

ANDRESSA CAROLINE NEVES

AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DE  
MICROORGANISMOS PRESENTES EM ÓLEO DIESEL

CASCVEL  
PARANÁ – BRASIL  
MARÇO - 2018

ANDRESSA CAROLINE NEVES

AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DE  
MICROORGANISMOS PRESENTES EM ÓLEO DIESEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia de Energia na Agricultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Energia na Agricultura, área de concentração Agroenergia.

Orientador: Helton José Alves

Coorientador: Fábio Rogério Rosado

CASCABEL  
PARANÁ – BRASIL  
MARÇO - 2018.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas - UNIOESTE)

N422a Neves, Andressa Caroline.  
Avaliação da radiação ultravioleta na inativação de microrganismos presentes em óleo diesel / Andressa Caroline Neves. --- Cascavel (PR), 2018.  
66 f.:il.

Orientador: Helton José Alves  
Co-orientador: Fábio Rogério Rosado  
Dissertação (Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura) –  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018,  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Energia na Agricultura.  
Inclui Bibliografia

1. Biodiesel. 2. Contaminação microbiológica. 4. Biodegradabilidade. I.  
Alves, Helton José. II. Rosado, Fábio Rogério. III. Universidade Estadual do  
Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 621.042

Rosângela A. A. Silva – CRB 9ª/1810

**ANDRESSA CAROLINE NEVES**

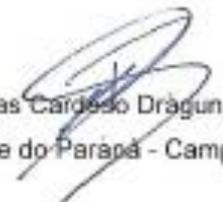
**"AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DE  
MICROORGANISMOS PRESENTES EM ÓLEO DIESEL"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Energia na Agricultura, área de concentração Agroenergia, linha de pesquisa Biocombustíveis, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



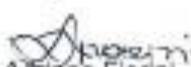
Orientador(a) - Helton José Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Douglas Cardoso Drăgunski

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)



Adriana Fiorini

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)



Rodrigo Sequinel

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Cascavel, 23 de março de 2018

*“Por todos aqueles em que o destino e a vida pediram para embarcar em busca dos seus sonhos, se distanciarem dos que mais amam e pagar alto preço de viver longe de casa. Nos que viemos não estamos livres do medo e de tantas fraquezas, mas estamos sempre livres do medo de nunca termos tentado.”*

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

*Charles Chaplin*

*“Uma mente necessita de livros da mesma forma que uma espada necessita de uma pedra de amolar se quisermos que se mantenha afiada.”*

*George R. R. Martin*

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus pela força, fé e vontade para conquistar meus ideais;

À UNIOESTE por fornecer os recursos para a realização desta pesquisa;

À assistente do Programa Vanderléia L. S. Schmidt por todo prontidão;

À Capes pelo incentivo financeiro concedido;

A Universidade Federal do Paraná por fornecer recursos e equipamentos para a realização desta pesquisa;

Ao meu orientador professor Dr. Helton José Alves por todo apoio, auxílio, orientação e compreensão em vários momentos;

Ao meu coorientador professor Dr. Fábio Rogério Rosado pela orientação e ajuda nos experimentos;

À Prof. Dr. Adriana Fiorini pelos ensinamentos e contribuições no aprimoramento da pesquisa;

Aos membros da banca pelas valiosas contribuições e sugestões no trabalho;

Aos técnicos e colegas do Laboratório de Catálise e Produção de Biocombustíveis;

Aos amigos Fernanda, Aline, Bárbara, Rafaela, Maristela, Michael e ao meu namorado Alex por toda compreensão, ajuda, paciência e amor;

A minha família e principalmente a minha mãe, a mulher que me deu tudo para seguir em frente, esteve sempre ao meu lado com apoio incondicional, me protegendo e sempre me incentivando.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Consumo final de energia por fonte.....	5
<b>Figura 2.</b> Reação de obtenção de biodiesel: (a) transesterificação; (b) esterificação.	7
<b>Figura 3.</b> Perfil nacional de matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel. .	7
<b>Figura 4.</b> Percentual de matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel na região Sul. ....	8
<b>Figura 5.</b> Não conformidades de óleo diesel B8 .....	9
<b>Figura 6.</b> Tanque de estocagem que apresenta contaminação microbiana na interface óleo/água.....	15
<b>Figura 7.</b> Esquema gráfico do reator de radiação ultravioleta. ....	23
<b>Figura 8.</b> Reator com radiação ultravioleta (a: quadro elétrico; b: reator completo; c: tanque de armazenamento). ....	24
<b>Figura 9.</b> Colunas de reação com lâmpadas ultravioletas. ....	24
<b>Figura 10.</b> Locais de coleta de amostra (a: coleta inferior do tanque esquerdo; b: coleta central no tanque esquerdo; c: coleta inferior do tanque direito).....	25
<b>Figura 11.</b> Absorbância dos ensaios em decorrência do tempo de exposição à radiação UV.....	33
<b>Figura 12.</b> Perfil de quantificação de células viáveis nos ensaios. ....	34
<b>Figura 13.</b> Espectro de varredura das amostras do ensaio B e C (com inóculo).....	41
<b>Figura 14.</b> Espectro de varredura das amostras do ensaio D e E (sem inóculo).....	42
<b>Figura 15.</b> Viscosidade cinemática à 25°C dos ensaios .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Especificações do óleo diesel de acordo com a ANP. ....	11
<b>Tabela 2.</b> Microrganismos: arqueias, bactérias e fungos (filamentosos e leveduriformes) isolados em óleo diesel, biodiesel e misturas .....	16
<b>Tabela 3.</b> Condições experimentais dos diferentes ensaios. ....	26
<b>Tabela 4.</b> Identificação de bactérias isoladas dos ensaios. ....	37
<b>Tabela 5.</b> Relação dos meses de coleta com a identificação molecular .....	38
<b>Tabela 6.</b> Resultado do teste de biodegradabilidade após 24 horas .....	39
<b>Tabela 7.</b> Resultado do teste de biodegradabilidade após 48 horas .....	39
<b>Tabela 8.</b> Resultado do teste de biodegradabilidade após 96 horas .....	40
<b>Tabela 9.</b> Diferença de temperatura das amostras, no sistema com e sem circulação .....	43
<b>Tabela 10.</b> Caracterização físico-química de massa específica à 20°C .....	44

NEVES, Andressa Caroline. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, março de 2018. **Avaliação da radiação ultravioleta na inativação de microrganismos presentes em óleo diesel.** Prof. Dr. Helton José Alves, Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado

## RESUMO

A adição do biodiesel ao óleo diesel é obrigatória desde 2008, e até 2018 o percentual atualmente é de 8% (B8) pode atingir até 15% (B15), de acordo com a Lei nº 13.263 de 23/03/2016. Diferente do diesel fóssil, o biodiesel apresenta uma quantidade elevada de ligações insaturadas, sítios ativos carboxílicos que conferem caráter higroscópico ao combustível, o que torna suscetível a degradações. Durante o armazenamento pode ocorrer a degradações microbiológicas, onde na presença de umidade, contato com oxigênio, luz e temperatura fornece um ambiente favorável à proliferação de microrganismos, que levam à degradação do combustível, sendo que a biomassa resultante ocasiona diversos problemas no motor. Com a redução destes microrganismos é possível aumentar o tempo de estocagem de óleo diesel comercial, favorecendo a distribuição e comercialização em um país continental, como o Brasil. Algumas alternativas têm sido utilizadas para contornar este tipo de problema, como é o caso dos aditivos químicos, porém apresentam desvantagem, como o aumento do custo do produto final e a geração de resíduos. O objetivo deste trabalho é identificar e quantificar microrganismos presentes em óleo diesel, e diminuir o crescimento microbiológico utilizando radiação ultravioleta. Foram coletadas amostras de óleo diesel S10 (teor máximo de enxofre de 10 mg kg<sup>-1</sup>), em distintos períodos ao longo do ano. As amostras de diesel comercial foram adicionadas num reator composto por lâmpadas de radiação ultravioleta (40W) com 253nm e sistema de circulação. Os testes foram realizados em diferentes tempos de contato com a radiação ultravioleta (de 0 a 360 min), variando-se o volume de amostra (40 e 60 L) e a utilização ou não do sistema de circulação. Os microrganismos presentes no óleo diesel S10 B8 antes e após o tratamento foram quantificados pela técnica de microgota e método espectrofotométrico em 600nm e identificados por sequenciamento genético. O efeito da radiação sobre as propriedades físico-químicas do combustível foi avaliado por: diferenciação espectrofotométrica, massa específica à 20 °C, viscosidade cinemática e realizado o acompanhamento da temperatura. A combinação de 360 minutos de radiação, com circulação do sistema proporcionou uma diminuição de 1,50x10<sup>10</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para 3,33x10<sup>2</sup> UFC mL<sup>-1</sup> na concentração de microrganismos. Sobre as propriedades físico-químicas do óleo diesel, a máxima exposição à radiação não ocasionou alterações sobre os aspectos físico-químicos. Foram identificados microrganismos dos gêneros: *Staphylococcus sp.*; *Clostridium sp.*; *Enterococcus sp.*; *Enterobacter sp.* e *Bacillus sp.*, ao qual apresentaram alto potencial de degradação de óleo diesel e blendas, onde após 96 horas de incubação as amostras foram degradadas. Com isso pode-se concluir que a utilização da radiação UV como método de controle microbiológico diminuiu a concentração de microrganismos presentes, em torno de 99%, com isso aumentando o tempo de estocagem do combustível.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodiesel, contaminação microbiológica, biodegradabilidade.

NEVES, Andressa Caroline. State University of West Parana, march, 2018.  
**Evaluation of ultraviolet radiation in the inactivation of microorganisms present in diesel oil.** Prof. Dr. Helton José Alves, Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado

### ABSTRACT

The addition of biodiesel in the diesel oil is mandatory since 2008, and until 2018 the percentage who currently is 8% (B8) can reach up to 15% (B15), according to the law n° of 13,263 23/03/2016. But biodiesel is susceptible to degradation by unsaturated bonds and high hygroscopicity. During storage the microbiological degradation may occur, caused by contamination of microorganisms, mainly by the presence of water, where in contact with oxygen, light and temperature, provides a favourable environment for the proliferation of microorganisms, generating the formation of biomass that causes various engine problems. With the reduction of these microorganisms is possible to increase the storage time of commercial diesel, favoring the distribution and marketing in a country, such as Brazil. Some alternatives have been used to circumvent this kind of problem, as is the case with chemical additives, but present a disadvantage, as the rising cost of the final product and the generation of waste. The aim of this study is to identify, quantify and inactivate microorganisms present in diesel oil by using ultraviolet radiation to eliminate and/or reduce microbiological growth. We collected samples of diesel S10 (maximum sulphur content of 10 mg kg<sup>-1</sup>), from different periods throughout the year. Commercial diesel samples were added in a reactor composed of ultraviolet lamps (40W) and circulation system. The tests were conducted at different times of contact with ultraviolet radiation (from 0 to 360 min), varying the sample volume (40 and 60 L) and the use or non-use of the circulation system. The microorganisms present in the diesel S10 B8 before and after treatment were quantified by the technique of microdrop and absorbance, and identified by genetic sequence. The effect of radiation on physical and chemical properties of fuel was rated by: differentiation, temperature, mass spectrometric specifies the 20°C and kinematic viscosity. The combination of 360 minutes of radiation, with circulation of the system provided a decrease of 1, 50x10<sup>10</sup> UFC mL<sup>-1</sup> for 3, UFC 33x10<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup> in concentration of microorganisms. On the physico-chemical properties of diesel oil, the maximum exposure to radiation caused changes on the physical and chemical aspects. Microorganisms of the genera were identified: *Staphylococcus sp.*; *Clostridium sp.*; *Enterococcus sp.*; *Enterobacter SP.* and *Bacillus sp.*, which presented high potential for degradation of diesel oil and blends, where after 96 hours of incubation, the samples were oxidized. With this we can conclude that the use of UV radiation as a method for microbiological control inativou and/or decreased the microorganisms present, increasing storage of fuel.

**KEYWORDS:** Biodiesel, microbiological contamination, biodegradation.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Óleo diesel .....	4
3.2. Biodiesel.....	6
3.3. Misturas entre óleo diesel e biodiesel .....	8
3.4. Propriedades físico-químicas do óleo diesel e biodiesel.....	10
3.5. Estabilidade do óleo diesel e biodiesel.....	13
3.6. Degradação microbiana do biodiesel .....	14
3.7. Formas de controle da degradação microbiológica.....	18
3.8. Radiação Ultravioleta .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1. Coleta das amostras .....	22
4.2. Reator de radiação ultravioleta .....	23
4.3. Consumo energético do reator.....	25
4.4. Ensaio com reator de radiação UV.....	25
4.4.1. Ensaio A.....	26
4.4.2. Ensaio B e C .....	26
4.4.3. Ensaio D e E .....	27
4.5. Preparo do inóculo .....	27
4.6. Avaliação da atividade microbiológica .....	27
4.6.1. Preparo da suspensão bacteriana .....	27
4.6.2. Método espectrofotométrico .....	27
4.6.3. Técnica de microgota .....	28
4.6.4. Caracterização molecular.....	28
4.6.5. Avaliação da biodegradabilidade .....	29
4.7. Caracterização físico-química .....	30
4.7.1. Diferenciação espectrofotométrica .....	30
4.7.2. Temperatura das amostras .....	30
4.7.3. Massa específica à 20°C.....	30
4.7.4. Viscosidade cinemática à 20°C.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1. Coleta de amostras .....	32
5.2. Consumo energético do reator.....	32
5.3. Avaliação da atividade microbiológica .....	32
5.3.1. Método espectrofotométrico .....	32
5.3.2. Técnica de Microgota .....	34
5.3.3. Caracterização molecular.....	36
5.3.4. Avaliação da biodegradabilidade .....	38
5.4. Caracterização físico-química .....	41
5.4.1. Diferenciação espectrofotométrica .....	41
5.4.2. Temperatura das amostras .....	42
5.4.3. Massa específica à 20°C.....	43
5.4.4. Viscosidade cinemática à 20° C.....	45
6. CONCLUSÃO .....	47

7. TRABALHOS FUTUROS .....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O óleo diesel é um dos principais combustíveis utilizados no Brasil, atuando principalmente nos setores industriais e rodoviários. Contudo, esse combustível é obtido de fontes não renováveis, e seu uso está diretamente ligado ao aumento das emissões antrópicas de dióxido de carbono e enxofre.

Diante disso apresenta-se a necessidade da utilização de um combustível alternativo, que contribua na mitigação das mudanças climáticas e esgotamento de fontes fósseis. Esta alternativa é o biodiesel, que é obtido de fontes renováveis, proporciona uma energia sustentável e auxilia na redução das emissões dos gases de efeito estufa, como CO, CO<sub>2</sub> e compostos de enxofre (Meira *et al.*, 2016; Caliskan, 2017; Patel e Sankhavara, 2017).

Atualmente o percentual de biodiesel ao óleo diesel é de 8%, contudo a Lei nº 13.263 de 23 de março de 2016, que entrou em vigor em 2017, determina que o aumento aconteça para 9% em 2018 e 10% em 2019. A lei também determina que em até 36 meses da data de promulgação, seja autorizada a adição de 15% em volume de biodiesel ao óleo diesel, após testes que validem a mistura.

A inclusão do biodiesel ao óleo diesel apresenta várias vantagens ao combustível resultante, contudo o biodiesel é mais suscetível a oxidações devido a condições ambientais (luz, ar, umidade, etc.), sendo que teores elevados podem afetar a estabilidade do combustível, ocasionando degradações e alterações nas propriedades físico-químicas do combustível.

A degradação pode ocorrer em todo tipo de combustível, e uma forma de degradação é a microbiológica, que ocorre principalmente durante o processo de armazenamento, provocando alterações na qualidade com o avanço do tempo.

A contaminação microbiológica pode ocorrer durante toda a cadeia de produção e/ou transporte de óleo diesel e biodiesel. Esse tipo de contaminação acontece principalmente pela presença de água em tanques de armazenamento. Visto que o biodiesel apresenta uma alta capacidade de higroscopicidade, e com acúmulo de umidade no interior dos tanques de armazenamento, sua capacidade de absorção é alta.

A presença de água no biodiesel auxilia na degradação microbiana, onde em contato com oxigênio, luz e temperatura, fornece um ambiente favorável a proliferação de microrganismos. A presença de água em tanques de transporte e armazenamento

contribui para a produção de biomassa microbiana, provocando corrosão de componentes de motor, entupimentos de tubos e filtros, danos nos sistemas de injeção e diminuição da qualidade do combustível, e também a formação de biofilmes (Buker *et al.*, 2011; Buker *et al.*, 2014).

Os métodos mais utilizados para controle deste tipo de degradação são os físicos e químicos, tais como: aplicação de aditivos químicos; drenagens e limpezas nos tanques, filtração e centrifugação do combustível. Contudo ambos apresentam desvantagem em seu uso (Zimmer, 2014; Beker *et al.*, 2016).

Diante disso vê-se a necessidade de novos métodos a serem utilizados como forma de controle microbiológico. A radiação ultravioleta vem como alternativa de controle, visto que sua ação atua diretamente na inativação de microrganismos, apresentando ação germicida e/ou bactericida, ocasionando quebra de importantes grupamentos bioquímicos.

Com o aumento da concentração de biodiesel ao óleo diesel, a capacidade de higroscopicidade do combustível final é elevada, tornando-o mais propenso a contaminações microbiológicas.

