

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE
ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
“STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO**

**INFLUÊNCIA DO TEOR DE BIODIESEL NO PROCESSO DE
DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO ÓLEO DIESEL E UTILIZAÇÃO
DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA COMO CONTROLE
MICROBIOLÓGICO**

ANDRESSA CAROLINE NEVES

TOLEDO – PR - BRASIL

FEVEREIRO DE 2023

ANDRESSA CAROLINE NEVES

**INFLUÊNCIA DO TEOR DE BIODIESEL NO PROCESSO DE
DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO ÓLEO DIESEL E UTILIZAÇÃO
DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA COMO CONTROLE
MICROBIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Helton José Alves

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado.

TOLEDO – PR - BRASIL

FEVEREIRO DE 2023

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

Neves, Andressa Caroline
Influência do teor de biodiesel no processo de degradação microbiana do óleo diesel e utilização de radiação ultravioleta como controle microbiológico / Andressa Caroline Neves; orientador Edson Antonio da Silva; coorientador Helton José Alves. -- Toledo, 2023.
88 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2023.

1. contaminação microbiológica. 2. biodegradabilidade. 3. estabilidade oxidativa. I. da Silva, Edson Antonio, orient. II. Alves, Helton José, coorient. III. Título.

"Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

À DEUS por toda força, fé e por sempre me guiar.

À minha mãe por todo amor e por sempre estar ao meu lado, me apoiando incondicionalmente e me incentivando.

Ao meu marido Alex e minha filha por toda ajuda, amor, compreensão e paciência.

À UNIOESTE e UFPR por fornecer os recursos para realização desta pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Antônio da Silva por toda compreensão e ajuda nos diversos momentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Helton José Alves por toda ajuda, compreensão, auxílio, orientação e apoio nos diversos momentos de dificuldade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado pelas diversas ajudas.

Ao técnico do Laboratório LABMATER Lázaro Gasparini por todo auxílio e aos companheiros e amigos do laboratório.

Ao meu querido amigo Marcos, por toda força, ajuda, paciência, apoio e disponibilidade em me ajudar nos diversos momentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	18
3.1. Biocombustível: Biodiesel.....	18
3.2. Misturas: óleo diesel e biodiesel.....	21
3.3. Propriedades físico-químicas do combustível	24
3.4. Degradação do óleo diesel e biodiesel.....	29
3.5. Degradação microbiológica	31
3.5.1. Influência do teor de água.....	37
3.6. Formas de controle microbiológico.....	39
3.6.1. Radiação ultravioleta.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Coleta e preparo das amostras de combustíveis.....	43
4.2. Reator de radiação ultravioleta.....	45
4.3. Ensaio de radiação ultravioleta.....	45
4.4. Teste de estocagem do combustível após radiação ultravioleta	46
4.5. Determinação da presença de bactérias	46
4.5.1. Preparo da suspensão bacteriana	46
4.5.2. Método espectrofotométrico.....	47
4.6. Caracterização físico-química	47
4.6.1. Temperatura das amostras	47
4.6.2. Massa específica à 20° C.....	47
4.6.3. Viscosidade cinemática à 20° C.....	48

4.6.4. Teor de água: Karl Fischer.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1. Ensaio de radiação ultravioleta.....	50
5.1.1. Determinação da presença de bactérias.....	50
5.1.2. Influência do teor de água na presença de microrganismos.....	58
5.1.3. Identificação molecular das amostras.....	61
5.2. Teste de estocagem do combustível após radiação ultravioleta.....	63
5.3. Caracterização físico-química.....	64
5.3.1. Temperatura das amostras.....	64
5.3.2. Massa específica à 20°C.....	65
5.3.3. Viscosidade cinemática à 20°C.....	67
5.3.4. Teor de água: Karl Fischer.....	68
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da cadeia de produção do biodiesel.....	19
Figura 2. Esquema do processo de transesterificação	19
Figura 3. Esquema do processo de esterificação	20
Figura 4. Esquema do processo de hidrólise.....	20
Figura 5. Demonstração de diferentes formas em que a água aparece em tanques de estocagem de combustível.....	38
Figura 6. Fluxograma dos experimentos e análises	44
Figura 7. Esquema geral do reator de radiação ultravioleta.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Evolução dos teores de enxofre no combustível Diesel comercializado no Brasil	22
Tabela 2. Especificações para caracterização do óleo diesel e métodos e limites utilizados de acordo com a ANP.	25
Tabela 3. Especificações para caracterização do biodiesel e métodos e limites utilizados de acordo com a ANP	27
Tabela 4. Propriedades físico-químicas relacionada com a degradação.....	30
Tabela 5. Microrganismos isolados de biodiesel, óleo diesel e misturas	34
Tabela 6. Composição e identificação das amostras para cada ensaio.	44
Tabela 7. Absorbância das blendas antes e após a radiação ultravioleta e % de diminuição da concentração de microrganismos.....	57
Tabela 8. Identificação molecular das amostras de Óleo diesel S10 e Biodiesel puro	61
Tabela 9. Valores de temperatura das amostras de combustíveis nos ensaios com radiação ultravioleta.	65
Tabela 10. Massa específica à 20°C das amostras de combustíveis nos ensaios antes e após o contato com radiação ultravioleta	66
Tabela 11. Viscosidade cinemática à 20°C das amostras de combustíveis nos ensaios antes e após o contato com radiação ultravioleta	67
Tabela 12. Teor de água: método de Karl Fischer das amostras de combustíveis nos ensaios antes e após o contato com radiação ultravioleta.	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Leitura de absorvância das amostras na montagem das blendas (B11, B25, B50 e B75) e após 10 dias estocadas.	50
Gráfico 2. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B11 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).	53
Gráfico 3. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B25 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).	54
Gráfico 4. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B50 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).	55
Gráfico 5. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B75 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).	56
Gráfico 6. Leitura de absorvância (600nm) das blendas óleo diesel/biodiesel (B11, B25, B50 e B75) sem adição de água.	58
Gráfico 7. Leitura de absorvância (600nm) das blendas óleo diesel/biodiesel (B11, B25, B50 e B75) com adição de 1000ppm de água.	59
Gráfico 8. Leitura de absorvância (600nm) das blendas óleo diesel/biodiesel (B11, B25, B50 e B75) com adição de 2500ppm de água.	60
Gráfico 9. Leitura de absorvância das amostras após 10, 20 e 30 dias estocadas.	63

INFLUÊNCIA DO TEOR DE BIODIESEL NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO ÓLEO DIESEL E UTILIZAÇÃO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA COMO CONTROLE MICROBIOLÓGICO

Autor: Andressa Caroline Neves

Orientador: Dr. Edson Antonio da Silva

Co-orientador: Dr. Helton José Alves

Co-orientador: Dr. Fábio Rogério Rosado

Qualificação de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645, CEP: 85903-000 – Toledo – Paraná – Brasil, defendida em 03 de fevereiro de 2023, 88p.

