

MARCOS ANTONIO POLINARSKI

INFLUÊNCIA DOS TEORES DE ÁGUA E ENXOFRE NO CONTROLE
MICROBIOLÓGICO DE COMBUSTÍVEIS DIESEL BX UTILIZANDO
RADIÇÃO ULTRAVIOLETA

CASCVEL
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2020

MARCOS ANTONIO POLINARSKI

INFLUÊNCIA DOS TEORES DE ÁGUA E ENXOFRE NO CONTROLE
MICROBIOLÓGICO DE COMBUSTÍVEIS DIESEL BX UTILIZANDO
RADIÇÃO ULTRAVIOLETA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Helton José Alves

Coorientador: Dr. Fábio Rogério Rosado

CASCADEL
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Polinarski, Marcos Antonio

Influência dos teores de água e enxofre no controle microbiológico de combustíveis diesel Bx utilizando radiação ultravioleta / Marcos Antonio Polinarski; orientador(a), Helton José Alves; coorientador(a), Fábio Rogério Rosado, 2020.

82 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura, 2020.

1. Contaminação microbiológica de combustíveis. 2. Influência de teor de água e enxofre. 3. Radiação ultravioleta. 4. Controle microbiológico. I. Alves, Helton José. II. Rosado, Fábio Rogério. III. Título.

MARCOS ANTONIO POLINARSKI

Influência dos teores de água e enxofre no controle microbiológico de combustíveis diesel Bx utilizando radiação ultravioleta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre 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)



Edson Antonio da Silva

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



Adriana Fiorini Rosado

Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina (UFPR)



Rodrigo Sequinel

Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina (UFPR)

Cascavel, 28 de fevereiro de 2020

“Não importa onde uma pessoa nasce, mas quem ela escolhe ser.”
- J. K. Rowling

“Educação não transforma o mundo. Educação transforma pessoas. Pessoas transformam o mundo.”
- Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar nos momentos de tormenta;

Aos meus pais, por todo amor para comigo e pelo apoio e incentivo para seguir na vida acadêmica;

Às minhas irmãs e sobrinhos, por todos os momentos de alegria;

À CAPES, pelo incentivo financeiro por meio da bolsa;

À UNIOESTE, por fornecer ensino público, gratuito e de qualidade;

À UFPR-Setor Palotina, por ceder a infraestrutura para realização da pesquisa;

Ao meu orientador, prof. Dr. Helton José Alves, pelo incentivo à pesquisa, orientação e compreensão nos momentos de dificuldade;

Ao meu coorientador, prof. Dr. Fábio Rogério Rosado, pelo incentivo e disposição em auxiliar nos experimentos;

À prof. Dra. Adriana Fiorini, pela ajuda e disposição durante o período dos experimentos;

Aos membros da banca examinadora, pela colaboração e sugestões ao trabalho;

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Materiais e Energias Renováveis, pelos momentos de descontração, ajuda e cafés;

À minha amiga Andressa Neves, por todo suporte, paciência e ajuda;

Aos meus amigos e companheiros de moradia (Marcella, Douglas, Octávio) por protagonizarem momentos marcantes e por tornaram mais leves os dias em Palotina;

Aos meus amigos do grupo “Luluzinha” pelos momentos de descontração, noites de filmes, jantares e, acima de tudo, pela amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram desta jornada junto comigo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações para obtenção de biodiesel, onde (a) representa a transesterificação e (b) a esterificação.....	7
Figura 2. Diferentes formas que a água pode ser encontrada nos tanques de armazenamento de diesel B.....	16
Figura 3. Concentrações máximas de enxofre (ppm) no combustível diesel em diferentes países no ano de 2016.	22
Figura 4. Fluxograma metodológico seguido para o desenvolvimento do presente trabalho.	35
Figura 5. Esquema geral do reator de radiação ultravioleta.....	36
Figura 6. A e B: Amostras MP-D1 e MP-D2, referente ao diesel S10 e S500 respectivamente, sem alteração de cor após estocagem; C e D: Amostras MP-D7 e MP-D8 referentes ao diesel B20, S10 e S500 respectivamente, com adição de água com mudança de cor após estocagem; E e F: Amostra MP-D7 e MP-D8 com formação de biomassa microbiana.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de derivados de petróleo energéticos (2013 – 2018)	5
Tabela 2. Especificações do óleo diesel (características, limites e métodos) de acordo com a ANP	9
Tabela 3. Viscosidade, densidade, poder calorífico e emissões de combustível diesel emulsionado em água em diferentes proporções.....	18
Tabela 4. Evolução dos teores de enxofre no combustível Diesel comercializado no Brasil	23
Tabela 5. Consequências do desenvolvimento microbiano em combustíveis.....	25
Tabela 6. Bactérias e fungos isolados em óleo diesel, biodiesel e blendas	27
Tabela 7. Composição das amostras a serem avaliadas	37
Tabela 8. Valores de absorvância (600 nm) para as diferentes amostras de combustível no início e no final da estocagem	45
Tabela 9. Absorvância das amostras de combustível anterior e posterior o tratamento com radiação ultravioleta e eficiência do tratamento empregado.....	48
Tabela 10. Absorvância das amostras de combustível diesel B11 e B20 com diferentes teores de enxofre (S10 e S500)	59
Tabela 11. Absorvância (600 nm) para as amostras de combustível no início e fim da estocagem, fim do tratamento e após 10, 20 e 30 dias do tratamento com radiação ultravioleta	61
Tabela 12. Titulação de Karl Fischer para teor de água das amostras de combustíveis utilizados no reator ultravioleta anterior e posterior o contato com radiação ultravioleta	63
Tabela 13. Massa específica à 20°C das amostras de combustíveis utilizadas no reator ultravioleta anterior e posterior a exposição à radiação ultravioleta	65
Tabela 14. Viscosidade cinemática à 20°C das amostras de combustíveis utilizadas no reator ultravioleta anterior e posterior a exposição à radiação ultravioleta.....	66
Tabela 15. Estabilidade oxidativa (h) para amostras de diesel B11 e B20, tanto S10 quanto S500, com adição de água (10000 ppm) e sem adição, anterior e posterior a exposição à radiação ultravioleta	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Relação entre peso seco (mg.mL^{-1}) e medidas de absorvância (λ 600 nm) durante ensaio com radiação ultravioleta da amostra de combustível MP-D8 (B20, S500, 2500 ppm de água).....	43
Gráfico 2. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S10 B11 comercial (MP-D1), com adição de 2500 ppm de água (MP-D5) e 10000 ppm de água (MP-D9) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.....	51
Gráfico 3. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S500 B11 comercial (MP-D2), com adição de 2500 ppm de água (MP-D6) e 10000 ppm de água (MP-D10) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.....	53
Gráfico 4. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S10 B20 (MP-D3), com adição de 2500 ppm de água (MP-D7) e 10000 ppm de água (MP-D11) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.....	55
Gráfico 5. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S500 B20 comercial (MP-D4), com adição de 2500 ppm de água (MP-D8) e 10000 ppm de água (MP-D12) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.....	57

POLINARSKI, Marcos Antonio. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, julho de 2019. **Avaliação da influência da água e enxofre no controle microbiológico em combustíveis diesel Bx utilizando radiação ultravioleta.** Prof. Dr. Helton José Alves; Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado.

RESUMO

A presença de microrganismos em óleo diesel, biodiesel e suas misturas, é uma pauta que tem sido bastante documentada pela literatura, sobretudo pelos efeitos negativos que tende a causar, como por exemplo, a formação de borras, entupimento de filtros e válvulas e corrosão de tanques de armazenamento. Com o aumento gradativo dos teores de biodiesel ao diesel comercializado, os cuidados durante a estocagem do combustível devem ser ainda maiores, uma vez que esse biocombustível possui caráter higroscópico, o que facilita a contaminação devido a capacidade de absorção de água. Uma das formas de evitar e/ou diminuir a contaminação microbiológica é a aplicação de técnicas como limpeza periódica dos tanques de armazenamento ou o uso de biocidas. Contudo seu uso pode estar associado a mudanças nos parâmetros físico-químicos do combustível. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de microrganismos em combustível diesel B11 e B20 com variações quanto ao teor de enxofre (10 ppm e 500 ppm) e água (sem adição, 2500 ppm e 10000 ppm), propor o uso da radiação ultravioleta como alternativa ao controle microbiano e verificar se seu promove alterações em suas características físico-químicas. Para tanto, as amostras de combustíveis foram estocadas por 10 dias, onde a presença de microrganismos foi acompanhada a partir da leitura de absorbância. Após a estocagem, os combustíveis foram expostos à radiação ultravioleta durante 360 minutos, nos quais a presença de microrganismos foi acompanhada a cada 45 minutos. Características como teor de água, viscosidade, massa específica e estabilidade oxidativa foram avaliadas no início e final do tratamento. Após o tratamento a presença de microrganismos foi acompanhada a cada 10 dias por um período de 30 dias a fim de verificar sua eficácia. Os resultados apontaram que durante a estocagem simulada os combustíveis com adição de água foram os mais susceptíveis ao crescimento de microrganismos, enquanto para os combustíveis sem alteração as mudanças mais expressivas foram em relação ao combustível com maior teor de enxofre. O tratamento com radiação ultravioleta demonstrou eficiência acima de 90% para duas das doze amostras analisadas, enquanto apenas 4 amostras tiveram eficiência menor que 50% na redução da presença de microrganismos caracterizada pela leitura da absorbância. Tratando-se dos parâmetros físico-químicos, foi verificado que a utilização da radiação ultravioleta promoveu mudanças estatisticamente significativas, porém não alteraram a qualidade final do combustível. O uso da radiação ultravioleta para controle da presença de microrganismos mostrou-se estável por até 10 dias após sua aplicação. Os resultados encontrados apontam o potencial da radiação ultravioleta como método de controle microbiano, além disso, foi verificado que a redução dos teores de enxofre não aumenta, por si só, a contaminação microbiana no combustível, sendo a presença de água a principal razão da contaminação.

PALAVRAS-CHAVE: biodiesel; contaminação microbiana; biodegradabilidade.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

POLINARSKI, Marcos Antonio. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, julho de 2019. **Evaluation of water and sulfur influence on microbiological control of Bx diesel fuels using ultraviolet radiation.** Prof. Dr. Helton José Alves; Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado.

ABSTRACT

The presence of microorganisms in diesel oil, biodiesel and their blends, is an issue that has been well documented in the literature, especially due to the negative effects that it tends to cause, for example, the sludge formation, clogging of filters and valves and storage tanks corrosion. With the gradual increase in the levels of biodiesel to commercial diesel, the precautions during fuel storage should be greater, since this biofuel has a hygroscopic character, which facilitates contamination due to the water absorption capacity. One of the ways to avoid microbiological contamination is the application of techniques such as periodic cleaning of storage tanks or the use of biocides. However, their use may be associated with changes in the fuel physicochemical parameters. The aim of this work was to evaluate the presence of microorganisms in diesel fuel B11 and B20 with variations in the sulfur (10 ppm and 500 ppm) and water (without addition, 2500 ppm and 10000 ppm) content, and to propose the use of ultraviolet radiation as alternative to microbial control and to verify if the UV use promotes changes in the fuel physical-chemical characteristics. The fuel samples were stored for 10 days, where the presence of microorganisms was monitored from the absorbance reading. After storage, the fuels were exposed to ultraviolet radiation for 360 minutes, and the microorganisms presence was monitored every 45 minutes. Water content, viscosity, density and oxidative stability were evaluated at the beginning and end of the treatment. After the treatment the microorganisms presence was followed during 30 days. The results showed that during simulated storage, fuels with water addition were the most susceptible microorganisms growth, while fuels without alteration the most significant changes were related to a higher sulfur content. The ultraviolet radiation treatment showed efficiency higher than 90% for 2 of the 12 samples analyzed, while only 4 samples had an efficiency lower than 50% in the microorganisms presence reduction. Regarding the physical-chemical parameters, it was found that the use of ultraviolet radiation promoted statistically significant changes but did not change the final quality of the fuel. The UV treatment proved to be stable for up to 10 days after its application. The results have showed the potential of ultraviolet radiation as a method of microbial control and reduction of sulfur levels does not increase microbial contamination in the fuel, with the presence of water being the main reason for contamination.

KEYWORDS: biodiesel; microbial contamination; biodegradability.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	vii
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 Diesel, biodiesel e suas misturas	4
3.2 Propriedades físico-químicas do diesel comercializado	9
3.3 Degradação do diesel Bx: fatores de influência	13
3.3.1 Instabilidade durante o processo de armazenamento	14
3.3.2 Presença de água	15
3.3.3 Presença de enxofre	21
3.3.4 Consumo de nutrientes e degradação microbiana	24
3.4 Métodos de controle microbiológico	30
3.4.1 Radiação ultravioleta.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Reator ultravioleta	36
4.2 Definição e preparo da composição dos combustíveis	36
4.3 Estocagem simulada e ensaios no reator ultravioleta	38
4.4 Avaliação da presença de microrganismos	38
4.4.1 Preparo do meio de cultura bacteriano	39
4.4.2 Método espectrofotométrico	39
4.4.3 Peso seco	40
4.5 Caracterização físico-química	40
4.5.1 Massa específica à 25°C.....	40
4.5.2 Viscosidade à 20°C	41
4.5.3 Teor de água	41
4.5.4 Estabilidade à Oxidação.....	42
4.6 Análise Estatística	42
5. Resultados e discussão	43
5.1 Comparação entre os métodos espectrofotométrico e peso seco	43

5.2 Avaliação da presença de microrganismos durante estocagem simulada	44
5.3 Ensaio com radiação ultravioleta	48
5.4 Influência da água	50
5.5 Influência do enxofre durante os ensaios com radiação ultravioleta	58
5.6 Avaliação da presença de microrganismos após os ensaios com radiação ultravioleta	60
5.7 Parâmetros físico-químicos	62
5.7.1 Teor de água: análise por Karl Fischer	62
5.7.2 Massa específica à 25°C	64
5.7.3 Viscosidade cinemática a 20°C	65
5.7.4 Estabilidade oxidativa	67
6. CONCLUSÕES	69
7. TRABALHOS FUTUROS	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país cujo transporte é realizado, principalmente, por vias rodoviárias, o que faz que o óleo diesel seja o combustível de maior consumo nacional. A fim de amenizar as emissões promovidas por esse combustível, houve a necessidade de redução dos teores de enxofre no diesel comercializado no país. Atualmente são comercializados o diesel S10 e S500, com limites máximos de 10 e 500 ppm de enxofre, respectivamente (AZAMBUJA et al., 2017).

O fato desse combustível ser de origem fóssil, também se faz um importante tópico de discussão, uma vez que exploração de petróleo no Brasil e no mundo é um assunto de grande repercussão tratando-se da escassez dos recursos naturais. Nesse sentido, o incentivo para a utilização de combustíveis que sejam de origem renováveis, como o etanol e biodiesel, aumenta cada vez mais. O biodiesel é combustível que pode ser obtido por meio de diversas fontes, como óleo de soja e gorduras animais. Dentre os biocombustíveis existentes é o único com propriedades semelhantes ao óleo diesel de origem fóssil, tornando-o uma excelente alternativa na substituição parcial ou total do diesel.

Atualmente o percentual de biodiesel ao óleo diesel é de 11%, com projeções de aumento para 20% nos próximos anos. A adoção dessa mistura apresenta uma série de vantagens ao combustível, como redução de gases poluentes e melhorias na lubricidade. Em contrapartida, a adição do biodiesel ao diesel pode fazer com que o combustível resultante seja mais suscetível a oxidação, devido sua característica de biodegradabilidade, e contaminação microbiana, decorrente de suas propriedades higroscópicas, principalmente quando ocorre em más condições de armazenamento (BENTO et al, 2016).

Com a diminuição do nível de enxofre e aumento do porcentual de biodiesel ao diesel fóssil, discussões acerca das propriedades físico-químicas têm sido levantadas. Isso ocorre devido ao fato de que menores teores de enxofre e maiores teores de biodiesel parecem fazer com o diesel torne-se mais vulnerável à processos de degradação, principalmente de origem microbiológica que podem causar alterações nas propriedades físicas e químicas, comprometendo a qualidade final do produto (AZAMBUJA et al., 2017).

Uma forma de conter e/ou diminuir a contaminação microbiana e os efeitos

negativos atrelados a ela, é a utilização de métodos físicos e químicos para controle microbiológico, tais como: limpeza dos tanques de armazenamento, drenagem da água acumulada, filtragem e centrifugação dos combustíveis, aplicação de biocidas e aditivos químicos (ZIMMER, 2014; BEKER *et al.*, 2016). Ainda que eficientes, a aplicação desses métodos pode acarretar altos custos na aquisição de materiais e/ou manutenção, além do risco de alteração nas propriedades do combustível.

Ao considerar o preço de aquisição e manutenção desses métodos e o risco de alteração das propriedades do combustível, a busca por métodos alternativos para o controle microbiológico de combustíveis que não promovam alterações em suas propriedades físicas e químicas se justifica. Uma alternativa para o controle microbiológico é a utilização da radiação ultravioleta como tratamento (BAUTISTA *et al.*, 2016). Esse tipo de tratamento tem sido aplicado em águas residuárias de estações de tratamento de esgoto e tem se mostrado eficiente para a inativação de microrganismos. Contudo, na área de combustíveis há poucos estudos que avaliam sua eficiência no controle dos microrganismos presentes no óleo diesel (NEVES, 2018).

Ainda que se saiba que a presença de água é um fator que está atrelado às mudanças de propriedades do combustível, no que se diz respeito sua degradação, a literatura apresenta, de maneira geral, poucos estudos que relacionam a problemática associada às mudanças das propriedades físico-químicas frente a contaminação microbiológica em diesel Bx com variados teores de enxofre.

Com isso, este trabalho está pautado nas hipóteses de que maiores concentrações de água e menores concentrações de enxofre em diesel Bx favorecem a proliferação de microrganismos no produto e que a aplicação da radiação UV na inativação microbiológica não provoca alterações nas propriedades físicas e químicas da mistura.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência de teores de água e enxofre em misturas Bx, com foco na avaliação da presença de microrganismos e verificação das mudanças nos parâmetros físico-químicos, aplicando radiação ultravioleta como método de controle alternativo. Acredita-se, portanto, que diante da escassez de trabalhos que abordem este assunto, o presente trabalho torna-se promissor, podendo contribuir fortemente para a literatura relacionada ao tema.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da variação dos teores de enxofre e água em combustível diesel Bx sobre o crescimento de microrganismos durante estocagem simulada e propor um método de controle microbiológico para esse tipo de combustível empregando radiação ultravioleta.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se há uma relação entre os diferentes teores de enxofre e água, de maneira isolada e correlata, no desenvolvimento e inativação de microrganismos;
- Definir e adaptar métodos para verificação da presença de microrganismos nas misturas diesel Bx utilizadas com diferentes teores de enxofre e água;
- Verificar a eficiência do tratamento com radiação ultravioleta na diminuição da presença de microrganismos em diferentes tempos de contato das amostras com a radiação;
- Determinar a curva de crescimento e mortalidade dos microrganismos durante o tratamento utilizado;
- Avaliar o efeito da estocagem sobre os parâmetros microbiológicos;
- Avaliar se as condições de tratamento para inativação microbiológica influenciam as propriedades físico-químicas das misturas Bx.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para fundamentar teórica e metodologicamente este trabalho, foram abordados os seguintes temas: diesel, biodiesel e suas misturas; propriedades físico-químicas do diesel comercializado; degradação do diesel Bx: fatores de influência (onde serão tratados assuntos relacionados a estocagem, presença de água e enxofre, consumo de nutrientes e contaminação microbiana); métodos de controle biológico; e radiação ultravioleta.

3.1 Diesel, biodiesel e suas misturas

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP), define como combustível qualquer produto cuja queima ou transformação química provoque a geração de energia. Nesse sentido, o petróleo é tido como a principal matéria prima para a fabricação de uma série de combustíveis energéticos utilizados em escala global, sendo o óleo diesel um de seus principais produtos.

O óleo diesel possui em sua composição, majoritariamente, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, em proporções residuais, nitrogênio, enxofre e oxigênio (ANP, 2016a). Entretanto, sua composição pode variar de acordo com a origem do petróleo utilizado na sua fabricação e nos diferentes processos de refino (ALEME; BARBEIRA, 2012).

Dentre os combustíveis derivados do petróleo, o óleo diesel é o mais produzido a nível nacional (Tabela 1), seguido da gasolina A e o óleo combustível. De acordo com a ANP (2018), a produção deste combustível no ano de 2017 foi de 41.880.333 m³, o que representa 38,7% da produção total de derivados de petróleo, tanto energéticos quanto não energéticos.

Tabela 1. Produção de derivados de petróleo energéticos (2013 – 2018)

Derivados de Petróleo	Produção (m ³)					
	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Gasolina A	29.720.707	30.078.550	26.923.072	27.719.573	27.661.932	25.064.972
Gasolina de aviação	93.685	93.762	72.486	53.902	59.662	46.220
GLP	10.228.151	10.050.965	9.897.467	9.663.122	10.311.178	10.083.998
Óleo combustível	14.761.276	16.267.891	14.339.295	11.506.738	11.692.764	10.716.336
Óleo diesel	49.539.186	49.675.057	49.457.609	45.369.807	40.581.202	41.880.465
QAV	5.554.391	6.079.114	5.656.859	5.789.278	6.168.600	6.376.333
Outros	263.487	472.222	371.056	128.071	68.608	6.376.333
Total	110.160.883	112.717.562	106.717.844	100.230.490	96.543.945	108.207.373

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2019.

Em razão da liderança do ramo rodoviário, no que se refere ao transporte brasileiro, o diesel é o combustível mais comercializado no país. Em território nacional a ANP estabelece por meio da resolução nº 50/2013 que para o uso rodoviário sejam utilizados os tipos S10 e S500. Uma das diferenças entre os dois tipos apresentados é que o diesel S500 apresenta em sua composição 500 mg kg⁻¹ de enxofre, enquanto o S10 apresenta 10 mg kg⁻¹ (ANP, 2013). Tratando-se do uso não rodoviário do óleo diesel, o tipo comercializado é o S1800, que pode ser utilizado para fins de mineração, transporte ferroviário e geração de energia elétrica (ANP, 2016a).

Uma das maiores preocupações mundiais é em relação à sustentabilidade e a preservação do meio ambiente uma vez que, em sua combustão, o óleo diesel promove a emissão de diversos poluentes, como óxidos de enxofre e nitrogênio, metais tóxicos, dióxido de carbono e outros compostos que podem colocar em risco a saúde humana e causar impactos ambientais negativos (BETHA; BALASUBRAMANIAN, 2011). Segundo dados levantados pelo Balanço Energético Nacional – BEN – (2018) as emissões antrópicas associadas à matriz energética brasileira atingiram 435,8 MtCO₂-^{eq}, sendo o setor de transportes responsável por 45,8% desse montante, o que representa 199,7 MtCO₂-^{eq}.

O aumento das emissões está diretamente associado ao consumo de combustíveis energéticos de origem fóssil. De acordo com o BEN (2018), de 2010 a 2017 houve um acréscimo de 15,44% nas emissões de gases do efeito estufa. Haja

vista que o óleo diesel é o combustível mais utilizado no setor de transporte, seguido da gasolina, e que ambos combustíveis são de origem fóssil, portanto responsáveis por emissões de gases poluentes, cada vez mais há a necessidade da inserção de combustíveis alternativos na matriz energética nacional, como é o caso do biodiesel (GARCIA, 2006).

Garcia (2006) define o biodiesel como um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto. Esse biocombustível pode ser produzido a partir de óleos vegetais (girassol, soja, mamona, dendê e demais oleaginosas) ou de gorduras animais, e um dos fatores que o torna atrativo é o fato que durante sua combustão ocorrem reduções significativas na emissão de poluentes atmosféricos (VAZ, 2010).

Em 2004, o Governo Federal assumiu o compromisso de viabilizar a produção e o uso de biodiesel no país a partir do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). Tal compromisso foi reafirmado com a criação da Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e define o biodiesel como um biocombustível derivado de biomassa renovável (BRASIL, 2005).