A radiação ultravioleta para inativação de microrganismos atualmente é utilizada no tratamento de esgotos sanitários, águas de chuvas e efluentes. Não foram encontrados trabalhos na literatura consultada sobre seus efeitos na eliminação de microrganismos do óleo diesel. Sendo assim, este trabalho pode ser uma saída simples para minimizar ou retardar o problema de degradações microbiológicas no óleo diesel.

Diante disto, este trabalho trata-se de identificar, quantificar e inativar microrganismos presentes em óleo diesel, utilizando radiação ultravioleta a fim de minimizar ou retardar o crescimento microbiológico. Visto que, a exposição de microrganismos a radiação ultravioleta tende a ocasionar lesões irreversíveis impedindo sua reprodução.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito da radiação ultravioleta na inativação de microrganismos presentes em óleo diesel comercial S10 B8.

### 2.2. Objetivos específicos

- Elaborar um reator para a realização de testes de incidência da radiação ultravioleta sobre combustíveis em escala piloto;
- Determinar o tempo ideal de contato da radiação ultravioleta sobre o óleo diesel para inativar e/ou diminuir o crescimento de microrganismos;
- Avaliar o efeito da circulação do óleo diesel dentro do reator;
- Quantificar os microrganismos presentes em óleo diesel antes e após o tratamento com radiação ultravioleta;
- Realizar a identificação dos microrganismos isolados no óleo diesel comercial;
- Avaliar as características físico-química do combustível;
- Avaliar a capacidade de biodegradação dos microrganismos isolados em diferentes blends de óleo diesel com biodiesel.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Óleo diesel

De acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível - ANP, combustível é qualquer produto que a partir de sua queima ou transformação química provoca a geração de energia, ex. gás natural, gasolina, óleo diesel, carvão mineral, etc.

O óleo diesel é definido como um combustível líquido, de origem fóssil (derivado do petróleo), composto por hidrocarbonetos (átomos de hidrogênio e carbono), com cadeias carbonos, apresentando pequenas quantidades residuais de oxigênio, nitrogênio e enxofre. É um combustível inflamável, límpido, viscoso, baixa volatilidade, odores fortes e marcantes e com médio nível de toxicidade (ANP, 2016).

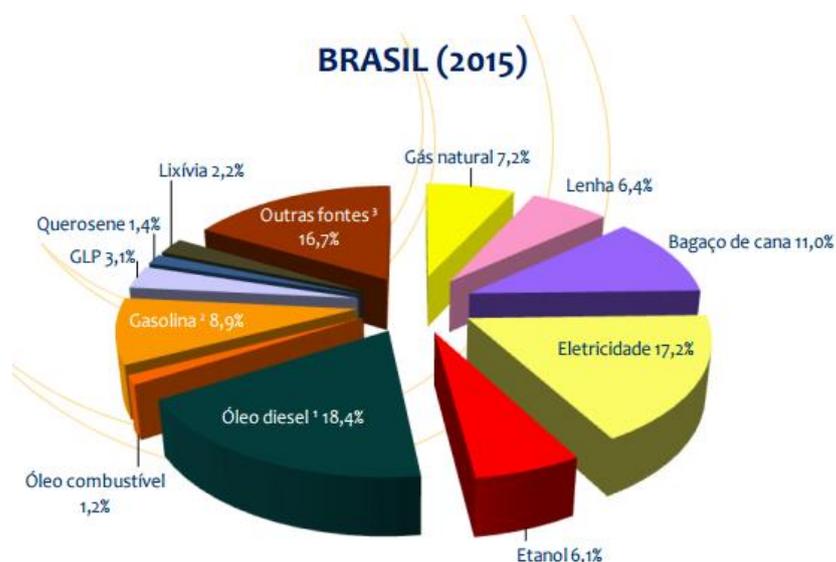
Atualmente no mercado brasileiro o diesel é um dos principais combustíveis utilizados e comercializados, sendo sua aplicação diretamente no uso rodoviário (veículos automotivos, máquinas agrícolas, construção e industriais), no uso não rodoviário (mineração a céu aberto, transporte ferroviária e usinas termoelétricas) e no uso marítimo (embarcações) (ANP, 2016).

De acordo com a Resolução da ANP, nº 30 de 23 de junho de 2016, o óleo diesel é classificado de acordo com o teor de biodiesel. O óleo diesel A é um combustível isento de biodiesel, empregado no uso rodoviário ou não rodoviário, destinado a veículos de motores de ciclo Diesel, proveniente de refinarias, nas centrais de matérias-primas petroquímicas e nos formuladores. O óleo diesel BX a B30 é um combustível composto da mistura do óleo diesel A com biodiesel, onde o teor é estabelecido pela legislação vigente, sendo inferior ou igual a 30% em volume.

A Resolução da ANP, nº 50 de 23 de dezembro de 2013 estabelece a nomenclatura em relação ao teor máximo de enxofre, onde óleo diesel S10 apresenta teor máximo de enxofre de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  e óleo diesel S500 teor máximo de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de enxofre.

De acordo com dados do Balanço Energético Nacional – BEM (ano base 2015) elaborado pela Empresa de Pesquisa Energética – EPE, em 2015 houve um regresso de 1,9% no consumo de combustíveis, principalmente nos setores industriais e transportes. Em relação ao consumo de óleo diesel houve uma queda de 4,3% no

consumo e essa diminuição está diretamente relacionada com uma leve diminuição da atividade no setor de transporte, principal consumidor de óleo diesel, ao qual o óleo diesel representa 18,4% (Figura 1) do consumo final de energia por fonte na matriz energética brasileira.



**Figura 1.** Consumo final de energia por fonte.

(<sup>1</sup> inclui biodiesel; <sup>2</sup> inclui apenas gasolina A (automotiva); <sup>3</sup> inclui gás de refinaria, coque de carvão mineral e carvão vegetal, dentre outros).

Fonte: Balanço Energético Nacional (ano base 2015), 2016).

De acordo com o Balanço Energético Nacional, em 2015 as emissões antrópicas alcançaram valores de 462,34 MtCO<sub>2</sub>-<sup>eq</sup>, sendo o setor de transporte com a maior geração de emissões totais, com 42%. Visto que o óleo diesel é um dos principais combustíveis fósseis utilizados no setor de transporte, juntamente com a gasolina, há necessidade da utilização de combustíveis alternativos que sejam ecológicos e renováveis, contribuindo com a mitigação das mudanças climáticas e o esgotamento de fontes fósseis (Caliskan, 2017).

Diante disso, os biocombustíveis se tornam uma alternativa de combustível a partir de fontes renováveis e obtenção de energia sustentável, a fim de minimizar os efeitos com a poluição ambiental (Patel e Sankhavar, 2017).

A inclusão do biodiesel ao óleo diesel passou a ser obrigatória desde 2008. Esta inclusão está diretamente relacionada com os benefícios ambientais, visto que o biodiesel é renovável e produzido a partir de óleos vegetais e animais. De acordo com Meira et.al, (2016) a mistura de biodiesel ao óleo diesel auxilia para uma redução de CO, CO<sub>2</sub> e enxofre.

### 3.2. Biodiesel

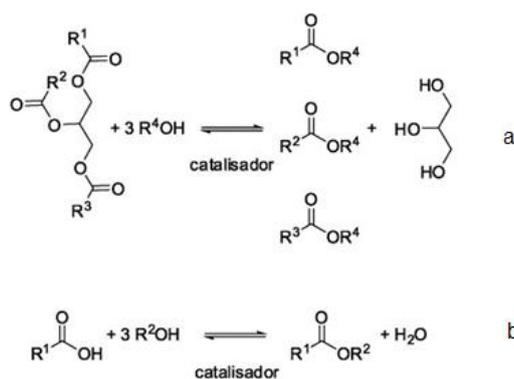
Os biocombustíveis são derivados de biomassas renováveis, que podem ser utilizados em motores a combustão ou na geração de energia, na substituição parcial ou completa de combustíveis de origem fósseis. São exemplos de biocombustíveis o etanol, o biodiesel dentre outras regulamentadas pela ANP (ANP, 2016).

A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira se iniciou com a criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em 2004 e com a implementação da Lei 11.097/2005

Segundo a ANP (2017), biodiesel é um combustível obtido a partir de óleos e gorduras, vegetais ou animais, definido de acordo com a Resolução da ANP, nº 30 de 23 de junho de 2016, como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de materiais graxos, que atenda às especificações do regulamento técnico contido na Resolução.

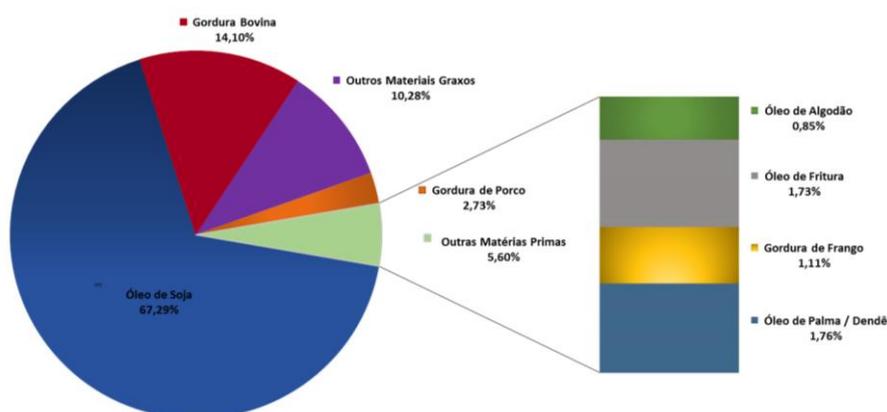
É um combustível oxigenado e renovável (Aldhaidhawi *et al.*, 2017), com alto potencial de biodegradabilidade, menor toxicidade, maior índice de cetano, melhor lubrificação, baixos teores de enxofre, sendo menores as emissões de gases nocivos (Patel e Sankhavra, 2017). Apresenta características muito próximas do óleo diesel, podendo ser usado diretamente e/ou misturas (blendas) em motores de ignição, podendo ser necessários pequenas modificações (Shahabuddin *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2014; Caliskan, 2017).

O biodiesel é produzido a partir do processo de transesterificação ou esterificação de um triacilglicerol ou do ácido graxo, com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador, esta reação está representada na Figura 2 (Pinho, 2016).



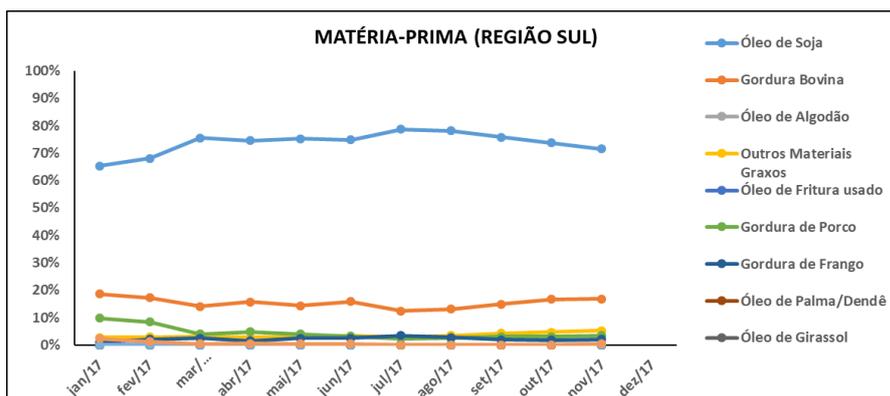
**Figura 2.** Reação de obtenção de biodiesel: (a) transesterificação; (b) esterificação.  
Fonte: Pinho, (2016).

As matérias-primas oleaginosas apresentam diversidade muito grande de utilização. No Brasil as principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel são os óleos vegetais (como soja, dendê, girassol, algodão, entre outros), gorduras animais (como sebo, óleos de peixes, gordura de suínos, aves e outros) e óleos e gorduras residuais (óleos provenientes de frituras, matérias-primas graxas provenientes de esgotos urbanos e outros). A Figura 3 apresenta o perfil nacional de matérias-primas (Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2017).



**Figura 3.** Perfil nacional de matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel.  
Fonte: Boletim do Biodiesel – ANP, (2018).

Na região sul, o óleo de soja é a matéria prima mais utilizada na produção de biodiesel, contudo também são utilizados gordura bovina, porco, óleo de frango e óleos de algodão, palma e girassol, conforme demonstrado na Figura 4.



**Figura 4.** Percentual de matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel na região Sul. Fonte: Boletim do Biodiesel – ANP (2018).

Devido ao biodiesel ser produzido de diversas fontes de matérias-primas, sua composição química se torna muito variada. Em termos de natureza (tamanho de cadeia e grau de insaturação) e quantidade de ésteres graxos as propriedades físico-químicas do biodiesel variam significativamente (Pinho, 2016).

Apesar do biodiesel apresentar várias vantagens em sua utilização, ele possui uma maior predisposição à oxidação do que o óleo diesel, em função da presença de ligações insaturadas nas moléculas provenientes das matérias-primas utilizadas, elevada reatividade com ar e alta higroscopicidade (capacidade em absorver água) (Fu *et al.*, 2016).

Os teores de ésteres saturados e insaturados variam em função do tipo de matéria-prima disponibilizada para a produção do biodiesel. Quando o biodiesel apresenta grandes quantidades de ésteres saturados em sua composição, não apresenta propriedades ideais de fluxo a frio. O biodiesel tende a solidificar em elevadas temperaturas, próximas à temperatura ambiente, porém tem uma maior estabilidade à oxidação. De outro lado um biodiesel composto principalmente por ésteres insaturados apresenta boas qualidades de fluxo a frio, mas apresenta uma maior degradação à oxidação (Dogan e Temur, 2013; Pinho, 2016).

### 3.3. Misturas entre óleo diesel e biodiesel

A mistura de biodiesel e óleo diesel é possível visto que o biodiesel é miscível com o diesel, independente da proporção utilizada, formando misturas (blendas) denominadas BX (onde o X é a proporção adicionada de biodiesel ao óleo diesel) (Bastos, 2014).

Atualmente o percentual de biodiesel ao óleo diesel é de 8% do volume final do óleo diesel, sancionado pela Lei nº 13.263 de 23 de março de 2016. Essa determinação entrou em vigor em 01 de Março de 2017, e de acordo com a medida, o percentual deve aumentar para 9% em 2018 e 10% em 2019. A lei também determina que em até 36 meses da data de promulgação seja autorizada a adição de 15% em volume de biodiesel ao óleo diesel.

Para a utilização dessas misturas em motores e que ocorre que apresente uma funcionalidade correta, é indispensável que as propriedades físicas e químicas sejam adequadas às normas. As normas técnicas para o óleo diesel são estabelecidas pela ANP na Resolução nº 50 de 23 de dezembro de 2013, onde descreve todos os parâmetros físico-químicos exigidos, assim como para o biodiesel, regulamentado pela Resolução nº45 de 25 de agosto de 2014.

A ANP dispõe de um boletim de conformidade, um documento de qualidade, expedido pelos distribuidores, que pode ser utilizada para verificar os resultados das análises físico-químicas do biodiesel. A ANP analisou 3.025 amostras de óleo diesel B8 comercializada no mês de Junho de 2017, onde foi relatado que o teor de biodiesel fora das especificações representou 55% do total de não conformidades, conforme Figura 5 (Ministério de Minas e Energia – MME, 2018).



**Figura 5.** Não conformidades de óleo diesel B8  
Fonte: MME (2018).

A inclusão do biodiesel ao óleo diesel ocasionou algumas vantagens, por ser um combustível obtido de fontes renováveis. Contudo o biodiesel apresenta uma maior facilidade de oxidação, levando à formação de compostos que danificam os motores a diesel, principalmente pela alta capacidade de absorção de água (Carvalho *et al.*, 2016; Pinho, 2016).

Os principais problemas associados à mistura de biodiesel ao óleo diesel englobam a formação de depósitos em tanques de transporte e armazenamento; obstruções de filtros de bomba de combustível; sistemas de injeções, corrosão em bombas, pistão, injetor, tubo compressor, câmara de combustão e catalítica (Carvalho *et al.*, 2016; Pinho, 2016).

### **3.4. Propriedades físico-químicas do óleo diesel e biodiesel**

A ANP determina especificações necessárias a um combustível, com o objetivo de estabelecer e atingir uma qualidade mínima para o uso, obedecendo as normas técnicas a fim de garantir uma uniformidade no produto, visto que as alterações nas propriedades físico-químicas podem ocorrer desde o processo de produção até a utilização final em postos de combustíveis (Ramos *et al.*, 2016).

As metodologias utilizadas para determinar as propriedades físico-químicas são estabelecidas por normas técnicas, tais como as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da “American Society for Testing and Materials” (ASTM), da “International Organization for Standardization” (ISSO) e do “Comité Européen de Normalisation” (CEN) (ANP, 2014; Ramos *et al.*, 2016).

A qualidade do combustível pode ser dividida em três categorias, sendo a primeira categoria dividida pelos ensaios comuns do controle de qualidade de combustíveis fósseis, a segunda pelos ensaios utilizados no controle da qualidade de óleos vegetais e a terceira pelos ensaios específicos para biodiesel (Pullen e Saeed, 2012; Ramos *et al.*, 2016).

As principais características do biodiesel que estão diretamente relacionadas com a estabilidade, sensíveis a incidência de processos degenerativos, de origem abiótica (hidrolítica e oxidativa) são: teor de umidade; índice de acidez; índice de peróxido; densidade, viscosidade cinemática à 40° C e índice de estabilidade oxidativa (Pinho 2016).

