geralmente exige um solo mais enriquecido, sendo comum a utilização de gesso agrícola, compostos fosfatados e potássicos (Sousa'; Lobato', 1996). Já o amendoim, por sua vez, muitas vezes necessita apenas de calagem, com adição de calcário dolomítico, para alcançar boa produtividade ("BASF", [S.d.]).

Mas ainda ressalta-se a importância do biodiesel em detrimento do diesel comum, pois a literatura relata, para *Daphnia magna*, uma clara diferença de níveis toxicológicos entre diesel e biodiesel, com este último destacando-se pelo nível de mortalidade dos organismos de 2,5 a

4 vezes menor que o primeiro, o que reflete em segurança ambiental em corpos aquáticos quando se utiliza combustíveis verdes (Müller et al., 2019). O diesel de Müller et al (2019) atingiu 50% de mortalidade dos organismos na concentração de 39,56%, valor elevado em comparação também com os biocombustíveis deste estudo. Mesmo tendo em vista que *Daphnia magna* e *Daphnia similis* são organismos diferentes, tal fato não anula a maior toxicidade do diesel convencional em detrimento do biocombustível verde.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo evidencia que o biodiesel de amendoim apresenta menor toxicidade ambiental em comparação ao de soja, configurando-se como alternativa mais segura para a redução dos impactos de vazamentos e contaminações em ecossistemas aquáticos. Embora não seja isento de riscos, sua utilização contribui para a diminuição de gases de efeito estufa, avanço da sustentabilidade energética e fortalecimento da produção agrícola local, desde que sejam observadas as práticas adequadas de descarte e manejo de subprodutos como o glicerol. Os agradecimentos deste trabalho vão aos laboratórios de Ecotoxicologia e de Operações Unitárias da Universidade Santa Cecília por cederem seu espaço e materiais necessários para realização do estudo, e ao CNPq pelo incentivo financeiro disponibilizado.

5 REFERÊNCIAS

ABDELMAHMOUD, Esra Faisal Musa; ALHUSSEIN, Adil Ali Mohammed; GASMELSEED, Gurashi Abdalla. Oil Extraction from Oil Cake. **Journal of Karary University for Engineering and Science**, 30 set. 2024.

ABNT NBR 12713: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). [S.l.]: Abnt, 2016.

ABNT NBR 15469 (2021) - Ecotoxicologia - Coleta, Preservação e Preparo de Amostras | PDF | Salinidade | Solubilidade. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/856870197/ABNT-NBR-15469-2021-Ecotoxicologia-Coleta-preservac-a-o-e-preparo-de-amstras>>. Acesso em: 4 out. 2025.

AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158–170, jun. 2003.

BOWNIK, Adam. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 194–205, 1 dez. 2017.

DAVIS, J. P. *et al.* Peanut Oil Stability and Physical Properties Across a Range of Industrially Relevant Oleic Acid/Linoleic Acid Ratios. **Peanut Science**, v. 43, n. 1, 1 jan. 2016.

FISPQ-Hexano-6.pdf. , 2016. Disponível em: <<https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2018/10/FISPQ-Hexano-6.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2025

GERIS, Regina *et al.* Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, p. 1369–1373, out. 2007.

GOVERNMENT OF CANADA, Canadian Grain Commission. **Fatty acid composition: Quality of Canadian soybean oilseed-type 2021**. Disponível em: <https://www.grainscanada.gc.ca/en/grain-research/export-quality/oilseeds/soybean-oil/2021/05-fatty-acid-composition.html?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 27 jul. 2025.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in bioassays**. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es60140a017>>. Acesso em: 21 maio. 2024.

IEA. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica>>. Acesso em: 26 maio. 2024.

LEE, Jin Wuk *et al.* Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. **Journal of Environmental Sciences**, v. 35, p. 115–127, 1 set. 2015.

MÜLLER, Juliana Braun *et al.* Comparative assessment of acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 221, p. 640–646, abr. 2019.

OLIVEIRA, Auanna Marcelly Soares de *et al.* Avaliação físico-química do óleo extraído de amendoim (*arachis hypogaea*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e49710112011–e49710112011, 25 jan. 2021.

POTRICH, Erich. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA. 2019.

QUESSADA, Talita Pedrosa *et al.* OBTENÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA E MILHO UTILIZANDO CATALISADORES BÁSICOS E CATALISADOR ÁCIDO. 2010.

RATTNER, Henrique. Mudanças climáticas: aquecimento e esfriamento. 2011.

SOUSA', Ojalma M. G.; LOBATO', Edson. Correção do Solo e Adubação da Cultura da Soja. 1996.

Um pouco mais sobre o cultivo do amendoim | BASF. Disponível em: <<https://agriculture.basf.com/br/pt/conteudos/cultivos-e-sementes/amendoim/um-pouco-mais-sobre-o-cultivo-do-amendoim>>. Acesso em: 10 ago. 2025.

URQUIAGA, Segundo; ALVES, Bruno José Rodrigues; BOODEY, Roberto Michael. Produção de biocombustíveis A questão do balanço energético. **Revista de Política Agrícola**, v. 14, n. 1, p. 42–46, 2005.

ZAGATTO, Pedro Antônio. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. **Revista Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 79–83, 1 jun. 1988.