A obtenção deste biocombustível ocorre, geralmente, por meio do processo de transesterificação, em que os triglicerídeos existentes nos óleos e/ou gordura vegetal, na presença de um catalisador, reagem com um álcool primário (etanol ou metanol), dando origem a moléculas menores de ésteres alquílicos (biodiesel) e glicerina (ANP, 2016b). Esse processo é responsável por diminuir a viscosidade do óleo ou gordura que dá origem ao biodiesel, melhorando suas propriedades físico químicas (GARCIA, 2006; SILVA, 2015).

Outra maneira de obter-se biodiesel é por meio do processo de esterificação de ácidos graxos com um álcool de cadeia curta na presença de catalisador, em que o produto desta reação será um éster alquílico e água (PINHO, 2016). Este processo juntamente como o de transesterificação, estão ilustrados na figura 1.

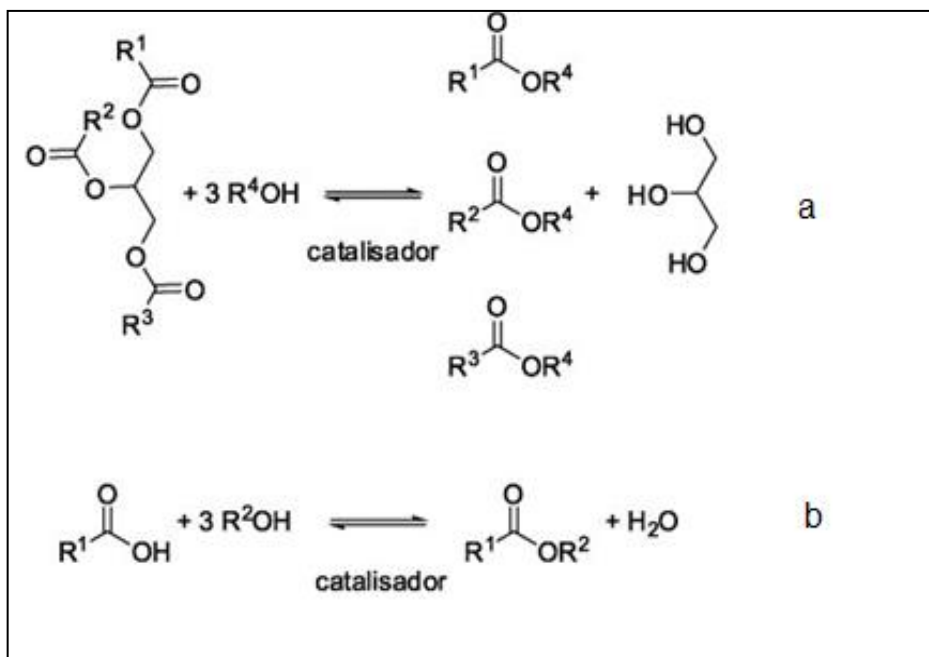


Figura 1. Reações para obtenção de biodiesel, onde (a) representa a transesterificação e (b) a esterificação.

Fonte: Pinho, 2016.

Garcia (2006) e Patel e Sankhavara (2017) destacam que o biodiesel é virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos e que apresenta uma série de benefícios, tais como a biodegradabilidade, maior ponto de fulgor, maior número de cetano, melhor lubricidade, menor emissão de material particulado, além de ser de origem renovável. Com isso, a inclusão deste biocombustível na matriz energética e o incentivo de seu uso, possibilitam acréscimos no âmbito social e ambiental, como, por exemplo, a redução das emissões de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e gases do enxofre (SO_x), o fortalecimento da agricultura familiar e a fixação do homem no campo (NABI; AKHTER; SHAHADAT, 2006; MEIRA *et al.*, 2016).

Ainda que os benefícios proporcionados pela mistura desses combustíveis sejam significativos, há de se considerar os desafios associados. Dentre eles, pode-se citar a maior predisposição à oxidação que acarreta a elevação da acidez e da corrosividade, na formação de sedimentos durante a estocagem e na biodeteriorização do produto, além da elevada reatividade com o ar e a higroscopicidade, relacionada à capacidade de absorção de água do combustível, que pode levar ao desenvolvimento e crescimento de microrganismos (BUENO, 2006; BUCKER, 2009; CARVALHO *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2016).

O cenário nacional de produção de biodiesel tem crescido a cada ano. Em 2010 a produção foi de 2.386.399 m³, já em 2017 a produção deste biocombustível bateu a marca de 4.291.294 m³, ou seja, 79,82% a mais que em 2010 (ANP, 2018). No Brasil, a região que mais produz biodiesel é o centro-oeste, seguido do sul e sudeste.

Os estados brasileiros com maior capacidade de produção deste produto são, em sua maioria, àqueles com maior produtividade agrícola, como é o caso do Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Goiás e Paraná (ANP, 2018). Tal fato ocorre, principalmente, devido a disponibilidade de terras para o cultivo e produção das matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel. A ANP (2018) destaca, em seu anuário estatístico, que dentre as matérias primas utilizadas na produção de biodiesel, a soja é a que prevalece, representando um total de 71,6% dentre as demais matérias primas utilizadas. A gordura animal encontra-se no segundo lugar, seguida por outros materiais graxos e óleo de algodão, representando 16,8%, 11,3% e 0,3% respectivamente.

Bento *et al.* (2016) e Neves (2018) comentam que devido as diversas fontes de matérias primas, a composição e propriedades físico-químicas do biodiesel se tornam variados, com diferença no tamanho dos constituintes, grau de insaturação e proporção entre diferentes ésteres graxos. Todavia, suas propriedades são similares ao diesel oriundo do petróleo, tornando-o uma excelente alternativa para sua substituição parcial ou integral (PATEL; SANKHAVARA, 2017). Nesse sentido, os ésteres de ácidos graxos caracterizam uma estratégia para atender a frota de veículos à diesel no mercado, podendo ser utilizados em misturas com o diesel de petróleo sem que haja a necessidade de adaptação dos motores (VAN GERPEN *et al.*, 2004; MURUGESAN *et al.*, 2009; BOELTER, 2017).

Boelter (2017) destaca que para as misturas de diesel:biodiesel são utilizadas nomenclaturas específicas, designada "Bx", em que 'x' refere-se ao percentual de adição do biodiesel ao diesel. Dessa forma, a denominação para o diesel e biodiesel em sua forma pura é de B0 e B100, respectivamente.

No Brasil, as misturas de biodiesel ao diesel fóssil iniciaram em 2004, em caráter experimental, e até o ano de 2007 a comercialização do diesel com teor de 2% de biodiesel (B2) passou a ser voluntária. A adição obrigatória desse biocombustível aconteceu apenas em 2008, sendo 2% o teor exigido (ANP, 2016b). Os teores de mistura do biodiesel ao óleo diesel comercializado nacionalmente foram

aumentando à medida que o mercado brasileiro amadureceu, passando de 2% (B2) em 2008 para 7% (B7) em 2014 (ANP, 2016b) e atualmente, o teor obrigatório em território nacional é de 11% (B11) (BRASIL, 2016).

3.2 Propriedades físico-químicas do diesel comercializado

No Brasil, o órgão responsável por estabelecer os parâmetros mínimos de qualidade para comercialização de combustíveis é a ANP. Esses parâmetros (Tabela 2), listados na Resolução ANP nº 50 de 23 de dezembro de 2013, objetivam garantir uma uniformidade ao produto, desde sua produção até sua utilização final. Neste regulamento estão listados as principais características e propriedades do diesel e biodiesel, seus limites e principais normas que devem ser aplicadas para suas determinações.

As especificações fornecidas pela ANP seguem rigorosos métodos de análise, estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e *International Organization for Standardization* (ISO) (RAMOS *et al.*, 2016). Como essas especificações ditam os parâmetros mínimos de qualidade do combustível é importante atentar-se a elas, pois combustíveis fora dessas especificações estão sujeitos à degradação e, conseqüente, perda de qualidade.

Tabela 2. Especificações do óleo diesel (características, limites e métodos) de acordo com a ANP

(continua)

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/m ³) (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

(continua)

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
Resíduo de carbono – 10% amostra (%massa)	0,25			NBR 14318 ASTM D524
Cinzas (%massa)	0,01			NBR 9842 ASTM D482
Corrosividade ao cobre	1			NBR 14359 ASTM D130
Teor de água (mg/kg)	200	500		ASTM D6304 EN ISO 12937
Água e sedimentos (% vol.)	-	0,05		ASTM D2709
Estabilidade à oxidação (h)	Anotar			EN15751
Contaminação total (mg/kg) (12)	24	Anotar		EN12662
Número de acidez (mg KOH/g)	0,3			NBR 14248 ASTM D664

(conclusão)

Condutividade elétrica (Ps/M) (13)	25	25	Anotar (14)	ASTM D2624 ASTM D4308
Número de cetano ou número de cetano derivado (NCD)	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.

Dentre todas as especificações existentes, alguns autores indicam que a estabilidade oxidativa, viscosidade cinemática, massa específica e teor de água são os que mais influenciam na qualidade do produto, no que diz respeito a sua degradação (PULLEN; SAEED, 2012; RAMOS *et al.*, 2016; PINHO, 2016).

Seja durante o processo de produção, transporte, venda em postos de combustíveis ou consumo em veículos e máquinas agrícolas, o diesel, biodiesel e suas blends estão expostos a processos deteriorativos, principalmente quando estocado sob condições inadequadas. Nesse sentido, a existência de normas com requisitos mínimos de qualidade se justifica.

A resistência do combustível a essas alterações físico-químicas denomina-se estabilidade (BRAUN *et al.*, 2015). A estabilidade oxidativa, por sua vez, trata-se da capacidade do óleo resistir ao processo de oxidação. Este parâmetro é expresso pelo período de indução em horas, ou seja, tempo entre início da medição e o momento em que ocorre um aumento considerável na formação de produtos desta oxidação (ZIMMER, 2014). Gupta e Demirbas (2010) ressaltam que ao analisar a estabilidade oxidativa de um combustível, pode-se criar inferências a respeito de sua composição

química, qualidade da matéria-prima utilizada em sua produção e condições durante o processamento e estocagem, seja do óleo ou da semente.

Garcia (2006) escreve que a estabilidade oxidativa diminui com o aumento no número de insaturações no ácido graxo, dessa forma é possível afirmar que ela é influenciada pelo comprimento da cadeia, número de insaturações, disponibilidade de oxigênio, entre demais ocorrências relacionadas a funções químicas (WAZILEWSKI, 2012; OLIVEIRA, 2016).

Diante disso, têm-se que a estabilidade oxidativa é um parâmetro fundamental a ser avaliado tratando-se da manutenção da qualidade dos combustíveis em estocagem, pois está associada a mudanças nas propriedades físicas e químicas (GOG *et al.*, 2007; CAVALCANTI, 2009; MOSER, 2009; ZIMMER, 2014). Um dos parâmetros que podem ser alterados em decorrência da oxidação de combustíveis é a viscosidade. Esta é definida como a medida da resistência do fluido ao escoamento, dessa forma, quanto menor a viscosidade, melhor será a fluidez do líquido (ZIMMER, 2014).

A viscosidade, além de ser uma referência de qualidade do combustível, é um dos parâmetros que podem ser alterados em decorrência da oxidação do combustível. Tratando-se de combustível diesel, biodiesel e suas misturas, o aumento da viscosidade indica a presença de material de alto peso molecular no produto relacionada à formação de ácidos e compostos poliméricos (ZIMMER, 2014). Esse fato pode dar início a formação de gomas e sedimentos no produto, influenciando no processo de combustão e provocando a deposição de resíduos em partes internas do motor (ATABANI *et al.*, 2012; MAZUMDAR *et al.*, 2013). Sanli (2018) afirma que valores elevados de viscosidade influenciam negativamente o processo de injeção do combustível, além de ser indicativo de deterioração do produto.

A massa específica, também conhecida como densidade, é um importante parâmetro de qualidade de combustível, e é definida como a massa por unidade de volume. Zimmer (2014) aponta que existe uma correlação entre os valores de massa específica e viscosidade de ésteres metílicos de óleo vegetal, onde um aumento de 860 para 885 kg/m³ na densidade de um biodiesel de origem vegetal acarreta num acréscimo da viscosidade que antes seria de 3,59 mm²/s passando a ser 4,63 mm²/s. Quando a densidade se encontra acima dos níveis permitidos, a emissão de poluentes como monóxido de carbono e material particulado podem aumentar. Em contrapartida,

quando ela está abaixo dos níveis estabelecidos, há perda de potência do motor e aumento de consumo do combustível (RODRIGUES, 2011; OLIVEIRA, 2016).

Neste contexto, de requisitos mínimos de qualidade de combustíveis, o teor de água se faz um importante parâmetro a ser analisado. A presença de água pode acentuar processos de corrosão, contribuir para degradação hidrolítica e fornecer ambiente propício para o crescimento e proliferação de microrganismos (JAKERIA; FAZAL; HASEEB, 2014; ZIMMER, 2014; AZAMBUJA et al, 2017; BOELTER *et al.*, 2018).

3.3 Degradação do diesel Bx: fatores de influência

A qualidade final do combustível depende de diversos fatores, como a origem do petróleo processado, processos durante o refino (hidrotratamento), tipo e origem da matéria prima utilizada (no caso de biodiesel) e principalmente as condições de estocagem, pois é nela que o combustível se torna mais susceptível a degradação. (AZAMBUJA, 2016).

Tratando-se da degradação química de combustíveis, pode-se citar os processos de ordem térmica, oxidativa e hidrolítica como um dos principais. Já a degradação de origem biológica está associada à ação de microrganismos que, quando presentes no combustível, podem funcionar como catalisadores nos processos de degradação química (ZIMMER, 2014).

A degradação térmica ocorre em função da temperatura que, quando elevada, atua na deterioração de ésteres metílicos. A literatura aponta que altas temperaturas aceleram o processo de oxidação e promovem modificações nas propriedades físico-químicas do combustível, como elevação da densidade, viscosidade e acidez (MOSER, 2011; MAZUMDAR *et al.*, 2013). Já a degradação oxidativa é causada pela reação do oxigênio atmosférico com os ácidos graxos insaturados presentes no combustível (ZIMMER, 2014). A degradação hidrolítica, por sua vez, está relacionada a presença de água. Zimmer *et al.* (2013) apontam que a hidrólise do biodiesel inicia o acúmulo de ácidos graxos livres, incorporação de água dissolvida, formação de polímeros, além de facilitar a proliferação de microrganismos.

3.3.1 Instabilidade durante o processo de armazenamento

Segundo a ANP não há um prazo de validade para o óleo diesel, principalmente quando realizadas boas práticas de manuseio e armazenamento, pois estas possibilitam o prolongamento da vida útil do produto. De forma a orientar o mercado consumidor desse produto, o citado órgão informa por meio da cartilha intitulada “Manuseio e Armazenamento de Óleo Diesel B” quais são as orientações e procedimentos que devem ser realizados a fim de garantir a preservação do produto (ANP, 2017). A norma que regulamenta os procedimentos e requisitos para o armazenamento, transporte, abastecimento e controle da qualidade de biodiesel e/ou diesel BX é a ABNT NBR 15512:2014.

Após a introdução do biodiesel ao diesel comercializado, os cuidados durante o armazenamento tornaram-se ainda maior, principalmente devido à maior fragilidade do biodiesel quando comparado suas características físicas e químicas (AZAMBUJA, 2016). Ainda que considerado quimicamente estável, o biodiesel tem maior propensão a degradação química e biológica do que o óleo diesel durante o armazenamento prolongado (ZIMMER, 2014). Por isso os tanques onde o combustível de qualquer origem é armazenado devem estar limpos, secos e protegidos de luz e temperaturas extremas a fim de evitar sua oxidação ou incorporação de contaminantes (ANP, 2016c).

Más condições de armazenamento podem acarretar diversos problemas ao produto, afetando diretamente seu desempenho no motor. Estes problemas estão relacionados a oxidação (devido o contato com o oxigênio do ar, luz e metais provenientes da corrosão dos tanques), decomposição térmica (devido a exposição a altas temperaturas), hidrólise e contaminação microbiana (em decorrência do contato com água ou umidade em tanques e linhas de combustíveis) (HASEEB *et al.*, 2010; MAZUMDAR *et al.*, 2013; ZIMMER, 2014, AZAMBUJA *et al.*, 2017).

Os benefícios da adição de biodiesel ao diesel são bastante conhecidos, principalmente devido as diminuições de gases poluentes, sendo o apelo ambiental uns dos fatores primordiais. Entretanto, diversos estudos nacionais e internacionais apontam que essa mistura promove um maior incremento de populações microbianas, dificultando seu controle durante a armazenagem (BENTO *et al.*, 2006; BUCKER *et al.*, 2011; CAZAROLLI *et al.*, 2016; MARTIN-SANCHEZ *et al.*, 2016; AZAMBUJA, *et*

al., 2017). Com isso, as possibilidades de encontrar água na fase óleo de óleo diesel BX são maiores e como consequência desse fato há acúmulo de biomassa (principalmente na interface óleo-água) que pode ser desagregada e misturar-se no combustível como um todo (AZAMBUJA, 2016).

3.3.2 Presença de água

Dentre os fatores que influenciam na qualidade final do combustível diesel, o teor de água é um dos mais importantes, uma vez que sua presença está associada como a maior fonte de contaminação do combustível devido ao crescimento microbiano (BENTO *et al.*, 2004; FREGOLENTE; FREGOLENTE; MACIEL, 2012). A norma brasileira regulamentada pela ANP estabelece que o teor máximo de água permitido para os combustíveis Diesel S10 e S500 seja de 200 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹ respectivamente, sendo os métodos ASMT D6304 e EN ISO 12937 uma das formas de medição (ANP, 2013).

A presença de água no óleo diesel pode ocorrer de diversas maneiras, seja na forma de água livre, dispersa, em emulsão ou até mesmo solúvel (PETROBRÁS, 2014). Ainda que haja rigorosos cuidados para evitar a presença dessa substância, dificilmente consegue-se evitá-la, pois, surge continuamente nos estoques do óleo diesel, sendo a condensação da umidade do ar e a troca de tanques de acondicionamento uma das razões que favorecem esse contato (PETROBRÁS, 2014).

Uma outra razão da ocorrência de água no combustível é que após a produção do biodiesel é necessário um processo de purificação. Este processo é realizado com o objetivo de retirar resíduos indesejáveis a fim de produzir um óleo com aspecto mais fluído. No entanto, para sua realização, quando feito de maneira convencional, é utilizado água, aumentando a possibilidade de concentrações indesejáveis desse líquido no combustível (CAZAROLLI *et al.*, 2012).

Pinho (2016) aponta que a água pode ser encontrada no tanque de armazenamento de combustível diesel do tipo B (adição de biodiesel) em três diferentes condições, sendo em forma de gotícula, emulsionada ou livre, como pode ser observado na figura 2.

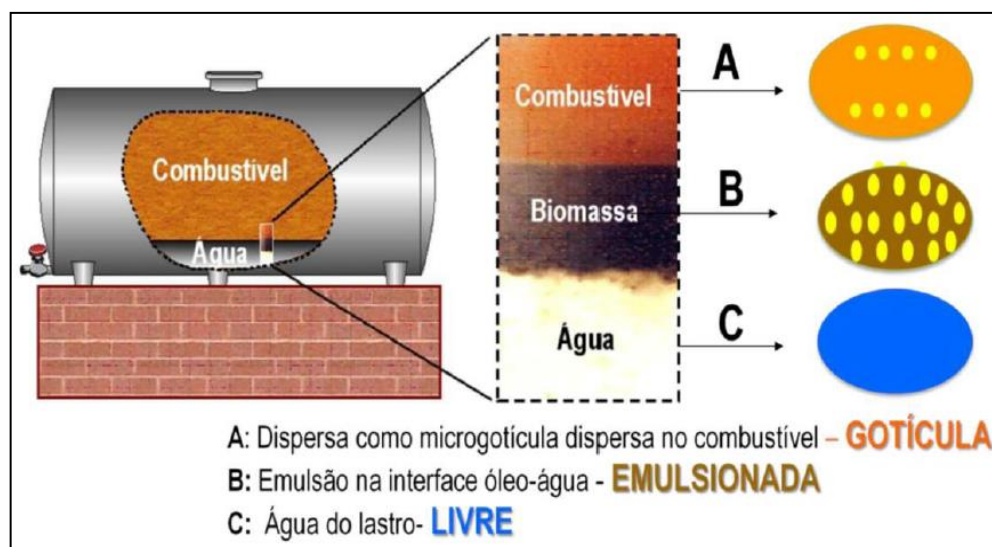


Figura 2. Diferentes formas que a água pode ser encontrada nos tanques de armazenamento de diesel B.

Fonte: Bento *et al.*, 2016.

Segundo Bhuiya *et al.* (2016), enquanto o diesel sem adição de biocombustível pode conter 50 ppm de água dissolvida, o biodiesel pode atingir números muito superiores, chegando a 1500 ppm. Outros autores chegaram em conclusões similares, como é o caso de Van Gerpen *et al.* (1996) que verificaram em um estudo com o biodiesel proveniente do óleo de soja, que a capacidade de absorção de água em relação ao diesel é de 40 vezes superior. Tal fato se justifica pelas características higroscópicas do biodiesel, dessa forma quando misturado ao diesel puro, o combustível final torna-se mais higroscópico e, portanto, mais suscetível à contaminação por água.

Diferentes estudos associam a degradação do combustível com a presença de água e o fato do diesel comercializado nacionalmente conter 10% de biodiesel aumenta sua higroscopicidade, potencializando sua tendência natural a oxidação (GERPEN *et al.*, 1997; BENTO *et al.*, 2004; BUCKER *et al.*, 2011; DELFINO *et al.*, 2018). Bhuiya *et al.* (2016) e Mahmudul *et al.* (2017) apontam que água no combustível são responsáveis por problemas como a redução do calor da combustão, corrosão dos componentes do sistema de combustíveis do motor (bombas injetoras e tubos de combustível) e bloqueio do filtro de combustível.

A armazenagem do combustível em tanques é um fator que colabora para presença de água, pois neles podem ocorrer a absorção de umidade e processos de degradação oxidativa (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Gaylarde, Bento e Kelley (1999) escrevem que mesmo nos melhores tanques de armazenamento de

combustíveis é possível ocorrer a presença de água por absorção da umidade. Com isso, reforça-se a necessidade de manutenção dos tanques, pois, uma vez que a contaminação microbiana se espalha no combustível, ela pode ser facilmente passada de tanques a tanques, até atingir o motor do veículo (ZIMMER, 2014).

Outra problemática associada à presença de água no diesel é o desenvolvimento microbiano. Gaylard, Bento e Kelley (1999) defendem que o teor de 1% de água é suficiente para iniciar crescimento microbiano no diesel, já Cazarolli *et al.* (2012) afirmam que microlitros de água são suficientes para iniciar tal atividade biológica. O desenvolvimento de microrganismos em tanques de estocagem de combustível diminui a qualidade do diesel a ser comercializado pois, a atividade biológica dos microrganismos pode levar a corrosão de metais e formação de material particulado e lodo no interior do tanque (FREGOLENTE; MACIEL; OLIVEIRA, 2015).