São apresentados na Tabela 1 especificações necessárias para identificar as características da qualidade do óleo diesel.

Tabela 1. Especificações do óleo diesel de acordo com a ANP.

CARACTERÍSTICA	LIMITE			MÉTODO
	S10	S500	S1800 Não rodoviário	
Aspecto (1)	LII (2)			Visual
Cor	(3)	Vermelho (4)	(5)	Visual
Cor ASTM, máx.	3,0			NBR 14483 ASTM D6045 ASTM D1500
Massa específica a 20° C (kg/m³) (6)	817,8 a 865,0	817,8 a 875,5	822,4 a 886,0	NBR 7148 NBR 14065 ASTM D1298 ASTM D4052 NBR 15983 ASTM D7042
Viscosidade Cinemática a 40°C (mm²/s) (7)	1,9 a 4,1	2,0 a 5,0		NBR 10441 ASTM D445 ASTM D7279 NBR 15983 ASTM D 7042
Teor de Biodiesel (% vol.)	(8)			NBR 15568 EN 14078 ASTM D7861 ASTM D7371 (9)
Enxofre (mg/kg)	10	500	1800	ASTM D5453 ASTM D2622 ASTM D7039 ASTM D7220 (9) ASTM D2622 ASTM D5453 ASTM D7039
Destilação/10% vol. (°C) (10)	180	Anotar		NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160
Destilação/50% vol. (°C) (10)	245,0 a 295,0	245,0 a 310,0		
Destilação/85% vol. (°C) (10)	Anotar			
Destilação/90% vol.(°C) (10)	Anotar			
Destilação/95% vol. (°C) (10)	Anotar			
Ponto de fulgor (°C)	38			NBR 7974 NBR 14598 ASTM D56 ASTM D93 ASTM D3828
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	(11)			NBR 14747 ASTM D6371

<b>Resíduo de carbono – 10% amostra (%massa)</b>	0,25			NBR 14318 ASTM D524
<b>Cinzas (%massa)</b>	0,01			NBR 9842 ASTM D482
<b>Corrosividade ao cobre</b>	1			NBR 14359 ASTM D130
<b>Teor de água (mg/kg)</b>	200	500		ASTM D6304 EN ISO 12937
<b>Água e sedimentos (% vol.)</b>	-	0,05		ASTM D2709
<b>Estabilidade à oxidação (h)</b>	20			EN15751
<b>Contaminação total (mg/kg) (12)</b>	24	Anotar		EN12662
<b>Número de acidez (mg KOH/g)</b>	0,3			NBR 14248 ASTM D664
<b>Condutividade elétrica (Ps/M) (13)</b>	25	25	Anotar (14)	ASTM D2624 ASTM D4308
<b>Número de cetano ou número de cetano derivado (NCD)</b>	48	42	42	ASTM D613 ASTM D6890 ASTM D7170 ASTM D7668

Fonte: ANP, 2014.

Nota: (1) Em caso de disputa ou para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total, para o óleo diesel BX a B30 (S10) e teor de água e água e sedimentos para o óleo diesel BX a B30 (S500), e somente teor de água no óleo diesel BX a B30 (S1800). O Aspecto será considerado não conforme caso ao menos um desses parâmetros esteja fora de especificação. (2) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio. (3) Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada devido à coloração do biodiesel. (4) O corante vermelho deverá ser especificado conforme a Resolução ANP nº 50/2013, ou outra que venha substituí-la. (5) Coloração de amarelo a alaranjado, podendo apresentar-se ligeiramente alterado para a tonalidade marrom devido à coloração do biodiesel. (6) As normas NBR 14065 e ASTM D4052 devem ser utilizadas como referência. (7) As normas ASTM D445 e NBR 10441 devem ser utilizadas como referência. (8) Será admitida variação de  $\pm 0,5\%$  em volume para misturas de óleo diesel com teor de biodiesel inferior a 20% e variação de  $\pm 1,0\%$  em volume para óleo diesel B20 a B30. A norma EN 14078 deve ser utilizada como referência. (9) Aplicável somente para mistura de óleo diesel A com até 20% de biodiesel. (10) Para óleo diesel BX a B20, somente os métodos NBR 9619 e ASTM D86 devem ser utilizados. O método ASTM D1160 deve ser utilizado para óleo diesel B21 a B30, sendo neste caso os limites "anotar" para as temperaturas de 10% e 50% recuperados. (11) Limites conforme Tabela II. (12) Deverá ser utilizada somente a versão da norma de 1998 ou 2008 (EN 12662:1998 ou EN 12662:2008) (13) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento/bombeio do combustível pelo distribuidor. (14) Caso a condutividade elétrica medida seja inferior a 25 (pS/m) deverá ser dado destaque do resultado no certificado da qualidade para que o distribuidor seja alertado quanto à adoção de medidas de segurança.

O teor de umidade indica a extensão da degradação hidrolítica que promove a geração de ácidos grãos livres, tendo como consequência, altos valores de índice de. O índice de peróxido reflete no progresso de oxidação, indicando a formação de produtos de oxidação secundários. No processo final de oxidação ocorre o aumento da densidade e também elevação da viscosidade, onde em sua fase final oligômeros são observados, contribuindo nos elevados valores. Para o índice de estabilidade oxidativa, valores baixos indicam baixa resistência à estabilidade de oxidação,

refletem também o tempo de propagação do processo de oxidação e a reserva de oxidantes ainda presente (Ashraful *et al.*, 2014; Pinho 2016).

### **3.5. Estabilidade do óleo diesel e biodiesel**

A degradação pode ocorrer em todo tipo de combustível, afetando as propriedades físicas e químicas, a qualidade no uso e também provocando a formação de outros compostos. A forma em que o combustível resiste a essas alterações é denominada estabilidade (Braun *et al.*, 2015).

Os tipos de degradações que mais afetam o biodiesel são: (i) oxidação, quando ocorre contato com oxigênio presente no ar; (ii) térmica, por excesso de calor; (iii) hidrólise pela contaminação de água e umidade em tanques de armazenamento; e (iv) contaminação microbiana que pode conter bactérias, fungos ou leveduras (Pullen e Saeed, 2012; Braun *et al.*, 2015).

A estabilidade está diretamente relacionada com a cadeia de produção do biodiesel, podendo ser proveniente da matéria-prima, processo de produção, transporte e armazenamento. A estabilidade pode ser dividida em três tipos: estabilidade de armazenamento, estabilidade à oxidação e estabilidade térmica. (Pullen e Saeed, 2012; Fu *et al.*, 2016; Saluja, Kumas e Sham, 2016).

Estabilidade de armazenamento é determinada como a capacidade de um combustível em resistir ao longo prazo de armazenamento, sem que ocorra a sua deterioração. É a resistência em relação às mudanças físicas e químicas ou interações durante o armazenamento, tais como: interação com luz, umidade, oxigênio do ar, temperatura, etc (Fu *et al.*, 2016; Pinho, 2016; Saluja, Kumas e Sham, 2016).

A estabilidade à oxidação define um combustível que tem a tendência em reagir com moléculas de oxigênio em temperaturas mais próximas a do meio ambiente e a suscetibilidade do combustível à degradação por oxidação. (Pullen e Saeed, 2012).

As matérias primas utilizadas no processo de produção de biodiesel apresentam estruturas insaturadas, que permanecem nos ésteres alquílicos e podem sofrer processos de oxidação. O processo de oxidação envolve várias reações do oxigênio molecular, presente no meio, acompanhado pela formação de peróxidos e

hidroperóxidos, podendo degradar-se em produtos de cadeia curta, como: cetonas aldeídos, álcoois e ácidos de baixo peso molecular, sendo capaz também de formar produtos de elevado peso molecular (Pullen e Saeed, 2012; Pinho, 2016; Saluja, Kumas e Sham, 2016).

O processo de oxidação dos triacilglicerídeos é derivado de várias reações, onde ocorre formação de radicais livres, que sofrem rearranjos que provocam o aumento da massa molecular do sistema, formando materiais insolúveis no meio. Esse material aumenta a viscosidade do biodiesel, estando relacionado também com os depósitos em tanques, problemas em sistema de injeção e outras partes do motor (Pinho, 2016; Saluja, Kumas e Sham, 2016).

Estabilidade térmica é a vulnerabilidade do combustível em se degradar em altas temperaturas. Em elevadas temperaturas ocorre a deterioração dos antioxidantes naturais do biodiesel, aumentando o processo de oxidação. A estabilidade térmica é importante quando o biodiesel entre em contato com o calor do motor (Pinho, 2016; Saluja, Kumas e Sham, 2016).

### **3.6. Degradação microbiana do biodiesel**

A biodegradabilidade é uma das principais vantagens do biodiesel, contudo essa mesma biodegradabilidade permite que o biodiesel seja mais suscetível às degradações/contaminação microbiológica, principalmente nas etapas de armazenamento do biodiesel (Buker *et al.*, 2011).

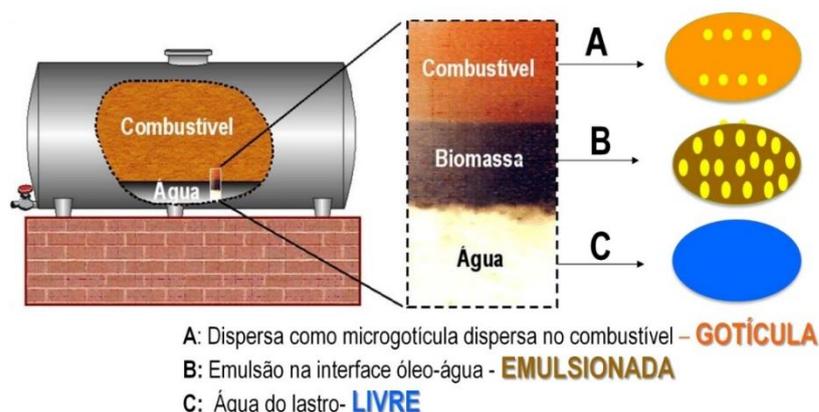
A degradação microbiológica ocorre principalmente durante o processo de armazenamento, que provoca alterações na qualidade ao longo do tempo. Uma das principais alterações que ocorre nos combustíveis é a formação de material particulado que posteriormente se sedimenta, também chamado de borra, podendo ser de procedência química ou microbiológica. Os sedimentos microbiológicos podem apresentar potencial de contaminação durante toda a cadeia de produção e/ou transporte de óleo diesel e biodiesel (Pinho, 2016).

Uma das propriedades de qualidade que auxilia na degradação microbiana é o teor de água presente no biodiesel. Quando os valores ultrapassam os limites máximos acelera a oxidação hidrolítica, alterando as características químicas ao longo

do tempo, e com o contato de oxigênio, luz e temperatura, promove um ambiente favorável à contaminação microbiana (Fattah *et al.*, 2014; Beker *et al.*, 2016).

A presença de água em tanques de transporte e armazenamento contribui para uma maior agregação de biomassa microbiana e a corrosão, promovida por microrganismos produtores de ácido (Beker *et al.*, 2016). Esse acúmulo de biomassa microbiana provoca corrosão de componentes de motor, entupimentos de tubos e filtros, danos nos sistemas de injeção e diminuição da qualidade do combustível, e também a formação de biofilmes (Beker *et al.*, 2011; Beker *et al.*, 2014).

Várias são as formas do contato do combustível com a água, podendo ser proveniente do processo de produção do biodiesel, da condensação do ar nas paredes dos tanques, por vazamentos, através do processo de limpeza dos tanques, na carga ou descarga do combustível, conforme demonstra a Figura 6 (Pinho, 2016).



**Figura 6.** Tanque de estocagem que apresenta contaminação microbiana na interface óleo/água.  
 Fonte: Pinho (2016).

O contato dos microrganismos pode ocorrer por meio da poeira, de águas e ar contaminados, podendo constituir uma fonte de nutrientes para proliferação (Jakeria *et al.*, 2014). O óleo diesel e o biodiesel são utilizados como fonte de nutrientes devido a sua composição de hidrocarbonetos, utilizada como fonte de carboidratos. Quando os microrganismos não metabolizam hidrocarbonetos, os mesmos utilizam ésteres de ácido graxos do biodiesel e metabólitos secundários de outros microrganismos. São necessários também nutrientes inorgânicos (fósforo e nitrogênio), que podem ser provenientes de resíduos químicos ou da água (Hill e Hill, 2009; Das e Chandran, 2010; Jekeria *et al.*, 2014; Pinho, 2016).

Após o combustível ter entrado em contato com esses microrganismos, ele passa a ser uma fonte de nutrientes, quando as condições de crescimento favorecem, com a presença de água livre, temperatura (4°– 60°C), pH (4 – 9) e tempo de contato ocorrendo a formação de biomassa (Sørensen *et al.*, 2011; Pinho, 2016).

Os principais tipos de microrganismos que contaminam o combustível são: bactérias anaeróbias e aeróbias, fungos e leveduras. Sendo que as bactérias aeróbias são os primeiros microrganismos a contaminar, seguidos de fungos filamentosos e leveduriformes e bactérias anaeróbias (Bento e Gaylarde, 2001; Buker *et al.*, 2011; Pullen e Saeed, 2012).

Na Tabela 2 são demonstrados alguns tipos de microrganismos encontrados em diferentes combustíveis, relatados em diversos trabalhos nacionais e internacionais.

**Tabela 2.** Microrganismos: arqueias, bactérias e fungos (filamentosos e leveduriformes) isolados em óleo diesel, biodiesel e misturas

Arquéias	Combustível	Referência
<i>Euryarchaeota</i>	Mistura B10	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Crenarchaeota</i>	Mistura B10	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Euryarchaeota</i>	Diesel	Azambuja <i>et al.</i> , (2016)
Bactérias	Combustível	Referência
<i>Achromobacter</i>	Diesel	White <i>et al.</i> , (2011); Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Acinetobacter</i>	Diesel	Onuorah <i>et al.</i> , (2013)
<i>Actinobacteria</i>	Diesel	White <i>et al.</i> , (2011); Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2013)
<i>Aeromonas</i>	Misturas	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Aerosphaera</i>	Biodiesel e Misturas	Sørensen <i>et al.</i> , (2011)
<i>Alcaligenes</i>	Diesel, biodiesel e mistura	White <i>et al.</i> , (2011); Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Arthrobacter sp.</i>	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Bacillus</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Bento <i>et al.</i> , (2001); White <i>et al.</i> , (2011); Onuorah <i>et al.</i> , (2013); Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2014); Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Biodiesel e misturas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>B. cereus</i>	Diesel	Bento <i>et al.</i> , (2001); White <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. subtilis</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Bento <i>et al.</i> , (2001)
<i>Brevundimonas</i>	Diesel, biodiesel e mistura	White <i>et al.</i> , (2011); Sørensen <i>et al.</i> , (2011); Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2013; 2014)
<i>Burkholderia</i>	Diesel e misturas	White <i>et al.</i> , (2011); Buker <i>et al.</i> , (2014)

<i>Comamonas</i>	Misturas	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Clostridium</i>	Biodiesel e Misturas	White <i>et al.</i> , (2011); Sørensen <i>et al.</i> , (2011); Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Comamodaceae</i>	Diesel	Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Desulfovibrio</i>	Diesel e misturas	White <i>et al.</i> , (2011); Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Dysgonomonas</i>	Misturas	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Enterobacter</i>	Misturas	White <i>et al.</i> , (2011)
<i>Flavobacterium</i>	Diesel	White <i>et al.</i> , (2011); Onuorah <i>et al.</i> , (2013)
<i>Hylemonella</i>	Misturas	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Klebsiella</i>	Misturas	White <i>et al.</i> , (2011); Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Biodiesel e Misturas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Micrococcus</i>	Diesel e biodiesel	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); White <i>et al.</i> , (2011); Onuorah <i>et al.</i> , (2013); Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2014); Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Ochrobactrum</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2014); Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Pseudomonas</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Bento <i>et al.</i> , (2001); White <i>et al.</i> , (2011); Onuorah <i>et al.</i> , (2013); Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2014); Buker <i>et al.</i> , (2014); Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Rhizobium</i>	Diesel e misturas	White <i>et al.</i> , (2011); Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2013; 2014)
<i>Rhodococcus</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2013; 2014); Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Sphingobacterium</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Staphylococcus</i>	Diesel	White <i>et al.</i> , (2011)
<i>Tepeidimonas sp.</i>	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<b>Fungos</b>	<b>Combustível</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Buker <i>et al.</i> , (2011)
<i>Aspergillus penicillioides</i>	Biodiesel e misturas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Candida dubliniensis</i>	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Candida viswanathii</i>	Biodiesel e misturas	Mariano <i>et al.</i> , (2008-A); Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Cladosporium sp.</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Rodriguez-Rodrigues <i>et al.</i> , (2010); Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Engyodontium album</i>	Biodiesel	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Paecilomyces</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Rodriguez-Rodrigues <i>et al.</i> , (2010); Buker <i>et al.</i> , (2011)
<i>Paecilomyces saturatus</i>	Misturas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)

<i>Penicillium</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Rodriguez-Rodrigues <i>et al.</i> , (2010); Onuorah <i>et al.</i> , (2013); Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Pichia anomala</i>	Biodiesel e misturas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	Misturas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Cazarolli <i>et al.</i> , (2012)
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	Biodiesel	Cazarolli <i>et al.</i> , (2014)
<i>Rhodotorula sp.</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Buker <i>et al.</i> , (2011)

Fonte: adaptado de (Allsopp *et al.*, 2016) e (Pinho, 2016).