RESUMO

Atualmente no Brasil a adição do biodiesel ao óleo diesel é de 10%, já estando estabelecidos o aumento para 15%. A mistura é possível devido a sua miscibilidade com óleo diesel, ao qual promove benefícios ambientais, contudo a mistura se torna suscetível a degradações, onde o biodiesel contribui na absorção de água, facilitando a contaminação e proliferação de microrganismos. Diante disto, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência do teor de biodiesel na contaminação microbiológica de diferentes blends de combustível diesel B além do comercial, e verificar o efeito da radiação ultravioleta como método de controle para inativação de microrganismos presentes. Coletou-se amostras de óleo diesel comercial (B11) e biodiesel puro (B100), e preparadas blends com 25, 50, e 75% de teores de biodiesel e avaliada a influência do teor de água em 1000 e 2500 ppm, valores acima do permitido pela legislação. Após o preparo das blends, as amostras são estocadas por 10 dias, caracterizadas e posteriormente a este período, levadas ao reator de radiação ultravioleta, composto por uma lâmpada UVC germicida (55 W, 253 nm). Os ensaios tiveram duração de 360 minutos com coletas a cada 60 minutos para realizar as análises microbiológicas e análises físico-químicas, antes do processo e após os 360 minutos. A caracterização microbiológica consistiu nos métodos de quantificação espectrofotométrica, coloração de Gram e identificação molecular dos microrganismos. Na caracterização físico-química do combustível realizou-se as seguintes análises: temperatura, massa específica à 20° C, viscosidade cinemática à 20° C e teor de água. Após os ensaios com radiação ultravioleta, as amostras são estocadas durante 10, 20 e 30 dias, e nestes tempos, coletadas alíquotas para realizar a quantificação dos microrganismos, com objetivo de verificar a eficiência e o tempo de atuação da radiação ultravioleta. Os resultados apontaram que o período de estocagem inicial de 10 dias favoreceu a proliferação de microrganismos em algumas amostras com adição de água. Para os ensaios de radiação ultravioleta, todas as amostras tiveram redução da concentração de microrganismos acima de 50%, e as amostras B11-C, B25-1000 e B50-C o percentual de redução foi superior a 80%. Foi possível identificar diferentes microrganismos presentes nas amostras de óleo diesel e biodiesel, como: *Solobacillus spp.*, *Exiguobacterium scetylicum* e *Pantoea spp.* Para as propriedades físico-químicas avaliadas, a adição de biodiesel e água promoveu alteração, mas após o período de exposição à radiação ultravioleta os valores retornaram aos estipulados pela normatização. Para estocagem experimental do combustível após a exposição à radiação ultravioleta concluiu-se

que a ação da radiação se mantém ativa em até 10 dias, e após este período é necessário a realizar novamente do tratamento. Com todos os dados correlacionados, conclui-se que a utilização da radiação ultravioleta foi eficiente para eliminar e/ou diminuir a carga de microrganismos presentes em óleo diesel e biodiesel.

PALAVRAS-CHAVE: contaminação microbiológica; biodegradabilidade; estabilidade oxidativa.

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

INFLUENCE OF BIODIESEL CONTENT ON THE PROCESS OF MICROBIAL DEGRADATION OF DIESEL OIL AND USE OF ULTRAVIOLET RADIATION AS MICROBIOLOGICAL CONTROL

Author: Andressa Caroline Neves

Supervisor: Dr. Edson Antonio da Silva

Corienter: Dr. Helton José Alves

Corienter: Dr. Fábio Rogério Rosado

Doctorate Qualification; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on February, 03th 2023. 88p.

ABSTRACT

Currently in Brazil the addition of biodiesel to diesel oil is 10%, with an increase to 15% already established. The mixture is possible due to its miscibility with diesel oil, which promotes environmental benefits, but the mixture becomes susceptible to degradation, where biodiesel contributes to water absorption, facilitating the contamination and proliferation of microorganisms. In view of this, this work aims to evaluate the influence of biodiesel content on the microbiological contamination of different blends of commercial diesel fuel B, and to verify the effect of ultraviolet radiation as a control method for the inactivation of microorganisms present. Samples of commercial diesel oil (B11) and pure biodiesel (B100) were collected, and blends with 25, 50, and 75% biodiesel contents were prepared and the influence of water content was evaluated at 1000 and 2500 ppm, values above the allowed by the legislation. After the blends preparation, the samples are stored for 10 days, characterized and after this period, taken to the ultraviolet radiation reactor, composed of a germicidal UVC lamp (55 W, 253 nm). The tests lasted 360 minutes, with collections every 60 minutes to perform the microbiological analysis and physicochemical analysis, before the process and after the 360 minutes. The microbiological characterization consisted of spectrophotometric quantification methods, Gram staining and molecular identification of the microorganisms. In the physical-chemical characterization of the fuel, the following analyses were performed: temperature, specific mass at 20° C, kinematic viscosity at 20° C, and water content. After the tests with ultraviolet radiation, the samples are stored for 10, 20 and 30 days, and at these times, aliquots are collected to perform the quantification of microorganisms, in order to verify the efficiency and time of action of ultraviolet radiation. The results showed that the initial storage period of 10 days favored the proliferation of microorganisms in some samples with added water. For the ultraviolet radiation tests, all samples had a reduction in the concentration of microorganisms above 50%, and the samples B11-C, B25-1000 and B50-C had a reduction percentage above 80%. It was possible to identify different microorganisms present in the diesel and biodiesel samples, such as: *Solobacillus* spp., *Exiguobacterium scetylicum* and *Pantoea* spp. For the physical-chemical properties evaluated, the addition of biodiesel and water promoted changes, but after the exposure period to ultraviolet radiation the values returned to those stipulated by the standardization. For the physical-chemical properties evaluated, the addition of biodiesel and water caused changes, but after the period of exposure to ultraviolet radiation the values returned to those stipulated by the standardization.

For experimental storage of the fuel after exposure to ultraviolet radiation it was concluded that the action of radiation remains active for up to 10 days, and after this period it is necessary to perform the treatment again. With all the correlated data, it is concluded that the use of ultraviolet radiation was efficient to eliminate and/or reduce the load of microorganisms present in diesel oil and biodiesel.

KEYWORDS: microbiological contamination; biodegradability; oxidative stability

"This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Funding Code 001

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios da humanidade é sobre as questões ambientais, diante disso, os biocombustíveis têm se mostrado como uma alternativa, remetendo a uma matriz energética de recursos renováveis, limpos e sustentáveis, sendo que atualmente no país, os mais utilizados são etanol e biodiesel.