Ainda que acarrete vários problemas ao combustível, diversos autores têm estudado emulsão água em diesel com o objetivo de reduzir as emissões provocadas pela combustão do combustível e verificar o comportamento do motor (ITHNIN *et al.*, 2015; ITHNIN *et al.*, 2018; HASANNUDDIN *et al.*, 2018). Os resultados encontrados por tais autores apontam que a emulsão água em diesel pode ser eficiente na redução de poluentes, principalmente de Material Particulado (MP) e de Óxidos de Nitrogênio (NO_x), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Viscosidade, densidade, poder calorífico e emissões de combustível diesel emulsionado em água em diferentes proporções

(continua)

Combustível	Surfactante	Características do combustível			Emissões					Referência/Ano
		Viscosidade	Densidade	PC	NOx	CO ₂	CO	HC	MP	
A/O (5% de água)	SPAN 80 (2%)	↑ 80%	-	-	↓26,1%	↑31%	↑30,6%	-	↓21%	Ithnin <i>et al.</i> (2015)
A/O (10% de água)		↑140%	-	-	↓28%	↑30,3%	↑30,6%	-	↓30,6%	
A/O (15% de água)		↑240%	-	-	↓38,5%	↑32,5%	↑40,8%	-	↓23,6%	
A/O (20% de água)		↑360%	-	-	↓42%	↑32,5%	↑39,5%	-	↓39,5%	
A/O (5% de água)	-	NI	NI	NI	↓32,1%	-	↑48,4%	-	↓13,4%	Ithnin <i>et al.</i> (2018)
A/O (5% de água)	SPAM 80 (0,2%)	↑51,5%	↑1,4%	↓5%	↓28,6%	-	↑35,5%	-	↓27,7%	
A/O (15% de água)	Tween 80 e Span 80 (2%)	↑33,4%	↑2,9%	↓8,6%	↓13,5%	↑75%	↓8,3%	↑7,1%	-	Singh & Bharj (2015a)
A/O (15% de água) + NTC (50 ppm)		↑83,4%	↑3,3%	↓9,3%	↓28,7%	↑94,2%	↓40,6%	↓2,3%	-	
A/O (15% de água) + NTC (100 ppm)		↑85,6%	↑3,6%	↓7,4%	↓41,5%	↑94,2%	↓58,6%	↓4,7%	-	
A/O (15% de água) + NTC (150 ppm)		↑91,2%	↑3,6%	↓4,6%	↓42,7%	↑107,7%	↓74,4%	↓11,9%	-	
A/O (15% de água) + Al ₂ O ₃	SPAN 80 (2%)	↑57,2%	↑3,2%	↓2,9%	↓4,5%	-	↓23,2%	↓1,4%	-	Kumar & Kumar (2015)
A/O (20% de água)	Tween 80 e Span 80 (2%)	↑77,5%	↑3,80%	↓11,2%	↓29,4%	↑52,4%	↓17,1%	↑21,1%	-	Singh & Bharj (2015b)
A/O (20% de água) + NTC (50 ppm)		↑104,7%	↑4%	↓9,3%	↓40,4%	↑71,7%	↓28,3%	↓11,5%	-	
A/O (20% de água) + NTC (100 ppm)		↑106,9%	↑4,2%	↓8,6%	↓47,6%	↑92,4%	↓42,8%	↓19,1%	-	
A/O (20% de água) + NTC (150 ppm)		↑109,9%	↑4,5%	↓6,5%	↓48,4%	↑101,5%	↓53,5%	↓33,9%	-	
A/O (10% de água)	Tween 80 e Span 80 (2%)	↑65,2%	↑1,6%	↓10,8%	↓6,2%	-	↑14,1%	↑2,1%	-	Singh, Sharma, Gangacharyulu (2016)

(conclusão)

Combustível	Surfactante	Características do combustível				Emissões				Referência/Ano
		Viscosidade	Densidade	PC	NOx	CO ₂	CO	HC	MP	
A/O (10% de água) + TiO ₂ (50 ppm)		↑ 67,6%	↑ 1,7%	↓ 8,4%	↓ 5,5%	-	↓ 4,4%	↓ 14,9%	-	Singh, Sharma, Gangacharyulu (2016)
A/O (10% de água) + TiO ₂ (70 ppm)		↑ 69,2%	↑ 1,8%	↓ 6,6%	↑ 4,1%	-	↓ 14,9%	↓ 25,9%	-	
A/O (15% de água)		↑ 92,4%	↑ 2,5%	↓ 16,1%	↓ 6,5%	-	↑ 5,9%	↑ 37%	-	
A/O (15% de água) + TiO ₂ (50 ppm)		↑ 95,2%	↑ 2,6%	↓ 13,4%	↓ 6,3%	-	NS	↓ 3,5%	-	
A/O (15% de água) + TiO ₂ (70 ppm)		↑ 96,4%	↑ 2,6%	↓ 10,4%	↓ 6%	-	↓ 7,4%	↓ 14,9%	-	
A/O (10% de água)	NI (1%)	↑ 83,3%	↑ 1,6%	-	↓ 36,9%	↓ 1,2%	↑ 40%	↑ 57,6%	-	Vellaiyan & Amirthagadeswaran (2016)
A/O (10% de água) + ZnO (50 ppm)		↑ 85,4%	↑ 1,6%	-	↓ 38,4%	NS	↑ 25,5%	↑ 36,4%	-	
A/O (10% de água) + ZnO (100 ppm)		↑ 86,6%	↑ 1,7%	-	↓ 40%	↑ 1,2%	NS	↑ 12,7%	-	
A/O (10% de água)	Span 80 (1%)	↑ 15,4%	NS	-	↓ 49,3%	↓ 18,7%	↑ 26,5%	↑ 595,1%	↓ 60,4%	Hasannuddin <i>et al.</i> (2018)
A/O (10% de água) + Al ₂ O ₃ (50 ppm)		↑ 15,4%	NS	-	↓ 60,1%	↓ 18,6%	↓ 4,3%	↑ 597,5%	↓ 49,7%	
A/O (10% de água) + CuO (50 ppm)		↑ 15,4%	NS	-	↓ 39,8%	↓ 19,7%	↑ 26,5%	↑ 395,1%	↓ 45,3%	
A/O (10% de água) + MgO (50 ppm)		↑ 15,4%	NS	-	↓ 64,1%	↓ 28,6%	↓ 3,4%	↑ 797,5%	↓ 66%	
A/O (10% de água) + MnO (50 ppm)		↑ 15,4%	NS	-	↓ 38,7%	↓ 21,6%	↑ 10,2%	↑ 412,1%	↓ 58,5%	
A/O (10% de água) + ZnO (50 ppm)		↑ 14,1%	NS	-	↓ 67,4%	↓ 31,9%	↓ 12,8%	↑ 663,4%	↓ 68,5%	

Fonte: autoria própria.

NI – Não informado; NS – Não significativo; ↑ - aumento do parâmetro; ↓ - diminuição do parâmetro; PC – poder calorífico; MP – Material partícula; HC – Hidrocarbonetos; A/O – emulsão água e óleo; NTC – Nanotubos de carbono.

Ithnin *et al.* (2015) investigaram a influência da água em óleo diesel no que diz respeito às emissões de dióxido de nitrogênio e carbono, emissão de material particulado, viscosidade e consumo específico de combustível. Para tanto, os autores utilizaram diferentes teores de água (5%, 10%, 15% e 20%) para realizar a emulsão com o diesel juntamente com surfactante Span 80. Os resultados apontaram uma redução nas emissões de material particulado e óxido de nitrogênio, fazendo com que a mistura de água em diesel seja promissora.

Singh e Bharj (2015a) realizaram emulsão água em diesel na proporção de 15%, adicionando na mistura nanotubo de carbono (NTC) em variadas concentrações a fim de verificar o efeito da mistura frente às emissões de NO_x, CO, CO₂ e hidrocarbonetos. Os autores verificaram que as emulsões realizadas diminuiram consideravelmente as emissões de óxido de nitrogênio e monóxido de carbono e que as misturas não promoveram mudanças significativas no comportamento do motor, entretanto houve uma elevação na viscosidade e densidade quando comparado ao diesel puro.

Posteriormente, Singh e Bharj (2015b) realizaram os mesmos testes, mas dessa vez o teor de água adicionado ao diesel para a realização da emulsão foi de 20%. Os resultados apontaram que se tratando das emissões de NO_x, CO, CO₂, HC, verificou-se que para as duas primeiras houve reduções significativas, enquanto as emissões de CO₂ aumentaram em todas as blends testadas. Já em relação a emissão de HC, os combustíveis com 50, 100 e 150 ppm de NTC resultaram em uma redução de 11,5, 19,1 e 33,9% respectivamente.

Singh, Sharma e Gangacharyulu (2016) realizaram emulsões água (10 e 15% de água) em diesel com adição de nano partículas de óxido de titânio (50 e 70 ppm). Os autores analisaram o desempenho das blends de combustível quanto a performance, características do combustível e emissões, e verificaram uma queda no consumo específico de combustível ao freio com a adição de TiO₂ no combustível emulsionado com 10% de água. Com exceção da blenda com 70 ppm de TiO₂ com 10% de água, notou-se uma diminuição significativa nas reduções de óxidos de Nitrogênio. Tratando-se das emissões de Monóxido de Carbono e Hidrocarbonetos, foi possível observar redução das emissões na presença de TiO₂.

Embora a literatura mencionada aponte que a adição de água pode ser uma solução para a redução das emissões, é necessário preocupar-se a respeito da qualidade do combustível após a emulsão. A tabela 3 mostrou que a mistura água,

diesel e surfactante aumentou a viscosidade e a densidade do líquido e fez com que o poder calorífico diminuísse. Tais parâmetros devem ser levados em consideração, uma vez que influenciam na qualidade final do combustível. Além disso, os autores não consideraram o efeito negativo que a adição de água causa ao diesel, como por exemplo crescimento microbiano que, por sua vez, podem desencadear problemas que afetam não apenas o combustível em si, mas também tanques de armazenamento e tubulações devido a corrosão.

3.3.3 Presença de enxofre

Dentre os parâmetros de qualidade exigidos pela Resolução ANP nº 50 de 2013 (ANP, 2013), o teor de enxofre se encontra como um dos mais importantes a ser considerado, uma vez que sua presença está diretamente associada à emissão de poluentes como material particulado e gases tóxicos oriundos de sua combustão (AZAMBUJA, 2016).

Teores elevados desse elemento no diesel podem provocar diversos efeitos negativos, pois podem ser responsáveis pela corrosão de tubulações e unidades de armazenamento, causar danos aos motores dos veículos, além de estar associado aos impactos ambientais causados pelas emissões (SRIVASTAVA; NANDAN, 2012; RANZAN, 2014). Em decorrência dessas questões, as quantidades de enxofre no óleo diesel vêm sendo regulamentadas e, por isso, devem ser removidos durante o processo de refino (AZAMBUJA, 2016).

O processo de remoção de enxofre do combustível é realizado por meio da hidrodessulfurização (HDS) ou hidrotratamento (HDT). Neste processo, os compostos de enxofre presentes no óleo diesel são transformados em sulfeto de hidrogênio por meio da reação com catalisadores (PAWELEC, *et al.*, 2011). Schmitt (2013) destaca que a HDS demanda altas pressões (30 a 130 atmosferas), temperaturas elevadas (300 a 400°C), reatores com grandes capacidades e o uso de hidrogênio, fatores que encarecem o processo e demandam maior consumo de energia. Entretanto, durante esse processo, além da remoção de enxofre, há também a remoção de outros componentes, como os poliaromáticos, que melhoram a lubricidade do combustível.

Nesse contexto, a adição de biodiesel ao diesel comercializado pode ser vista como um compensador da perda de lubricidade provocada pela redução de enxofre.

A boa lubrificidade do biodiesel funciona como aditivo de lubrificidade ao diesel quando misturados, como comprovado por Knothe e Steidley (2005) que verificaram que a adição de 1% - 2% de biodiesel pode compensar a perda de lubrificidade de combustíveis com baixo teor de enxofre.

As discussões a respeito da diminuição das concentrações de enxofre iniciaram devido ao aspecto ambiental e da saúde humana, uma vez que esse elemento, durante a combustão do diesel, produz o dióxido de enxofre (SO₂), que é uma substância nociva (RANZAN, 2014; HAJJARI, et. al., 2017). Em razão disso, muitos países têm diminuído os teores desse elemento químico no diesel comercializado, como é o caso da Alemanha, que há anos produz diesel com 10 ppm de enxofre (RANZAN, 2014; AZAMBUJA, 2016).

De acordo com Ranzan (2014), em países desenvolvidos a comercialização de óleo Diesel com baixas concentrações de enxofre ocorre há mais de 10 anos, sendo que em 2005 o Japão, Estados Unidos da América e alguns países da União Européia possuíam concentrações máximas de 10, 15 e 50 ppm respectivamente. Os teores de enxofre variam de país para país, embora em diversas partes do mundo a concentração máxima permitida esteja abaixo de 50 ppm (figura 3).

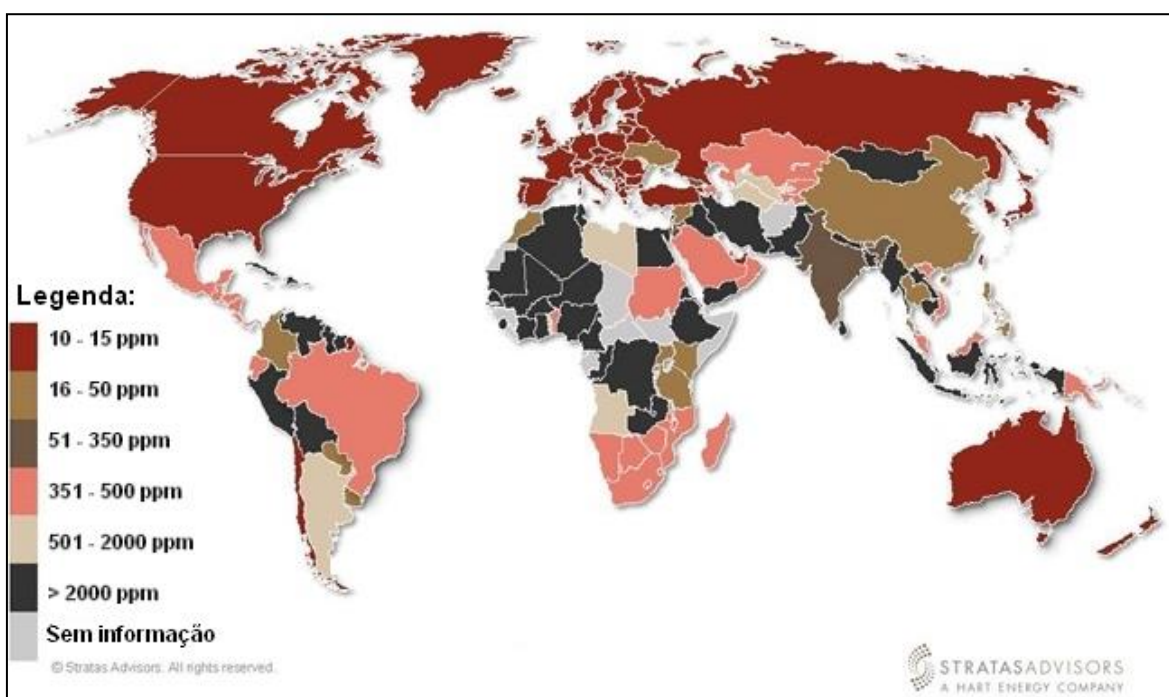


Figura 3. Concentrações máximas de enxofre (ppm) no combustível diesel em diferentes países no ano de 2016.

Fonte: adaptado de Stratas Advisors, 2016.

No Brasil são comercializados óleos Diesel com diferentes proporções de enxofre, sendo o S10, S500 e S1800 com limites máximos de 10 mg kg⁻¹, 500 mg kg⁻¹ e 1800 mg kg⁻¹ respectivamente (ANP, 2016a). Entretanto, apenas o diesel S10 e S500 são permitidos na frota rodoviária. As reduções dos teores de S no combustível brasileiro iniciaram-se em 2009, com a substituição gradativa do S1800 pelo S500, como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4. Evolução dos teores de enxofre no combustível Diesel comercializado no Brasil

Diesel A e B	Teores máximos de enxofre (ppm)	Especificações
S1800	1800	Substituição gradativa pelo S500 desde 2009. Eliminado da frota rodoviária em 2014. Somente para geração de energia elétrica, ferroviário e mineração.
S500	500	Substituição gradativa pelo S50 desde 2009. Atualmente permanece como o diesel com maior conteúdo de enxofre de uso rodoviário no país com adição de corante vermelho para diferenciação.
S50	50	Mandatário em 2012 para antecipar a entrada do S10. Substituído pelo S10 em 2013 e não mais disponível na frota brasileira.
S10	10	Mandatário em 2013. Atualmente permanece como o diesel com menor conteúdo de enxofre de uso rodoviário no país.

Fonte: adaptado de Azambuja, 2016.

O diesel comercializado no Brasil possui atualmente 11% de biodiesel adicionado, o chamado B11, e teores de enxofre que variam de acordo com o tipo de combustível (S10, S500 ou S1800). Ainda que a adição de biodiesel compense a perda de lubrificidade (para diesel fóssil com menores teores de enxofre), torna o combustível mais susceptível à absorção de água, devido as propriedades higroscópicas do biocombustível (BUCKER, 2009). E embora seja evidente os benefícios da redução dos níveis de enxofre, principalmente do ponto de vista ambiental, as consequências de tal remoção ainda está sendo estudadas.

Knothe e Steidley (2005) verificaram que o processo de remoção de enxofre afetou as propriedades físico-químicas do óleo diesel, provocando mudanças na lubrificidade e viscosidade do combustível. Chapman (2011) destacou problemas de corrosão em diesel com ultrabaixo teor de enxofre (15 ppm) e os associou com o aumento da comunidade microbiana e a redução de S que diminuiu a quantidade de compostos aromáticos, facilitando o crescimento de microrganismos.

Dodos *et al.* (2011) verificaram o crescimento microbiano em diesel com diferentes concentrações de enxofre (baixa e ultrabaixa concentração de enxofre) e

biodiesel, e concluíram que baixas concentrações desse elemento podem favorecer o crescimento microbiano. Os autores ainda relataram que os combustíveis analisados apresentaram diferenças na estabilidade oxidativa e acidez, que podem ou não estar associada à quantidade de compostos sulfurados no combustível.

Srisvatava e Nandan (2012) testaram a corrosão do combustível utilizando óleo Diesel Euro III em diferentes concentrações de enxofre (350, 400, 450 e 500 ppm), onde verificaram a corrosão (mm.ano^{-1}) e perda de combustível devido a corrosão (g) e concluíram que quanto maior a concentração de enxofre, maiores serão os níveis de corrosão do metal. Os autores ainda relatam que em combustíveis com maiores concentrações de enxofre, o crescimento microbiano é menor, devido às propriedades do elemento que podem funcionar como inibidores da ação de microrganismos.

Azambuja *et al.* (2017) verificaram a influência do enxofre no crescimento microbiano em diesel com três concentrações diferentes desse elemento (3,3 ppm, 327 ppm e 861 ppm) e concluíram que o combustível com teor de 327 ppm de S foi o mais susceptível à biodegradação. Por outro lado, os autores sugerem que a remoção de enxofre do diesel puro, por si só, não é responsável pelo aumento da contaminação microbiana, e sim a adição de biodiesel ao diesel, uma vez que suas características higroscópicas facilitam o crescimento de fungos e bactérias.

De fato, há diversos estudos nos quais as opiniões acerca da presença do enxofre, em maiores ou menores quantidades, são divergentes. Enquanto alguns pesquisadores apontam que a remoção de compostos sulfurados do óleo diesel tende a influenciar na proliferação de microrganismos, outros defendem que a presença de enxofre, por si só, não influencia o avanço ou retardo da contaminação por microrganismos no combustível. Diante deste cenário, os objetivos que este trabalho visa atingir, irá contribuir para essa questão, uma vez que carecem de trabalhos que avaliem a influência do enxofre para o crescimento microbiano em combustíveis diesel.

3.3.4 Consumo de nutrientes e degradação microbiana

Um dos problemas associados à qualidade dos combustíveis é a possibilidade de deterioração, principalmente durante a fase de armazenamento, uma vez que os mesmos podem estar expostos a diversos fatores que podem dar início a esse processo, como o ar, umidade, calor, luz e a presença de microrganismos (GAYLARD;

BENTO; KELLEY, 1999; BENTO *et al.*, 2005; ZIMMER, 2014).

Dentre os efeitos negativos que podem ser desencadeados em decorrência da degradação microbiológica, pode-se citar a formação de material particulado como um dos mais comuns, originando sedimentos biológicos também conhecido como borra (NEVES, 2018). Srivastava e Nandan (2012) afirmam que a contaminação microbiana pode contribuir com a instabilidade do combustível e acelerar seu envelhecimento, mas que as principais consequências do crescimento de microrganismos são a corrosão dos tanques, o bloqueamento de tubulações e filtros e o desgaste das bombas.

A tabela 5 relaciona as consequências que a degradação microbiana causa aos combustíveis, bem como os tipos de microrganismos responsáveis por tais ações.

Os hidrocarbonetos presentes no combustível, bem como os aditivos (compostos fosforados e nitrogenados) que o óleo diesel contém servem como fonte de nutrientes aos quais muitos microrganismos possuem a capacidade de metabolizar. Ao longo dos anos, diversos autores (GAYLARD *et al.*, 1999; BENTO; GAYLARD, 2005; ZIMMER, 2014; AZAMBUJA, 2017) tem estudado a presença de microrganismos em combustíveis e sua relação com a degradação do mesmo e constataram que dentre os combustíveis existentes, o óleo diesel é o mais propenso ao crescimento microbiano, principalmente quando misturado ao biodiesel, pois suas cadeias de hidrocarbonetos são utilizadas como fonte de carbono por fungos, bactérias e leveduras.

Tabela 5. Consequências do desenvolvimento microbiano em combustíveis

Problemas	Principais grupos de microrganismos envolvidos
Bloqueios de tubulações, válvulas, filtros e mangueiras;	Fungos e bactérias produtoras de substâncias poliméricas;
Aumento do teor de água;	Todos;
Formação de borras;	Todos;
Produção de surfactantes;	Fungos e bactérias aeróbicas;
Corrosão de tanques e linhas de armazenamento;	Fungos e bactérias anaeróbicas;
Produção de sólidos suspensos;	Todos;
Divisão de hidrocarbonetos;	Fungos e bactérias aeróbicas;
Diminuição da vida útil dos filtros;	Todos;
Aumento do teor de enxofre;	Bactérias redutoras de enxofre;
Problemas de saúde;	Bactérias produtoras de endotoxinas, patógenos oportunistas, bactérias redutoras de enxofre.

Fonte: adaptado de Gaylarde, Bento e Kelly, 1999.

Nesse sentido, Hill e Hill (2009) afirmam que as misturas diesel/biodiesel contêm todos os nutrientes habituais do óleo mineral e que a adição de biodiesel promove a adição de novos nutrientes que serão facilmente consumidos por microrganismos, uma vez que uma das características do biodiesel diz respeito sua biodegradabilidade.

Os primeiros registros sobre a presença de microrganismos em combustível derivado de petróleo datam o final do século XIX e início do século XX, com o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* em parafina e a oxidação do metano pela bactéria *Pseudomonas methanica* (BOELTER, 2017). Em relação aos estudos que relacionam a corrosão de combustíveis com a presença de microrganismos, Bucker (2009) relata que os primeiros registros datam o final da década de 50, e que a natureza microbiana dos resíduos do tanque de aeronaves foi estudada por Bakanaukas em 1958. No Brasil, a primeira referência acerca da presença de microrganismos em combustíveis foi de Gutheil (1966), que isolou o fungo *Cladosporium reinae* em tanques de querosene. Gaylard, Bento e Kelley (1999) citam diversos fungos, bactérias e leveduras com capacidade de crescimento em combustível, que mais tarde foram observados por Bento e Gaylarde (2001), White *et al.* (2011) e Soriano *et al.* (2015), como é caso da bactéria *Pseudomonas* sp. e do fungo *Penicillium* sp. Ao longo dos anos foram desenvolvidos uma série trabalhos cujo foco era de identificar os microrganismos presentes em combustível diesel, biodiesel e suas blendas. Nesse sentido, a tabela 6 expõe a relação desses microrganismos com os combustíveis os quais foram encontrados.