Como observados na tabela acima, muitos dos microrganismos são encontrados tanto em diesel quanto em misturas com biodiesel. Para bactérias encontradas em óleo diesel, o que mais se predomina são: *Bacillus*; *B. cereus*; *B. subtilis*; *Flavobacterium*; *Pseudomonas*; *Flavobacterium*; *Staphylococcus*.

Muitos destes microrganismos isolados de combustíveis são utilizados em estudos de biorremediação, com objetivo de degradação de combustíveis, visando a capacidade dos microrganismos em degradar poluentes a base de hidrocarbonetos (Mariano *et al.*, 2008-B).

### 3.7. Formas de controle da degradação microbiológica

Diante do que foi exposto, é improvável acondicionar os combustíveis livres de microrganismos, por isso a necessidade de um manejo adequado, principalmente nos processos de armazenamento (Zimmer, 2014).

A contaminação microbiológica pode ser controlada ou eliminada através de métodos físicos e métodos químicos. Os métodos físicos apresentam uma maior simplicidade e baixos custos de processo, para evitar o crescimento microbiano. Já os métodos químicos consistem na aplicação de compostos químicos (aditivos) que evitam e controlam o crescimento de microrganismos. Esses compostos podem ser aplicados numa forma contínua, onde se tem uma maior frequência de aplicação com baixas concentrações dos aditivos, ou uma aplicação choque com uma alta concentração de aditivo com baixa frequência, aplicados a intervalos pré-determinados (Zimmer, 2014; Beker *et al.*, 2016).

Os métodos físicos utilizados para o controle são os métodos de drenagens frequentes e limpezas periódicas nos tanques, sendo associadas a filtração e

centrifugação do combustível. Contudo, o método físico apresenta como desvantagem, a dificuldade na drenagem completa dos tanques, devido aos diferentes tipos, tamanhos e formato dos tanques (Zimmer, 2014; Pinho, 2016).

O método químico consiste na utilização de antioxidantes (aditivos comerciais) e/ou biocidas, com propósito de eliminar ou inibir o crescimento microbiano.

Os biocidas ou microbiocidas podem ser definidos como um grupo de componentes e estruturas químicas (orgânica e inorgânica) utilizados para vetar o crescimento microbiológico. São agrupados de acordo com o microrganismo alvo, podendo ser solúvel em água e/ou óleo, sendo em forma pura ou misturados em produtos comerciais (Buker *et al.*, 2014; Zimmer, 2014).

São classificados em duas categorias: oxidantes (ozônio, peróxidos de hidrogênio, compostos clorados) e não oxidantes (compostos sulfurados, estanhados, isothiazolonas, sais de cobre e outros). A ação desses agentes químicos podem ser uma ação biocida (letal) ou uma ação biostática (inibitória), podendo agir com três alvos nos microrganismos: estruturas celulares externas (parede celular), com componentes da membrana plasmática ou com as estruturas citoplasmáticas (Yemashova *et al.*, 2007; Pinho, 2016)

Os antioxidantes são utilizados para desacelerar o processo de degradação oxidativa, aumentando a estabilidade oxidativa. Podem ser antioxidantes sintéticos ou naturais (presentes no biodiesel), caracterizados pela presença de grupos fenólico (catecol, tocoferol), e devido a essa composição fenólica, esses antioxidantes apresentam atividade antimicrobiana. São exemplos de antioxidantes sintéticos: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propia (PG) (Pullen e Saeed, 2012; Pinho, 2016).

Os antioxidantes são classificados em relação ao mecanismo de ação: podendo ser primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos (Bastos, 2014).

### **3.8. Radiação Ultravioleta**

A radiação solar é composta por diferentes tipos de radiações, em função do comprimento de onda. São classificados em três regiões, variando de acordo com o

intervalo de comprimento de onda ( $\lambda$ ): infravermelho ( $> 780$  nm), luz visível (780 - 400 nm) e ultravioleta (400 - 100 nm) (Araujo e Souza, 2008; Balogh *et al.*, 2011).

A radiação UV pode ser classificada em UVA (luz negra: 400 – 315nm), UVB (luz eritematogênica: 315 – 280nm) e UVC (radiação germicida: 280 – 100nm). A radiação UVC é a mais energética, visto que atua diretamente na inativação de microrganismos; quanto menor for o comprimento de onda, maior a energia da radiação (Okuno e Vilela, 2005; Sgarbi, Carmo e Rosa, 2012; Ponczek, 2014).

A radiação UVC está associada à sua ação germicida e/ou bactericida, com elevada energia de radiação, apresenta ações carcinogênicas e mutagênicas. A ação germicida é acarretada pela quebra de moléculas e/ou catálise de reações químicas de moléculas (Sanhueza e Maia, 2001; Araujo e Souza, 2008).

Pode ocorrer absorção da radiação UV em diferentes moléculas, tais como: DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, entre outras. Essa absorção provoca reações fotoquímicas e interações secundárias (Balogh *et al.*, 2011).

Quando a radiação atinge importantes grupamento bioquímicos ocasiona lesões irreversíveis e impede a reprodução de microrganismos. O dano está relacionado a intensidade de radiação, capacidade de absorção e ao tempo de exposição nessa radiação. O efeito germicida alcança efetividade máxima num comprimento de onda de 260 nm, ao qual atua diretamente nas bases hidrogenadas do ácido desoxirribonucléico (DNA) e ribonucléico (RNA) (Sanhueza e Maia, 2001; Bilotta e Daniel, 2006).

Vários são os trabalhos que utilizam radiação UV para desinfecção de águas. No trabalho de Souza (2011), foi avaliado a radiação UV em efluentes domésticos, a fim de avaliar a inativação de ovos de *Ascaris sp.* Foi possível inativar 90% dos ovos *Ascaris sp.*, contudo os resultados não se adequaram as diretrizes da Organização Mundial da Saúde. Souza *et al.* (2012), avaliaram a potencialidade da radiação UV na desinfecção de esgoto sanitário.

Battistelli *et al* (2016), utilizaram um reator UV, com doses de radiação variando de 43,8 a 194,9 mWs.cm<sup>-2</sup>, no pós-tratamento de um reator UASB, a fim de avaliar a desinfecção do efluente. Houve a inativação satisfatória, variando uma inativação de 90 – 94%, de *E. coli*, *Clostridium perfringens*, coliformes totais, colifagos.

Ferreira (2015), avaliou a existência e o perfil de sensibilidade de bactérias ambientais e/ou feco-orais isoladas de esgoto hospitalar e sanitário a fim de caracterizar o perfil de sensibilidade das bactérias com desinfetantes, antibióticos e radiação UV. Neste trabalho foi utilizado um esterilizador de água acoplado com lâmpadas UVC 15W, onde a suspensão com o isolado bacteriano é introduzida e retirada amostras para quantificação nos tempos de: 15", 30", 5', 10', 15' e 20'. Em ambos isolados encontrados a maior inativação dos microrganismos por radiação UV foi no maior tempo (20') de contato com a radiação, contudo a concentração de sólidos em suspensão nos diferentes tipos de esgotos pode resultar numa menor efetividade do processo de inativação dos microrganismos por radiação UV.

Como exposto anteriormente, fatores como luz tornam o biodiesel mais suscetível à oxidações e aumenta a contaminação microbiológica. Alguns estudos descrevem a influência da radiação UV no período de indução do biodiesel. A incidência de radiação UV em prolongados tempos (acima de 6 horas) leva a formação de radicais livres que iniciam o processo de oxidação (Ambrosio *et al.*, 2014; Silva 2015).

A radiação UV apresenta várias vantagens para sua utilização na desinfecção de efluentes e águas, tais como:

- É um processo físico que não requer da adição de produtos químicos;
- Não produz produtos residuais, sendo assim as doses de aplicação podem ser realizadas de acordo com o necessário;
- É efetiva na desinfecção de diversas bactérias, leveduras, fungos e vírus;
- Processo simples e de baixo custo de operação e manutenção;
- Baixo tempo de contato para efetivação da desinfecção, sendo assim não necessita de grandes tanques (Dias, 2001).

Contudo este tipo de processo também pode apresentar algumas desvantagens, como:

- Para alguns vírus, baixas doses de contato não são eficientes;
- Por ser um processo que atua diretamente no código genético, os equipamentos devem ser devidamente vedados;

- Este processo não melhora a qualidade de cor, odor e matéria orgânica de efluentes;
- O material particulado (dissolvido ou suspenso) diminuiu a intensidade da radiação;
- Alto custo inicial de implantação (Dias, 2001).

As lâmpadas de fluorescência têm descarga de vapores de mercúrio, combinada de um filamento, um tubo de vidro cilíndrico, ao qual é preenchido com gás nobre e uma superfície interna coberta com pó fluorescente.

Estas lâmpadas tem um menor custo energético, de 80%, quando comparado com lâmpadas incandescentes comuns, apresentam alta eficiência e longa durabilidade, devido a conversão de mais energia em luz do que em calor podendo ser aplicadas em diversas áreas, tanto comercial quanto industrial (MME, 2011).

A radiação ultravioleta para inativação de microrganismos atualmente é utilizada no tratamento de esgotos sanitários, águas de chuvas e efluentes, não foram encontrados trabalhos na literatura consultada sobre seus efeitos na eliminação de microrganismos do óleo diesel. Sendo assim, este trabalho pode ser uma saída simples para minimizar ou retardar o problema de degradações microbiológicas no óleo diesel.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

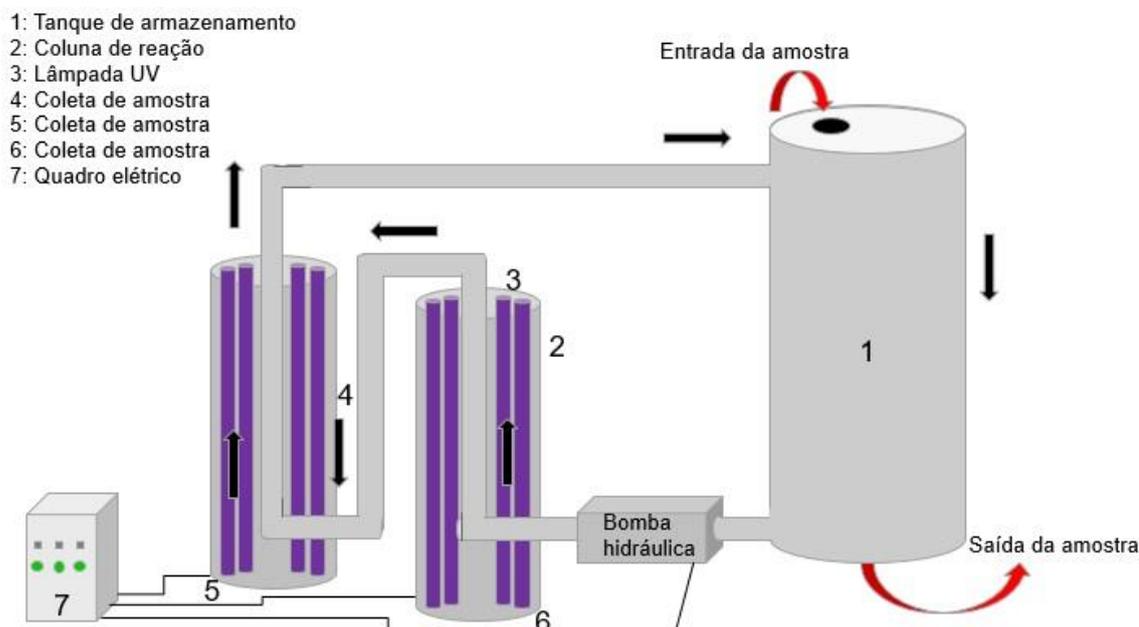
Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Catálise e Produção de Biocombustível – LabCatProBio e no Laboratório de Microscopia e Microbiologia ambos na Universidade Federal do Paraná – UFPR, Setor Palotina/PR.

##### **4.1. Coleta das amostras**

As amostras de óleo diesel S10 - B8 foram coletadas em posto de abastecimento na cidade de Palotina – PR. A coleta foi realizada nos meses de Junho, Setembro, Novembro e Dezembro de 2017. Para as coletas foram utilizados galões de 50 litros, previamente lavados com detergente neutro e deixado abertos e invertidos para completa secagem. Os ensaios no reator foram realizados no dia da coleta da amostra.

## 4.2. Reator de radiação ultravioleta

Na Figura 7 se encontra um esquema geral do reator de radiação ultravioleta.

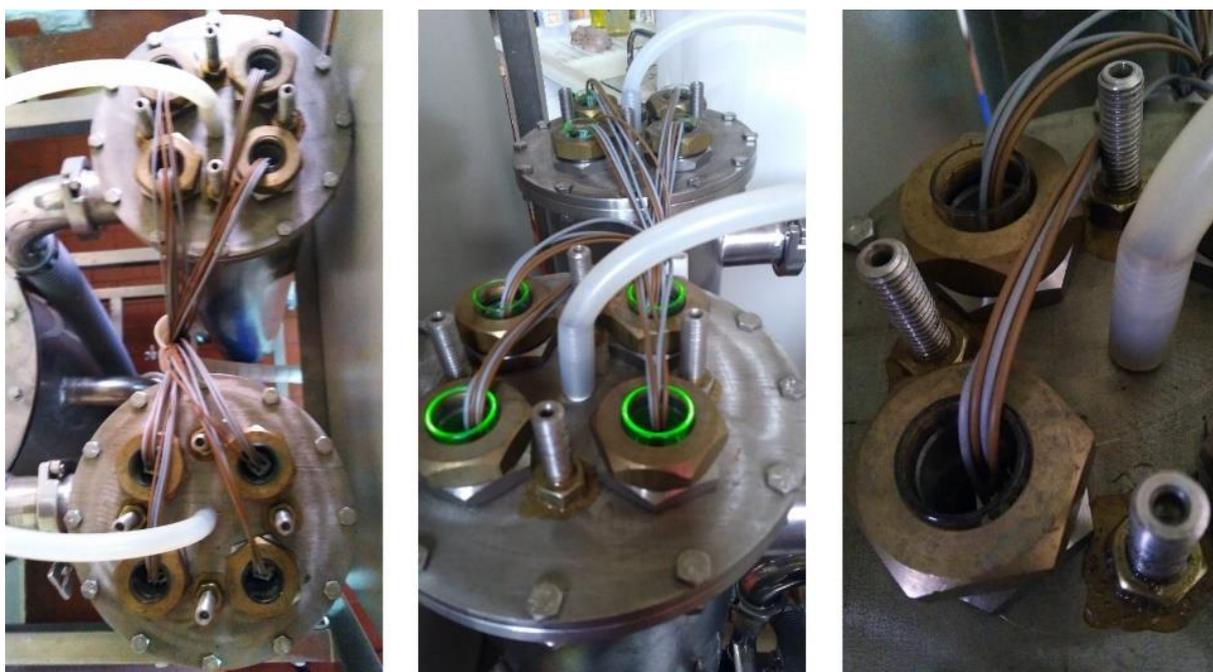


**Figura 7.** Esquema gráfico do reator de radiação ultravioleta.

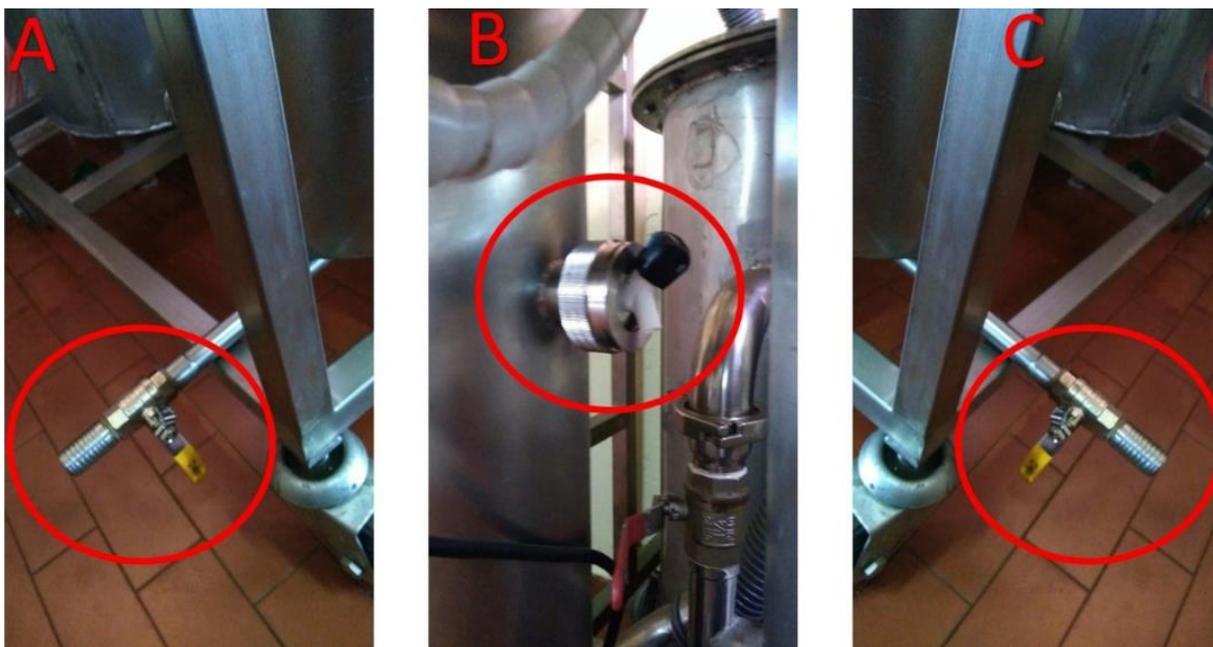
O reator é composto por duas colunas de reação e um tanque reserva, os sistemas de acionamento das lâmpadas e circulação se encontram na parte frontal do reator, sendo acionados separadamente (Figura 8). Cada coluna é composta por 4 lâmpadas fluorescente tubulares de flúor UVC germicida, da marca SYLVANIA de 40 W cada e comprimento de onda de 253 nm (Figura 9). A circulação é realizada por uma bomba hidráulica HYDROBLOC P 500T da marca KSB, com uma vazão de  $40 \pm 5$  (L min<sup>-1</sup>). As amostras são adicionadas pela parte superior do tanque de armazenamento e a saída das amostras ao fundo do tanque de armazenamento. As coletas das amostras são realizadas em diferentes pontos das colunas de reação, conforme Figura 10.