O biodiesel é um biocombustível que utiliza na sua síntese óleos de origem animal ou vegetal, podendo ser utilizado em motores de combustão ou para geração de energia, tanto na substituição parcial e/ou completa de combustíveis de origem fóssil (Chen *et al.* 2014; Santos, 2014; Neves, 2018). A diferença principal do biodiesel e o óleo diesel está relacionada com a estrutura química. O óleo diesel é composto por átomos de hidrogênio e carbono, enquanto o biodiesel apresenta adicionalmente átomos de oxigênio.

Desde 2008 ocorre a mistura obrigatória do biodiesel ao óleo diesel, atualmente o percentual de biodiesel teve uma regressão devido a fatores econômicos e a pandemia do Covid-19, passando de 13% no ano de 2020/2021 para 10%, redução estabelecida para proteger os interesses do consumidor, quanto ao preço, qualidade e oferta do produto.

São utilizadas diferentes matérias-primas para produção de biodiesel, tais como: óleo vegetais, gorduras animais, óleos alimentares usados e algas, sendo que os mais utilizados no Brasil são óleo de soja e gordura animal, produzindo respectivamente 4.907.872,509 e 714.242,288 m³ de biodiesel (ANP, 2021).

Mesmo apresentando diversas vantagens ao adicionar biodiesel ao óleo diesel, deve haver um rigoroso controle de qualidade, como por exemplo a alta suscetibilidade a oxidações que o biodiesel fornece, apresentando uma maior instabilidade ao combustível, ocasionando alterações das propriedades físico-químicas e degradações. Todo combustível é passível de degradações, sendo elas provenientes dos processos de oxidação, térmico, pela hidrólise e contaminações microbiológicas (Braun *et al.* 2015; Neves *et al.* 2020).

A degradação microbiológica pode ocorrer em qualquer parte da cadeia de produção, seja na produção, transporte até o uso do combustível. Acontece principalmente devido a presença de água em tanques de armazenamento. Visto que, o biodiesel apresenta uma alta capacidade de higroscopicidade, e com

acúmulo de umidade no interior dos tanques de armazenamento, sua capacidade de absorção de água é alta (Fattah *et al.* 2014; Beker *et al.* 2016; Neves *et al.* 2020).

Um dos principais fatores que favorecem a contaminação microbiológica é a presença de água, tornando o ambiente propício a contaminação e proliferação de microrganismos durante processo de armazenamento e estocagem, por um processo de biodeterioração (Passman, 2013; Bento *et al.* 2016; Cazarolli, 2019; Neves *et al.* 2020; Polinarski *et al.* 2022).

Os métodos de controle microbiológico podem ser divididos em métodos físicos e químicos, como drenagem, limpeza, centrifugação e filtração de combustíveis e a utilização de aditivos químicos. Contudo, ambos os métodos apresentam desvantagens, como dificuldade de realização dos processos físicos e a geração de resíduos para os processos químicos (Zimmer, 2014; Beker *et al.* 2016).

Com isso, se vê a necessidade de métodos que auxiliam no controle microbiológico. A radiação ultravioleta é uma alternativa aos métodos atuais de controle de contaminações microbiológicas, sendo que sua utilização já é efetiva em águas e efluentes líquidos. Por apresentar uma ação germicida e bactericida, atua diretamente na inativação de microrganismos.

Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes teores de biodiesel, acrescidos ao óleo diesel comercial, na contaminação microbiológica do combustível, e verificar o efeito da radiação ultravioleta como forma de controle para eliminação e/ou diminuição de microrganismos presentes no combustível.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência do teor de biodiesel na contaminação microbiológica do combustível diesel B, e verificar o efeito da radiação ultravioleta na inativação e/ou eliminação de microrganismos presentes no combustível.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar diferentes blendas de óleo diesel e biodiesel em relação a contaminação microbiológica e determinar uma curva de crescimento e mortalidade dos microrganismos presentes;
- Avaliar o comportamento de teores de água acima da especificação presente em blendas em relação a contaminação e desenvolvimento de microrganismos;
- Determinar o tempo necessário de exposição da radiação ultravioleta no combustível, com objetivo de eliminar e/ou inativar os microrganismos presentes;
- Avaliar o tempo de estocagem das blendas óleo diesel e biodiesel após a exposição da radiação ultravioleta, com objetivo de verificar a preservação das amostras e os microrganismos ainda presentes;
- Realizar identificação molecular dos microrganismos isolados do biodiesel puro (B100) e óleo diesel comercial (S10);
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos combustíveis antes e após a radiação ultravioleta.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. Biocombustível: Biodiesel

Constituem o biocombustível uma matriz energética de recursos renováveis, limpos e sustentáveis, se tornando uma oportunidade para diversos setores da produção agrícola e segmentos sociais, sendo que as questões ambientais são consideradas um dos principais problemas associados a utilização de combustíveis fósseis. Atualmente existem vários usos de energias renováveis, como: energia solar, energia eólica, energia hidrelétrica, energia geotérmica e oceânica, e biocombustíveis, com objetivo de garantir desenvolvimento aos países (Mahmudul *et al.* 2017).

Os biocombustíveis podem ser derivados de diferentes matérias primas (óleos e/ou gordura animal), as quais incluem: cana-de-açúcar, óleos vegetais, gorduras animais, resíduos florestais, etc. Sendo que atualmente no país, os mais utilizados são etanol e biodiesel (Cárdenas, 2011; Varão *et al.* 2017).

O biodiesel é considerado um biocombustível, derivado de biomassa renovável, podendo ser utilizado em motores de combustão ou para geração de energia, tanto na substituição parcial e/ou completa de combustíveis de origem fóssil (Chen *et al.* 2014; Santos, 2014; Neves, 2018).

De acordo com a Resolução nº 798 de 01/08/2019 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal.

Para o processo de obtenção do biodiesel, deve-se abranger toda a cadeia de produção, desde a localização das indústrias, plantio das oleaginosas, recebimentos de óleos e gorduras, processos de obtenção e exportação, tanto do biodiesel como dos subprodutos provenientes (Figura 1).