Tabela 6. Bactérias e fungos isolados em óleo diesel, biodiesel e blendas

(continua)

Arquéias	Combustível	Referência
<i>Euryarchaeota</i>	Mistura B10	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Crenarchaeota</i>		
<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); Martin-Sanches; Gorbushina; Toepel, 2016.
<i>Acetobacter peroxydans</i>	Diesel	Martin-Sanches; Gorbushina; Toepel, 2016.
<i>Acinetobacter</i>	Diesel	Onuorah <i>et al.</i> , (2013); Azambuja <i>et al.</i> (2017); Neves (2018)
<i>Aeromonas</i>	Blendas	Buker <i>et al.</i> , (2014)
<i>Aerosphaera</i>	Biodiesel e blendas	Sørensen <i>et al.</i> , (2011)
<i>Alcaligenes</i>	Biodiesel, diesel e blendas	White <i>et al.</i> , (2011); Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Arthrobacter</i> sp.	Biodiesel, diesel e blendas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Bacillus</i>	Diesel e blendas	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); Azambuja <i>et al.</i> (2017); Neves (2018)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Biodiesel e blendas	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>B. cereus</i>	Diesel	Bento <i>et al.</i> , (2001); White <i>et al.</i> , (2011); Martin-Sanchez <i>et al.</i> , (2016); Neves (2018)
<i>B. subtilis</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> , (1999); Bento <i>et al.</i> , (2001)
<i>B. thuringiensis</i>	Diesel	Martin-Sanchez <i>et al.</i> , (2016); Neves (2018)
<i>Brevundimonas</i>	Diesel, Biodiesel e blendas	White <i>et al.</i> , (2011); Sørensen <i>et al.</i> , (2011)
<i>Burkholderia</i>	Diesel e blendas	White <i>et al.</i> , (2011); Buker <i>et al.</i> , (2014); Martin-Sanches; Gorbushina; Toepel, 2016.
<i>Cellulomonas marina</i>		
<i>Citrobacter farmeri</i>	Diesel	Martin-Sanches; Gorbushina; Toepel, 2016.
<i>C. amalonaticus</i>		
<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); Neves (2018)
<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); Neves (2018)
<i>Enterococcus</i> sp.	Misturas	Neves (2018)
<i>Enterococcus qallinarum</i>		
<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)

(continua)

Bactérias	Combustível	Referência
<i>Lactobacillus pentosus</i> <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>L. casei</i> , <i>L. zeae</i> <i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	Diesel	Martin-Sanches; Gorbushina; Toepel, 2016.
<i>Mesorhizobium</i> sp.	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>Mycosphaerella</i>	Diesel e blendas	Azambuja <i>et al.</i> (2017).
<i>Ochrobactrum</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Restrepo-Florez <i>et al.</i> , (2014); Soriano <i>et al.</i> , (2015)
<i>Paludibacterium yongneupense</i>	Diesel	Martin-Sanchez <i>et al.</i> , (2016)
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	Mistura B8	Neves (2018)
<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>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Diesel	Martin-Sanches; Gorbushina; Toepel, 2016.
<i>Sphingobacterium</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Lisiecki <i>et al.</i> , (2014)
<i>Staphylococcus</i>	Diesel	White <i>et al.</i> , (2011)
<i>Staphylococcus warneri/pasteuri</i>	Mistura B8	Neves (2018)
<i>Tepidimonas</i> sp.	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> , (2015)
Fungos	Combustível	Referência
<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>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)

(conclusão)

Fungos	Combustível	Referência
<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); Beker <i>et al.</i> (2016)
<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); Beker <i>et al.</i> , (2011); Azambuja <i>et al.</i> (2017).

Fonte: adaptado de Bento *et al.* (2016)

Bucker *et al.* (2011) apontam que o biodiesel e as misturas de diesel:biodiesel são mais susceptíveis à degradação e/ou contaminação microbiológica durante o armazenamento, isso, pois, o biocombustível possui maior capacidade de absorção de água, podendo criar condições propícias ao desenvolvimento desses microrganismos.

Além da água, outro fator que pode ser associado ao desenvolvimento da presença de microrganismos nos combustíveis é a redução do teor de enxofre (AZAMBUJA *et al.*, 2017). Dodos *et al.* (2011) observaram o comportamento microbiano em combustíveis com diferentes teores de enxofre e biodiesel, e concluíram que a redução de enxofre tende a aumentar a presença de microrganismos, afetando na estabilidade oxidativa e na acidez dos combustíveis. Em diesel com teores elevados de enxofre, percebe-se que o crescimento microbiano é reduzido comparado aos combustíveis com baixo teor desse elemento (SRIVASTAVA; NANDAN, 2012). Entretanto, Azambuja *et al.* (2017) apontam que ainda são necessários mais trabalhos que abordem essa temática, uma vez que pouco se foi estudada a influência do enxofre sobre o crescimento de microrganismos

Além do exposto, a temperatura e pH do combustível também podem ser colocados como fatores de influência para o crescimento microbiano e suas ações degradadoras, ainda que não essenciais. Ao encontrar condições favoráveis ao seu crescimento, uma população microbiana pode se desenvolver em temperaturas que variam de 4°C à 60°C e de pH 4 a pH 9 (CHUNG *et al.*, 2000). Todavia, uma temperatura na faixa de 20°C à 30°C é vista como a mais propícia para o

desenvolvimento da maior parte dos microrganismos (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

A ação microbiana tem início na estocagem do óleo diesel B e/ou biodiesel. Bento e Gaylarde (2001) apontam que bactérias e leveduras são os primeiros organismos a se estabelecerem nesta colonização, seguidos por fungos filamentosos. Uma vez dentro dos tanques, estes organismos se estabelecem na interface água e óleo ou se aderem às paredes, formando biofilmes (ZIMMER, 2014). Com isso, as populações microbianas com competência de degradação iniciam suas atividades com a quebra das moléculas que compõe o combustível, já os microrganismos que não consomem as fontes de carbono disponíveis diretamente, utilizam-se dos fragmentos parcialmente degradados (YEMASHOVA *et al.*, 2007). Esta ação pode ser denominada como consórcio microbiano, nas quais os microrganismos aeróbicos criam condições para os anaeróbicos se desenvolverem (ZIMMER, 2014).

Como elencado na tabela 8, a maior parte dos microrganismos encontrados são comuns ao diesel, biodiesel e suas blends. Das bactérias apresentadas, as mais comuns encontradas segundo literatura pesquisada foram *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*. Tratando-se dos fungos, os mais comuns na literatura foram *Cladosporium sp.*, *Paecilomyces* e *Penicillium*.

Ressalva-se a importância de estudar quais são os microrganismos que atuam como degradadores do combustível, pois a partir disso torna-se possível desenvolver metodologias para combatê-los, bem como utilizá-los em processos de biorremediação de ambientes contaminados por combustíveis (MARIANO *et al.*, 2008; SANLI, 2018).

3.4 Métodos de controle microbiológico

É comum que os problemas referentes a contaminação microbiana, especialmente no combustível diesel, sejam investigados somente quando começam a ocorrer danos que comprometam equipamentos, como por exemplo, a corrosão de tanques de armazenamento e entupimentos da bomba (BUCKER, 2009). Dependendo da magnitude dos danos, os preços a serem pagos pela manutenção e conserto podem ser altos. Nesse sentido é importante zelar pela boa preservação dos tanques de armazenamento e transporte e realizar avaliações frequentes a fim de garantir a qualidade do combustível e evitar problemas (ZIMMER, 2014).

Sabe-se que a contaminação microbiológica é um problema recorrente e de difícil controle. Contudo há métodos físicos e químicos que auxiliam na redução de microrganismos, inibindo seu desenvolvimento. Os métodos físicos se destacam pela simplicidade e baixos custos de processos, já os métodos químicos se caracterizam pela adição de compostos químicos, também conhecidos como aditivos, ao produto que previnem e inibem o crescimento microbiano (NEVES, 2018).

A drenagem da água na fase aquosa (também conhecida como água de lastro) é um dos processos físicos que podem ser aplicados no controle e prevenção de microrganismos nos tanques de combustível. A eliminação da água pode ser tida como uma forma efetiva de controlar o crescimento dos microrganismos, uma vez que ela propicia ambiente favorável para tal acontecimento. A drenagem e a limpeza física regular dos tanques de armazenamento podem garantir um ambiente com bons níveis de descontaminação (ZIMMER, 2014). De maneira a complementar esse processo, Pasmman (2003) indica que seja feita a filtração e centrifugação do combustível, a fim de aumentar a eficiência do processo de controle.

Os métodos químicos para prevenção e controle microbiológico consistem na utilização de antioxidantes (aditivos comerciais) e/ou aplicação de agentes antimicrobianos (biocidas) (BUCKER, 2009; NEVES, 2018). O uso de biocidas tem sido visto como um dos métodos de maior eficiência no controle da suscetibilidade à deterioração de combustíveis por contaminação microbiana (GAYLARDE *et al.*, 1999; PASSMAN, 2005; BUCKER, 2009).

Passman (2003) data a utilização de biocidas no controle da contaminação microbiana desde os anos 60, sendo seu uso mais recorrente em combustíveis de aviação. Estes compreendem produtos com largo espectro de componentes de estruturas químicas (compostos inorgânicos e orgânicos), empregados no processo de desinfecção, esterilização de objetos e superfícies e controle microbiológico (BUCKER, 2009; ZIMMER, 2014).

Os biocidas podem ser classificados, devido seu caráter químico, em duas categorias, sendo (1) oxidantes (ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos clorados) e (2) não oxidantes (compostos sulfurados, estanhados, isotiazolonas, sais de cobre, entre outros). Pasmman (2003) ressalta que há biocidas que podem ser mais eficientes para fungos (fungicidas), para bactérias (bactericidas) e outros que podem abranger um espectro maior que envolva ambos grupos. Além disso, o autor informa que esse tipo de produto é solúvel tanto em água, óleo ou ambos, dependendo da

necessidade.

Esses agentes antimicrobianos podem ser divididos em quatro categorias: (1) oxidantes; (2) eletrofílicos; (3) líticos; e (4) protonóforos. Os oxidantes promovem a morte rápida de microrganismos, sendo praticamente efetivo para qualquer tipo de microrganismos, pois possui amplo espectro e sua ação consiste em oxidar os compostos que constituem as células microbianas (ZIMMER, 2014). Os eletrofílicos são não-oxidantes e atuam sobre os microrganismos por interferência em seu metabolismo e/ou sendo responsáveis por desintegrar a parede celular dos mesmos (WIENCEK; CHAPMAN, 1999; CHAPMAN, 2003). Os líticos atuam sobre componentes da membrana celular alterando sua permeabilidade, desestabilizam a membrana e promovem a sua lise (CHAPMAN, 2003). Os protonóforos interferem na habilidade da célula manter o pH, promovendo a acidificação de seu meio interno e desequilibrando metabolicamente os microrganismos (CHAPMAN, 2003).

Os antioxidantes são utilizados a fim de aumentar a estabilidade oxidativa do combustível e atuam de forma a desacelerar o processo de degradação. Podem ser de origem sintética (butil-hidroxi-anisol, butil-hidroxi-tolueno, tec-butyl-hidroquiona, galato de propia) ou natural (presentes no biodiesel) e são caracterizados pela presença de compostos fenólicos que justificam sua eficiência na atividade antimicrobiana (BUCKER, 2009; PULLEN, SAEED, 2012; PINHO, 2016; NEVES, 2018).

No Brasil a ANP não recomenda o uso de biocidas juntamente com os aditivos, ainda que seja em tanques contaminados e que haja diversos estudos que testem e comprovem a eficiência deste produto para fins antimicrobianos (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; BENTO *et al.*, 2010; ZIMMER *et al.*, 2010).

3.4.1 Radiação ultravioleta

A combinação de um campo elétrico e um campo magnético resultam na radiação eletromagnética que se propaga através do tempo transportando energia (MALTEZ, 2018). Essa radiação pode ser classificada de acordo com a frequência de suas ondas a qual formam um espectro eletromagnético. Nesse espectro são encontradas algumas regiões que variam de acordo com o intervalo de comprimento de onda (λ), como por exemplo: infravermelho (> 780 nm), luz visível (400 - 780 nm)

e ultravioleta (100 - 400 nm) (ARAUJO; SOUZA, 2008; BALOGH *et al.*, 2011).

O comprimento de onda onde ocorre o processamento da radiação ultravioleta (UV) varia entre 100 e 400 nm. Este intervalo pode ser subdividido em radiação UVA (luz negra, com comprimento de onda variando de 315 – 400 nm), UVB (luz eritematogênica: 280 – 315 nm) e UVC (radiação germicida: 100 – 280 nm) (MALTEZ, 2018; NEVES, 2018).

A radiação UVC está associada à sua ação germicida que é ocasionada pela quebra de moléculas e/ou catálise de reações químicas de moléculas (SANHUEZA; MAIA, 2001; ARAUJO; SOUZA, 2008). Balogh *et al.* (2011) informam que a absorção desse tipo de radiação em moléculas de DNA, RNA, proteínas, entre outras, provoca reações fotoquímicas e interações secundárias. Nesse sentido, quando a radiação atinge grupamentos bioquímicos, promove lesões irreversíveis, impedindo a reprodução de microrganismos (BAUTISTA *et al.*, 2016; NEVES, 2018).

Fatores como a intensidade de radiação, capacidade de absorção e tempo de exposição à radiação influenciam diretamente nos efeitos promovidos por esse tipo de radiação. Pesquisas apontam que o efeito germicida alcança total efetividade quando o comprimento de onda está em 260 nm, pois atua diretamente nas bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico e ribonucleico, isto é, o DNA e RNA respectivamente (BILOTTA; DANIEL, 2006; NYANGARESI *et al.*, 2019).

A literatura aponta a eficiência da radiação UV no tratamento de alguns líquidos, sendo a desinfecção de água um dos principais objetos de estudo (HIJNEN; BEERENDDONK; MEDEMA, 2006; SOUZA *et al.*, 2012; FERREIRA, 2015; BATTISTELLI *et al.*, 2016; NYANGARESI *et al.*, 2019). Nesse sentido, Souza *et al.* (2012) investigaram o uso da radiação UV para a desinfecção de esgoto proveniente de uma estação de tratamento de esgotos (ETE) onde verificaram a eficiência da radiação na inativação de *Escherichia coli*, principalmente em níveis maiores de radiação.

Ferreira (2015) incidiu radiação ultravioleta em um isolado bacteriano oriundo de esgoto hospitalar e sanitário. Para tanto, foi utilizada uma lâmpada UVC 15W e as amostras foram submetidas a diferentes tempos de exposição à radiação (15", 30", 5', 10', 15' e 20'). Ao final do estudo, foi constatada a eficácia da radiação para a inativação das bactérias presentes nas amostras, sendo a maior eficiência encontrada para o tempo de 20 minutos de exposição. No entanto, o autor ressalva que a presença de sólidos nas amostras de esgoto pode interferir na eficiência do

tratamento.

Battistelli *et al.* (2016) utilizaram um reator UV, com doses de radiação variando de 43,8 a 194,9 mWs.cm⁻², no pós tratamento de um reator UASB com o objetivo de avaliar o potencial de desinfecção da radiação sobre o efluente. Os autores constaram uma inativação na faixa de 90 a 94% em *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, coliformes totais e colifagos.

Como observado, a literatura apresenta diversos trabalhos que comprovam a eficiência da radiação ultravioleta no controle e inativação de microrganismos, principalmente em águas residuárias provenientes de esgotos. No entanto, poucos estudos relatam seus efeitos na eliminação de microrganismos presentes em combustíveis. Diante disso, Neves (2018) testou a eficiência da radiação UVC em combustível Diesel B8. A autora utilizou 8 lâmpadas UVC 40W com comprimento de onda de 253 nm em um reator batelada UV com volume de combustível variando de 40 a 60 litros e diferentes tempos de ensaio (60, 120, 240 e 360 minutos). Ao final dos testes, foi concluído a eficiência do tratamento, principalmente para o ensaio de 360 minutos de duração, onde neste caso a carga microbiológica diminuiu significativamente, passando de $1,5 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ para $3,33 \times 10^2$ UFC mL⁻¹.

Considerando o que foi exposto, este trabalho tem o potencial de colaborar com a literatura, visto que não foram encontrados na bibliografia consultada dados que abordem a influência de enxofre e água em misturas diesel Bx considerando os fatores microbiológicos, bem como a utilização da radiação ultravioleta como tratamento do combustível afim de evitar e/ou diminuir a contaminação microbiológica. Nesse sentido, este trabalho busca estudar a utilização de radiação ultravioleta para inativação microbiológica e os efeitos que seu uso pode vir a causar nas características físico-químicas do combustível, de modo que possa ser aplicado para fins comerciais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para verificar quais os efeitos provocados pela adição de água e diferentes teores de enxofre na inativação de microrganismos por radiação ultravioleta em combustíveis diesel Bx, foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Materiais e Energias Renováveis (LABMATER) e no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), ambos situados na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma apresentado na figura 4.

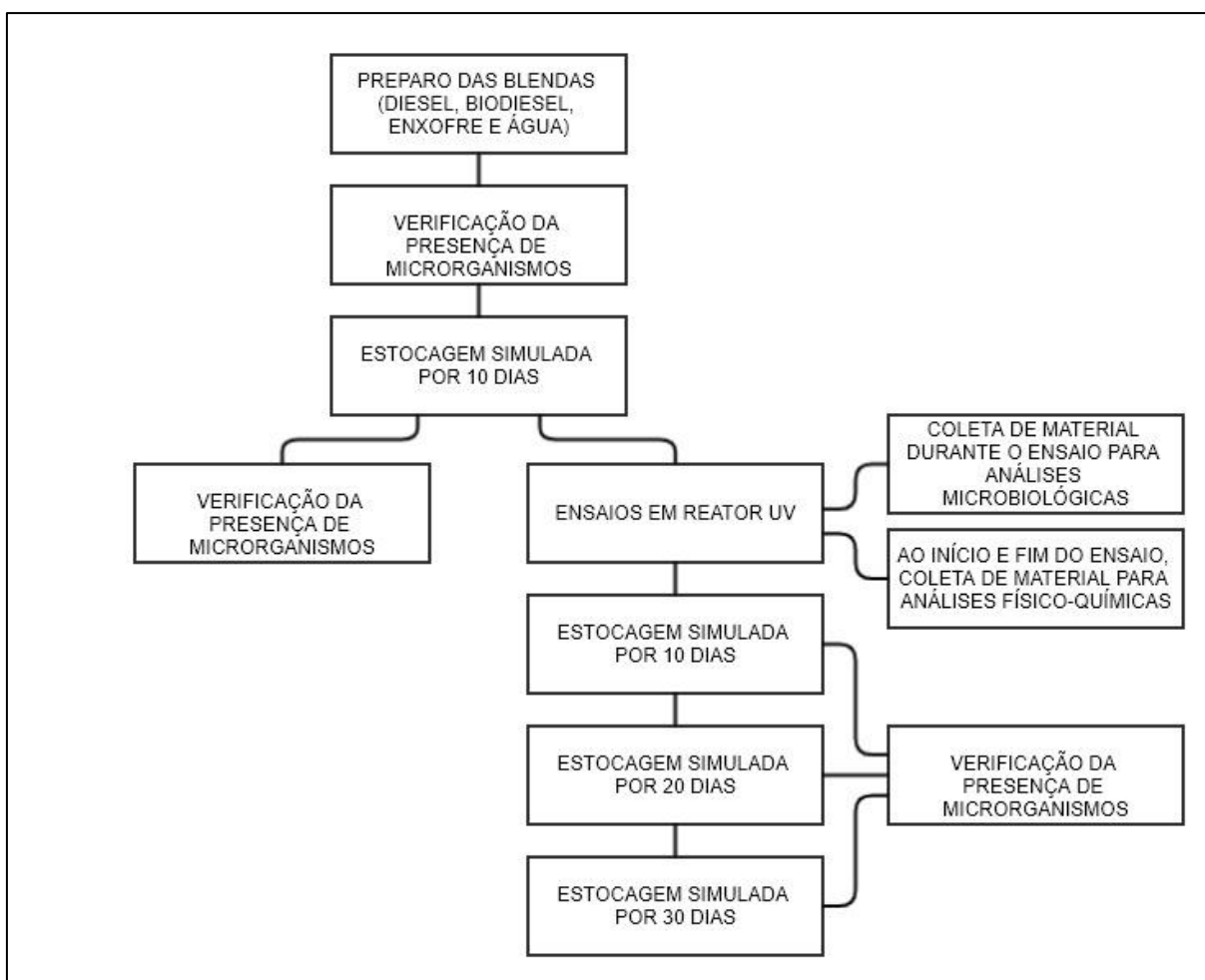


Figura 4. Fluxograma metodológico seguido para o desenvolvimento do presente trabalho.
Fonte: autoria própria.

4.1 Reator ultravioleta

Em trabalho anterior do grupo de pesquisa, Neves (2018) verificou que a utilização da radiação ultravioleta foi eficiente na inativação dos microrganismos presentes no combustível diesel B8. A autora realizou seu experimento utilizando combustível diesel S10 (B8) em reator contendo 8 lâmpadas UVC 40W. No entanto, para esse experimento foi utilizado um reator de bancada para melhor controle das variáveis e redução do consumo de materiais.

O reator UV utilizado consiste na adaptação de uma incubadora shaker refrigerada, a qual foi acoplado em sua lateral esquerda interna uma lâmpada fluorescente tubular de flúor UVC germicida, de 55 W e comprimento de onda de 253 nm da marca Osram. O esquema representativo deste equipamento pode ser visualizado na figura 5.

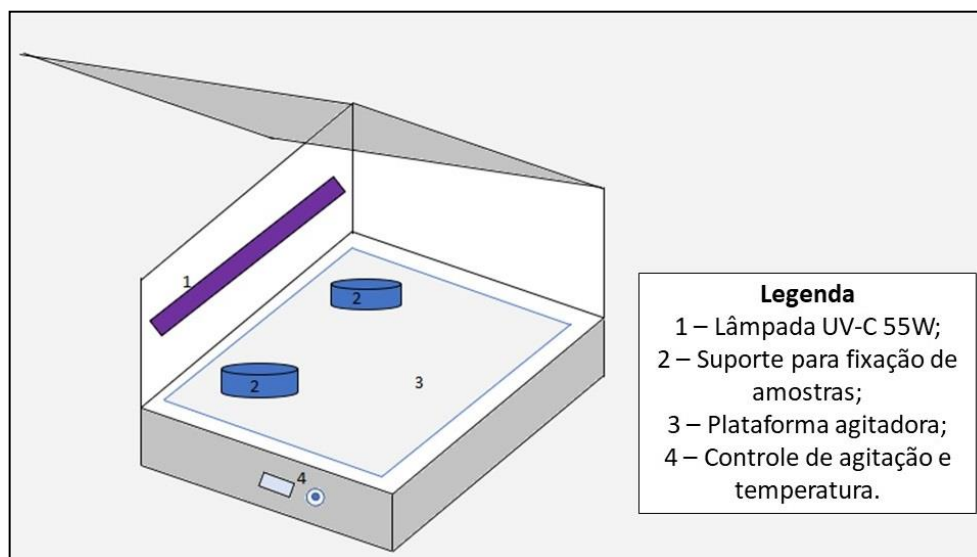


Figura 5. Esquema geral do reator de radiação ultravioleta.

Fonte: autoria própria.

Além da lâmpada de radiação ultravioleta com ação germicida, o reator é composto por 2 suportes onde as amostras de combustíveis foram acondicionadas, plataforma agitadora e painel para controle da agitação e temperatura.

4.2 Definição e preparo da composição dos combustíveis

Considerando os objetivos deste trabalho, foram estudados combustíveis diesel com duas concentrações de biodiesel, sendo o diesel comercial (B11) e diesel

com 20% de biodiesel adicionado em sua composição (B20). Além disso, as amostras de diesel variaram o teor de enxofre (S10 e S500) e teor de água (comercial, 2500 ppm e 10000 ppm). A distribuição e composição das amostras (tabela 7) foram baseadas na literatura nacional e internacional, seguindo as tendências do mercado de combustíveis conforme apresentado na revisão bibliográfica (BENTO *et al.*, 2016; AZAMBUJA *et al.*, 2016; CAZAROLLI *et al.*, 2018).

Tabela 7. Composição das amostras a serem avaliadas

Amostra combustível	Especificações			
	Biodiesel (%)	Teor de enxofre* (ppm)	Adição de água (ppm)	
MP-D1	11	10		
MP-D2		500		
MP-D3	20	10		
MP-D4		500		
MP-D5	11	10		
MP-D6		500		
MP-D7	20	10		2.500
MP-D8		500		
MP-D9	11	10		
MP-D10		500		
MP-D11	20	10		10.000
MP-D12		500		

*Teor de enxofre de acordo como foi adquirido no posto de combustível, podendo atingir no máximo 10 ppm e 500 ppm respectivamente.

Fonte: autoria própria.