**Figura 8.** Reator com radiação ultravioleta (a: quadro elétrico; b: reator completo; c: tanque de armazenamento).



**Figura 9.** Colunas de reação com lâmpadas ultravioletas.



**Figura 10.** Locais de coleta de amostra (a: coleta inferior do tanque esquerdo; b: coleta central no tanque esquerdo; c: coleta inferior do tanque direito).

### 4.3. Consumo energético do reator

Para determinar o gasto energético das lâmpadas UVC de flúor do reator, foi realizado o cálculo do consumo energético pelas formulas abaixo:

$$\text{Consumo energético } kW = \frac{\text{potência da lâmpada } (W) \times \text{horas de consumo}}{1000}$$

$$\text{Valor de consumo } kWh = \text{consumo energético } (kW) \times 0,6911$$

Onde:

0,6911= da tarifa convencional industrial do subgrupo B3, COPEL, com impostos incluídos.

### 4.4. Ensaios com reator de radiação UV

Para os ensaios foi utilizado combustível óleo diesel S10 B8. O combustível foi adicionado ao tanque de armazenamento, com circulação do sistema no início do processo a fim de estabilizar as amostras no reator. As coletas de amostra no tempo 0 (min) aconteceu após o tempo de estabilização. Foi coletado 10 (mL) de amostra em tubos previamente esterilizados para análise microbiológica e 30 (mL) para as análises físico-químicas, sendo acondicionadas em temperatura ambiente e sem contato com luz. Posteriormente, as lâmpadas UV são acionadas e iniciados os ensaios e as coletas nos diferentes tempos.

A Tabela 3 demonstra um resumo dos diferentes ensaios realizados no reator e as condições experimentais.

**Tabela 3.** Condições experimentais dos diferentes ensaios.

<b>Ensaio</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Volume de óleo diesel (L)</b>	<b>Tempo total de ensaio (min)</b>	<b>Circulação</b>	<b>Inóculo</b>
<b>A</b>	Junho	60	60	SIM	NÃO
<b>B</b>	Novembro	40	120	SIM	SIM
<b>C</b>	Novembro		240	NÃO	SIM
<b>D</b>	Dezembro	40	360	SIM	NÃO
<b>E</b>	Dezembro		360	NÃO	NÃO

#### **4.4.1. Ensaio A**

O ensaio A foi o ensaio teste, realizado para verificar a necessidade da utilização de tempos superiores ou inferiores a 60 minutos.

Foi composto por 60 litros de óleo diesel, com circulação de 5 minutos para estabilização da amostra no reator. A coleta de amostras foi realizada ao fundo do tanque de reação, a cada 10 minutos e teve duração total de 60 (min). Após o teste, o reator foi esvaziado e realizado lavagem do tanque com detergente neutro e água corrente, posterior deixado aberto para secagem. Ao início dos ensaios seguintes um volume de diesel foi circulado e posterior desprezado, para não haver interferência. Este procedimento de lavagem foi adotado nos intervalos dos diferentes ensaios.

#### **4.4.2. Ensaio B e C**

Como a presença de água favorece a proliferação de microrganismos, os ensaios B e C constituíram numa simulação de um cenário com alta contaminação microbiológica.

Foi utilizado um volume de 40 litros de óleo diesel e 5% de inóculo bacteriano, com a presença de circulação do sistema. A bactéria utilizada neste ensaio foi isolada do ensaio A, conforme item 4.5. O tempo de estabilização da amostra com o reator foi de 20 minutos, e o ensaio teve duração de 120 minutos.

Após o termino do ensaio B, o volume foi mantido no reator por 4 dias. Posteriormente o mesmo material foi circulado por 20 minutos, desligado a circulação, e iniciado o ensaio C. As amostras foram coletadas no fundo do tanque de reação, com tempo total do ensaio foi de 240 minutos.

#### **4.4.3. Ensaio D e E**

Para o ensaio D foi utilizado 40 litros de óleo diesel com circulação do sistema, com tempo de estabilização de 20 minutos. A coleta de amostras foi realizada no meio da coluna de reação. O ensaio teve duração 360 minutos. Ao fim do ensaio D o volume foi mantido dentro do reator por 6 dias. Posteriormente o mesmo material foi circulado por 20 minutos, desligado a circulação e iniciado o ensaio E, sem circulação, com tempo total de ensaio de 360 minutos.

#### **4.5. Preparo do inóculo**

Para o preparo do inóculo utilizado no ensaio B e C, foi feito um pré-inóculo, onde uma colônia bacteriana do ensaio A, foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB) estéril, mantidos em estufa 35°C por 12h. Posterior o pré-inóculo foi adicionado novamente em meio LB, mantidos por mais 12h à 35°C em estufa bacteriológica. O inóculo foi incubado juntamente com o volume de óleo diesel no reator.

#### **4.6. Avaliação da atividade microbiológica**

##### **4.6.1. Preparo da suspensão bacteriana**

Esta suspensão bacteriana é utilizada para a quantificação de microrganismos presentes nas amostras. O preparo da suspensão bacteriana foi realizado pela adaptação da Norma ASTM E1259-10, onde 10ml da amostra de óleo diesel coletada em tubos estéreis foram adicionados em 90 ml de meio de cultura LB estéril, mantidos sob agitação a 150 rpm, a 35°C, por 18 horas. Esta etapa foi realizada para todos os pontos coletados (VAZ, 2010; ZIMMER, 2014)

##### **4.6.2. Método espectrofotométrico**

Foi utilizado o método espectrofotométrico para leitura de absorbância, para verificar o aumento da turbidez nas suspensões bacterianas nos diferentes tempos de coleta dos ensaios. Mediu-se a absorbância (600 nm) em espectrofotômetro UV 5300pc, para determinar o crescimento bacteriano. As amostras foram inseridas em um funil de separação de fases, esperou-se 10 minutos para separação de fases, e pela parte inferior foram retiradas as alíquotas para leitura, evitando assim a interferência do óleo diesel durante a avaliação (RIBEIRO *et al.*, 2015).

### 4.6.3. Técnica de microgota

Para determinar a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) foi utilizada a técnica de microgota, adaptado de Romeiro (2007).

Foi realizado uma diluição seriada (10<sup>0</sup> a 10<sup>-7</sup>) da suspensão bacteriana em salina a 0,9% em microtubos estéreis. Posteriormente cada diluição foi plaqueada em placas de Petri contendo meio LB ágar com auxílio de micropipeta, em capela de fluxo laminar, utilizando 3 gotas de 3 µl. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por um período de 16 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias de bactérias e o cálculo de UFC foi realizado conforme Equação abaixo:

$$\text{UFC ml}^{-1} = \text{média de colônias} \times \frac{1}{\text{diluição da amostra}} \times \frac{1}{\text{volume de amostra (mL)}}$$

### 4.6.4. Caracterização molecular

A caracterização molecular foi realizada no tempo inicial e final de cada ensaio. Para caracterização molecular uma colônia bacteriana de cada amostra foi cultivada em 5ml de meio LB líquido e mantida por aproximadamente 16 horas, sob agitação a 120 rpm, a 28 °C. Posteriormente o DNA genômico foi extraído de acordo com o método descrito por (Shahriaret *et al.*, 2011), a partir de 3 ml da cultura. O DNA extraído foi diluído na proporção 1:10 em água Milli-Q e a sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0). A amplificação por PCR da região do rDNA 16S foi realizada com os *primers* Y1 *forward* (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') Young *et al.* (1991) e Y3 *reverse* (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') Cruz (2001), produzindo um *amplicon* de aproximadamente 1500 pb. Para a realização da PCR, 2 µl do DNA diluído foi misturado com Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da *Taq* DNA Polimerase (4G Pesquisa e Desenvolvimento) e 0,2 µM de cada *primer*, em um volume final de 20 µl. As reações foram amplificadas em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96. As condições de amplificação foram: 5 min iniciais a 94°C, e 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C, como extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados

por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X utilizando o padrão de peso molecular de 100pb (Kasvi), com 0,5 µg/ml de brometo de etídio.

Para o sequenciamento da região do gene ribossomal 16S, o fragmento amplificado de 1500 pb foi eluído do gel e purificado com kit de eluição EZ10 (Bio Basic Inc), visando a purificação dos fragmentos para o sequenciamento. Uma alíquota de 2 µL dos produtos de PCR foi quantificada com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop2000 (ThermoScientific). O grau de pureza foi determinado pela relação A260/280. Após quantificação, 60 ng do produto de PCR eluído foi seco em termociclador, à 60°C, juntamente com 0,45 pmol do *primer forward* e *reverse*, e as amostras foram enviadas para a empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA, Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento.

#### **4.6.5. Avaliação da biodegradabilidade**

O teste de biodegradabilidade consiste na utilização do indicador redox 2,6-diclorofenol indolfenol (DCPIP), que se baseia na oxidação de uma fonte de carbono, sendo utilizado para determinar a capacidade de um microrganismo biodegradar hidrocarbonetos. Este indicador apresenta a funcionalidade de um acceptor artificial de elétrons na cadeia transportadora, tendo a mesma função que o oxigênio, o nitrato ou o sulfato. Quando oxidado o indicador muda a coloração do meio para incolor e quando reduzido para coloração azul.

Este procedimento foi adaptado de Vaz (2010). Foram utilizados os isolados do tempo inicial e final de cada ensaio. As bactérias isoladas foram inoculadas em caldo Bushnell Hass (BH) e incubadas à 30°C, até o crescimento atingir um padrão de absorbância 0,5, medida em espectrofotômetro, indicando aproximadamente  $9 \times 10^8$  células.

Posteriormente as culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 e centrifugado novamente, esse processo foi repetido 2 vezes e padronizado uma absorbância de 0,5. Para a realização deste experimento foi utilizado microplacas de acrílico, previamente esterilizadas, com 96 poços, o experimento foi realizado em duplicata.

Adicionou-se 25µL de solução bacteriana; 170µL de meio de cultura BH; 6µL do indicador DCPIP; 4µL de diferentes blendas de óleo diesel com biodiesel (8, 10, 15, 20, 50 e 100%). Constituiu também um controle positivo (174µL de meio de cultura BH com glucose 0,1%, 25µL de solução bacteriana e 6µL do indicador DCPIP) e um controle negativo (174µL de meio de cultura BH, 25µL de solução bacteriana e 6µL do indicador DCPIP). As placas foram incubadas à 30°C em estufa, as leituras foram realizadas com 12, 24 e 72 horas. A descoloração do corante é indicativo da utilização do combustível como fonte de carbono pelos microrganismos.

#### **4.7. Caracterização físico-química**

As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras antes e depois da exposição à radiação ultravioleta. Foram selecionadas as amostras que apresentaram maior inibição no crescimento microbiológico.

##### **4.7.1. Diferenciação espectrofotométrica**

Para análise de aspecto de diferença de cor das amostras foi realizado a varredura das amostras em espectrofotômetro UV 5300PC, com interface ao software MetaSpace Pro, célula de quartzo de 1 cm de caminho óptico e varredura entre 200 nm a 900nm. A varredura foi realizada nos ensaios com maior tempo de contato com radiação e nos tempos iniciais e finais de cada. Esta análise foi utilizada para verificar se a incidência de radiação ultravioleta promovia a formação de novos compostos, indicados pela presença de novos picos ao fim do ensaio.

##### **4.7.2. Temperatura das amostras**

Durante os ensaios realizou-se o acompanhamento da temperatura utilizando um termômetro digital, medido em amostras coletadas no fundo da coluna de reação. Com intuito de verificar a variação perante a exposição das amostras em contato com a radiação, o efeito do sistema de circulação do reator, assim com a interferência da temperatura nos microrganismos presentes nas amostras.

##### **4.7.3. Massa específica à 20°C**

A determinação da massa específica das amostras seguiu metodologia gravimétrica. Para isto, inicialmente calibra-se um balão volumétrico de 10 (mL), anotando-se o valor real do volume do mesmo. Posteriormente, pesa-se em balança

analítica a massa de amostra até aferir o menisco do balão volumétrico, marcando-se este valor como  $m_{amostra}$ . O volume real do balão volumétrico calibrado é o  $V_{amostra}$  (AOCS, 2013). Todo procedimento foi realizado controladamente à 20 °C.

Calcula-se a densidade a partir da Equação abaixo.

$$\rho \text{ (g ml}^{-1}\text{)} = \frac{m_{amostra}}{V_{amostra}}$$

Onde:

$\rho$  = densidade em  $\text{g ml}^{-1}$ .

$m_{amostra}$  = massa de amostra em gramas

$V_{amostra}$  = volume de amostra em mililitros

#### 4.7.4. Viscosidade cinemática à 20°C

Esta análise foi realizada somente para comparação entre os ensaios e as amostras obtidas. Para a determinação da viscosidade das amostras será utilizado um viscosímetro rotativo analógico EEQ-9031, que é usado para determinar parâmetros de fluidos com alta viscosidade, como os óleos.

Este procedimento será realizado em duas medições, relacionadas com a velocidade de rotação do viscosímetro (H12 e H30), cada uma delas realizada em triplicata utilizando spindle número 1. Realiza-se visualmente, quando do contato do equipamento com o óleo, as leituras de  $H_x$ , e a partir da Equação abaixo calcula-se o valor de viscosidade relativa.

$$a_x = \frac{H_x}{2,5}$$

Onde:

$a_x$  – viscosidade relativa para cada  $H_x$

$H_x$  – valor obtido pela leitura do viscosímetro para cada step.

2,5 – raio do recipiente adaptado para as amostras.

A viscosidade relativa deve ser multiplicada pelo coeficiente  $k$ , valor tabelado para cada step  $H_x$ , para obter então a viscosidade absoluta. Para H12, o mesmo vale 5 e para H30 é dado por 2. A viscosidade absoluta é calculada pela Equação abaixo (AOCS, 2013).

$$n_x = k_x \times a_x \text{ Equação 4}$$

Em que:

$n_x$  – viscosidade absoluta para cada  $a_x$

$k_x$  - valor tabelado do coeficiente para cada step  $H_x$

$a_x$  – viscosidade relativa para cada  $H_x$

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Coleta de amostras**

Como o biodiesel é produzido por diferentes matérias-primas, matérias essas que variam de acordo com a procedência, sazonalidade, fatores climáticos, sua composição química e as propriedades físico-químicas, se tornam muito variáveis (Pinho, 2016).

O biodiesel é mais suscetível às degradações e contaminação microbiológicas, principalmente no armazenamento, em relação ao diesel. Como a presença de água favorece a proliferação de microrganismos, os ensaios B e C foram simulações de um cenário com alta contaminação microbiológica, onde foi utilizado microrganismos isolados do óleo diesel como inóculo.

Neste trabalho foram coletadas amostras de óleo diesel em diferentes meses de produção do biodiesel, onde em cada mês o conjunto e o percentual de matérias-primas da produção de biodiesel variou.

Diante dessa variação de matérias-primas e ao tempo de armazenamento do combustível no posto de abastecimento, as concentrações de microrganismos iniciais variaram em cada em ensaio, de acordo com o mês de coleta.

### **5.2. Consumo energético do reator**

Lâmpadas fluorescentes tubulares apresentam uma redução de 80% no gasto energético, com alta eficiência e longa durabilidade, garantindo aplicações e utilização em diversas áreas comerciais e industriais (MME, 2011).

O consumo das 8 lâmpadas do reator é de 0,32 kW, ao qual em 1 hora de uso custa 0,2211 reais, com base no preço do R\$/kWh da tarifa convencional industrial do subgrupo B3, COPEL na data de 22/02/2018, inclusos de impostos (ICMS e PIS/COFINS) (Resolução ANEEL nº 2.255, 2017).