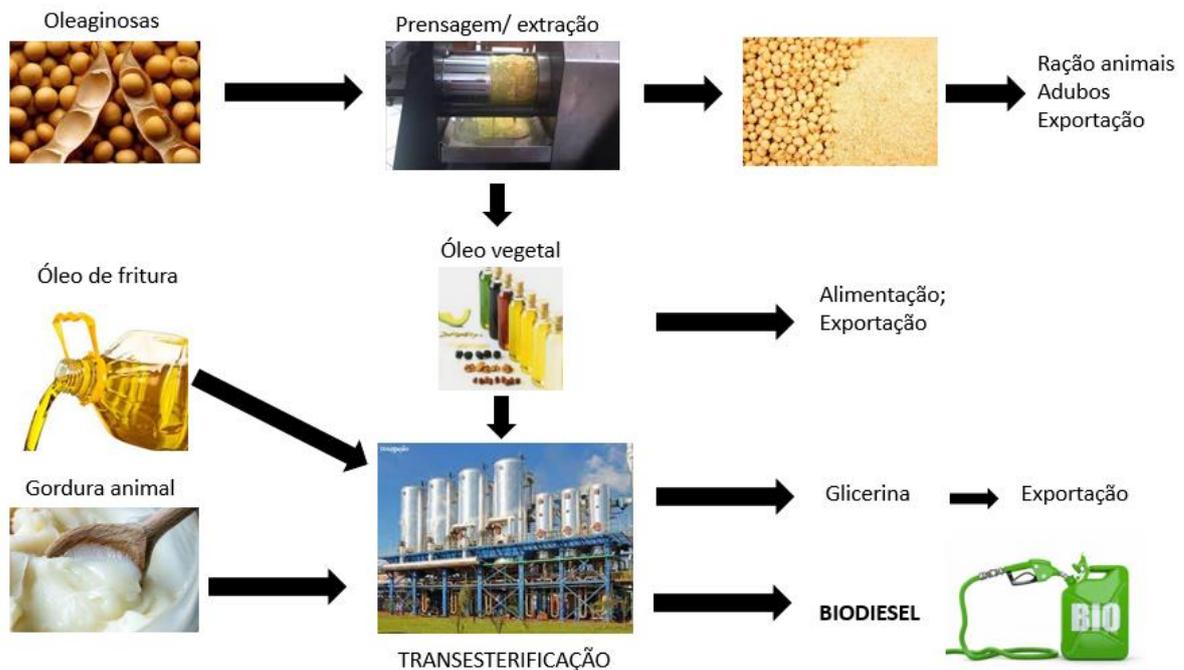


Figura 1. Representação da cadeia de produção do biodiesel

O biodiesel pode ser produzido por diferentes processos, como o processo de transesterificação, esterificação e hidroesterificação. Todos estes processos são caracterizados pela quebra um triacilglicerol ou ácido graxo, juntamente com um álcool de cadeia curta ou água (hidrólise), e um catalisador. As porções de ácidos graxos, assim como o álcool utilizado, contribuem para as propriedades dos ésteres de ácidos carboxílicos. Os mecanismos de transesterificação, esterificação e hidrólise são representados nas Figura 2, Figura 3, Figura 4 respectivamente (Knothe & Razon, 2017).

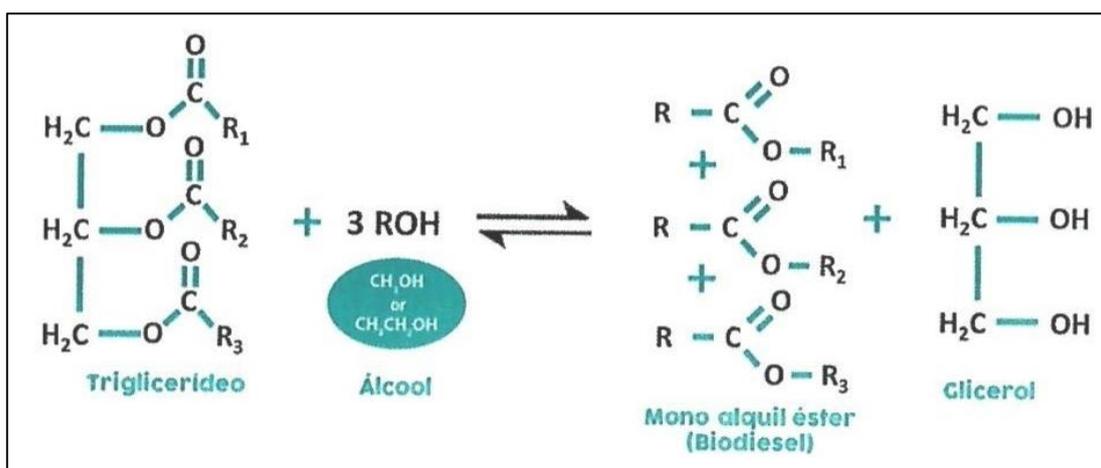


Figura 2. Esquema do processo de transesterificação
Fonte: Knothe & Razon, 2017

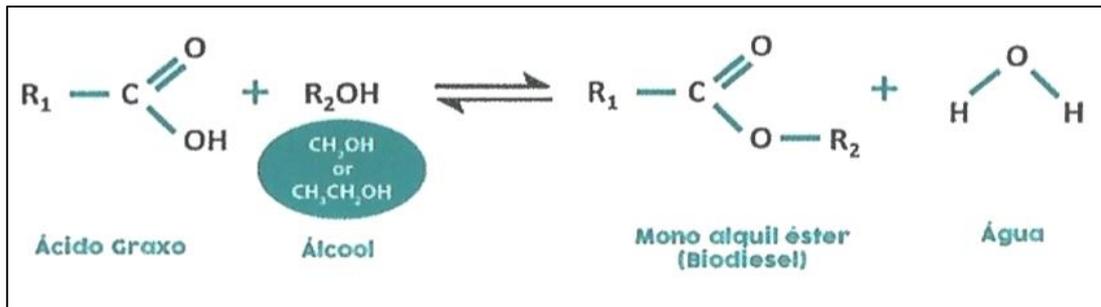


Figura 3. Esquema do processo de esterificação
Fonte: Knothe & Razon, 2017

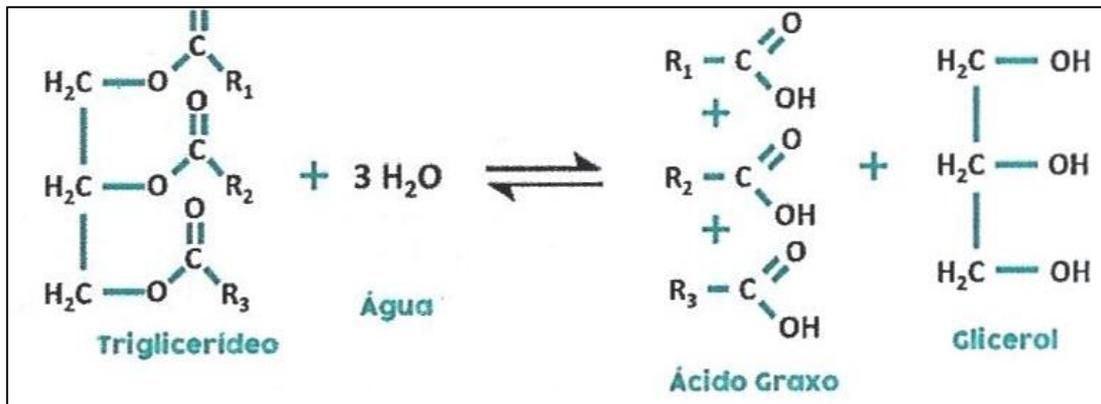


Figura 4. Esquema do processo de hidrólise
Fonte: Knothe & Razon, 2017

O processo mais utilizado é o de transesterificação, no qual um mol de triacilglicerol reage com três mols de álcool, sendo que na presença de um catalisador (homogêneo, heterogêneo ou enzimático) este processo modifica a estrutura molecular do óleo e/ou gordura, tornando quase idêntico ao óleo diesel, conseqüentemente com características físicas e químicas similares (Neves, 2018; Souza, 2019).