Para os ensaios foram utilizados combustível diesel comercial, B11, e mistura diesel:biodiesel B20 com variações nos teores de água e enxofre. Ao todo, foram 12 composições de combustível, conforme apresentado na tabela 7. Para tanto, os combustíveis diesel B11 (S10 e S500) foram adquiridos em posto de abastecimento na cidade de Palotina – PR. Para o preparo da blenda B20 foi adquirido biodiesel B100 em indústria que atua no setor no estado do Paraná. Já para as amostras com adição de água, foi utilizado água ultrapura Milli-Q nas proporções planejadas.

Para a aquisição dos combustíveis utilizou-se galões de 10 litros, previamente higienizados e secos. Posteriormente, as misturas foram realizadas e em seguida acondicionadas em frascos de 500 mL, transparentes, limpos, esterilizados e vedados. Ressalva-se que o volume de cada amostra preparada foi de 400 mL.

4.3 Estocagem simulada e ensaios no reator ultravioleta

Após o preparo das misturas dos combustíveis, uma alíquota de 10 mL foi coletada para verificação da presença de microrganismos na amostra. Posteriormente, os combustíveis foram acondicionados em local livre de luz e umidade, a temperatura ambiente por um período de 10 dias a fim de simular uma estocagem. Ao final dos 10 dias, uma nova alíquota de 10 mL foi coletada a fim de verificar se houve aumento ou diminuição da presença de microrganismos durante a estocagem. Após tal verificação, os ensaios com utilização da radiação UV foram iniciados.

Foram realizados 12 ensaios diferentes, sendo 1 para cada composição de combustível. Os ensaios tiveram duração de 360 minutos, com coleta de 10 mL de material para análise da presença de microrganismos a cada 45 minutos. No entanto, no tempo inicial e final de cada ensaio, foi coletado um volume de 50 mL de combustível a fim de realizar análises físico químicas do mesmo, verificando, assim, se a radiação UV promove algum efeito nos parâmetros avaliados.

A duração do ensaio foi definida com base em trabalho anterior do grupo de pesquisa (NEVES, 2018) ao qual concluiu-se que 360 minutos de exposição à radiação ultravioleta promove uma maior eficiência ao tratamento.

Ao final de cada ensaio, os combustíveis foram estocados em ambiente livre de luz e umidade e com temperatura ambiente. Após 10, 20 e 30 dias foram coletadas amostras dos frascos e realizada novamente análise microbiológica a fim de verificar a duração do efeito do tratamento.

4.4 Avaliação da presença de microrganismos

A fim de quantificar os microrganismos presentes nas amostras de combustível foram utilizados os seguintes métodos: método espectrofotométrico e técnica do peso seco. Entretanto, para que esses métodos possam ser aplicados há a necessidade de preparo de um meio de cultura bacteriano a fim de criar um ambiente propício para o cultivo dos microrganismos. O método do peso seco, no entanto, foi realizado apenas para um ensaio a fim de relacionar o resultado com o método espectrofotométrico para a validação do método.

4.4.1 Preparo do meio de cultura bacteriano

O meio foi preparado com base na adaptação da Norma ASTM E1259-10. Alíquotas de 10 mL de óleo diesel coletados nos diferentes tempos de ensaio foram adicionadas em 90 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) estéril e mantidos sob agitação a 150 rpm na incubadora shaker, a 35°C, pelo período de 18 horas (VAZ, 2010; ZIMMER, 2014; NEVES, 2018).

4.4.2 Método espectrofotométrico

Uma forma de verificar a presença de biomassa microbiana em combustível diesel é por meio do método espectrofotométrico também conhecido como turbidimetria ou análise espectrofotométrica da densidade óptica, caracterizado pela leitura da absorvância de um volume de meio de cultura em espectrofotômetro com comprimento de onda em 600 nm (BARBERI *et al.*, 2004; GIOVANELLA *et al.*, 2011). Apesar de ser um método de quantificação indireto, isto é, não proporciona um resultado quantitativo, pode ser considerado eficiente uma vez que o aumento e diminuição da absorvância está diretamente relacionado com a presença de microrganismos (NEVES, 2018). Desta forma, quanto maior a absorvância do meio, maior a quantidade de microrganismos nele presente.

Para realização desta técnica, 20 mL de suspensão bacteriana foi adicionado em tubos cônicos e centrifugado a 3400 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando apenas a massa microbiana, posterior foi adicionado 10 mL de água salina (0,9%), a massa foi então resuspendida e o processo de centrifugação foi realizado novamente sob as mesmas condições a fim de eliminar os resíduos de meio líquido que podem interferir na leitura. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e mais 10 mL de salina foram adicionados. Seguidamente, as amostras foram agitadas em vortex por 60 segundos e as leituras da absorvância foram realizadas em triplicatas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. A técnica foi realizada em triplicata.

4.4.3 Peso seco

Uma das técnicas mais utilizadas para verificação de biomassa microbiana em combustíveis líquidos é a técnica de peso seco (ZIMMER *et al.*, 2013; AZAMBUJA *et al.*, 2016; BUCKER *et al.*, 2018; CAZAROLLI *et al.*, 2018). Esta técnica consiste na filtração do combustível por meio de uma bomba a vácuo, com a utilização de um filtro de nitrato de celulose com poros de 0,22 μm , onde após a filtração o filtro passa por um processo de secagem e é pesado novamente, sendo o resultado expresso em mg ou mg/mL. Este método de quantificação é uma alternativa viável frente aos demais métodos de contagem existentes, visto a dificuldade da empregabilidade de outros métodos de quantificação bacteriana devido as características do óleo diesel.

Para este trabalho a técnica foi adaptada de Azambuja *et al.* 2016, cujo método consistiu na filtração à vácuo de 10 mL do meio de cultura bacteriano sob um filtro de celulose de 0,45 μm . Após a filtração, os filtros foram lavados com 4 mL de hexano a fim de remover o óleo diesel residual da biomassa retida. Posteriormente os filtros foram acondicionados individualmente em placas de Petri e o peso foi anotado. Após, os mesmos foram levados à estufa onde permaneceram a 30°C por um período de 48 horas, e então foram transferidos para um dessecador por um período de 24 horas para remoção total da umidade. Por fim, os filtros foram novamente pesados e a biomassa microbiana calculada a partir do peso final menos o peso inicial. A técnica foi realizada em triplicata.

4.5 Caracterização físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras de combustível anterior e posterior exposição à radiação ultravioleta.

4.5.1 Massa específica à 25°C

A análise de massa específica foi realizada a 25°C a partir do uso do equipamento Densito 30PX (Mettler Toledo) e ocorreu no Laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

4.5.2 Viscosidade à 20°C

A viscosidade cinemática dos combustíveis utilizados nesse trabalho foi calculada com o auxílio de um viscosímetro rotativo analógico EEQ-9031, que é comumente utilizado na determinação de parâmetros de fluidos com alta viscosidade, como é o caso dos óleos. Este procedimento foi realizado em duas medições, relacionadas com a velocidade de rotação do viscosímetro (H12 e H30), realizadas em triplicada, utilizando o *spindle* número 1. Quando o *spindle* entra em contato com a amostra, liga-se o equipamento e realiza-se de maneira visual as leituras de Hx. Após as leituras, com auxílio da equação 2, calculou-se o valor de viscosidade relativa.

$$a_x = \frac{H_x}{2,5} \quad (1)$$

Onde:

a_x = viscosidade relativa para cada Hx;

H_x = valor obtido pela leitura do viscosímetro para cada step;

2,5 = raio do recipiente adaptado para alocação das amostras.

Após calcular a viscosidade relativa, pode-se determinar a viscosidade absoluta a partir da equação 2. O valor do coeficiente para H12 e H30 são 5 e 2 respectivamente.

$$n_x = k_x \times a_x \quad (2)$$

Onde:

n_x = viscosidade absoluta para cada a_x ;

k_x = valor tabelado do coeficiente para cada stop Hx;

a_x = viscosidade relativa para cada Hx.

Para estes experimentos, a viscosidade relativa foi transformada em viscosidade absoluta por meio de cálculos matemáticos, conforme descritos acima, com o objetivo de tornar o resultado comparável à norma brasileira de combustíveis.

4.5.3 Teor de água

O método de Karl-Fisher é um dos meios utilizados para determinar a presença

de água em amostras. Constituído por uma mistura de iodo, dióxido de enxofre e piridina em metanol, o reagente Karl Fisher (RKF) é capaz de determinar pequenas quantidades de água. O procedimento baseia-se numa titulação visual ou eletrométrica. Nesta técnica a presença de água faz com o iodo seja reduzido pelo dióxido de enxofre, e quando toda água da amostra for consumida, a reação cessa. Com isso, o volume de RKF gasto na titulação é utilizado nos cálculos do teor de umidade.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina a partir do uso do equipamento V20 *Volumetric KF Titrator* (Mettler Toledo).

4.5.4 Estabilidade à Oxidação

A estabilidade à oxidação trata-se de um parâmetro de qualidade para a comercialização de óleo diesel, conforme estabelece a ANP. Uma das formas de verificar a estabilidade à oxidação de óleos é por meio do Método Rancimat, proposto por Hadorn e Zurcher, que consiste na utilização de um fluxo de ar à uma temperatura de 110°C com objetivo de promover a oxidação acelerada (MIRANDA, 2018). Esta análise foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos da Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama. Foi utilizado o equipamento 893 *Professional Biodiesel Rancimat* (Metrohm) e análise realizada de acordo com a norma EN 15751, com temperatura em 110°C e fluxo de ar de 10 L.h⁻¹.

4.6 Análise Estatística

Para comparar eventuais diferenças estatísticas das variáveis resultantes das análises microbiológicas durante a estocagem simulada e tratamento com radiação ultravioleta, bem como das análises físico-químicas pré e pós tratamento, foi utilizado a análise de variância de um critério (one-way ANOVA), e quando significativo, com teste Tukey de comparação de médias. Estas análises foram realizadas a partir do uso do software livre SISVAR.

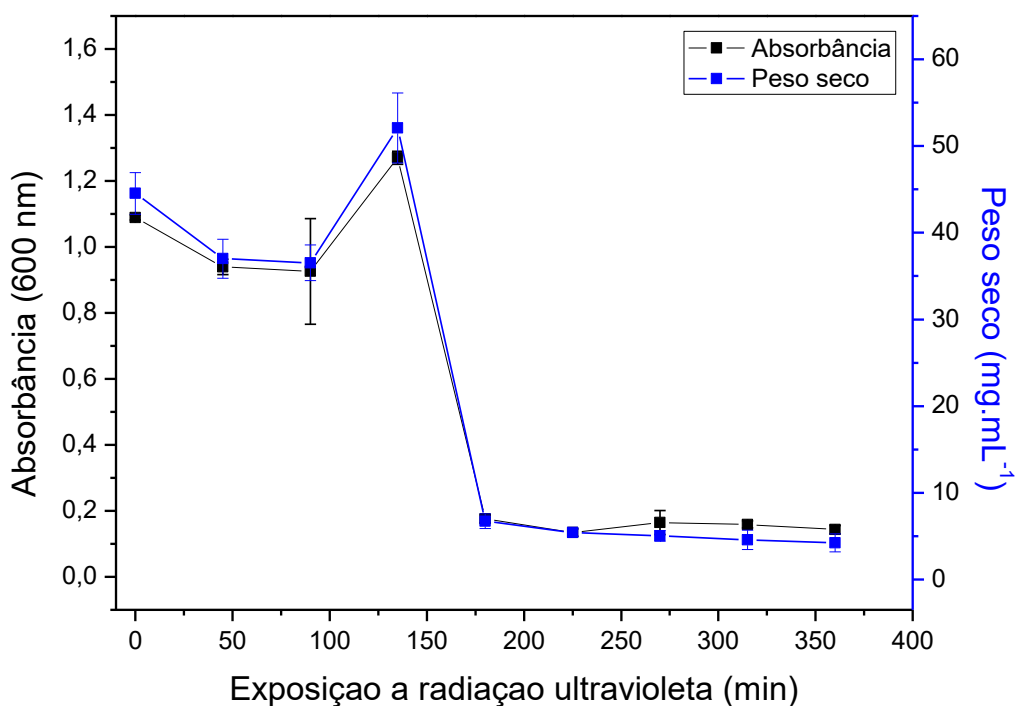
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação entre os métodos espectrofotométrico e peso seco

Para verificação da presença de microrganismos em combustíveis, optou-se pela utilização do método espectrofotométrico adaptado por Neves (2018), contudo a fim de verificar a eficiência do método foi realizado um teste comparativo entre a metodologia de peso seco e o método espectrofotométrico. Para tanto, a amostra MP-D8 foi escolhida para realizar a relação, pois durante a estocagem foi uma das amostras que houve maior proliferação de microrganismos. Dessa forma, seguindo metodologia descrita neste trabalho foi realizado ensaio no reator ultravioleta com duração de 360 minutos e a verificação da presença de microrganismos realizada por meio das duas técnicas.

Os resultados da comparação entre o método de peso seco e o método espectrofotométrico pode ser observada no gráfico 1.

Gráfico 1. Relação entre peso seco ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e medidas de absorbância (λ 600 nm) durante ensaio com radiação ultravioleta da amostra de combustível MP-D8 (B20, S500, 2500 ppm de água).



Ambas as técnicas foram realizadas em triplicatas, e como pôde ser observado no gráfico as curvas acompanharam a mesma tendência. Ainda que para os quatro

primeiros pontos o valor do peso seco encontra-se um pouco acima dos valores de absorvância, é evidente o mesmo comportamento uma vez que do primeiro ao terceiro ponto há um decréscimo da presença microbiológica seguindo para o quarto ponto com um acréscimo da mesma. Nota-se, também, que para os tempos de 180 e 225 minutos de exposição à radiação ultravioleta, os resultados de ambas as técnicas se sobrepuseram com baixo valor de desvio padrão.

Neves (2018) em trabalho similar, utilizou-se do método espectrofotométrico juntamente com a técnica da microgota, expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹), para verificar a presença de microrganismos presentes em amostras de combustível diesel S10 com adição de 8% de biodiesel. A autora constatou que conforme os valores de UFC.mL⁻¹ variavam, havia também uma variação da absorvância que seguia uma mesma tendência. Com isso a autora concluiu que os resultados encontrados pelos diferentes métodos seguiam uma tendência, fazendo que ambos sejam confiáveis.

Desta forma, ao considerar os resultados apresentados por Neves (2018) e os obtidos neste trabalho, é possível concluir que o método espectrofotométrico utilizado é válido para verificação do aumento e ou diminuição da presença de microrganismos em combustíveis líquidos, principalmente ao óleo diesel que é o foco deste trabalho. Embora este método não possa ser colocado como quantitativo, permite realizar análises e discussões a respeito da presença de microrganismos.

5.2 Avaliação da presença de microrganismos durante estocagem simulada

Para este trabalho, foi avaliada a presença de microrganismos em combustível diesel B11 e B20 com diferentes teores de enxofre e água, conforme descrito no item material e métodos. Para tanto, uma alíquota de 10 mL de combustível foi retirada da fase óleo e adicionada em 90 mL de meio de cultura LB para posterior leitura de absorvância a partir da adaptação do método espectrofotométrico utilizado por Neves (2018), que parte do princípio que maiores valores de absorvância apontam maior presença de microrganismos, conforme consta descrito na seção de metodologia.

A tabela 8 apresenta os valores de absorvância para cada amostra de combustível, contendo a absorvância inicial, relacionada a quantidade de microrganismos presentes no combustível no início da estocagem, e absorvância final, referente a presença microbiológica após 10 dias de estocagem.

Tabela 8. Valores de absorvância (600 nm) para as diferentes amostras de combustível no início e no final da estocagem

Amostras de combustível	Início da estocagem	Final da estocagem	Aumento relativo da absorvância (%)
MP-D1	0,181 ± 0,008 a	0,269 ± 0,001 b	47
MP-D2	0,044 ± 0,007 a	0,152 ± 0,039 b	245
MP-D3	0,148 ± 0,071 a	0,167 ± 0,026 a	13
MP-D4	0,198 ± 0,012 a	0,252 ± 0,002 b	27
MP-D5	0,247 ± 0,010 a	0,300 ± 0,001 b	21
MP-D6	0,267 ± 0,005 a	0,382 ± 0,001 b	43
MP-D7	0,213 ± 0,009 a	0,496 ± 0,006 b	133
MP-D8	0,174 ± 0,006 a	1,089 ± 0,007 b	255
MP-D9	0,512 ± 0,001 a	1,549 ± 0,001 b	203
MP-D10	0,178 ± 0,007 a	1,408 ± 0,002 b	691
MP-D11	0,344 ± 0,001 a	0,987 ± 0,039 b	187
MP-D12	0,315 ± 0,062 a	0,391 ± 0,007 b	24

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

Ao analisar a tabela acima é possível verificar que as amostras de combustível com teor de enxofre de até 500 ppm, com exceção da MP-D12, obtiveram aumento da absorvância superior as amostras com teor de enxofre de até 10 ppm. Ainda que as amostras contenham diferentes teores de água e combustível, ao considerar apenas o teor de enxofre como variável, é possível afirmar que durante o armazenamento, combustíveis com maiores teor de enxofre foram mais susceptíveis à proliferação de microrganismos, em especial para as amostras MP-D2, MP-D8 e MP-D10 que tiveram um aumento superior a 100% da absorvância em relação ao início da estocagem.

Ao considerar as amostras MP-D1 e MP-D2 que são comerciais, ou seja, que não foram submetidas a alterações, percebe-se que embora MP-D2 tenha tido um maior aumento relativo da absorvância, MP-D1 que caracteriza o combustível diesel B11 S10 obteve valores de absorvância superior, tanto no início quanto no final da estocagem. Alguns autores (DODOS *et al.*, 2011; SRIVASTAVA e NANDAM, 2012; LYLES *et al.*, 2013) sugerem que quanto maior a presença de enxofre no combustível diesel, menor será a contaminação microbiológica, pois tiofenos, thiois, ácidos tiofênicos e sulfetos aromáticos presentes nesses combustíveis podem inibir as atividades metabólicas de microrganismos. Porém, alguns dos resultados encontrados apontaram que as amostras com diesel com maior teor de enxofre foram as mais suscetíveis à contaminação durante a estocagem.

As amostras MP-D3 e MP-D4 configuram combustível diesel B20 com até 10 e 500 ppm de enxofre respectivamente. Em comparação as amostras MP-D1 e MP-D2, que são combustíveis B11, notou-se que a adição de biodiesel favoreceu o aumento

da absorvância para o combustível com maior teor de enxofre, o que corrobora com os resultados encontrados por Azambuja *et al.* (2016) que afirmam que o teor de biodiesel tende a ter maior influência na proliferação microbiana do que o teor de enxofre propriamente dito. A amostra MP-D3 não diferiu estatisticamente durante a estocagem.

Tratando-se das amostras MP-D5 até MP-D12, todas receberam adição de água, sendo que de MP-D5 à MP-D8 a quantidade de água adicionada foi de 2.500 ppm, enquanto para MP-D9 a MP-D12 foi de 10.000 ppm. Ao analisar a absorvância destas amostras, é notório a diferença entre o início e o final da estocagem, uma vez que os valores encontrados foram superiores em relação aos combustíveis sem adição de água. O aumento da concentração de microrganismos nestas amostras, está diretamente relacionado com o teor de água adicionado nas mesmas, uma vez que diversos autores apontam que a presença de água se configura como o fator principal para o desenvolvimento e proliferação de bactérias, fungos e leveduras (BENTO *et al.*, 2004; BUCKER *et al.*, 2011; CAZAROLLI, *et al.*, 2014; AZAMBUJA *et al.*, 2016; DELFINO, *et al.*, 2018).

Além do exposto, faz-se importante salientar que as amostras MP-D1 a MP-D4 durante a estocagem não tiveram alteração visual de cor, enquanto as amostras MP-D5 a MP-D12 apresentaram alteração na cor, tornando-se mais turvas em relação ao início da estocagem. Tais amostras também apresentaram formação de biomassa microbiana, caracterizada pela formação de uma biomassa esbranquiçada, conforme ilustrado na figura 6.

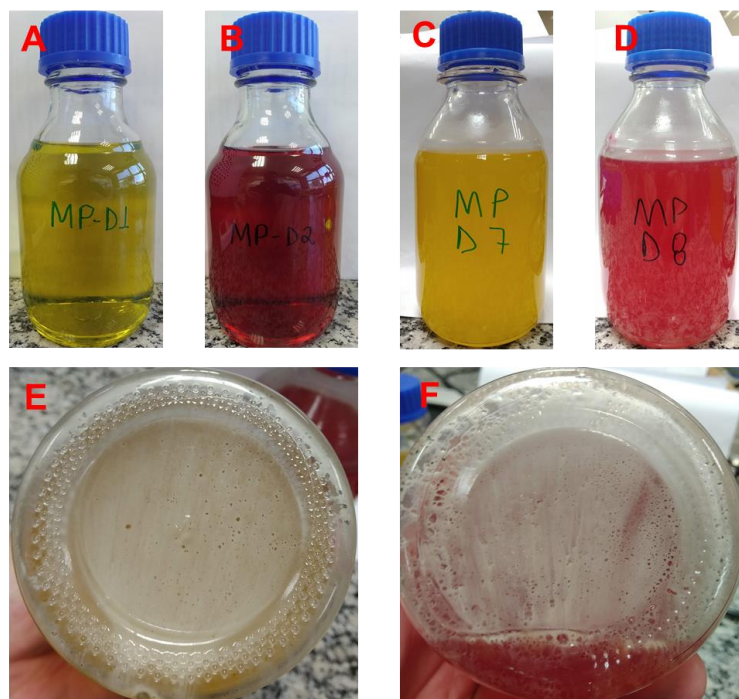


Figura 6. A e B: Amostras MP-D1 e MP-D2, referente ao diesel S10 e S500 respectivamente, sem alteração de cor após estocagem; C e D: Amostras MP-D7 e MP-D8 referentes ao diesel B20, S10 e S500 respectivamente, com adição de água com mudança de cor após estocagem; E e F: Amostra MP-D7 e MP-D8 com formação de biomassa microbiana.

Como visto na figura 6, o combustível dos frascos A e B encontram-se límpidos e livre de impurezas, conforme a características exigidas pela ANP segundo a resolução ANP nº 50 de 2013. Os frascos C e D, referentes as amostras MP-D7 e MP-D8 (20% de biodiesel, 2.500 ppm de água, com teor de enxofre de até 10 e 500 ppm respectivamente) anterior ao período da estocagem também apresentavam-se límpidos e livres de impureza, conforme frascos A e B, entretanto após 10 dias estocados apresentaram turvação e os líquidos tornaram-se translúcidos, além de haver formação de biomassa microbiana no fundo do frasco, conforme aponta as figuras 6 E e F.

Diante disso, foi possível verificar, que para as amostras com maiores valores de absorvância houve formação de biomassa microbiana devido a adição de água. Cazarolli *et al.* (2019) adicionaram 2000 e 10000 ppm de água ultrapura em biodiesel e verificaram o crescimento de microrganismos por meio do aparecimento de biomassa no frasco. Assim, pode-se afirmar que durante a estocagem, a presença de água e o teor de biodiesel tendem a influenciar mais que o teor de enxofre no que diz respeito ao crescimento e proliferação de bactérias, fungos e filamentos.

5.3 Ensaios com radiação ultravioleta

Os ensaios com radiação ultravioleta foram realizados para todas as 12 amostras de combustível. Tais amostras variaram quanto sua composição, com diferença na relação diesel biodiesel, teor de água e teor de enxofre conforme apresentado na tabela 7 (material e métodos).

A fim de verificar a eficiência da radiação ultravioleta como método alternativo de controle e inativação de microrganismos no combustível foram realizadas medidas de absorvância previamente à exposição à radiação ultravioleta, durante a exposição com medidas realizadas a cada 45 minutos e ao final da exposição, após 360 minutos de contato com a radiação. A tabela 9 ilustra a absorvância anterior e posterior a radiação ultravioleta bem como a eficiência do tratamento (%). Neste cenário, a diminuição da absorvância está associada à diminuição da presença de microrganismos no combustível diesel em todas as composições utilizadas.