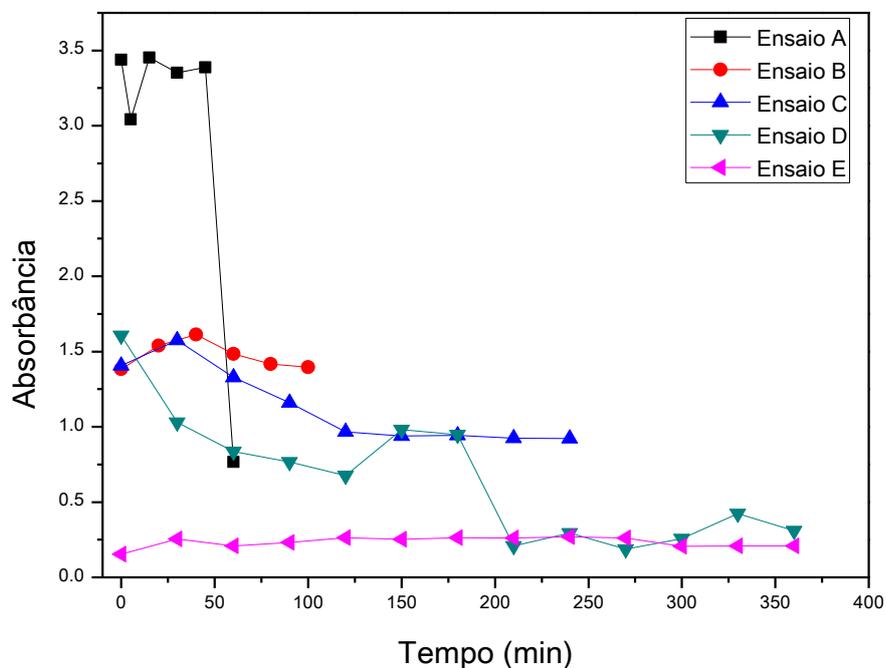
### **5.3. Avaliação da atividade microbiológica**

#### **5.3.1. Método espectrofotométrico**

De acordo com a escala de McFarland a turvação em meios de cultura líquidos determina a intensidade da multiplicação dos microrganismos, onde o aumento das

bactérias impede a passagem da luz, ocasionando a turvação ou opacidade no meio (Pobac do Brasil, 2017). O aumento ou diminuição da absorbância reflete na concentração de células de microrganismos presentes no meio. Contudo, nessa concentração de células estão presentes tanto células vivas, quanto células mortas (RIBEIRO *et al.*, 2015; QUATRIN *et al.*, 2016).

Na Figura 11 estão representados os valores de absorbância das suspensões bacterianas, dos diferentes ensaios no decorrer no tempo de exposição à radiação UV.



**Figura 11.** Absorbância dos ensaios em decorrência do tempo de exposição à radiação UV

O ensaio A ensaio apresentou a maior absorbância no tempo 0 minutos e durante o experimento a absorbância acompanhou os valores iniciais, apresentando uma redução somente ao fim do ensaio, com valores chegando a 0,767. Esse comportamento também se estendeu e acompanhou a quantificação de microrganismos, item 5.1.2, indicando que nesta amostra de óleo diesel em 60 minutos ocorreu a diminuição da concentração celular viável de microrganismos.

Nos ensaios B e C, que ocorreu a adição de inóculo ao início do teste, os valores de absorbância iniciais foram elevados, e o comportamento durante o ensaio permaneceu semelhante. Para o ensaio C, somente após 120 minutos houve uma

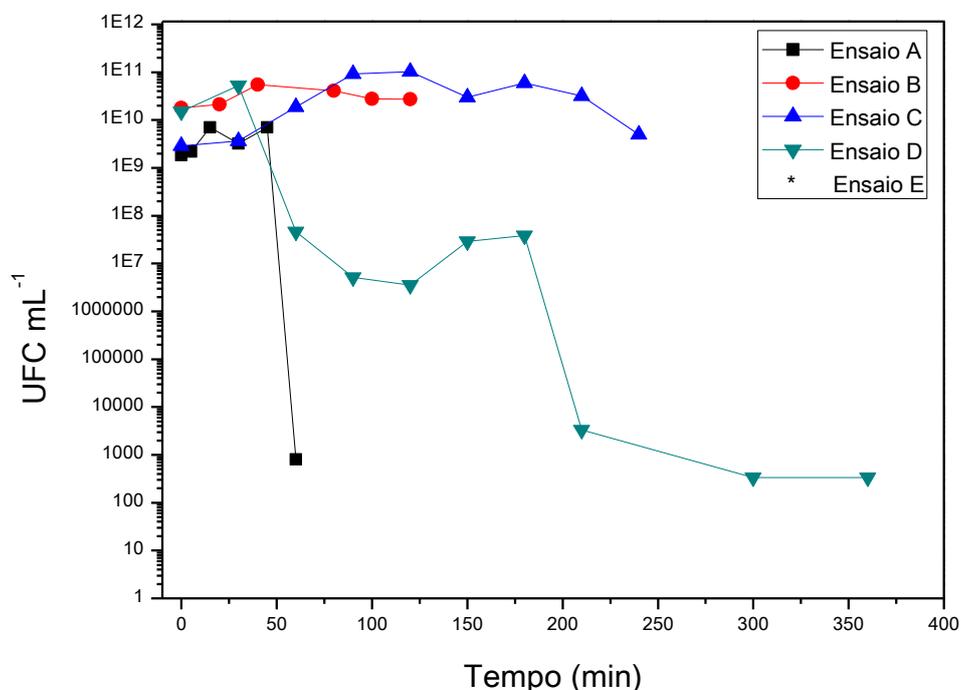
diminuição para 0,922, onde se estabilizou até o fim do ensaio, mas na quantificação para células vivas, os valores permaneceram altos.

Para o ensaio D, os valores apresentaram redução em relação ao tempo de experimento, passando de 1,606 nm no tempo de 0 minutos para 0,310 ao fim do experimento, com 360 minutos. O ensaio E, teve valores baixos de absorvância durante todo o experimento, contudo na quantificação este ensaio não apresentou células viáveis, essa absorvância pode ser resultado de células mortas presentes nas amostras.

Os ensaios que apresentaram diminuição na absorvância estão relacionados com a diminuição da concentração celular de microrganismos presentes. Quando correlacionado com a quantificação de células vivas, técnica de microgota, é possível verificar a diminuição dos microrganismos presentes nas amostras.

### 5.3.2. Técnica de Microgota

Na Figura 12 se encontra a quantificação de células viáveis, nos diferentes ensaios, durante o decorrer do tempo de experimento.



**Figura 12.** Perfil de quantificação de células viáveis nos ensaios.

\* o ensaio E não apresentou colônias viáveis na contagem

Nos ensaios A, D e E, não foram utilizados inóculo. Nestes ensaios a concentração inicial de microrganismos foi de  $1,82 \times 10^9$  e  $1,50 \times 10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente para A e D, no ensaio E a concentração inicial foi zero. Para o ensaio A ao fim de 60 minutos houve uma diminuição para  $8 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>, e no ensaio D somente após 360 minutos a quantidade de microrganismos chegou a  $3,33 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>. A diferença de tempo para inativação destes microrganismos se deve ao período de coleta do óleo diesel de cada ensaio e aos diferentes microrganismos presentes nas amostras.

O ensaio E, que foi continuidade do ensaio D, ao final do ensaio D ainda se encontrou microrganismos, com isso foi realizado o ensaio sem circulação do sistema, a fim de verificar se o contato da radiação seria maior para completa inativação. Porém no tempo 0 minutos do ensaio E não foi encontrado células vivas, e no decorrer de 360 minutos de experimento, não houve a detecção de microrganismos presentes.

Para os ensaios B e C foram utilizados inóculo ao início do ensaio B, visando um cenário de alta concentração microbiológica. Nestes ensaios verificou-se a influência da circulação do sistema. Para o ensaio B, que foi realizado com circulação, não houve diminuição da carga de microrganismos. Como na amostra havia uma maior concentração de água, ocorreu a proliferação dos microrganismos, passando de  $1,78 \times 10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> em 0 minutos, para  $2,72 \times 10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> em 120 minutos. No ensaio C, realizado sem circulação, apresentou o mesmo perfil do ensaio B, sendo que ao fim de 240 minutos a concentração de microrganismo permaneceu elevada, chegando a  $5,00 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Com isso pode-se concluir que cada amostra coletada apresenta um perfil diferenciado em relação ao tempo de inativação. Nos ensaios realizados com inóculo, pode-se concluir que ocorreu uma maior proliferação de microrganismos, em decorrência da maior concentração de água, proveniente do inóculo, e a utilização ou não de circulação não proporcionou diferença na inibição dos microrganismos.

O ensaio que demonstrou um melhor perfil de combinação do tempo de radiação UV combinado com o sistema de circulação do reator, foi o ensaio D. Este ensaio apresentou uma elevada diminuição da carga microbiológica após 360 minutos de contato com radiação UV e a circulação do sistema permitiu uma melhor incidência sobre a amostra.

### 5.3.3. Caracterização molecular

Os dados obtidos pelo sequenciamento genético foram comparados com os dados contidos no banco de dados do *GenBank*. A análise permitiu identificar os gêneros de microrganismos presentes antes e após os ensaios com radiação ultravioleta. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Para o ensaio A os isolados foram os mesmos antes e após a incidência com radiação ultravioleta. Foram identificados os gêneros *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus pasteurii* e *Staphylococcus warneri*. Este gênero é um dos patógenos humano e animais mais comum, podem crescer em temperaturas entre 18 – 40° C. Foram encontrados este gênero de microrganismo em diversos trabalhos como degradadores do óleo diesel (Vaz, 2010; White *et al.*, 2011; Silva, 2012).

No tempo inicial do ensaio B foram identificados os gêneros *Clostridium sp.* e *Paraclostridium bifermentans*. São bactérias encontradas tanto em solo como em águas. Estes microrganismos foram encontrados em biodiesel e misturas de biodiesel com óleo diesel, relatados em trabalhos como White *et al.*, (2011); Sørensen *et al.*, (2011); Buker *et al.*, (2014). Já no tempo final do ensaio B, os microrganismos identificados foram diferentes, *Enterococcus sp.* e *Enterococcus gallinarum*. Estes microrganismos apresentam origem de alimentos e água.

O ensaio C também foram identificados ao início do ensaio os mesmos gêneros encontrados no ensaio B, *Clostridium sp.*; *Paraclostridium bifermentans*. No tempo final do ensaio foram identificados *Enterobacter sp.* e *Enterobacter ludwigii*, são bactérias encontradas em diferentes níveis da natureza (água doce, solos, esgotos, vegetais, animais, etc.).

No ensaio B e C foi utilizado um inóculo proveniente dos microrganismos isolados do ensaio A, contudo os microrganismos do ensaio A não foram identificados ao final do ensaio B e C. Ao fim do ensaio B e C o tempo de contato com radiação foi maior que no ensaio A, ocorrendo a inativação deste gênero de microrganismos.

Para o ensaio D foram identificados os gêneros *Acinetobacter sp.* e *Acinetobacter baumannii* no tempo inicial do ensaio, também encontrados em óleo diesel no trabalho de Onuorah *et al.*, (2013), e *Bacillus sp.*; *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* no tempo final do ensaio D, os mesmos gêneros foram identificados em óleo diesel, biodiesel e misturas nos trabalhos Gaylarde *et al.*, (1999); Bento *et al.*,

(2001); White *et al.*, (2011); Onuorah *et al.*, (2013); Restrepo-Florez *et al.*, (2014); Buker *et al.*, (2014).

**Tabela 4.** Identificação de bactérias isoladas dos ensaios.

Ensaio	Tempo (min)	Espécie referência	% de ID*
A	0	<i>Staphylococcus warneri/ pasteuri</i>	98%
	60	<i>Staphylococcus warneri/ pasteuri</i>	97%
B	0	<i>Clostridium sp</i>	96%
		<i>Paraclostridium bifermentans</i>	96%
	120	<i>Enterococcus sp.</i>	99%
C	0	<i>Enterococcus qallinarum</i>	99%
		<i>Clostridium sp</i>	98%
	240	<i>Paraclostridium bifermentans</i>	98%
		<i>Enterobacter sp.</i>	97%
D	0	<i>Enterobacter ludwigii</i>	97%
		<i>Acinetobacter sp.</i>	97%
	360	<i>Acinetobacter baumannii</i>	97%
		<i>Bacillus sp.</i>	97%
		<i>Bacillus cereus/ thuringiensis</i>	97%

\* % de identificação da sequência genética encontrada com os microrganismos identificados

Nos ensaios B, C e D ocorreu a mudança de gêneros de bactérias, do tempo inicial para o tempo final, essa mudança pode ser explicada pela maior facilidade de inibição dos grupos iniciais pela radiação ultravioleta, permanecendo os grupos que apresentam maior resistência.

Pode-se ter ocorrido também uma competição de nutrientes, visto que quando se tem uma grande variedade de microrganismos numa amostra, ocorre a competição nutricional, onde alguns gêneros têm maior facilidade em utilizar o hidrocarboneto do combustível como fonte de nutrientes, com isso os fatores nutricionais limitam o crescimento das demais bactérias. Esse tipo de competição de nutrientes é um fator limitante e conduz a seleção no crescimento microbiológico.

A diferença dos gêneros encontrados antes e após os ensaios, podem ser explicados também pelo tipo de meio de cultura utilizado para o crescimento microbiológico, visto que o meio LB, é um meio não seletivo, utilizado para crescimento de diversas bactérias, na manutenção e cultivo. Com isso, o meio contém nutrientes básico para crescimento, e como cada gênero de microrganismos necessita de diferentes nutrientes para o crescimento, este fator pode ter sido uma variável para os diferentes gêneros encontrados.

Os gêneros encontrados no tempo inicial e final de cada ensaio podem apresentar, ou não, uma maior facilidade em passar da fase óleo para fase água (meio de cultura) e com o decorrer do tempo de ensaio alguns microrganismos foram

inibidos, facilitando o crescimento de outros microrganismos com maior resistência e facilidade em utilizar o combustível como fonte de nutriente.

Na Tabela 5 observa-se que, para cada período de coleta das amostras dos ensaios, apresentaram um perfil de gêneros identificados distintos dos demais.

**Tabela 5.** Relação dos meses de coleta com a identificação molecular

Ensaio	Data da coleta	Espécie referência
A	Junho	<i>Staphylococcus sp.</i>
B/C	Novembro	<i>Clostridium sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> e <i>Enterococcus sp.</i>
D	Dezembro	<i>Acinobacter sp.</i> e <i>Bacillus sp.</i>

Como relatado anteriormente, a produção do biodiesel, adicionado ao óleo diesel, varia-se de acordo com o mês de produção e as matérias-primas utilizadas. Como o biodiesel é uma das formas de contaminação microbiológica, devido a sua instabilidade e a sua produção é realizada com diversas matérias primas, em cada mês de coleta de amostra dos ensaios, a identificação molecular dos gêneros foi diferente. Os gêneros identificados em junho, não foram encontrados nos outros meses de coleta, assim como em novembro e dezembro.

As contaminações do combustível pelas bactérias identificadas nestes ensaios promovem e facilitam a formação de compostos que causam problemas associados a: bloqueio de tubulações, filtros e válvulas; formação de sedimentos; corrosões; incrustações e degradação do combustível.

#### 5.3.4. Avaliação da biodegradabilidade

Este teste foi realizado com os isolados dos ensaios A, B, C e D, dos tempos iniciais e finais. Ao qual foram verificados a capacidade destes isolados em degradar as diferentes blendas de óleo diesel e biodiesel.

As leituras foram realizadas com tempo de avaliação de 24, 48 e 96 horas de incubação, e foram identificadas pela descoloração do corante 2,6-diclorofenol indolfenol (DCPIP), onde a oxidação do meio é determinada pela mudança da cor azul para incolor.

Pode-se observar que após 24 horas de incubação (Tabela 6) as bactérias isoladas dos ensaios A (tempo inicial e final) e ensaio D (tempo inicial e final), degradaram o biodiesel puro (B100).

Nas demais blendas a degradação iniciou-se após 48 horas (7), onde as bactérias do ensaio A no tempo inicial degradaram as blendas B8, B20 e B40, já as bactérias isoladas do ensaio A no tempo final degradaram todas as blendas. Para o ensaio D, nas bactérias isoladas do tempo inicial, ocorreu a degradação da blenda B8, e nas bactérias isoladas do tempo final, ocorreu a degradação em todas as blendas.

No tempo de 96 horas (Tabela 8) ocorreu a degradação do combustível pelas demais bactérias isoladas. As bactérias isoladas dos tempos iniciais e finais, do ensaio B e C, degradaram todas as blendas produzidas.

**Tabela 6.** Resultado do teste de biodegradabilidade após 24 horas

<b>Isolados</b>	<b>C+</b>	<b>B8</b>	<b>B8</b>	<b>B20</b>	<b>B20</b>	<b>B40</b>	<b>B40</b>	<b>B60</b>	<b>B60</b>	<b>B100</b>	<b>B100</b>	<b>C-</b>
<b>Ensaio A T0'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>C-</b>
<b>Ensaio A T60'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>C-</b>
<b>Ensaio B T0'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio B T120'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio C T0'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio C T240'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio D T0'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>C-</b>
<b>Ensaio D T360'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>C-</b>

\* C+: controle positivo; C-: controle negativo

**Tabela 7.** Resultado do teste de biodegradabilidade após 48 horas

<b>Isolados</b>	<b>C+</b>	<b>B8</b>	<b>B8</b>	<b>B20</b>	<b>B20</b>	<b>B40</b>	<b>B40</b>	<b>B60</b>	<b>B60</b>	<b>B100</b>	<b>B100</b>	<b>C-</b>
<b>Ensaio A T0'</b>	<b>C+</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<b>C-</b>
<b>Ensaio A T60'</b>	<b>C+</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<b>C-</b>
<b>Ensaio B T0'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio B T120'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio C T0'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio C T240'</b>	<b>C+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>C-</b>
<b>Ensaio D T0'</b>	<b>C+</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>C-</b>
<b>Ensaio D T360'</b>	<b>C+</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<b>C-</b>

\* C+: controle positivo; C-: controle negativo

**Tabela 8.** Resultado do teste de biodegradabilidade após 96 horas

Isolados	C+	B8	B8	B20	B20	B40	B40	B60	B60	B100	B100	C-
Ensaio A T0'	C+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	C-
Ensaio A T60'	C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C-
Ensaio B T0'	C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C-
Ensaio B T120'	C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C-
Ensaio C T0'	C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C-
Ensaio C T240'	C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C-
Ensaio D T0'	C+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	C-
Ensaio D T360'	C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C-

\* C+: controle positivo; C-: controle negativo

Mesmo que a biodegradabilidade do biodiesel seja considerada uma vantagem quando correlacionada as perspectivas ambientais, ela constituiu para misturas de óleo diesel e biodiesel um problema. Uma maior concentração de biodiesel nas misturas ocasiona novas condições de armazenamento, condições estas que estão diretamente relacionadas com a instabilidade química do biodiesel, apresentando uma maior probabilidade de degradação. Durante o armazenamento prolongado do combustível e em contato com fatores externos, as condições se tornam mais favoráveis para proliferação dos microrganismos.