Atualmente o biodiesel é produzido a partir de uma diversidade de matérias-primas, tais como: óleos vegetais, gorduras animais, óleos alimentares usados e algas. No entanto, as mais utilizadas são a óleo de soja e gordura animal, cujas representatividades giram em torno de 70% e 13% respectivamente. O óleo de soja se apresenta como um dos líderes mundiais no mercado de óleos vegetais, principalmente, decorrente da importância no agronegócio brasileiro, sendo ele o maior detentor de potencial para o programa nacional de biodiesel (ANP, 2020).

A utilização de diversos tipos de óleos vegetais é devido ao perfil de ácido graxos compostos nesses óleos, sendo os mais comuns ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico. Devido à variedade na quantidade dos

ácidos graxos proveniente de diferentes matérias-primas utilizadas, o biodiesel produzido no final apresenta variação nas propriedades físico-químicas.

No Brasil, cada região apresenta um perfil específico de acordo com a disponibilidade das matérias-primas. A região Sul do país utiliza óleo de soja para produção de biodiesel, mas também apresenta uma porcentagem de gordura bovina, assim como a região Norte, diferenciando somente pela utilização de óleo de Palma. Na região Nordeste tanto óleo de soja como óleo de palma, na região Centro-Oeste óleo de soja e óleo de milho, e a região Sudeste a gordura bovina é a matéria-prima mais utilizada, seguido de óleo de soja e gordura de porco (ANP, 2020). Em relação ao ano de 2020, a produção de biodiesel teve um aumento de 8,5%, totalizando 6,4 bilhões de litros de biodiesel (ANP, 2022).

O biodiesel é descrito como um combustível biodegradável, produzido a partir de fontes renováveis, oxigenado, e possui as seguintes características: alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, melhor lubrificação, maior viscosidade, baixos teores de enxofre, redução da dependência externa em energia, redução de emissões de poluentes, (Aldhaidhawi *et al.* 2017; Patel e Sankhavara, 2017; Caliskan, 2017).

Contudo, por ser produzido por diferentes matérias-primas, apresenta composição química muito variada, competitividade entre produção de alimento e combustível (Neves, 2018; Malt e Souza, 2019). É considerado um combustível, que apesar das várias vantagens de sua utilização, apresenta maior predisposição a oxidação, elevada reatividade com ar e alta higroscopicidade, isto é, maior predisposição na absorção de água (Fu *et al.* 2016; Neves, 2018).

3.2. Misturas: óleo diesel e biodiesel

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível - ANP, determina que qualquer produto que, a partir de sua queima ou transformação química, provoque geração de energia (ex. gás natural, gasolina, óleo diesel, carvão mineral, etc.) seja considerado um combustível.

O óleo diesel é definido de acordo com a ANP como combustível líquido, de origem fóssil, composto por hidrocarbonetos, com cadeias carbonos, apresentando pequenas quantidades residuais de oxigênio, nitrogênio e enxofre. É um

combustível inflamável, límpido, viscoso, baixa volatilidade, odores fortes e marcantes e com médio nível de toxicidade.

Pode-se classificar o óleo diesel de acordo a porcentagem de teor de enxofre ou teor de biodiesel. Em relação ao teor de enxofre pode ser classificado em óleo diesel S10, onde apresenta teor máximo de enxofre de 10 mg kg⁻¹ e óleo diesel S500, com teor máximo de 500 mg kg⁻¹ de enxofre e óleo diesel S1800, com teor máximo de 1800 mg kg⁻¹ (Resolução nº 50 da ANP).

Contudo, atualmente no Brasil somente os óleos diesel S10 e S500 são comercializados, visto que desde 2009 houve a redução do teor de enxofre, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. 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 em 2014. Somente para geração de energia elétrica, ferroviária e mineração.
S500	500	Substituição gradativa pelo S50 desde 2009. Atualmente permanece como o diesel com maior conteúdo de enxofre no país, com a adição do corante vermelho para diferenciação.
S50	50	Mandatário em 2012 para antecipar a entrada do S10. Substituído pelo S10 em 2013 e não mais disponível.
S10	10	Mandatário em 2013. Atualmente permanece como o diesel com menor conteúdo de enxofre

Fonte: Adaptado de Azambuja, 2016.

Já em relação ao teor de biodiesel, pode ser classificado como óleo diesel A um combustível isento da presença de biodiesel, destinado a veículos de motores de ciclo diesel. E óleo diesel B, quando é composto pela mistura do óleo diesel A e biodiesel, sendo denominado como BX, ao qual se refere a porcentagem mássica

de biodiesel adicionada ao óleo diesel, e fornece ao óleo diesel a denominação de BX, em que: X é a porcentagem mássica de biodiesel adicionada ao óleo diesel. A porcentagem de biodiesel é estabelecida pela legislação vigente (Resolução nº 30 da ANP; Boelter, 2017; Neves, 2018).

A diferença principal do biodiesel e óleo diesel está em relação a estrutura química, visto que no biodiesel ocorre a presença de átomos de oxigênio, diferente do óleo diesel, ao qual é composto por carbono e hidrogênio. Esses átomos de oxigênio acarretam uma maior predisposição de absorver água, os ésteres metílicos do biodiesel se tornam mais polares e são capazes de realizar ligações do hidrogênio com a água, fazendo com que o biodiesel apresente maior higroscopicidade (Neves *et al.* 2021).

A mistura do biodiesel ao óleo diesel é possível devido a sua miscibilidade com óleo diesel. A Lei nº 13.263 de 23/03/2016 já estabelece valores até 15% pré-aprovados até 2023. Esta inclusão de biodiesel ao óleo diesel foi obrigatória no Brasil e iniciou-se em 2008, diretamente ligada as vantagens da utilização do biodiesel, ao qual promove benefícios ambientais (Meira *et al.* 2016; Neves, 2018).

Contudo, devido a fatores econômicos e a pandemia do Covid-19, o percentual de biodiesel adicionado ao óleo diesel teve uma redução, e de 13% no ano 2020/2021, passou a 10% no ano de 2022. Esta redução foi aprovada pelo Conselho Nacional de Políticas Energéticas – CNPE e teve como objetivo proteger os interesses do consumidor referente ao preço, qualidade e oferta do produto.