Tabela 9. Absorvância das amostras de combustível anterior e posterior o tratamento com radiação ultravioleta e eficiência do tratamento empregado

Amostras	Temperatura média do ensaio (°C)	Absorvância		Diminuição da absorvância (%)
		Anterior à UV	Após 360' de exposição à UV	
MP-D1*	32,6 ± 0,631	0,269 ± 0,001 a	0,117 ± 0,006 a	56
MP-D2*	32,6 ± 0,631	0,152 ± 0,039 a	0,092 ± 0,009 a	39
MP-D3*	31,2 ± 1,238	0,167 ± 0,026 a	0,143 ± 0,017 a	14
MP-D4*	31,2 ± 1,238	0,252 ± 0,002 a	0,118 ± 0,075 a	53
MP-D5	33,2 ± 2,250	0,300 ± 0,001 a	0,081 ± 0,002 b	73
MP-D6	33,2 ± 2,250	0,382 ± 0,001 a	0,077 ± 0,010 b	80
MP-D7	40,3 ± 3,381	0,496 ± 0,006 a	0,226 ± 0,025 b	54
MP-D8	40,3 ± 3,381	1,089 ± 0,007 a	0,143 ± 0,013 b	87
MP-D9	37,7 ± 3,364	1,549 ± 0,001 a	0,064 ± 0,013 b	95
MP-D10	37,7 ± 3,364	1,408 ± 0,002 a	0,0447 ± 0,005 b	97
MP-D11	34,2 ± 4,419	0,987 ± 0,039 a	0,697 ± 0,029 b	29
MP-D12*	34,2 ± 4,419	0,391 ± 0,007 a	0,241 ± 0,029 a	38

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

*Amostras estatisticamente iguais antes e após o tratamento.

Como pôde ser visto na tabela acima, a eficiência do tratamento com radiação

ultravioleta variou conforme cada amostra combustível. A amostra MP-D3, por exemplo, que anterior ao tratamento continha uma absorvância de 0,167 ABS passou para 0,143 ABS após 360 minutos de exposição à radiação ultravioleta, o que significa uma eficiência de 14% na diminuição da concentração de microrganismos no combustível. Entretanto, a mesma não diferiu estatisticamente, o que aponta que o tratamento não obteve o efeito desejado. Já a amostra MP-D10 obteve um dos melhores resultados em relação a inativação de microrganismos, uma vez que sua absorvância inicial era de 1,408 passando para 0,0447 ABS, o que representa uma diminuição de 97%, além disso os valores de absorvância anterior e posterior à radiação ultravioleta, diferem-se estatisticamente a um nível de 5% de significância.

Em trabalho similar, Neves (2018) verificou em um ensaio de 360 minutos de duração utilizando óleo diesel S10 com 8% de biodiesel uma diminuição de 80,69%, no qual a absorvância da suspensão bacteriana entre o início e fim do ensaio, passou de 1,606 para 0,310 ABS. Em ensaio com duração de 60 minutos e outro combustível com a mesma composição (óleo diesel S10 B8), com absorvância inicial de aproximadamente 3,5 a autora constatou uma diminuição de aproximadamente 78%.

Em um panorama geral de análise, é possível verificar que as amostras sem adição de água, isto é, MP-D1 à MP-D4, o tratamento UV não obteve resultados com diferenças significativas estatisticamente quanto a redução da presença microbiológica. Já as demais amostras, que havia adição de água, diferiram-se. Este resultado permite afirmar que a adição de água é um fator determinante na proliferação de microrganismos em combustíveis, uma vez que as amostras nas quais houve sua adição houve maior contaminação e, conseqüentemente, melhor efeito da radiação ultravioleta na inativação dos microrganismos.

Neves (2018) apresentou resultados similares aos encontrados por esse trabalho, onde os ensaios mostraram diferentes variações quanto a diminuição da absorvância. Nesse sentido, Gielnik *et al.* (2019) e Bautista *et al.* (2016) explicam que a eficiência de tratamentos que visam diminuir e conter a presença de microrganismos em óleo diesel é variável, pois está associada a composição do combustível e a diversidade de microrganismos presentes no mesmo.

Bautista *et al.* (2016) utilizaram biocida como tratamento na inativação de microrganismos de amostras de diesel com baixa concentração de enxofre (10 ppm) e 7% de biodiesel adicionado. Os autores testaram biocidas com diferentes grupos funcionais, e após 45 dias da adição de biocida, encontraram redução da comunidade

microbiológica de até 100% para 6 biocidas diferentes. Entretanto, houve biocidas que após 45 dias favoreceram o a proliferação de microrganismos, como é o caso dos que continham Tiocarbamato e Tiocianato como grupos funcionais.

Diversos autores (BUCKER *et al.*, 2014; BAUTISTA *et al.*, 2016; ZIMMER *et al.*, 2017; FONSECA *et al.*, 2019) apontam o uso de biocidas como um modo eficiente para o tratamento de combustíveis contaminados por microrganismos. Entretanto, os biocidas, quando comparado ao tratamento com radiação ultravioleta, necessitam de maior tempo para fazer efeito na diminuição dos microrganismos. Muitos dos citados autores encontraram bons resultados após 15 dias de aplicação dos biocidas, já a utilização de radiação ultravioleta como tratamento alternativo demonstra eficiência em apenas algumas horas de exposição, como apresentado por Neves (2018) e reafirmado pelos resultados expressos na tabela 9.

Diante dos resultados obtidos, e comparações com outros métodos, e as informações disponíveis na literatura, é possível perceber que a radiação ultravioleta pode ser uma alternativa viável e eficiente para a diminuição da ação microbiológica em combustíveis, quando os mesmos encontram-se em um cenário de contaminação microbiológica elevada. Isso ocorre devido ao fato de a ação da radiação ultravioleta promove mudanças irreversíveis no DNA dos microrganismos presentes, impedindo-os de se reproduzir (NEVES, 2018; FONSECA *et al.*, 2019).

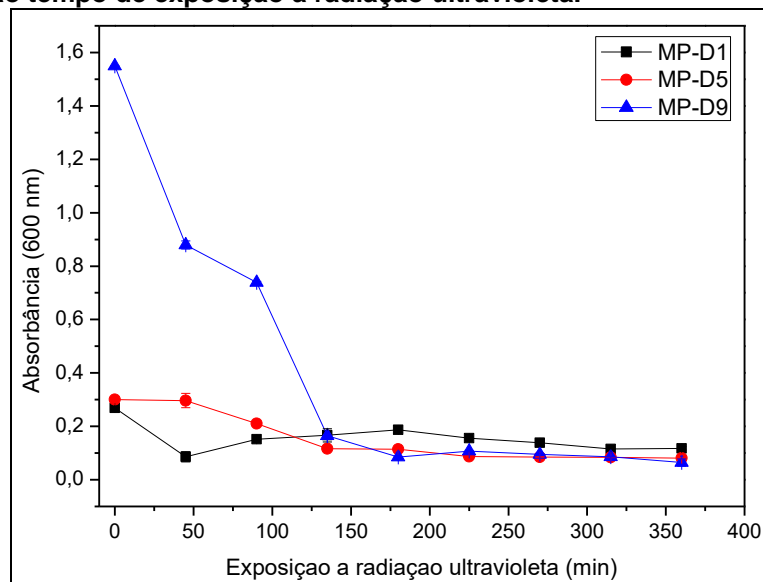
Para melhor compreensão dos resultados obtidos pelos ensaios no reator ultravioleta, os capítulos a seguir irão abordar os ensaios em sua totalidade, demonstrando a curva de crescimento e mortalidade dos microrganismos ao longo dos ensaios, bem como discussão da influência dos teores de água e enxofre sobre o crescimento e inativação de fungos, bactérias no combustível.

5.4 Influência da água

Os ensaios foram realizados com diesel B11 e B20, com diferentes concentrações de enxofre (S10 e S500) e variação do teor de água, onde havia uma amostra comercial, isto é, da forma com que se adquire no posto de combustível, uma amostra com 2500 ppm de água e outra com 10000 ppm de água adicionado.

O gráfico 2 exibe as curvas do comportamento microbiológico encontradas durante os ensaios com radiação ultravioleta das amostras MP-D1, MP-D5 e MP-D9, que são referentes ao diesel S10 comercial com 11% de biodiesel.

Gráfico 2. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S10 B11 comercial (MP-D1), com adição de 2500 ppm de água (MP-D5) e 10000 ppm de água (MP-D9) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.



Conforme apontado pela literatura (BENTO *et al.*, 2004; FREGOLENTE *et al.*, 2012; CAZAROLLI *et al.*, 2020) quanto maior a quantidade de água no combustível, maior será a possibilidade de contaminação microbiológica, pois a presença deste elemento propicia um ambiente favorável para o desenvolvimento de fungos e bactérias no combustível. Os resultados apresentados confirmam as informações encontradas na literatura, onde a amostra MP-D9, que havia maior quantidade de água adicionada, obteve a maior absorvância no início do ensaio, enquanto a amostra MP-D1, referente ao diesel S10 comercial, foi a que obteve absorvância menor.

O ensaio MP-D1 iniciou com uma absorvância de 0,269 e após 45 minutos de incidência da radiação ultravioleta uma queda na absorvância foi observada, a qual atingiu um total de 0,085 ABS. Entretanto, como pôde ser visto, houve um acréscimo da absorvância nos tempos de 90, 135 e 180 minutos, que pode estar associada à resistência de alguns microrganismos a radiação UV conforme apontam Bautista *et al.* (2016) e Fonseca *et al.* (2019). Após 225 minutos de incidência de UV a absorvância voltou a reduzir, até atingir um total de 0,117 ABS após 360 minutos de radiação. Após os 360 minutos de ensaio, foi possível verificar que o tratamento com radiação ultravioleta teve uma eficiência de 56,5% na diminuição da presença de microrganismos, porém a maior eficiência do tratamento ocorreu após 45 minutos, o que representou uma queda de 68,18% da absorvância em relação ao início do ensaio. Diante disso, é possível afirmar para o ensaio MP-D1, que embora ao final do

tempo previsto para o ensaio tenha havido uma redução significativa, 45 minutos de contato com a radiação ultravioleta foi onde observou-se o melhor desempenho tendo em foco a diminuição da concentração microbiológica no combustível.

O ensaio MP-D5 iniciou com uma absorbância similar ao do ensaio MP-D1, entretanto obteve uma eficiência maior ao final do ensaio, sendo de 73%. Outro fato que distingue o ensaio MP-D5 do MP-D1 está relacionado ao tipo de curva obtida. No ensaio MP-D1 observou-se após de 45 minutos de UV um aumento na absorbância que se estendeu até o minuto 180. Este comportamento não foi observado no ensaio MP-D5, uma vez que ao longo do ensaio foram constatados apenas diminuições da absorbância. Neves (2018) em ensaios realizados com óleo diesel utilizando radiação UV como forma de controle microbiológico também verificou comportamentos diferentes durante seus ensaios, sendo que em alguns casos a comunidade microbiológica aumentava e em outros diminuía. Esse tipo de comportamento pode estar relacionado à diversidade microbiológica em cada amostra, pois alguns microrganismos tendem a bloquear uns aos outros diante da radiação UV como tática de sobrevivência (BAUTISTA, 2016).

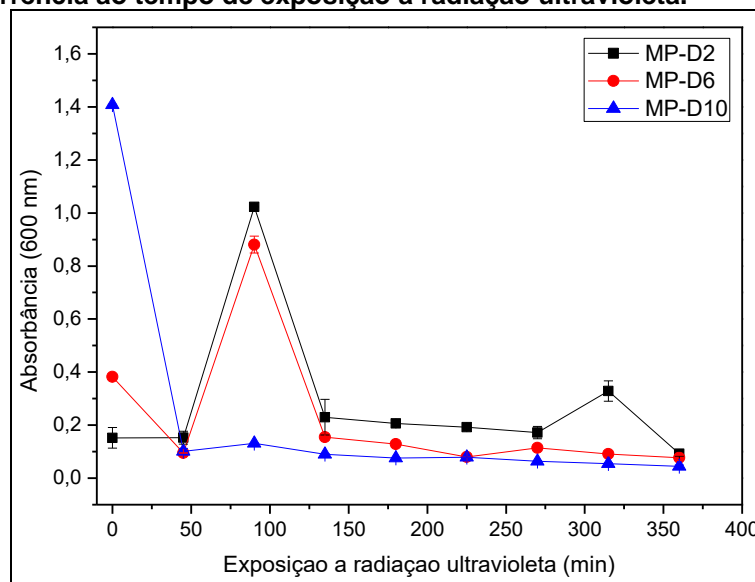
O ensaio MP-D9 é referente ao mesmo combustível dos ensaios MP-D1 e MP-D5, porém com adicional de 10000 ppm de água. Dentre os citados ensaios, foi o que obteve maior absorbância, sendo de 1,549 e maior eficiência após 360 de contato com a radiação UV. Para este ensaio notou-se uma elevada concentração de microrganismos, verificada por meio da absorbância e pelo aspecto do frasco onde a amostra combustível estava acondicionada que continha visivelmente formação de biomassa microbiana. Ao longo do ensaio foi possível observar a diminuição da absorbância ao longo da exposição à radiação UV, com um leve acréscimo após 225 minutos de ensaio. Após 45 minutos, uma diminuição de 43% foi constatada em relação a absorbância inicial e após 360 minutos a diminuição foi de 95,45%, sendo este o ensaio com maior eficiência dentre os 3 apresentados no gráfico 2.

Ao comparar os três ensaios entre si, é possível afirmar que o teor de água influencia diretamente na concentração de microrganismos no combustível e que a eficiência do tratamento aplicado foi melhor para as amostras com maior nível de contaminação. Em relação à utilização de biocidas como forma de controle microbiológico, que alguns casos são mais eficientes quando a concentração microbiológica é baixa (ZIMMER *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2019) a radiação ultravioleta se mostrou uma opção eficiente tanto num nível mais elevado de

contaminação quanto menos elevado, embora este em menor magnitude.

Também foram realizados ensaios com o diesel S500 com 11% de biodiesel, onde foram analisadas amostras comerciais e com diferentes teores de água, conforme mostra o gráfico 3.

Gráfico 3. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S500 B11 comercial (MP-D2), com adição de 2500 ppm de água (MP-D6) e 10000 ppm de água (MP-D10) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.



Estes ensaios seguiram o mesmo comportamento inicial dos ensaios apresentados no gráfico 2, onde a amostra com maior quantidade de água adicionada (MP-D10) resultou numa maior absorvância (1,408 ABS), seguido pelo ensaio MP-D6 com quantidade média de água e absorvância de 0,382 e, por fim, o ensaio com diesel S500 comercial, MP-D2 com absorvância de 0,174.

Nota-se que para todos os ensaios do gráfico 3 houve um pico de crescimento microbiano durante a exposição à radiação ultravioleta, que ocorreu após 90 minutos de contato com a luz UV. O ensaio MP-D2 apresentou um comportamento diferente do esperado, onde o tratamento proposto promoveu a proliferação de microrganismos que pode ser notada pelo aumento da absorvância em relação ao tempo inicial que perdurou até 315 minutos de exposição a radiação ultravioleta. Entre 315 e 360 minutos ocorreu uma diminuição da absorvância, que está associada a redução da comunidade microbiana. Bautista *et al.* (2016) utilizaram sonificação em diferentes amostras de óleo ao longo de 45 dias e perceberam que em algumas amostras, ao longo do tratamento, houve aumento da população microbiológica, antes que o tratamento finalizasse, entretanto não consideraram um tratamento viável devido ao

gasto energético e a baixa eficiência encontrada na maioria das amostras. Apesar do ensaio MP-D2 ter demonstrado picos de crescimento microbiano, pode-se considerar que o tratamento proposto cumpriu com seu objetivo ao final de 360 minutos de exposição a radiação ultravioleta, uma vez que houve uma redução de 39,47% da absorvância.

O ensaio MP-D6 continha 2500 ppm de água adicionada no combustível e iniciou com 0,382 de absorvância e finalizou com 0,077, o que representa uma diminuição de 79,84%. Embora não tenha sido o ensaio com maior eficiência em termos de porcentagem de redução da absorvância entre o início e final da exposição à radiação ultravioleta, foi um dos ensaios onde atingiu-se absorvância inferior à 0,1 que pode ser considerado um baixo nível de contaminação. Ao comparar a absorvância final dos ensaios até então apresentados com os resultados dos ensaios realizados por Neves (2018), é possível verificar que o tratamento aplicado neste trabalho teve uma eficiência maior na redução dos microrganismos. Contudo, há de se considerar que embora Neves (2018) tenha usado lâmpadas UVs com maior potência, o volume de combustível também era maior e o reator utilizado foi diferente.

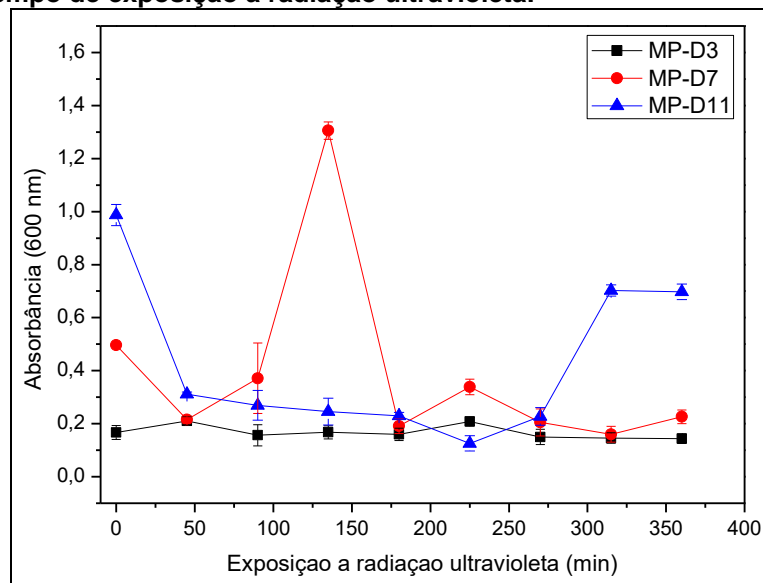
O ensaio MP-D10 foi o que houve maior eficiência dentre os apresentados no gráfico 3, que representa uma diminuição de 96,82% da presença de microrganismos. Assim como os ensaios MP-D2 e MP-D6, o referido ensaio teve um aumento da absorvância após 90 minutos de exposição à radiação ultravioleta. Entretanto, diferentemente dos outros ensaios, a absorvância neste tempo não ultrapassou a absorvância inicial. Este foi o ensaio com maior adição de água entre os demais, contendo 10000 ppm. Tal adição pode estar relacionada a maior presença de microrganismos que ocorreu desde a estocagem até o início do ensaio.

Diante dos ensaios MP-D2, MP-D6 e MP-D9, novamente pode-se concluir que a radiação ultravioleta promove maior eficiência na inativação de microrganismos de combustíveis com teores de água superiores ao exigido pela norma brasileira. Até o momento, diante dos resultados elucidados, o emprego da radiação ultravioleta como controle microbiológico tem se mostrado um tratamento promissor, especialmente para combustíveis com alto teor de água e alta concentração de microrganismos.

Além do diesel comercial S10 e S500 comercializado com adição de 11% de biodiesel, foram realizados ensaios com óleo diesel B20, isto é, com 20% de biodiesel, com até 10 e 500 ppm de enxofre. Para estes ensaios também houve adição de água nos teores de 2500 e 10000 ppm a fim de criar um ambiente favorável ao

desenvolvimento microbiológico. O gráfico 4 mostra a leitura da absorvância num comprimento de onda de 600 nanômetros para os ensaios MP-D3 (diesel B20 sem adição de água), MP-D7 (B20 com 2500 de água) e MP-D11 (B20 com 10000 ppm de água).

Gráfico 4. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S10 B20 (MP-D3), com adição de 2500 ppm de água (MP-D7) e 10000 ppm de água (MP-D11) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.



Assim como os ensaios anteriores, os ensaios MP-D3, MP-D7 e MP-D11 seguiram o mesmo comportamento inicial dos demais. A literatura (HASEEB *et al.*, 2010; MAZUMDAR *et al.*, 2013; ZIMMER, 2014, AZAMBUJA *et al.*, 2017) aponta que, tratando-se do óleo diesel, quanto maior a proporção da mistura diesel:biodiesel, maiores devem ser os cuidados na etapa de armazenamento, pois devido fato do biodiesel possuir características higroscópicas, a tendência é que o mesmo seja mais susceptível à contaminação microbiológica. Entretanto, no início do ensaio, o óleo diesel S10 B20 possuía uma absorvância menor que o óleo diesel S10 comercial. Ou seja, a presença de maiores teores de biodiesel, por si só, não incitou uma maior contaminação no combustível.

A respeito do ensaio realizado com a amostra MP-D3, percebe-se que a incidência da radiação ultravioleta não promoveu grandes mudanças na presença de microrganismos, uma vez que dentre todos os ensaios, este foi o que obteve menor eficiência, sendo ela de 14,37%. Conforme o gráfico mostra, houve alguns picos de crescimento durante o ensaio, que ocorreram nos tempos de 45 e 225 minutos de

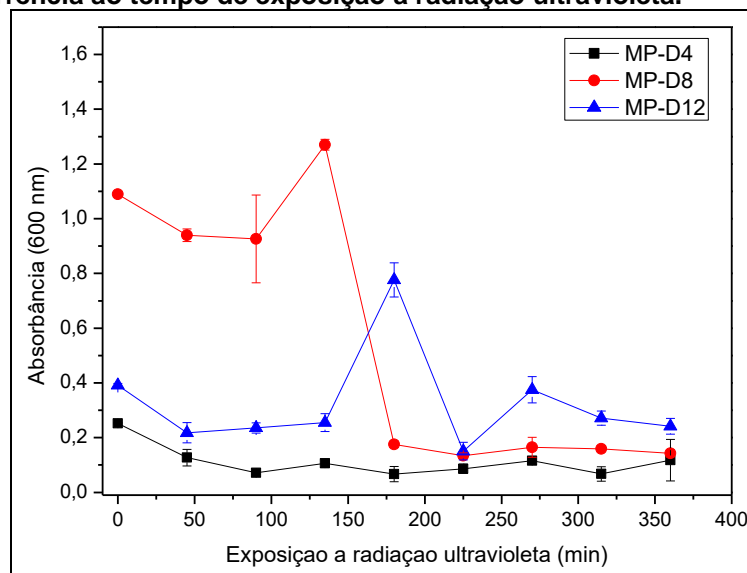
exposição a UV. Nestes picos, as medidas de absorvância encontrada para as amostras foram superiores a absorvância no início do ensaio, entretanto ao final dos 360 minutos de contato com a radiação UV a absorvância encontrada foi 14,37% menor do que no início do ensaio. Com isso, é possível afirmar que ainda que menor proporção, o tratamento proposto demonstrou uma diminuição da contaminação presente no combustível.

O ensaio MP-D7 obteve uma eficiência de 54,43% na diminuição da presença de microrganismos de acordo com a absorvância encontrada no início e no final do ensaio. Entretanto, houve picos de crescimento microbiológico durante o contato com a radiação ultravioleta que ocorreram nos minutos 135, 225 e 360. Até então, para a maioria dos ensaios realizados, a absorvância se estabilizou em, pelo menos, nos dois últimos pontos do gráfico, entretanto isso não ocorreu para este ensaio, onde a absorvância para o minuto 360 foi maior do que a do minuto 325, sendo de 0,165 e 0,221 ABS respectivamente. Além disso, a menor absorvância do ensaio ocorreu no minuto 325, onde a eficiência do tratamento foi de 67,76%.

Em relação ao ensaio da amostra MP-D11, no qual havia maior quantidade de água, a eficiência final foi de 29,38%. Após 225 minutos de exposição à radiação ultravioleta a absorvância começou a aumentar, o que implica na resistência dos microrganismos presentes na amostra e na capacidade de reprodução dos mesmos após longos períodos de contato com a radiação (BAUTISTA et al, 2016). Para este ensaio foi observado que desde o início até o minuto 225 não houve indícios de proliferação da comunidade microbiana, uma vez que a absorvância diminuiu. A maior queda de absorvância foi ocorrido após 45 minutos de ensaio, onde passou de 0,987 ABS para 0,311, que representou uma diminuição de 68,45%. Porém a menor absorvância observada durante o ensaio foi de 0,125 e ocorreu no tempo 225.