Pode-se observar no teste de biodegradabilidade que os microrganismos pertencentes aos gêneros *Staphylococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Bacillus sp.* (ensaios A e D) apresentam uma maior facilidade em degradar biodiesel puro (B100). Comprovando juntamente com outros trabalhos, que a adição de biodiesel promove uma maior instabilidade a misturas e aumentando o potencial de degradação microbiológica, conseqüentemente a produção de biomassa (White *et al.*, 2011; Onuorah *et al.*, 2013; Buker *et al.*, 2014; Restrepo-Florez *et al.*, 2014; Soriano *et al.*, 2015).

Pode-se concluir também que os microrganismos dos ensaios que tiveram a adição de inóculo (B e C) só iniciaram a degradação após 96 horas de testes, e os microrganismos dos ensaios sem inóculo (A e D) tiveram uma degradação do

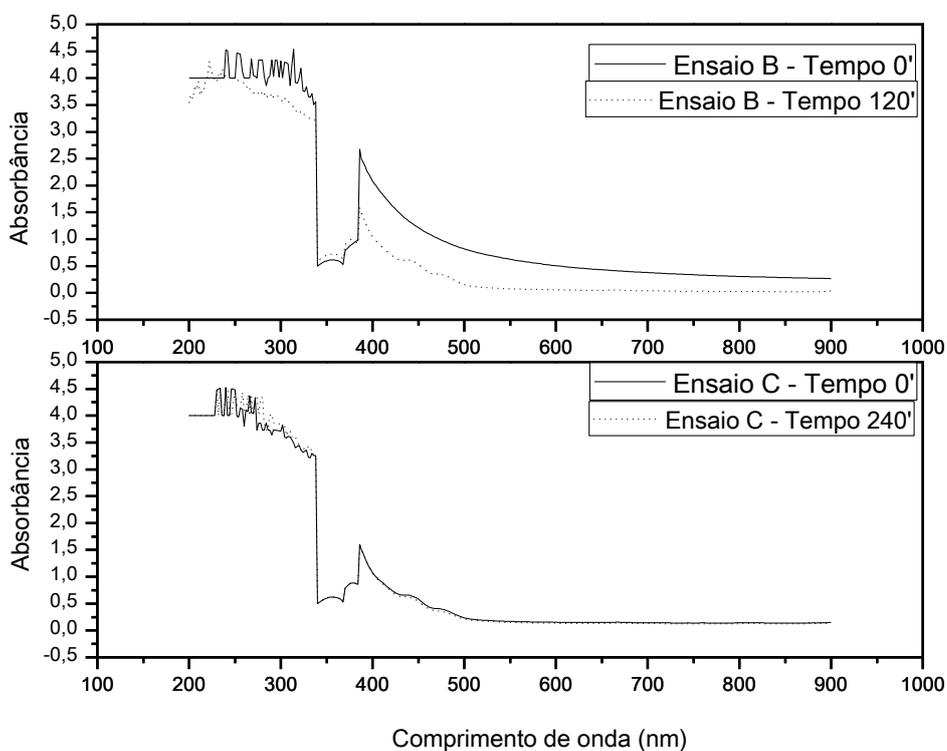
biodiesel puro e das blendas em até 48 horas de teste. Estes microrganismos apresentam uma maior facilidade em utilizar o combustível como fonte de nutrientes.

## 5.4. Caracterização físico-química

### 5.4.1. Diferenciação espectrofotométrica

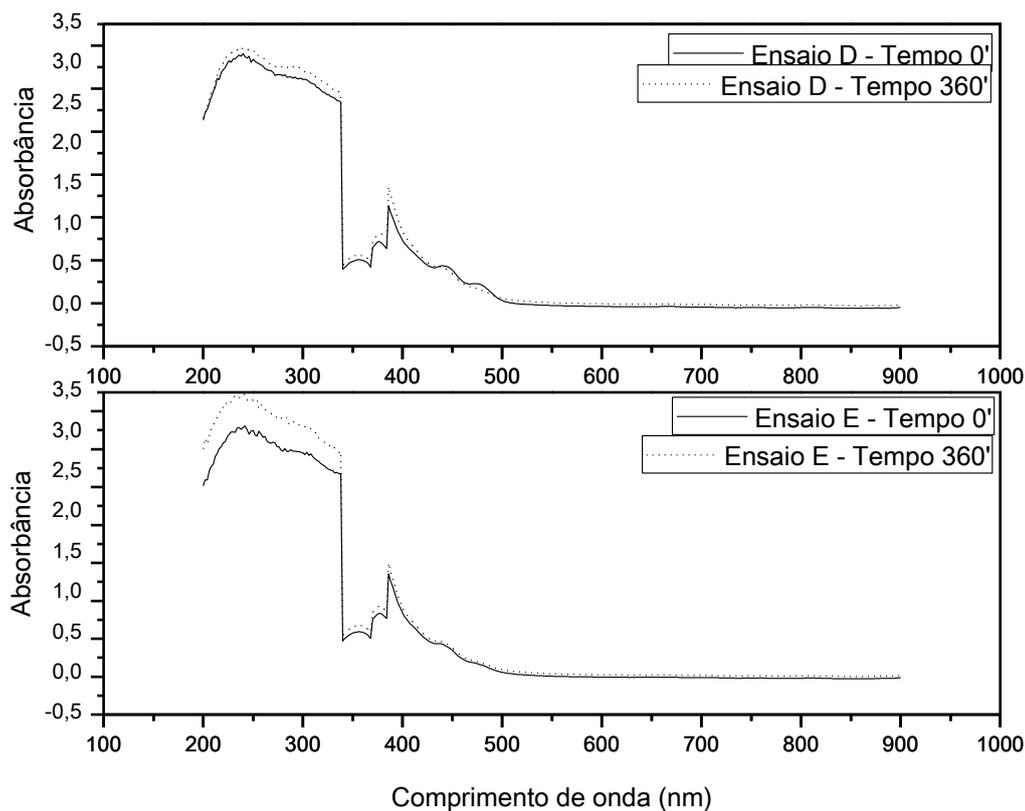
A varredura das amostras iniciais e finais dos ensaios com maior exposição à radiação ultravioleta teve como objetivo avaliar a formação de novos picos de absorvância após o tempo de exposição, indicando uma alteração na coloração do óleo diesel.

No tempo inicial do ensaio B, o espectro de absorvância indicou um pico mais elevado, decorrente da presença de água proveniente do inóculo utilizado (Figura 13). Após 120 min de ensaio o pico apresentou uma área menor, essa diminuição deve-se pela evaporação da água. Para o ensaio C tanto no tempo inicial quanto no tempo final, os espectros permaneceram parecidos sem a presença de novos picos, indicando que a radiação UV não proporcionou a formação de produtos que interferem na coloração do óleo diesel.



**Figura 13.** Espectro de varredura das amostras do ensaio B e C (com inóculo).

Nos espectros de absorção dos ensaios D e E (Figura 14) pode-se observar que após o tempo máximo de exposição à radiação UV, não houve formação de novos picos, apresentando semelhanças nos espectros de absorção dos tempos iniciais e finais. Com isso pode-se concluir que a exposição à radiação UV não interfere na mudança de coloração do óleo diesel.



**Figura 14.** Espectro de varredura das amostras do ensaio D e E (sem inóculo).

#### 5.4.2. Temperatura das amostras

Um dos principais fatores que influênciam no crescimento e desenvolvimento microbiológico é a temperatura. A temperatura é responsável por realizar alterações em reações químicas que favorecem o crescimento ou até mesmo inibindo. Cada tipo de microrganismo tem uma faixa ideal de crescimento, os microrganismos psicrófilos tem uma temperatura ótima de crescimento abaixo de 15°C, podendo ter crescimento a 0°C, os mesófilos apresentam temperatura ótima entre 20 – 40°C, sendo estes a maioria dos microrganismos e os termófilos com temperatura ótima acima de 45°C (VALDUGA *et al.*, 2009).

Na Tabela 9 é demonstrado a diferença da temperatura nos ensaios com e sem circulação do sistema.

**Tabela 9.** Diferença de temperatura das amostras, no sistema com e sem circulação

Tempo (min)	Com circulação	Sem circulação
	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
0	25,0	27,1
60	30,3	36,3
120	36,6	44,6
240	37,2	51,6
360	39,8	60,4

Em relação ao combustível os ensaios com circulação são preferenciais, visto que a máxima temperatura atingida foi de 39,8°C em 360 minutos. Para os ensaios realizados com circulação do sistema (A, B e D), a temperatura máxima final atingida se encontrou dentro da faixa ótima de crescimento da maioria dos microrganismos. Podendo-se prever que a temperatura não apresentou influência na inibição da maior parte dos microrganismos.

Os ensaios C e E foram realizados sem a circulação do sistema, e no decorrer do tempo de exposição da amostra com a radiação UV, houve um aumento da temperatura, chegando a 60,4°C. Contudo o ensaio C foi realizado com inoculação de microrganismos e ao fim de 240 minutos de experimento, a carga de microrganismos permaneceu alta, com  $5,00 \times 10^9$  UFC/mL<sup>-1</sup>, e a temperatura neste ensaio a temperatura atingiu 51,6°C.

No ensaio C foi identificado os microrganismos isolados pertencentes ao gênero *Clostridium sp.*, que apresentam espécies tanto psicrófilos (inferior a 30°C) quanto termófilos (superior a 40°C) (Blaschek 2014), concluindo que a alta carga de microrganismos neste ensaio está relacionada ao tipo de bactéria presentes no óleo diesel, e como não houve a circulação da amostra a incidência da radiação UV foi menor, sobre todo o conteúdo do reator.

Para o ensaio E mesmo a temperatura final do experimento tenha atingido 60,4°C, não foi possível detectar microrganismos presentes nas amostras iniciais deste ensaio.

#### 5.4.3. Massa específica à 20°C

A caracterização de massa específica à 20°C foi realizada para as amostras com maiores tempos de contato com a radiação UV, para ensaio A não foi realizado

esta análise. Foi realizada no laboratório de catálise e produção de biocombustível com temperatura controlada em 20°C. Essa caracterização é uma referência de qualidade para combustíveis automotivos, referindo-se a estocagem, manuseio e combustão. O aumento da massa específica ocasiona o acréscimo na produção de poluentes e valores baixos favorecem a perda de potência do motor e o aumento no consumo do combustível (ALEME, 2011; LIMA, 2012).

Na Tabela 10 são demonstrados os resultados de massa específica dos ensaios.

**Tabela 10.** Caracterização físico-química de massa específica à 20°C

Ensaio	Tempo de radiação UV (min)	Massa específica à 20°C (kg/m <sup>3</sup> )	Desvio Padrão
<b>B</b>	0'	1001,81	0,0141
	120'	831,87	0,0714
<b>C</b>	0'	826,56	0,0169
	240'	832,56	0,0293
<b>D</b>	0'	848,73	0,1458
	360'	823,78	0,0920
<b>E</b>	0'	845,91	0,0072
	360'	826,90	0,1029

De acordo com a Resolução nº30 de 23/06/2016 da ANP, o limite de massa específica à 20°C para óleo diesel S10 é de 817,8 a 865,0 kg m<sup>3</sup>. Com isso as amostras dos ensaios C, D e E permaneceram inclusas nos limites específicos, mesmo após 360 minutos de contato com radiação UV.

Como no ensaio B constituiu na utilização de inóculo ao início do processo, ocorreu um aumento na concentração de água presente no óleo diesel e consequentemente o aumento da massa específica. Decorrente disto, a densidade passou dos limites específicos no tempo 0 minutos, contudo após 120 minutos de circulação e radiação ultravioleta, os valores de densidade passarão a limites correspondente a normatização.

Esta diminuição da massa específica ao fim do ensaio pode ser explicada pela evaporação da água presente. Como no topo das colunas de reação e no tanque de armazenamento existe um volume composto de ar, o aquecimento provocado pelas lâmpadas UV pode ocasionar a evaporação da água produzindo um acúmulo de vapor d'água. Mesmo que a temperatura do combustível medida na saída do reator tenha

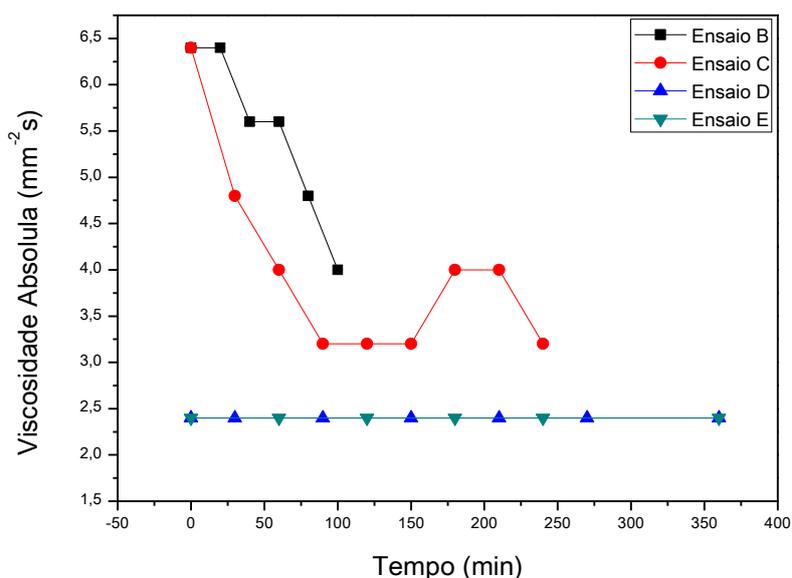
sido baixa, a temperatura próxima à lâmpada pode ser maior, provocando um superaquecimento no local próximo da lâmpada e evaporando a água presente.

#### 5.4.4. Viscosidade cinemática à 20° C

Segundo Meier (2014), a viscosidade é determinada a fim de verificar a resistência de um óleo ao escoamento a uma dada temperatura. Maiores valores de viscosidade proporcionam uma maior tendência na formação de depósitos e afeta atomização do combustível, procedendo na queima incompleta e emissões de materiais particulados (LIMA, 2012).

A caracterização de viscosidade à 20°C foi realizada para as amostras com maiores tempos de contato com a radiação UV, para ensaio A não foi realizado esta análise. Esta análise foi realizada somente como uma análise comparativa entre as amostras. A Resolução n°30 de 23/06/2016 da ANP determina os valores limites para viscosidade a 40°C de óleo diesel S10, entre 1,9 a 4,1 mm<sup>2</sup>s.

Na Figura 15 é demonstrado o comportamento da viscosidade cinemática à 25°C nos ensaios com maior exposição à radiação UV, no decorrer do tempo de experimento.



**Figura 15.** Viscosidade cinemática à 25°C dos ensaios

Para o ensaio B e C o valor de viscosidade sem a adição do inóculo foi de 2,4 mm<sup>2</sup>s, após a adição do inóculo os valores de viscosidade inicial foi de 6,4 mm<sup>2</sup>s, e

no transcorrer do tempo de exposição à radiação UV os valores variaram 3,2 a 6,4 mm<sup>2</sup>s. Estes altos valores de viscosidade podem ser resultado da inoculação de microrganismos realizada ao início do ensaio, visto que ao adicionar água ao óleo, houve a formação de uma emulsão, tratando-se de emulsões de líquidos diferentes, a viscosidade tende a apresentar maiores valores, do que quando em fases individuais (BASTOS, 2013; RONCHI, 2014).

Os ensaios D e E que não houve a adição de água nas amostras, apresentaram valores para viscosidade a 25°C, de 2,4 mm<sup>2</sup>s durante o decorrer de todo o tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Diante disso pode-se concluir que a utilização da radiação ultravioleta como método de controle de contaminações microbiológicas, não interfere sobre as propriedades do óleo diesel comercial. Visto que somente as amostras onde foram adicionados inóculo (água) apresentaram variação das propriedades físico-química. Com isso este método apresenta somente efeitos na inativação dos microrganismos.

## 6. CONCLUSÃO

Buscando atender os objetivos deste trabalho, foi possível a montagem de um reator com lâmpadas de radiação ultravioleta para utilização com o combustível óleo diesel, a quantificação dos microrganismos presentes nas amostras e determinar um tempo mínimo ideal de incidência com radiação UV para inativação e/ou diminuição do crescimento de microrganismos.

Os ensaios preliminares de radiação UV demonstraram a necessidade um tempo de contato do óleo diesel com a radiação UV de no mínimo 360 minutos e com a presença da circulação do sistema, evitando assim um aumento da temperatura do combustível no interior do reator.

Somente nos ensaios com a adição de inóculo ocorreu alterações nas propriedades físico-químicas do óleo diesel comercial, nos ensaios com óleo diesel comercial a radiação não proporcionou alterações nas propriedades do combustível.