No entanto, a Associação dos Produtores de Biocombustíveis do Brasil (Aprobio) visa intensificar esforços junto ao CNPE para que o aumento do teor de biodiesel volte a ser aumentado, sendo que, a adição de 14% de biodiesel ao diesel pouparia a compra de 2,5 bilhões de litros de combustível estrangeiro.

A mistura do biodiesel ao óleo diesel é possível devido a sua miscibilidade com óleo diesel, ao qual promove benefícios ambientais. 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; Neves *et al.* 2021).

Os principais problemas associados à mistura de biodiesel ao óleo diesel englobam a formação de depósitos em tanques de transporte e armazenamento; obstruções de filtros de bomba de combustível; sistemas de injeções, corrosão em bombas, pistão, injetor, tubo compressor, câmara de combustão e catalítica (Carvalho *et al.* 2016; Pinho, 2016; Neves, 2018).

3.3. Propriedades físico-químicas do combustível

Todo combustível apresenta especificações necessárias para sua utilização, sendo a ANP um órgão responsável por estabelecer e atingir uma qualidade mínima, obedecendo as normas técnicas e resoluções, com objetivo de garantir a uniformidade do combustível (Ramos *et al.* 2016)

As alterações nas propriedades do combustível podem ser resultantes tanto do processo de produção do combustível, do fim da cadeia de produção, como em postos de abastecimento. Diante disso, para cada combustível são determinadas propriedades físico-químicas pré-estabelecidas por normas, tais como da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da “American Society for Testing and Materials” (ASTM), da “International Organization for Standardization” (ISSO) e do “Comité Européen de Normalisation” (CEN) (ANP, 2020; Ramos *et al.* 2016).

A utilização das misturas de óleo diesel com biodiesel deve respeitar a um conjunto de normas que definem as propriedades físicas e químicas deste combustível. As normas técnicas para o óleo diesel são estabelecidas pela ANP na Resolução nº 50 de 23 de dezembro de 2013 (Tabela 2) que estabelece todos os parâmetros físico-químicos exigidos, assim como para o biodiesel, regulamentado pela Resolução nº45 de 25 de agosto de 2014 (Tabela 3).

Tabela 2. Especificações para caracterização do óleo diesel e métodos e limites utilizados de acordo com a ANP.

CARACTERÍSTICA	LIMITE			MÉTODO
	S10	S500	S1800 Não rodoviário	
Aspecto (1)	LII (2)			Visual
Cor	(3)	Vermelho (4)	(5)	Visual
Cor ASTM, máx.	3,0			NBR 14483 ASTM D6045 ASTM D1500
Massa específica a 20° C (kg/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
Viscosidade Cinemática a 40°C (mm ² /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.)	(10)			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

Continuação da Tabela 2. Especificações para caracterização do óleo diesel e métodos e limites utilizados de acordo com a ANP

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)	20		EN15751
Contaminação total (mg/kg) (12)	24	Anotar	
Número de acidez (mg KOH/g)	0,3		NBR 14248 ASTM D664
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

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.

Tabela 3. Especificações para caracterização do biodiesel e métodos e limites utilizados de acordo com a ANP

CARACTERÍSTICA	LIMITE	MÉTODO		
		ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto (1) (2)	LII*	-	-	-
Massa específica a 20° C (kg/m³)	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C (mm²/s)	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água (mg/kg) (3)	Máx. 200,0	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total (mg/kg) (13)	Máx. 24	15995	-	EN12662 (5)
Ponto de fulgor (°C) (4)	Mín. 100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster (% massa)	Mín. 96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas (% massa) (6)	Máx. 0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total (mg/kg)	Máx. 10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio (mg/kg)	Máx. 5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 (5) EN 14109 (5) EN 14538 (5)
Cálcio + Magnésio (mg/kg)	Máx. 5	15553 15556	-	EN 14538 (5)
Fósforo(mg/kg) (7)	Máx. 10	15553	4951	EN 14107 (5) EN 16294 (5)
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C (6)	Máx. 1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (6)	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	Máx. (9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez (mg KOH/g)	Máx. 0,50	14448 -	664 -	EN 14104 (5)
Glicerol livre (% massa)	Máx. 0,02	15771 15908 (5) -	6584 (5) -	EN 14105 (5) EN 14106 (5)
Glicerol total (% massa)	Máx. 0,25	15344 15908 (5)	6584 (5) -	EN 14105 (5)
Monoacilglicerol (% massa)	Máx. 0,7	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)

Continuação da Tabela 3. Especificações para caracterização do biodiesel e métodos e limites utilizados de acordo com a ANP

Diacilglicerol (% massa)	Máx. 0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Triacilglicerol (% massa)	Máx. 0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Metanol e/ou Etanol (% massa)	Máx. 0,20	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de Iodo (g/100g)	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C (h) (11)	Mín. 6 (12)	-	-	EN 14112 (5) EN 15751 (5)

Nota: (1)* Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio. Em caso de disputa, o produto só poderá ser considerado como não especificado no Aspecto, caso os parâmetros teor de água e/ou contaminação total estejam não conformes. (2) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total. O produto será reprovado caso pelo menos um desses dois últimos parâmetros esteja fora de especificação. (3) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +50 mg/kg no limite do teor de água no biodiesel para o produtor e de +150 mg/kg para o distribuidor. (4) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol. (5) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica. (6) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da Tabela de Especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados à ANP pelo Produtor de biodiesel, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de material graxo, o Produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de materiais graxos utilizados. (7) Em caso de disputa, deve ser utilizado o método EN 14107 como referência. (8) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano. (9) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C. (10) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa. (11) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível. (12) A estabilidade à oxidação a 110 °C terá seu limite mínimo de 8 horas, a partir de 1º de novembro de 2014. (13) Deverá ser utilizada somente a versão da norma de 1998 ou 2008 (EN 12662:1998 ou EN 12662:2008).

Tanto a composição química, quanto as propriedades das matérias-primas utilizadas para produção do combustível podem apresentar influência nas características finais de combustível, como por exemplo: densidade, número de cetanos e teor de enxofre (Varão *et al.* 2017).

Independentemente do tipo de matéria-prima utilizada na produção do biodiesel, o produto final deve respeitar as especificações determinadas pela ANP, aos quais são fixadas com objetivo de que contaminantes não ocasionam prejuízos na eficiência de queima do combustível, transporte e armazenamento, desempenho e integridade de motores. Os parâmetros mais estudados atualmente, para evitar tais problemas são: índice de acidez, ponto de fulgor, aspecto, massa específica, viscosidade, teor de água e estabilidade oxidativa (Antunes *et al.* 2017; Kozlowski *et al.* 2019).