Diante desses resultados é possível verificar que, de maneira geral, a radiação ultravioleta tende ser mais eficiente na inativação de combustíveis com alto teor de microrganismos, embora isso não seja uma regra, como pode ser visto pelo ensaio da amostra MP-D11. Ensaios também foram realizados com amostra de óleo diesel S500 com 20% de biodiesel adicionado, da mesma forma com que foram realizados com o diesel S500 B11, conforme gráfico 5.

Gráfico 5. Leituras de absorvância (600 nm) das amostras de óleo diesel S500 B20 comercial (MP-D4), com adição de 2500 ppm de água (MP-D8) e 10000 ppm de água (MP-D12) durante os ensaios em decorrência ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.



Diferentemente dos outros ensaios apresentados anteriormente, onde as amostras com maior quantidade de água demonstraram um nível de contaminação elevado comparado às demais, nos ensaios demonstrados no gráfico 5, a amostra MP-D8, que continha 2500 ppm de adição de água foi a com maior absorvância, seguido da amostra MP-D12 (com 10000 ppm de água) e por fim a MP-D4 onde não houve adição de água.

O ensaio MP-D4 teve uma eficiência de 53,17%, ao qual no início a absorvância observada foi de 0,252 ABS e no final do ensaio foi de 0,118 ABS. Ao longo do ensaio foi possível perceber pequenos picos de crescimento microbiano, e assim nos ensaio MP-D7, houve um aumento da absorvância entre os minutos 325 e 360, com absorvâncias de 0,067 e 0,118 respectivamente. Em trabalho realizado por Neves (2018) não foram encontrados comportamentos similares ao deste ensaio ao longo do tratamento com radiação ultravioleta.

Já o ensaio com a amostra MP-D8, que demonstrou um alto nível de contaminação microbiológica, comprovado por meio da leitura de absorvância, a absorvância inicial era de 1,089 passando para 0,128. A partir do gráfico 5 é possível verificar que a comunidade microbiológica teve uma certa resistência, uma vez que diminuições significativas de absorvância foram observadas após 135 de exposição a radiação ultravioleta. Após esse tempo, a absorvância se manteve estável até o final do ensaio, que teve uma eficiência de 86,87%.

O ensaio MP-D12 apresentou um pico de desenvolvimento microbiano no minuto 185, passando a uma redução no tempo seguinte (225 minutos) e, novamente, no minuto 270 os microrganismos voltaram a se desenvolver. Ao final do ensaio houve uma eficiência de 38,36% na redução da presença de microrganismos, embora a menor absorvância tenha sido verificada em 225 minutos de exposição a radiação ultravioleta.

Com isso é possível concluir que, embora concentrações elevadas de água tendem a aumentar a concentração de microrganismos, pode haver exceções, como verificado pela amostra MP-D12 que apesar de possuir 10000 ppm de água adicionada, havia uma absorvância menor comparada a amostra MP-D8. Bento *et al.* (2016) apontam que a maior quantidade de água no combustível encontra-se na interface água/óleo é possível que as amostras alteradas pela presença de água tivessem uma contaminação maior no início do ensaio, uma vez que as amostras de combustível utilizadas para a leitura de absorvância pelo método espectrofométrico foram coletadas apenas na fase óleo.

5.5 Influência do enxofre durante os ensaios com radiação ultravioleta

A biodegradação de combustíveis diesel e biodiesel têm sido bastante investigadas na literatura, como aponta as pesquisas de Bento *et al.* (2006), Zimmer *et al.* (2013), Bucker *et al.* (2014), Soriano *et al.* (2015). Entretanto, há poucas pesquisas que discutem a influência do teor de enxofre sobre o crescimento microbiano em diesel, biodiesel e suas blends, como é o caso do trabalho realizado por Azambuja e colaboradores (2017).

Para este trabalho, amostras de combustíveis diesel B11 e B20 contendo até 10 e 500 ppm de enxofre foram armazenados durante 10 dias e a presença de microrganismos foi verificada a partir da turvação do meio de cultura. Além disso, os combustíveis foram submetidos à radiação ultravioleta por um período de 360 minutos a fim de diminuir e/ou conter o crescimento microbiológico.

Na tabela 10 são apresentados os resultados para as leituras de absorvância dos combustíveis S10 e S500, tanto com 11% de biodiesel quanto com 20%, durante o período de estocagem e após a exposição à radiação ultravioleta.

Tabela 10. Absorbância das amostras de combustível diesel B11 e B20 com diferentes teores de enxofre (S10 e S500)

Teor máximo de enxofre (ppm)	Teor de biodiesel (%)	Amostra	Absorbância (600 nm)		
			Início da estocagem	Final da estocagem / Início do ensaio	Final do ensaio
10	11	MP-D1	0,181 ± 0,008	0,269 ± 0,001	0,117 ± 0,006
500	11	MP-D2	0,044 ± 0,007	0,152 ± 0,039	0,092 ± 0,009
10	20	MP-D3	0,148 ± 0,071	0,167 ± 0,026	0,143 ± 0,017
500	20	MP-D4	0,198 ± 0,012	0,252 ± 0,002	0,118 ± 0,075

Alguns autores (LONDRY & SUFLITA, 1998; HELDRETH & TUROS, 2005; DODOS *et al.*, 2011; SRISVATAVA & NANDAN, 2012) sugerem que a redução do teor de enxofre do combustível pode favorecer o aumento da presença de microrganismos, pois alguns compostos organosulfurados possuem propriedades antimicrobianas que inibem seu crescimento. Por isso, segundo esses autores, a presença de enxofre no óleo diesel auxilia no controle de crescimento e reprodução dos microrganismos durante a estocagem do óleo diesel.

Os resultados encontrados para este trabalho, demonstram que os óleos diesel com maior teor de enxofre, tanto B11 quanto B20, foram mais suscetíveis ao crescimento microbiano durante o período de estocagem. Tratando-se do óleo diesel B11, foi possível verificar que ainda que o óleo diesel S10 ao final da estocagem possuísse uma absorbância maior do que o S500, a amostra MP-D2 teve um aumento relativo superior à amostra MP-D1, quando se leva em consideração a absorbância no início da estocagem. Foi observado que para óleo diesel B11, a concentração de microrganismos cresceu em 48,62% para S10 e 245,45% para S500.

Para óleo diesel B20, observou-se comportamento similar, ainda que menor proporção. A amostra MP-D3, ao final da estocagem, teve um aumento de 12,84% da absorbância, enquanto a amostra MP-D4 aumentou em 27,27%. Mais uma vez foi possível perceber que o combustível com maior teor de enxofre, como é o caso da amostra MP-D4, foi mais suscetível ao crescimento e proliferação de microrganismos.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (POLINARSKI *et al.*, 2019), foi verificado durante estocagem simulada, o crescimento microbiológico de combustíveis óleo diesel B10, tanto S10 quanto S500, com e sem adição de água, por um período de 70 dias. Os resultados apontaram que o óleo diesel S10 foi mais suscetível ao crescimento microbiológico do que o óleo diesel S500, sem adição de água. Contudo, nas amostras que continham água, o diesel S500 mostrou maior

absorbância, relacionada a maior presença de microrganismos.

Azambuja *et al.* (2017) verificaram a composição microbiológica e a biodegradação de óleo diesel B10 com três concentrações de enxofre. Os autores verificaram que o combustível com teor elevado de enxofre foi mais susceptível ao crescimento microbiano, seguido pela amostra com menor concentração de enxofre, onde a amostra com teor médio desse elemento demonstrou menor proliferação durante estocagem ao longo de 40 dias. Além disso, ao contrário do que aponta a literatura, os autores verificaram que o combustível com maior teor de enxofre demonstrou ser mais susceptível à biodegradação.

Ao relacionar os resultados anteriores do grupo de pesquisa, bem como os encontrados por Azambuja *et al.* (2017), fica evidente que a remoção de compostos sulfurados do óleo diesel não influencia diretamente no crescimento microbiano, mas sim outros fatores, como teor de biodiesel e presença de água. Além disso, foi observado durante os ensaios com radiação ultravioleta que o teor de enxofre não influencia a eficiência do tratamento, uma vez os resultados obtidos apontaram variação entre si.

5.6 Avaliação da presença de microrganismos após os ensaios com radiação ultravioleta

Após os ensaios com radiação ultravioleta foi realizado o monitoramento do combustível quanto a presença de microrganismos. As amostras combustíveis foram submetidas à análise microbiológica a partir do método espectrofotométrico após 10, 20 e 30 dias da ocorrência do ensaio com radiação ultravioleta. A absorbância encontrada que relaciona a presença de microrganismos no combustível, durante todo o processo (início e final da estocagem e após 10, 20 e 30 dias do tratamento) pode ser observada na tabela 11.

Tabela 11. Absorbância (600 nm) para as amostras de combustível no início e fim da estocagem, fim do tratamento e após 10, 20 e 30 dias do tratamento com radiação ultravioleta

Amostras	Absorbância pré-tratamento		Final do ensaio	Absorbância após tratamento		
	Início da estocagem	Final da estocagem		10º dia	20 dias	30 dias
MP-D1	0,181 ± 0,008 a	0,269 ± 0,001 a	0,117 ± 0,006 a	0,161 ± 0,017 a	0,173 ± 0,003 a	1,098 ± 0,135 b
MP-D2	0,044 ± 0,007 a	0,152 ± 0,039 ab	0,092 ± 0,009 ab	0,231 ± 0,031 b	0,206 ± 0,047 ab	1,171 ± 0,321 c
MP-D3	0,148 ± 0,071 a	0,167 ± 0,026 a	0,143 ± 0,017 a	0,199 ± 0,003 a	1,151 ± 0,018 b	1,181 ± 0,067 b
MP-D4	0,198 ± 0,012 ab	0,252 ± 0,002 ab	0,118 ± 0,075 a	0,332 ± 0,032 b	1,223 ± 0,040 c	1,313 ± 0,028 c
MP-D5	0,247 ± 0,010 ab	0,300 ± 0,001 b	0,081 ± 0,002 a	0,205 ± 0,03 ab	1,215 ± 0,018 c	1,347 ± 0,149 c
MP-D6	0,267 ± 0,005 bc	0,382 ± 0,001 c	0,077 ± 0,01 a	0,091 ± 0,001 ab	0,237 ± 0,007 abc	0,276 ± 0,041 c
MP-D7	0,213 ± 0,009 b	0,496 ± 0,006 b	0,226 ± 0,025 a	0,220 ± 0,001 a	1,142 ± 0,054 c	1,154 ± 0,02 c
MP-D8	0,174 ± 0,006 ab	1,089 ± 0,007 c	0,143 ± 0,013 a	0,154 ± 0,003 ab	0,154 ± 0,005 ab	0,325 ± 0,182 b
MP-D9	0,512 ± 0,001 b	1,549 ± 0,001 d	0,064 ± 0,013 a	0,109 ± 0,012 a	0,281 ± 0,067 a	0,751 ± 0,091 c
MP-D10	0,178 ± 0,007 a	1,408 ± 0,002 b	0,0447 ± 0,005 a	0,116 ± 0,011 a	0,172 ± 0,021 a	0,720 ± 0,029 c
MP-D11	0,344 ± 0,001 a	0,987 ± 0,039 b	0,697 ± 0,029 c	0,095 ± 0,004 d	0,154 ± 0,017 d	1,169 ± 0,195 e
MP-D12	0,315 ± 0,062 ab	0,391 ± 0,007 b	0,241 ± 0,029 ab	0,291 ± 0,022 a	0,402 ± 0,035 ab	1,141 ± 0,097 c

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

A partir dos resultados apresentados na tabela 11 é possível perceber que o óleo diesel comercial S10, referente a amostra MP-D1, a absorvência manteve-se menor, comparado ao final da estocagem, por até 20 dias após o tratamento. Já para o diesel S500 comercial, B20 S10, B20 S500 (amostras MP-D2, MP-D3 e MP-D4 respectivamente, após 10 dias de tratamento a absorvência foi maior que ao final da estocagem, assim sugere-se que o tratamento deva ser repetido após no máximo 10 dias.

Após 10 dias do tratamento com radiação ultravioleta a absorvência referente as amostras MP-D5, MP-D7 e MP-D12 mantiveram-se inferior à encontrada no final da estocagem, contudo após 20 dias houve um aumento da mesma, apontando que o tratamento deve ser repetido após 10 dias. As amostras MP-D6, MP-D8, MP-D9 e MP-D10 após 30 dias de tratamento mantiveram-se com absorvência inferior à encontrada ao final da estocagem. Para essas amostras, o efeito da radiação ultravioleta mostrou-se prolongado em relação às demais. Para a amostra MP-D11, o comportamento foi diferente das demais, onde após 10 e 20 dias tratamento, a absorvência encontrada foi menor que a do final do tratamento. Este fato pode ser relacionado à erros de medição e à hipótese que os efeitos da radiação ultravioleta se prolongaram após o final do tratamento.

5.7 Parâmetros físico-químicos

Foram realizadas análises das amostras de combustível submetidas ao tratamento com radiação ultravioleta a fim de verificar se a radiação aplicada ao óleo diesel promove mudança em suas propriedades. As análises foram realizadas com as amostras antes e após a exposição à radiação UV e foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de água, massa específica, viscosidade cinemática e estabilidade oxidativa. Os resultados para estas análises serão apresentados nos tópicos seguintes.

5.7.1 Teor de água: análise por Karl Fischer

Como descrito no tópico Material e Métodos, as amostras de combustíveis denominadas MP-D5, MP-D6, MP-D7 e MP-D8 tiveram adição de água na quantidade de 2.500 ppm sobre o volume da amostra, enquanto as denominadas MP-D9, MP-

D10, MP-D11 e MP-D12 tiveram adição de 10.000 ppm. Em relação as demais amostras não houve adição de água.

Nesse sentido, considerando as características físicas do óleo diesel, é sabido que o mesmo é imiscível com água, isto é, não é possível a formação de uma fase única. Quando se adiciona água no combustível, ela tende a se concentrar no fundo dos tanques, em forma de lastro, no entanto, segundo Bento *et al.* (2016), ainda é possível encontrá-la no combustível, dispersa como microgotícula e também emulsionada na interface óleo-água.

Sendo assim, as análises de teor de água foram realizadas a fim de identificar a quantidade do líquido presente no combustível em forma de microgotícula, uma vez que a alíquota de combustível foi coletada na fase óleo. Dessa forma, foram realizadas análises de todas as amostras anterior e posterior o contato com a radiação ultravioleta, com o objetivo de verificar se a radiação interfere neste parâmetro.

A tabela 12 aponta os resultados encontrados para as análises de Karl Fischer pelo método ASTM D6304.

Tabela 12. Titulação de Karl Fischer para teor de água das amostras de combustíveis utilizados no reator ultravioleta anterior e posterior o contato com radiação ultravioleta

Amostras	Teor de água (ppm)	
	Anterior a exposição à radiação UV-C	Posterior a exposição à radiação UV-C
MP-D1	300,58 ± 21,74 a	271,68 ± 125,61 a
MP-D2	313,12 ± 7,75 a	282,04 ± 12,59 a
MP-D3	264,00 ± 144,04 a	251,85 ± 148,03 a
MP-D4	435,83 ± 65,55 a	302,60 ± 17,66 a
MP-D5	309,29 ± 44,88 a	210,18 ± 89,59 a
MP-D6	779,29 ± 133,91 a	284,58 ± 57,77 b
MP-D7	1359,13 ± 309,31 a	479,56 ± 41,35 b
MP-D8	874,96 ± 296,44 a	534,17 ± 50,52 b
MP-D9	268,12 ± 120,83 a	411,28 ± 15,52 b
MP-D10	422,67 ± 11,86 a	264,07 ± 33,61 a
MP-D11	822,04 ± 188,16 a	633,42 ± 234,11 a
MP-D12	743,22 ± 264,60 a	765,18 ± 158,40 a

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

Segundo a ANP (2013) o teor máximo de água permitido para óleo diesel comercial S10 e S500 é de de 200 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹ respectivamente. As

amostras MP-D1 e MP-D2 referem-se ao diesel S10 e S500 da forma em que são comercializados pelos postos de combustíveis. Nota-se que a amostra MP-D1 encontra-se fora das especificações exigidas, enquanto que a amostra MP-D2 está dentro da legislação vigente.

As amostras com legenda com final ímpar são referentes ao óleo diesel S10 e as com final par, S500, onde durante o preparo, com exceção das amostras MP-D1 à MP-D4, as demais tiveram adição de água. No entanto, a análise por Karl Fischer identificou teores menores do que adicionado. Isso ocorreu devido ao fato de que a alíquota retirada para as análises foi da fase óleo, onde a água se encontra na forma de microgotícula. Bento *et al.* (2016) explicam que nessa fase, a água se encontra em menor quantidade devido as características físicas do óleo diesel.

Embora pareça haver diferença entre os teores de água das amostras entre o início e fim com o tratamento com radiação ultravioleta, a análise estatística realizada apontou que apenas as amostras MP-D6, MP-D7, MP-D8 e MP-D9 se diferenciam estatisticamente a 5% de significância. Este resultado aponta que para as demais amostras a radiação ultravioleta não alterou o teor de água presente no combustível. Ainda que as citadas amostras se diferenciem estatisticamente, esta diferença pode ser explicada por Bento *et al.* (2016) que afirmam que na fase óleo a água é encontrada na como microgotícula, sendo assim, é possível que haja diferença no teor de água durante as análises. Para as amostras onde o teor de água foi inferior no final do tratamento em relação o início a possibilidade de ebulição da água é descartada, uma vez que os ensaios não ultrapassaram a temperatura de 40°C. Assim sendo, é possível concluir que o tratamento utilizado não gera mudanças no combustível em relação ao teor de água.

5.7.2 Massa específica à 25°C

As análises de massa específica ocorreram com todas as amostras de combustível anterior e posterior ao ensaio com radiação ultravioleta. Os resultados encontrados podem ser visualizados na tabela 13.

Tabela 13. Massa específica à 20°C das amostras de combustíveis utilizadas no reator ultravioleta anterior e posterior a exposição à radiação ultravioleta

Amostras	Massa específica (kg.m ⁻³)	
	Anterior a exposição à radiação UV-C	Posterior a exposição à radiação UV-C
MP-D1	0,835 ± 0 a	0,835 ± 0 a
MP-D2	0,855 ± 0 a	0,853 ± 0 a
MP-D3	0,839 ± 0 a	0,839 ± 0 a
MP-D4	0,854 ± 0 a	0,854 ± 0 a
MP-D5	0,835 ± 0 a	0,835 ± 0 a
MP-D6	0,852 ± 0 a	0,852 ± 0 a
MP-D7	0,838 ± 0 a	0,838 ± 0 a
MP-D8	0,854 ± 0 a	0,854 ± 0 a
MP-D9	0,834 ± 0 a	0,835 ± 0 a
MP-D10	0,852 ± 0 a	0,852 ± 0 a
MP-D11	0,839 ± 0 a	0,839 ± 0 a
MP-D12	0,853 ± 0 a	0,853 ± 0 a

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

A massa específica é um dos parâmetros de qualidade do combustível regulamentados pela Resolução nº30 de 23 de junho de 2016 da ANP que compete ao óleo diesel S10 valores que variam de 817,8 a 865,3 kg.m⁻³ e ao óleo diesel S500, 817,8 a 875,5 kg.m⁻³. Valores abaixo da norma favorecem a perda de potência do motor e maior consumo de combustível, enquanto valores acima da norma podem resultar no aumento da emissão de poluentes (ALEME, 2011; LIMA, 2012).

As análises realizadas com as amostras de combustível encontraram-se dentro da normatização e não foi observado mudanças em relação ao início e final do ensaio a 5% de significância. Mesmos as amostras que continham água adicionada não demonstraram aumento do parâmetro, justificado pela alíquota utilizada para análise ter sido retirada da fase óleo.

Neves (2018) realizou a análise de massa específica para amostras de óleo diesel S10 que passaram por tratamento com radiação ultravioleta e verificou que a radiação não promoveu mudanças neste parâmetro, assim como constatado por esse trabalho. Dessa forma, é possível afirmar que a exposição do combustível a radiação ultravioleta, em até 360 minutos, não promove alterações em sua massa específica.

5.7.3 Viscosidade cinemática a 20°C

A caracterização da viscosidade cinemática foi realizada para as amostras no início e no final do ensaio com radiação ultravioleta (tabela 14). Lima (2012) aponta que combustíveis com viscosidade elevada pode acarretar maiores emissões de

material particulado, além de afetar a atomização do combustível.

Tabela 14. Viscosidade cinemática à 20°C das amostras de combustíveis utilizadas no reator ultravioleta anterior e posterior a exposição à radiação ultravioleta

Amostras	Viscosidade Cinemática (mm ² /s)	
	Anterior a exposição à radiação UV-C	Posterior a exposição à radiação UV-C
MP-D1	2,96 ± 0,23 a	2,93 ± 0,23 a
MP-D2	4,13 ± 0,23 a	4,13 ± 0,23 a
MP-D3	2,40 ± 0,00 a	3,20 ± 0,00 b
MP-D4	4,80 ± 0,00 a	3,81 ± 0,20 b
MP-D5	3,06 ± 0,23 a	2,26 ± 0,23 b
MP-D6	3,33 ± 0,23 a	3,12 ± 0,28 a
MP-D7	4,53 ± 0,46 a	2,66 ± 0,23 b
MP-D8	3,73 ± 0,23 a	5,20 ± 0,69 b
MP-D9	2,53 ± 0,46 a	2,40 ± 0,40 a
MP-D10	2,80 ± 0,40 a	2,53 ± 0,23 a
MP-D11	3,60 ± 0,00 a	2,66 ± 0,23 b
MP-D12	5,52 ± 0,28 a	4,66 ± 0,61 b

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

Avaliar a viscosidade cinemática no combustível antes e após a exposição à radiação ultravioleta é de extrema importância, uma vez que permite verificar se o tratamento aplicado promove alterações nesse importante parâmetro de qualidade. A legislação (ANP, 2016) permite que para combustíveis S10 e S500 a viscosidade cinemática seja de 1,9 a 4,1 e 2,0 a 5,0 mm²/s respectivamente.

Com exceção das amostras MP-D7 e MP-D12 (anterior à radiação) e MP-D8 (posterior à radiação), todas as demais encontraram-se dentro das normas exigidas pela ANP. Para as amostras comerciais, MP-D1 e MP-D2, pode-se verificar que não houve alteração da viscosidade. Além disso, os resultados não apontaram uma tendência de aumento ou diminuição da viscosidade ao longo dos ensaios, uma vez que em alguns casos a viscosidade foi menor no combustível antes da radiação e em outros o contrário aconteceu. Estatisticamente, 7 das 12 amostras analisadas, apresentam diferença significativa (Tukey, 5% de significância), contudo não é possível afirmar que o tratamento é o responsável por mudar a viscosidade, uma vez que não foi encontrado um padrão de aumento ou diminuição após a incidência de radiação UV no combustível.

Neves (2018) realizou análises de viscosidade para suas amostras de

combustível e verificou, também, que para amostras comerciais a radiação ultravioleta não promoveu alterações nesse parâmetro. Porém, combustível onde houve alteração devido a adição de inóculo microbiano, a viscosidade variou. Entretanto, essas alterações podem não estar associadas ao efeito da radiação ultravioleta, uma vez que os combustíveis que não demonstraram uma estabilidade dos resultados continham adição de água, sendo esse um dos fatores que alteram tal parâmetro.

5.7.4 Estabilidade oxidativa

Um dos processos ao qual o combustível está sujeito é a degradação oxidativa, especialmente àqueles que possuem alto teor de biodiesel adicionado (MEIRA *et al.*, 2016). A norma atual para biodiesel prevê que esse biocombustível de possuir no mínimo 20 horas de estabilidade à oxidação, no entanto a norma para comercialização de óleo diesel do tipo rodoviário não especifica um valor para esta propriedade. Ainda assim, se faz um parâmetro importante de ser medido, ainda mais diante de um novo tratamento, como está sendo proposto.