Com essas características de ensaio, foi possível realizar a diminuição e/ou eliminação de microrganismos. O ensaio D foi o que apresentou melhores combinações na diminuição de microrganismos presentes no óleo diesel S10. Neste ensaio ocorreu uma diminuição da carga microbiológica, passando de  $1,50 \times 10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> para  $3,33 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo estes dados comprovados pela diminuição da absorbância do meio, caindo de 1,606 nm para 0,310 nm ao fim de 360 minutos de contato com radiação UV.

Em todas as amostras, iniciais e finais dos ensaios, foi possível realizar a identificação molecular das bactérias presentes. Foi possível realizar a identificação molecular de 10 espécies de bactérias na Região Sul do Brasil. Bactérias estas que apresentaram potencial de degradação tanto de biodiesel puro quanto da mistura de óleo diesel com biodiesel, sendo que em 24 horas o biodiesel puro foi degradado e as blendas B8, B20, B40 e B60 em 96 horas.

Como relatado no decorrer deste trabalho, a ação combinada da água, oxigênio, ar, temperatura e microrganismos fornecem um ambiente favorável para degradação microbiológica do combustível, sendo está um dos problemas mais recorrentes em relação ao tempo de armazenamento do óleo diesel comercial.

Portanto, a utilização da radiação ultravioleta como um método de controle para inativação e/ou eliminação de microrganismos, favorece a distribuição e comercialização de óleo diesel, aumentando o tempo de estocagem, e visando garantir a qualidade do produto até o consumidor final.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar o processo de quantificação dos microrganismos;
- Avaliar novos tempos de incidência com radiação UV;
- Produzir e testar blendas B20 e B40 no reator e radiação UV;
- Realizar um teste de estabilidade de amostras em diferentes tempos de armazenamento e avaliar a estabilidade após a radiação UV;
- Realizar uma identificação de microrganismos nas diferentes épocas de produção do biodiesel, avaliando as distintas matérias-primas;
- Estabelecer um Banco de Germoplasma de microrganismos degradadores de biodiesel, importantes para pesquisas de detecção e controle de qualidade do biodiesel.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Biodiesel**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3nratt3h.html>. Acesso em 24 de junho de 2017.
- Aldhaidhawi, M., Chiriach, R., Bădescu, V., Descombes, G., & Podevin, P. Investigation on the mixture formation, combustion characteristics and performance of a Diesel engine fueled with Diesel, Biodiesel B20 and hydrogen addition. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2017.
- Aleme, H. G. Determinação de parâmetros físico-químicos do óleo diesel a partir de curvas de destilação utilizando técnicas quimiométricas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Química. **Tese**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.
- Alsopp, D. S. K.; Seal, K. J.; Gaylardec, C. C.; Bento, F. M.; Shirakawa, M. Biodeterioração de materiais refinados e processados. Em: Introdução à Biodeterioração, 1ª edição. Editora da UFRGS, Porto Alegre, Capítulo 3: 59 – 131, 2016.
- Ambrosio, E.; Milano, L. M.; Souza, M. T. F.; Chiavelli, L. U. R.; Montanher, P. F.; Visentainer, J. V.; Almeida, V. C.; Souza, N. E.; Garcia, J. C. Study of biodiesel photodegradation through reactions cataly ed by fenton's reagent. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 25, p. 759, 2014.
- ASTM – American Society for Testing, materials – ASTM e1259 – 10 Standard Practice for evaluation of antimicrobials in liquid fuel boiling below 390°C. **ASTM International**, 2010, West Conshohocken, PA. Acesso em 17 de fevereiro de 2018.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicomcombustíveis. **Óleo diesel, 2016**. Disponível em <http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-derivados/155-combustiveis/1857-oleo-diesel>. Acesso em 20 de junho de 2017.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicomcombustíveis. **Boletim Mensal do Biodiesel – ano base Nov/2017**. Disponível em [http://aprobio.com.br/wp-content/uploads/2017/02/Boletim\\_Biodiesel\\_JANEIRO\\_2017.pdf](http://aprobio.com.br/wp-content/uploads/2017/02/Boletim_Biodiesel_JANEIRO_2017.pdf). Acesso em 20 de junho de 2018.
- AOCS – American Oil Chemists' Society, Oil Stability Index (OSI) Revised, AOCS Method Cd 12b-92, 2013.
- Araújo, T. S.; Souza, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia plena**, v. 4, n. 11, 2008.
- Ashraful, A. M.; Masjuki, H. H.; Kalam, M. A.; Ashrafur, S. M. R.; Habibullah, M.; Syazwan, M. Study of the effect of storage time on the oxidation and termal stability of various biodiesel and their blends. **Energy Fuels**, v. 28, n. 2; p. 1081-1089, 2014.
- Azambuja, A. O.; Buker, F.; Quadros, P. D.; Zhalininak, K.; Dias, R.; Vacaro, B. B.; Correa, C.; Ferrão, M.; Camargo, F. A. O.; Triplet, E.; Bento, F. M. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying súlfur contente, analysed by ilumina Hi-Seg. **Fuel**, 2016.

Balogh, T. S., Velasco, M. V. R., Pedriali, C. A., Kaneko, T. M., & Baby, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

Bastos, E. F. S. S. Propriedades reológicas e de estabilização de emulsões do fucopol. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. 2013.

Bastos, F. A. Estudos relativos a biodiesel:(i) determinação de metóxido de sódio por termometria, (ii) estudo da influência do líquido da castanha de caju na estabilidade oxidativa de diferentes tipos de biodiesel. **Tese**. Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade estadual de Campinas. 2014.

Battistelli, A. A., de Sousa Vidal, C. M., de Souza, J. B., & Cavallini, G. S. Tratamento Avançado de Efluente de Reator UASB por Membrana de Microfiltração Associado à Desinfecção por Radiação Ultravioleta. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 37, n. 1, p. 45-54, 2016.

Blaschek, H. P. Clostridium. In: Batt, C. A. e Tortorello, M. L. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2ª Edição. Academic Press, pg. 444-448, 2014.

Beker, S. A., da Silva, Y. P., Bücker, F., Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Peralba, M. D. C. R. & Bento, F. M. Effect of different concentrations of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on microbial growth and chemical stability of soybean biodiesel during simulated storage. **Fuel**, v. 184, p. 701-707, 2016.

BEM - Balanço Energético Nacional. Relatório Síntese – ano base 2015. Disponível em [https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final\\_2016\\_Web.pdf](https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final_2016_Web.pdf). Acesso em 21 de junho de 2017.

Bento, F. M., & Gaylarde, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.

Bilotta, P.; Daniel, L. A. Ozônio e radiação UV na inativação de indicadores patogênicos em esgoto sanitário: análise comparativa. **Minerva**, v. 3, n. 2, p. 199-207, 2006.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução n° 30 de 23 de junho de 2016. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 20 de junho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução n° 45 de 25 de agosto 2014. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 20 de junho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 50 de 23 de dezembro de 2013. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 20 de junho de 2017.

BRASIL. Lei nº 13.263 de 23 de março de 2016. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2016/lei/L13263.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/L13263.htm). Acesso em 28 de junho de 2017.

Braun, J. V., Santos, V. O. B., Silva, M. W., Ongaratto, D. P., & Fontoura, L. A. M. Avaliação da estabilidade oxidativa de blendas de biodieseis metílico e etílico de óleo de soja e de gorduras de origem vegetal. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 13, 2015.

Bücker, F., Barbosa, C. S., Quadros, P. D., Bueno, M. K., Fiori, P., te Huang, C., Frazzon, A. P. G., Ferrão, M. F. Camargo, F. A. O. & Bento, F. M. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 346-355, 2014.

Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. D. C. R., Camargo, F. A. O., & Bento, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 172-178, 2011.

CALISKAN, Hakan. Environmental and enviroeconomic researches on diesel engines with diesel and biodiesel fuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 154, p. 125-129, 2017.

Carvalho, A. L., Cardoso, E. A., Rocha, G. O., Teixeira, L. S., Pepe, I. M., & Grosjean, D. M. Carboxylic acid emissions from soybean biodiesel oxidation in the EN14112 (Rancimat) stability test. **Fuel**, v. 173, p. 29-36, 2016.

Cazarolli, J. C., Bücker, F., Manique, M. C., Krause, L. C., Maciel, G. P. D. S., Onorevoli, B., ... & Bento, F. M. Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 3, p. 251-257, 2012.

Cazarolli, J. C., Guzatto, R., Samios, D., Peralba, M. D. C. R., de Siqueira Cavalcanti, E. H., & Bento, F. M. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 364-372, 2014.

Cruz, L. M.; Souza, E. M.; Weber, O.B.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J.; Pedrosa, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananascomosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microb.** Vol. 67, p. 2375-2379, 2001.

Das, N., & Chandran, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2010.

Dias, V. D. Radiação ultravioleta e ozônio aplicados como métodos alternativos de desinfecção de afluentes secundários de esgoto sanitário. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia da USP. São Paulo 2001.

Dogan, T. H., Temur, H. Effect of fractional winterization of beef tallow biodiesel on the cold flow properties and viscosity. **Fuel**, v. 108, p. 793-796, 2013.

Fattah, I. R., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Hazrat, M. A., Masum, B. M., Imtenan, S., & Ashraf, A. M. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 356-370, 2014.

Ferreira, J. C. Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina – PR, 2015.

Fu, J., Turn, S. Q., Takushi, B. M., Kawamata, C. L. Storage and oxidation stabilities of biodiesel derived from waste cooking oil. **Fuel**, v. 167, p. 89-97, 2016.

Gaylarde, C. C.; Bento, F.; Kelly, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 01 – 10, 1999.

Hill, E. C.; Hill, G. C. Estratégias for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesel., In IASH, 2009, The 11<sup>o</sup> International Conference on Stability Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, 2009.

Jakeria, M. R.; Fazal, M. A.; Haseeb, A. S. M. A. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 154-163, 2014.

Lima, Alexandre de Souza. O Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis - PMQC / Autor: Alexandre de Souza Lima; Coautores: Carolina Santiago de Assis, Edmilson Raldenes, João Paulo Marques Lopes Pereira. – Rio de Janeiro: ANP, 2012.

Lisiecki, P., Chrzanowski, Ł., Szulc, A., Ławniczak, Ł., Białas, W., Dziadas, M., ... & Jeleń, H. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. **Fuel**, v. 116, p. 321-327, 2014.

Mariano<sup>a</sup>, A. P., Tomasella, R. C., De Oliveira, L. M., Contiero, J., & De Angelis, D. D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, 2008.

Mariano<sup>b</sup>, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. F., Piróllo, M. P. S. e Contiero, J. Biodegradabilidade de óleos comerciais e degradados. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39 (1), 133-142. 2008.

Meier, T. W., Cripa, F. B., Feroldi, M., Cremonez, P., Schneider, L., Bonassa, G., & Teleken, J. G. Avaliação da produção de ésteres metílicos e glicerol a partir das misturas de óleo residual, de soja e de canola. **Revista Tecnológica**, pg. 73-81. 2015.

Meira, M., Santana, P. M. B., Silva, D. S., Catarino, F. B. S., Borges, L. F. J., & Moreira, L. B. Aditivos melhoradores da estabilidade oxidativa e corrosividade do biodiesel e da lubrificidade da suas misturas com diesel. **Revista Educação, Tecnologia e Cultura-ETC**, v. 14, n. 14, 2016.

Meyer, D. D., Beker, S. A., Bücker, F., Peralba, M. D. C. R., Frazzon, A. P. G., Osti, J. F., Andrezza, R., Oliveira, F. A. & Bento, F. M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 356-363, 2014.

MME – Ministério de Minas e Energia. Manual de iluminação. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em [http://www.mme.gov.br/documents/10584/1985241/MANUAL%20DE%20ILUMINACAO%20-%20PROCEL\\_EPP%20-AGOSTO%202011.pdf](http://www.mme.gov.br/documents/10584/1985241/MANUAL%20DE%20ILUMINACAO%20-%20PROCEL_EPP%20-AGOSTO%202011.pdf). Acesso em 20 de novembro de 2017.

MME – Ministério de Minas e Energia. Boletim dos Biocombustíveis. Edição nº 109 de Mai/Jun de 2017. Disponível em <http://www.mme.gov.br/documents/1138769/1732805/Boletim+DBio+n%C2%BA+107+jan-fev+de+2017.pdf/e2e102f2-5ce3-4390-89d5-d08fc8bfcce3>. Acesso em 18 de janeiro de 2018.

Okuno, E; Vilela, M. A. C. **Radiação ultravioleta: características e efeitos**. Editora Livraria da Física, 1º ed. São Paulo, 2005.

Onuorah, S. C.; Ikegbunam, M.N., Awah, S.N., Ezeadila. J.O. Microbial Contamination of Stored Diesel Oil in Nigeria. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n.3, p. 1459-1464, 2013.

Patel, Rupesh L.; Sankhavara, C. D. Biodiesel production from Karanja oil and its use in diesel engine: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 464-474, 2017.

Perrin, A.; Souques, M. Electromagnetic Fields, Environment and Health. **Springer Science & Business Media**, 2013.

Pinho, D. M. M. Armazenagem e uso de biodiesel: problemas associados a formas de controle. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico – CDT, UnB, 2016.

Ponczek, M. Degradação de compostos orgânicos voláteis em fase gasosa através da fotocatalise com luz UV, TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/Pt. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UNICAMP. Campinas, 2014.

Pullen, J.; Saeed, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924-5950, 2012.

Quatrin, P. M., Comim, V. M., Lopes, L. Q. S., Gündel, A., de Almeida Vaucher, R., & Santos, R. C. V. Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes in vitro de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Sciential**, v.16, n.2, pg. 191-203. 2016.

Ramos, L. P., Kothe, V., César-Oliveira, M. A. F., Muniz-Wypych, A. S., Nakagaki, S., Krieger, N. & Cordeiro, C. S. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2016.

Resolução ANEEL nº 2.255 de 20 de Junho de 2017. Disponível em <http://www.copel.com/hpcopel/root/nivel2.jsp?endereco=%2Fhpcopel%2Froot%2Fpagcopel2.nsf%2F5d546c6fdeabc9a1032571000064b22e%2F8c04fbf11f00cc5703257488005939be>. Acesso em 22 de fevereiro de 2018.

Ribeiro, C. B., Buratto, W. G., Gueri, M. V. D., Scaburi, G. R., & Gonzeli, F. V. Fermentação alcoólica do caldo da cana: parâmetros operacionais de resposta no processo. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 4, pg. 465-472. 2015.

Rodríguez-Rodríguez, C. E., Rodríguez, E., Blanco, R., Cordero, I., & Segura, D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1595-1601, 2010.

Ronchi, R. P. Avaliação da eficiência do ultrassom no processo de separação de fases em água produzida e em emulsões sintéticas do tipo O/A. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Energia. Universidade Federal do Espírito Santos. 2014.

Saluja, R. K.; Kumar, V.; Sham, R. Stability of biodiesel—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 62, p. 866-881, 2016.

Sanhueza, R. M. V.; Maia, L. Utilização de luz ultravioleta (UV-C) na proteção de maçãs fuji da podridão por *Penicillium expansum*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa Uva e Vinho**. Bento Gonçalves, 2001.

Sgardi, F. C.; Carmo, E. D.; Rosa, L. F. B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. **Revista de Ciências Médicas**, v. 16, n. 4/6, 2012.

Shahabuddin, M., Kalam, M. A., Masjuki, H. H., Bhuiya, M. M. K., & Mofijur, M. An experimental investigation into biodiesel stability by means of oxidation and property determination. **Energy**, v. 44, n. 1, p. 616-622, 2012.

Shahriaret, M.; Haque, R.; Kabir, S.; Dewan, I.; Bhuyian, M. A. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. **Stamford J Pharm Sci**. vol. 4, p.53–57, 2011.

Silva, D. S. P. Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2012.

Silva, W. L. G. Biodiesel: síntese etílica e estabilidade oxidativa. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2015.

Sørensen, G., Pedersen, D. V., Nørgaard, A. K., Sørensen, K. B., & Nygaard, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5259-5264, 2011.

Soriano, A. U., Martins, L. F., de Assumpção Ventura, E. S., de Landa, F. H. T. G., de Araújo Valoni, É., Faria, F. R. D., ... & do Carmo, F. L. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 102-114, 2015.

Souza, G. S. M. B. Desinfecção de efluentes sanitários por radiação UV e GAMA: efeitos da inativação de ovos de *Ascaris sp.* **Tese**. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

Souza, J. B., de S Vidal, C. M., Cavallini, G. S., Quartaroli, L., & Marcon, L. R. C. Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de esgoto sanitário. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n. 2, p. 117-126, 2012.

Valduga, E., Tatsch, P. O., Tiggemann, L., Treichel, H., Toniazzo, G., Zeni, J., Luxxio, M. D. & Júnior, A. F. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, n. 9, pg. 2429-2436. 2009.

VAZ, F. S. Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. **Dissertação**. Universidade Federal de Goiás. 2010.

White, J., Gilbert, J., Hill, G., Hill, E., Huse, S. M., Weightman, A. J., & Mahenthiralingam, E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4527-4538, 2011.

Yemashova, N. A., Murygina, V. P., Zhukov, D. V., Zakharyantz, A. A., Gladchenko, M. A., Appanna, V., & Kalyuzhnyi, S. V. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 315, 2007.

Young, J.P.; Downer, H.L.; Eardly, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J Appl Bacteriol**, vol. 173, p. 2271-2277, 1991.

Zimmer, A. R. Monitoramento e controle da contaminação microbiana durante o armazenamento simulado de misturas diesel/biodiesel com uso de biocida. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS. 2014.