3.4. Degradação do óleo diesel e biodiesel

Estabilidade de um combustível é definida como a resistência que este apresenta em relação a processos de degradação. Essa resistência está diretamente ligada às alterações das propriedades físico-químicas, tornando o combustível inapropriado ao uso. A degradação pode ocorrer em qualquer tipo de combustível, afetando a qualidade no uso e ocasionando a formação de compostos (Braun *et al.* 2015; Neves, 2018).

Os combustíveis podem ser afetados por diferentes tipos de degradações, como: por oxidação, quando ocorre contato com oxigênio; térmica, por excesso de calor; pela hidrólise, referente à contaminação de água e umidade; e contaminações microbiológicas, presença de bactérias, fungos e/ou leveduras (Braun *et al.* 2015; Neves, 2018).

Os tipos de degradações, provenientes de ações hidrolítica e oxidativa, são ocasionadas principalmente nos períodos de estocagem por fatores como calor, umidade, ar atmosférico e metais, formando radicais livres e liberando aldeídos, ácidos carboxílicos e polímeros (Cazarolli, 2019).

A estabilidade pode ser dividida em três principais tipos: estabilidade oxidativa, estabilidade de armazenamento e estabilidade térmica. Os três tipos de estabilidades estão associados a matérias-primas utilizadas na cadeia de produção do biodiesel, processo de transporte e armazenamento do biodiesel (Saluja, Kumas e Sham, 2016).

Estabilidade oxidativa ocorre quando moléculas de oxigênio se interagem com cadeias de ácidos graxos presentes no biodiesel, ocasionando deterioração do combustível. O processo de oxidação se divide em três etapas: (i) iniciação: liberação de radicais livres; (ii) propagação: formação de hidroperóxidos instáveis, que elevam a acidez do combustível; e (iii) terminação: produção de oligômeros (polímeros), que se tornam insolúveis quando biodiesel é misturado ao óleo diesel, e forma uma borra escura (borra abiótica) (Pullen e Saeed, 2012; Neves, 2018).

A Tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas que sofrem incidência de degradação oxidativa e hidrólise.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas relacionada com a degradação

PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA	CRITÉRIO DE INDICAÇÃO
Estabilidade oxidativa	Reflete no tempo do processo de oxidação, valores baixos de estabilidade oxidativa indicam a menor resistência.
Índice de acidez	Elevados valores de acidez, alta formação de produtos ácidos por oxidação e/ou hidrólise.
Índice de peróxido	Altos valores indicam a taxa de formação de peróxidos. Indicação da formação de produtos de oxidação secundária
Densidade e Viscosidade	Processo de oxidação em sua fase final, onde o aumento da densidade reflete na elevação da viscosidade. Observação de oligômeros que contribuem na elevação dos valores dessas propriedades.
Teor de água dissolvida	Promove a geração de radicais livres ácidos, indica o alcance da degradação hidrolítica.

Fonte: Bento, *et al.* 2016.

Estabilidade de armazenamento é definida como a habilidade do combustível resistir a longos períodos de armazenamento em ambientes fechados, semifechados e atmosféricos. Neste tipo de estabilidade, fatores físicos e químicos influenciam diretamente, tais como: luz, umidade, oxigênio do ar, variação de temperatura. Para alguns autores, a estocagem do biodiesel no Brasil deve variar de 6 – 14 semanas, contudo no mercado internacional, essa variação pode ocorrer até 12 meses (Fu *et al.* 2016; Saluja, Kumas e Sham, 2016).

Para estabilidade térmica são avaliadas três condições: (1) temperatura na faixa de -5°C até 50°C, são para ambientes de períodos prolongados, como tanques de armazenamento; (2) temperaturas na faixa de 50°C a 70°C nos sistemas de alimentação e tanques veiculares e (3) altas temperaturas, > 90°C, que são em períodos de curto prazo, como proximidade de motor.

O biodiesel é mais suscetível a degradações por oxidação, devido da composição química, ocorrendo quebras de compostos indesejados (aldeídos, cetonas, ácidos, peróxidos, polímeros e ésteres de cadeia curta) que diminuem a qualidade do biodiesel, afetando o funcionamento de motores (Dantas *et al.* 2011; Focke, *et al.* 2016).

Diferente do óleo diesel, composto por hidrocarbonetos, o biodiesel se degrada com o decorrer do tempo, principalmente em ambientes aerados e climas

quentes e úmidos. O óleo diesel apresenta capacidade de absorver 50 ppm de água e o biodiesel 1500 ppm, esse excesso de água promove a hidrólise do combustível (Cazarolli *et al.* 2012; Neves, 2018).

O biodiesel produzido a partir de diversas matérias-primas é composto por ésteres de ácidos graxos, que apresentam ligações insaturadas, estas instaurações tornam o biodiesel mais suscetível à oxidação, apresentando uma maior reatividade com oxigênio. Contudo, esta instabilidade não depende somente da composição química, mas depende também das condições de manuseio, processamento e estocagem do produto (Yaakob *et al.* 2014; Supriyono *et al.* 2015).

Com isso, o biodiesel, deve apresentar estabilidade oxidativa, de armazenamento e térmica durante toda a cadeia de produção, até a queima em motores, quando já misturado em óleo diesel. A oxidação do biodiesel, forma compostos, que auxiliam na modificação do pH, acelerando os processos corrosão e depósitos em tanques de armazenagem, sendo assim, instabilidade do combustível durante armazenamento, transporte e abastecimento (Ramos *et al.* 2016; Cazarolli, 2019).

3.5. Degradação microbiológica

Este tipo de degradação é definido pela contaminação microbiológica do combustível por microrganismos, o biodiesel possui um elevado potencial de biodegradabilidade, tornando-o mais suscetível a degradações durante as etapas de produção e estocagem (Buker *et al.* 2011; Neves, 2018).

Este tipo de degradação tem atuação principalmente durante os períodos de estocagem, contribuindo com as alterações das propriedades físico-químicas do combustível. Durante o processo de degradação ocorre a formação de materiais particulados (borra), ao qual se sedimenta nos fundos de tanques de armazenagem (Bento *et al.* 2016; Neves, 2018).

A degradação ocorre quando os microrganismos utilizam como fonte de nutrientes os hidrocarbonetos presentes na composição dos combustíveis. Primeiramente, os hidrocarbonetos disponíveis são transformados em moléculas intermediárias comuns para as rotas catabólicas dos microrganismos. São gerados, por meio da reação de oxidação, álcoois, aldeídos, e ácidos graxos, que após são

utilizados nas rotas metabólica dos microrganismos (Bento *et al.* 2016; Varjani & Upasani, 2017; Lofthus *et al.* 2018).

Muitos microrganismos conseguem utilizar os hidrocarbonetos diretamente como fonte de carbono, contudo os microrganismos que não apresentam esta facilidade, utilizam ésteres graxos do biodiesel e metabolitos secundários de outros microrganismos. Já os aditivos (compostos fosforados e nitrogenados) presentes no óleo diesel, servem como fonte de nutrientes a muitos microrganismos (Hill e Hill, 2009; Jekeria *et al.* 2014; Neves, 2018).