Para esta medida foram selecionadas as amostras sem adição de água do diesel S10 e S500 comercial e B20, e as amostras dos citados combustíveis com adição de 10000 ppm de água. O resultado referente ao ponto de indução das amostras pode ser observado na tabela 15.

Tabela 15. Estabilidade oxidativa (h) para amostras de diesel B11 e B20, tanto S10 quanto S500, com adição de água (10000 ppm) e sem adição, anterior e posterior a exposição à radiação ultravioleta

Amostras	Tempo de indução (h)	
	Anterior a exposição à radiação UV-C	Posterior a exposição à radiação UV-C
MP-D1	28,38 a	22,97 b
MP-D2	24,73 a	27,85 b
MP-D3	24,25 a	20,53 b
MP-D4	24,18 a	23,68 b
MP-D9	24,52 a	21,27 b
MP-D10	26,53 a	25,22 b
MP-D11	21,66 a	18,68 b
MP-D12	16,93 a	20,82 b

Amostras seguidas da mesma letra na linha não diferem a 5% de significância no teste de Tukey.

Como pode ser visto na tabela acima, apenas as amostras MP-D12 (diesel B20, S500, com adição de 10000 ppm de água) resultou em estabilidade à oxidação inferior a 20 horas no início do tratamento, entretanto ao final da exposição à radiação ultravioleta o mesmo teve um aumento para 20,82 no tempo de indução. A amostra MP-D2 também demonstrou aumento da estabilidade oxidativa em relação ao início do tratamento, porém nenhuma das demais amostras se manteve com esse comportamento.

De maneira geral, percebe-se a exposição à radiação ultravioleta no combustível promove alterações na estabilidade oxidativa do combustível, uma vez que 6, das 8 amostras analisadas, obtiveram este comportamento. Contudo, com exceção da amostra MP-D11, ainda que menor ao final do tratamento, a estabilidade oxidativa do combustível se manteve acima de 20 horas, inclusive para àqueles que havia adição de água. Além disso, a análise estatística comprovou o efeito que a radiação ultravioleta promove mudança na estabilidade oxidativa para todas as amostras, uma vez que houve diferença significativa do tempo de indução entre o início e fim do tratamento.

6. CONCLUSÕES

Inicialmente foi possível constatar a partir da relação realizada com o método de quantificação de microrganismos por peso seco e o método espectrométrico, que a utilização da espectrofotometria como forma de verificação de presença de microrganismos é efetiva. Os resultados encontrados para a amostra de combustível onde as técnicas foram empregadas geraram curva de crescimento e mortalidade de microrganismos muito similares, o que leva a concluir a validade da utilização da absorbância como um método para verificação da presença microbiológica.

A partir dos experimentos realizados foi possível perceber durante a fase de estocagem simulada dos combustíveis utilizados que o teor de água foi o fator maior influência no que se refere ao desenvolvimento de microrganismos. As amostras estocadas com adição de água ao longo de 10 dias apresentaram formação de biomassa microbiana, enquanto as demais não.

A respeito da utilização da radiação ultravioleta como método alternativo para inativação e controle de contaminação microbiana, verificou-se que para 8 das 12 amostras utilizadas, o tratamento teve eficiência superior a 50%. Além disso, notou-se quanto maior a presença de microrganismos nas amostras, maior tende ser a eficiência do tratamento em sob a inativação e controle microbiano. A presença ou não de água, bem como de teores baixos ou elevados de enxofre, não afetam a eficiência do tratamento, entretanto influenciam no desenvolvimento microbiológico durante estocagem.

Os experimentos realizados apontaram que houve mudanças significativas nas propriedades físico-químicas das amostras, mas que ainda assim o combustível encontrava-se com o valor exigido pela norma. Além disso, algumas das mudanças encontradas para propriedades analisadas estão relacionadas a composição do combustível e não ao efeito do tratamento.

Por fim, pode-se afirmar que os objetivos propostos para este trabalho foram cumpridos, e que a hipótese inicial de que maiores concentrações de água e menores concentrações de enxofre aceleram o crescimento microbiológico não é verdadeira. Isso, pois durante a estocagem simulada, foi verificado que amostras com maior quantidade de enxofre e água foram mais suscetíveis a contaminação do àquelas com menor teor de enxofre. Com isso, conclui-se que a presença de água é o fator principal para o crescimento de microrganismos em combustível diesel, e que a utilização da

radiação ultravioleta pode ser vista como alternativa eficiente para o controle e prevenção de microrganismos que degradam o combustível.

7. TRABALHOS FUTUROS

- Identificar as bactérias presentes nas amostras de óleo diesel utilizadas;
- Identificar e isolar bactérias presentes no óleo diesel em diferentes regiões do Paraná;
- Otimizar métodos de contagem de microrganismos presentes no óleo diesel;
- Otimizar o tratamento com radiação ultravioleta;
- Realizar testes com lâmpadas UVC em diferentes comprimentos de onda;
- Iniciar um Banco de Germoplasma com diferentes bactérias isoladas do óleo diesel de diferentes localidades a fim de verificar a variedade de microrganismos do combustível e estudar, isoladamente, o potencial de degradação de cada uma delas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEME, H. G. **Determinação de parâmetros físico-químicos do óleo diesel a partir de curvas de destilação utilizando técnicas quimiométricas.** 2011. 149f. 2011. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)-Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ALEME, H. G., BARBEIRA, P. J. S. Determination of flash point and cetane index in diesel using distillation curves and multivariate calibration. **Fuel**, v. 102, pg. 129-134, 2012.

ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, 2019.

ANP. **Biodiesel**, 2016b. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em 13 de junho de 2019.

ANP. **Manuseio e armazenamento de óleo diesel B – orientações e procedimentos.** 2016c. Disponível em: <https://www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=42786>. Acesso em 17 de junho de 2019.

ANP. **Óleo Diesel**, 2016a. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1857-oleo-diesel> . Acesso em 13 de junho de 2019.

ANP. **Óleo Diesel**, 2017. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/perguntas/239-produtos-regulados-faq/oleo-diesel/3745-oleo-diesel-faq>. Acesso em 16 de agosto de 2019.

ANP. **Resolução nº 50, de 23.12.2013 – DOU 24.12.2013**, 2013. Disponível em: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2013/dezembro&item=ranp-50--2013>. Acesso em 14 de junho de 2019.

ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia plena**, v. 4, n. 11, 2008.

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 16 n. 4. p. 2070-2093, 2012.

AZAMBUJA, A. O. **Avaliação da contaminação microbiana durante armazenamento simulado da mistura B10 e óleo diesel com diferentes teores de enxofre.** 2016. 214 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2016.

AZAMBUJA, A. O. et al. Effect of sulfur content on microbial composition and biodegradation of a Brazilian diesel and biodiesel blend (B10). **Energy & Fuels**, v. 31, p. 12305-12316, 2017.

AZAMBUJA, A. O. et al. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying sulfur content, using high-throughput sequencing. **Fuel**, v. 189, p. 340-349, 2017.

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.

BARBERI, A. et al. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe br 29 em meios de cultivo de diferentes valores de ph inicial. **Ciênc. Agrotec.** V. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

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.

BAUTISTA, Luis Fernando et al. Assessment of biocides and ultrasound treatment to avoid bacterial growth in diesel fuel. **Fuel Processing Technology**, v. 152, p. 56-63, 2016.

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.

BEN. **Balanco energético nacional: relatório síntese (ano base 2017)**, 2018.

Disponível em: <http://epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-303/topico-397/Relat%C3%B3rio%20S%C3%ADntese%202018-ab%202017vff.pdf>. Acesso em 20 de junho de 2019.

BENTO, F. M. et al. Diagnóstico, monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In: PINHO, D. M. M; SUAREZ, P. A. Z. **Armazenagem e uso de biodiesel: problemas associados e formas de controle**. Brasília. Secretaria de desenvolvimento tecnológico e inovação, 2016, p. 111-17.

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.; CAVALCANTI, E. H. S. Implicações da adição de 5% de biodiesel na qualidade do óleo diesel. 2012. Disponível em:

<http://www.fetronor.com.br/comunicacao/noticias/implicacoes-da-adicao-de-5-de-biodiesel-na-qualidade-do-oleo-diesel/195>. Acesso em 20 de Novembro de 2018.

BENTO, F. M.; ENGLERT, G. E.; GAYLARDE, C. C.; MULLER, I. L. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems.

Materials and Corrosion, v. 55. n. 8. p. 577-585, 2004.

BENTO, F. M.; VISCARDI, S. K. R.; DARODA, R.; MENENDEZ, A. G.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Suscetibilidade do óleo diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**. v. 24, p. 24-26, 2006.

BETHA, R., BALASUBRAMANIAN, R. Emissions of particulate-bound elements from stationary diesel engine: Characterization and risk assessment. **Atmospheric Environment**, v. 45, p. 5273 – 5281, 2011.

BHUIYA, M. M. K.; RASUL, M. G.; KHAN, M. M. K.; ASHWATH, N.; AZAD, A. K.; HAZRAT, M. A. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel–Part 2: Properties, performance and emission characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55. p. 1129-1146, 2016.

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.

BOELTER, G. **Avaliação da capacidade deteriogênica de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* durante estocagem simulada em diesel, biodiesel e mistura B10**. 2017.122 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2017.

BOELTER, G.; CAZAROLLI, J. C.; BEKER, S. A.; QUADROS, P. D.; CORREA, C.; FERRÃO, M. F., GALEAZZI, C. F.; PIZZOLATO, T. M.; BENTO, F. M. (2018). *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25(30). p. 30410-30424, 2018.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Casa Civil**, 2005. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2004-2006/2005/lei/l11097.htm >. Acesso em 20 de junho de 2018.

BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, que altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. **Casa Civil**, 2016. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2015-2018/2016/lei/L13263.htm >. Acesso em 20 de junho de 2018.

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. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas**. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação

em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2009.

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.

BÜCKER, Francielle *et al.* Evaluation of the deteriogenic microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage. **Fuel**, v. 233, p. 911-917, 2018.

BUENO, A. V. **Análise da operação de motores diesel com misturas parciais de biodiesel**. 2006. 103 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2006.

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.

CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do biodiesel e misturas: abrangência, limitações dos métodos de avaliação. **Biodieselbr**. n. 13. p. 71-73, 2009.

CAZAROLLI, J. C., BUCKER, F., MANIQUE, M. C., KRAUSE, L. C., MACIEL, G. P. S., ONOREVOLI, B., CAMARÃO, E. B., CAVALCANTI, E. H. S., SAMIOS, D., PERALBA, M. C. R., 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. *et al.* Nature of insoluble material found in the bottom of soybean biodiesel storage tank: chemical and microbiological approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2034-2045, 2018.

CAZAROLLI, J. C. *et al.* Deterioration potential of *Aureobasidium pullulans* on biodiesel, diesel, and B20 blend. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 147, p. 104839, 2020.

CAZAROLLI, J. C. *et al.* Microbial growth in *Acrocomia aculeata* pulp oil, *Jatropha curcas* oil, and their respective biodiesels under simulated storage conditions. **Biofuel Research Journal**, v. 12, n. 3, p. 514-520, 2016.

CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51(2), p. 133-138. 2003.

- CHUNG, Y. C., CHEN, H. C., SHYU, Y. T., HUA, J. Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. **Fuel**, v. 79(12), p. 1525-1532, 2000.
- DELFINO, J. R.; PEREIRA, T. C.; VIEGAS, H. D. C.; MARQUES, E. P.; FERREIRA, A. A. P.; ZHANG, L.; MARQUES, A. L. B. (2018). A simple and fast method to determine water content in biodiesel by electrochemical impedance spectroscopy. **Talanta**, v. 179, p. 753-759, 2018.
- DODOS, G. S.; KONSTANTAKOS T.; LONGINOS S.; ZANNIKOS F. 2011. Effects os microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. In: **International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece**. 2011.
- FERREIRA, J. C. **Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina – PR, 2015.
- FONSECA, Marbella Maria Bernardes *et al.* Unlocking and functional profiling of the bacterial communities in diesel tanks upon additive treatment. **Fuel**, v. 236, p. 1311-1320, 2019.
- FREGOLENTE, P. B. L., MACIEL, M. R. W., OLIVEIRA, L. S. Removal of water content from biodiesel and diesel fuel using hydrogel adsorbents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 4, p. 895-901, 2015.
- FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; MACIEL, M. R. W. Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. **Journal of Chemical & Engineering Data**. v. 57, p. 1817–1821, 2012.
- 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.
- GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- GAYLARDE, C. C., BENTO, F. M., KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30m p. 01-10, 1999.
- GIELNIK, Anna *et al.* Bacterial seeding potential of digestate in bioremediation of diesel contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 143, p. 104715, 2019.
- GIOVANELLA, P. *et al.* Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n.2, p.232-236, 2011.
- GOG, A. M.; CHINTOANU, M.; ROMAN, M.; PITL, G.; LUCA, E.; IRIMIE, F. D. Biodiesel as an alternative fuel – general aspects. **Agricultura**. v. 63. n. 4. p. 19-29, 2007.

GUPTA, Ram B.; DEMIRBAS, Ayhan. **Gasoline, diesel, and ethanol biofuels from grasses and plants**. Cambridge University Press, 2010.

GUTHEIL, N. G. Ocorrência de *Cladosporium resiniae* (Lindau) de Vries em querosene de aviação no Brasil. **Boletim**, n. 9, 1966.

HAJJARI, M., TABATABAEI, M., AGHBASHLO, M., & GHANAVATI, H. A review on the prospects of sustainable biodiesel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiesel utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 445-464, 2017.

HASANNUDDIN, A. K., YAHYA, W. J., SARAH, S., ITHNIN, A. M., SYAHRULLAIL, S., SIDIK, N. A. C., ABU KASSIM, K. A., AHMAD, Y., HIROFUMI, N., AHMAD, M. A., SUGENG, D. A., ZUBBER, M. A., RAMLAN, N. A. Nano-additives incorporated water in diesel emulsion fuel: fuel properties, performance and emission characteristics assessment. **Energy conversion and management**, v. 169, p. 291-314, 2018.

HASANNUDDIN, A. K., YAHYA, W. J., SARAH, S., ITHNIN, A. M., SYAHRULLAIL, S., SIDIK, N. A. C.; ABU KASSIM, K. A.; AHMAD, Y.; HIROFUMI, N.; AHMAD, M. A.; SUGENG, D. A.; ZUBER, M. A.; RAMLAN, N. A. Nano-additives incorporated water in diesel emulsion fuel: fuel properties, performance and emission characteristics assessment. **Energy conversion and management**, v. 169, p. 291-314, 2018.

HASEEB, A.; MASJUKI, H. H.; ANN, L. J.; FAZAL, M. A. Comparative corrosive characteristics of petroleum diesel and palm biodiesel for automotive materials. **Fuel Process and Technology**. v. 91. p. 1308-1315, 2010.

HELDRETH, B.; TUROS, E. Microbiological properties and modes of action of organosulfur-based anti-infectives. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents**, v. 4, n. 4, p. 295-315, 2005.

HILL, E. C.; HILL, G. C. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. In: **IASH2009, The 11 th International Conference on Stability. Handling and use of liquid fuels, Prague, Czech Republic**. 2009.

ITHNIN, A. M., AHMAD, M. A., BAKAR, M. A. A., RAJOO, S., & YAHYA, W. J. Combustion performance and emission analysis of diesel engine fuelled with water-in-diesel emulsion fuel made from low-grade diesel fuel. **Energy Conversion and Management**, v. 90, p. 375-382, 2015.

ITHNIN, A. M., YAHYA, W. J., AHMAD, M. A., RAMLAN, N. A., KADIR, H. A., SIDIK, N. A. C., & KOGA, T. Emulsifier-free Water-in-Diesel emulsion fuel: Its stability behaviour, engine performance and exhaust emission. **Fuel**, 215, 454-462, 2018.

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**, 30, 154–163, 2014.

KNOTHE, G., STEIDLEY, K. R. Lubricity of components of biodiesel and petrodiesel. The origin of biodiesel lubricity. **Energy & Fuels**. v. 19, p. 1192-1200. 2005.

KUMAR NS, KUMAR MS. Investigation on the performance and emission characteristics of a diesel engine using water-diesel-nanofluid emulsion as fuel.

LIMA, A. S. *et al.* O Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis-PMQC. **Séries Temáticas ANP**, n. 5, 2012.

LÔBO, I. P., FERREIRA, S. L. C., CRUZ, R. S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LONDRY, Kathleen L.; SUFLITA, Joseph M. Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 17, n. 7, p. 1199-1206, 1998.

LYLES, Christopher N. *et al.* Impact of organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 11, p. 6052-6062, 2013.

MAHMUDUL, H. M., HAGOS, F. Y., MAMAT, R., ABDUL ADAM, A., ISHAK, W. F. W., ALENEZI, R. Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. **Renewable and**

MALTEZ, J. P. F. V.I. **Efeito da radiação ultravioleta na contagem de microrganismos aeróbios totais no leite de burra da raça asinina de Miranda.** 2018. 91 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. 2018.

MARIANO, 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.

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; GORBUSHINA, A. A.; TOEPEL, J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture-and qPCR-based approaches. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 126, p. 216-223, 2016.

MAZUMDAR, P.; BORUGADDA, V. B.; GOUD, V. V.; SAHOO, L. Effect of storage parameters on stability of Jatropha-derived biodiesel. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 4(1), n. 13, p. 1 – 9, 2013.

MEIRA, M. *et al.* Aditivos melhoradores da estabilidade oxidativa e corrosividade do biodiesel e da lubrificidade da suas misturas com diesel. **Educação, Tecnologia e Cultura-ETC**, v. 14, 2016.

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 das suas misturas com diesel. **Revista Educação, Tecnologia e Cultura – ETC.** v. 14, n. 14, 2016.

MIRANDA, E. L. **Óleo de gomado de grãos de soja sem defeitos e partidos para**

produção de biocombustível. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

MOSER, B. R. (2011). Influence of extended storage on fuel properties of methyl esters prepared from canola, palm, soybean and sunflower oils. **Renewable energy**. v 36(4). p. 1221-1226, 2011.

MOSER, B. R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. **Vitro cellular & developmental biology – plant**. v. 3. n. 45. p. 229 – 266, 2009.

MURUGESAN, A., UMARANI, C., CHINNUSAMY, T. R., KRISHNAN, M., SUBRAMANIAN, R., NEDUZCHEZHAIN, N. Production and analysis of biodiesel from non-edible oils – a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 13, p. 825-834, 2009.

NABI, N., AKHTER, S., SHAHADAT, Z. Improvement of engine emissions with conventional diesel fuel and diesel-biodiesel blends. **Bioresource Technology**. v. 97, n. 3, p. 372-378, 2006.

NEVES, A. C. **Avaliação da radiação ultravioleta na inativação de microrganismos presentes em óleo diesel**. 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

NYANGARESI, P. O., QIN, Y., CHEN, G., ZHANG, B., LU, Y., & SHEN, L. Comparison of the performance of pulsed and continuous UVC-LED irradiation in the inactivation of bacteria. **Water research**, v. 157, p. 218-227, 2019.

OLIVEIRA, E. P. D. **Estudo do teor de água no biodiesel utilizado na mistura do diesel no Amazonas**. 2016. 66 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos da Amazônia). Programa de pós-graduação em engenharia de recursos da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

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.

PASSMAN, F. J. Fuel and fuel system microbiology: fundamentals, diagnosis and contamination control. Manual 47. **ASTM International**, WestConshohocken, 114 p. 2003.

PASSMAN, F.; DOBRANIC, J. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **Proceedings of the 9th international conference on the stability and handling of liquid fuels, Sitges, Spain**. p. 18-22. 2005.

PATEL, R. 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.

PAWELEC, B.; NAVARRO, R.M.; CAMPOS-MARTIN, J.M.; FIERRO, J.L.G.;

Towards near zero sulfur liquid fuels: A perspective review. **Catalysis Science Technology**. v.1, p. 23-24, 2011.

PETROBRAS. **Óleo diesel: informações técnicas**. 2014. Assistência técnica. Versão 1.3. 2014. Disponível em:

<http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/public/downloads/diesel-manual.pdf>. Acesso em 12 de janeiro de 2019.

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.

POLINARSKI, M. P. *et al.* Crescimento microbiano em combustíveis diesel S10 e S500 com diferentes teores de água durante estocagem simulada. In: **7º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel**. Florianópolis, 2019.

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

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.

RANZAN, L. **Estudo da viabilidade do uso de espectroscopia por fluorescência 2D para quantificar teor de enxofre em óleo diesel**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

RODRIGUES, P. R. P. Obtenção e Caracterização Físico-química do Biodiesel B100 e de Misturas Biodiesel/Diesel. **Ciências Exatas e Naturais**. v.13. n 2. p. 212 – 226, 2011.

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(10), p. 1595-1601, 2010.

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.

SANLI, H. An experimental investigation on the usage of waste frying oil-diesel fuel blends with low viscosity in a Common Rail DI-diesel engine. **Fuel**, v. 222, p. 434-443, 2018.

SANTOS, V. M. L.; SILVA, J. A. B.; STRAGEVITCH, L.; LONGO, R. L. Thermochemistry of biodiesel oxidation reactions: A DFT study. **Fuel**. v.90, n.2, p. 811-817, 2011.

SCHMITT, C. C. **Adsorção de compostos sulfurados e nitrogenados do óleo diesel em coluna de carvão ativado**. 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado).

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

SILVA, T. B. **Contaminação microbiológica de diesel comercial no Distrito Federal**. 2015, 68 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica. Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

SINGH, N., & BHARJ, R. S. Effect of CNT-emulsified fuel on performance emission and combustion characteristics of four stroke diesel engine. **International Journal of Current Engineering and Technology**, v. 5(1), p. 477-485, 2015a.

SINGH, N., & BHARJ, R. S. Experimental investigation on the role of indigenous carbon nanotube emulsified fuel in a four-stroke diesel engine. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science**, v. 230(12), p. 2046-2059, 2015b.

SINGH, R.; SHARMA, S.; GANGACHARYULU, D. Effect of TiO₂ nanoparticle blended water diesel emulsion fuel on CI engine performance and emission characteristics. **International Journal of Engineering Research & Technology**. v. 5. n. 7. p. 416–421, 2016.

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., 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 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Unviersidade 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.

SRIVASTAVA, N. K.; NANDAN, N. K. Microbial growth control in diesel by optimization of Sulphur. **International journal of environmental pollution and remediation**, v. 1, n. 1, p. 119-125, 2012.

VAN GERPEN, J. H.; HAMMOND, E. G.; JOHNSON, L. A.; MARLEY, S. J.; YU, L.; LEE, I.; MONYEN, A. **Determining the influence of contaminants on biodiesel properties**. Final report prepared for The Iowa Soybean Promotion Board. Iowa State University, 1996.

VAN GERPEN, J., SHANKS, B., PRUSZKO, R., CLEMENTS, D., KNOTHE, G. **Biodiesel Production Technology**. National Renewable Energy Laboratory. Golgen, Colorado. 2004. 105 p.

VAZ, F. S. **Bactérias degradadoras de biodiesel, diesel e misturas em tanques de armazenamento**. 2010. 46 p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

VELLAIYAN, S.; AMIRTHAGADESWARAN, K. S. Zinc oxide incorporated water-in-diesel emulsion fuel: Formulation, particle size measurement, and emission characteristics assessment. **Petroleum Science and Technology**, v. 34(2), p. 114-122, 2016.

WAZILEWSKI, Willian Tenfen. **Estudo da estabilidade do biodiesel de crambe e soja**. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Parana, Paraná, 2012.

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.

WIENCEK, M.; CHAPMAN, J. S. Water treatment biocides: how do they work and why should you care? In: **CORROSION 99**. NACE International, 1999.

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.

ZIMMER, A. R. **Monitoramento e controle da contaminação microbiana durante o armazenamento simulado de misturas diesel/biodiesel com uso de biocida**. 2014, 241 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

ZIMMER, A.; CAZAROLLI, J.; TEIXEIRA, R. M.; VISCARDI, S. L. C.; CAVALCANTI, E. S. H.; GERBASE, A. E.; FERRÃO, M. F.; PIATNICKI, C. M. S.; BENTO, F. M. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). **Fuel**. v. 112. p. 153–162, 2013.