Além dos hidrocarbonetos, os microrganismos necessitam também de nutrientes inorgânicos, que são provenientes de resíduos químicos ou da água presente do combustível (Hill e Hill, 2009; Jekeria *et al.* 2014; Pinho, 2016). São necessárias também algumas condições de crescimento que favoreçam a proliferação dos microrganismos tais como: presença de água, temperatura, pH e tempo de contato da borra com combustível. A borra formada durante a contaminação apresenta um potencial de contaminação por toda cadeia de transporte e armazenamento do combustível (Sørensen *et al.* 2011; Pinho, 2016; Neves, 2018).

A temperatura não é considerada um fator determinante para o combustível, contudo aos microrganismos este é um fator de sobrevivência e desenvolvimento. A variação de temperatura para crescimento bacteriológico é extremamente grande, e varia de 4 a 60°C, sendo que a faixa que abrange a maioria dos microrganismos é entre 20 – 30°C, contribuindo ao desenvolvimento microbiano (Chung *et al.* 2000; Rodriguez-Rodriguez *et al.* 2010. Neves *et al.* 2020).

Em relação ao pH, microrganismos tem uma alta variação para sobrevivência, podendo se proliferar em valores de 4 até 9, com isso, as bactérias preferem meios mais neutros e fungos que tem preferência a meio ácidos. A água presente nos tanques é um fator associado aos valores de pH, visto que a mesma apresenta os ambientes ideais para proliferação dos microrganismos (Chung *et al.* 2000; Bento *et al.* 2005; Zimmer *et al.* 2013; Bucker *et al.* 2014). Outro fator de importância é a presença de oxigênio, sendo este encontrado na parte superior dos tanques, ao qual se encontra vazio ou durante o abastecimento dos tanques, que promove a aeração do combustível adicionado. A ausência deste fator não interfere

na proliferação, visto que muitos microrganismos são aeróbios, e se desenvolvem sem a presença do oxigênio (Rajasekar *et al.* 2007; White *et al.* 2011; Onuorah *et al.* 2013; Salgado *et al.* 2013; Buker *et al.* 2014; Azambuja *et al.* 2017; Cazarolli 2019; Neves *et al.* 2020).

O biodiesel adicionado ao óleo diesel apresenta diferentes propriedades físico-químicas, provenientes da diversidade de matérias-primas utilizadas para sua produção, ao qual promove diferentes sedimentos químicos que são utilizados como fonte de nutrientes para os microrganismos. As características de higroscopicidade, biodegradabilidade e poder de solvência auxiliam na facilidade de proliferação dos microrganismos (Hill e Hill, 2009; Jakeria *et al.* 2014; Neves, 2018).

Muitos estudos, realizados no âmbito nacional e internacional, relatam que a adição do biodiesel ao óleo diesel ocasiona uma maior produção de incremento de biomassa e sedimentos biológicos, principalmente quando em contato com água nos tanques de armazenamento e transporte (Bento *et al.* 2006; Dodos *et al.* 2011; Restrepo-Florez *et al.* 2013; Zimmer *et al.* 2013; Bucker *et al.* 2014; Lisieck *et al.* 2014)

Muitos microrganismos são encontrados tanto em biodiesel puro, quanto no óleo diesel fóssil e blends, tais como: bactérias anaeróbias e aeróbias, fungos e leveduras (Bento e Gaylarde, 2001; Buker *et al.* 2011; Pullen e Saeed, 2012; Neves, 2018). Na tabela 5 são apresentados alguns relatos da literatura que detectaram microrganismos neste combustível (diesel e misturas).

Tabela 5. Microrganismos isolados de biodiesel, óleo diesel e misturas

Arquéias	Combustível	Referência
<i>Euryarchaeotota</i>	Diesel e misturas	Buker <i>et al.</i> 2014; Azambuja <i>et al.</i> 2016
<i>Crenarchaeota</i>	Diesel e misturas	Buker <i>et al.</i> 2014; Azambuja <i>et al.</i> 2016
<i>Thaumarchaeota</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	Bento <i>et al.</i> (2005); Onuorah <i>et al.</i> (2013); Azambuja <i>et al.</i> (2017); Neves <i>et al.</i> (2020)
<i>Actinobacteria</i>	Diesel	White <i>et al.</i> (2011); Salgado <i>et al.</i> (2013)
<i>Aeromonas</i>	Misturas	Buker <i>et al.</i> (2014)
<i>Aerosphaera</i>	Biodiesel e Misturas	Sørensen <i>et al.</i> (2011)
<i>Alcaligenes</i>	Biodiesel, diesel e mistura	White <i>et al.</i> (2011); Lisiecki <i>et al.</i> (2014)
<i>Arthrobacter sp.</i>	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Bacillus sp.</i>	Diesel e misturas	Bento & Gaylarde (2001); White <i>et al.</i> (2011); Onuorah <i>et al.</i> (2013); Salgado <i>et al.</i> (2013); Buker <i>et al.</i> (2014); Azambuja <i>et al.</i> (2017); Cazarolli <i>et al.</i> (2018); Neves <i>et al.</i> (2020)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Biodiesel e misturas	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>B. cereus</i>	Diesel	Bento & Gaylarde (2001); Bento <i>et al.</i> (2005); White <i>et al.</i> (2011);
<i>B. subtilis</i>	Diesel	Bento & Gaylarde (2001)
<i>B. thuringiensis</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016); Neves <i>et al.</i> (2018)
<i>Brevundimonas</i>	Biodiesel, diesel e mistura	White <i>et al.</i> (2011); Sørensen <i>et al.</i> (2011); Salgado <i>et al.</i> (2013)
<i>Burkholderia</i>	Diesel e misturas	White <i>et al.</i> (2011); Buker <i>et al.</i> (2014); Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)
<i>Cellulomonas sp.</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016); Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Citrobacter farmeri</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)
<i>C. amalonaticus</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)
<i>Comamonas</i>	Misturas	Buker <i>et al.</i> (2014)

Continuação da Tabela 5. Microrganismos isolados de biodiesel, óleo diesel e misturas

<i>Clostridium sp.</i>	Biodiesel e Misturas	White <i>et al.</i> (2011); Sørensen <i>et al.</i> (2011); Buker <i>et al.</i> (2014); Neves <i>et al.</i> (2020)
<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 sp.</i>	Misturas	White <i>et al.</i> (2011); Neves <i>et al.</i> (2020)
<i>Enterococcus sp.</i>	Misturas	Neves <i>et al.</i> (2020)
<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>Hypocreales sp.</i>	Misturas	Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Klebsiella</i>	Misturas	Chao <i>et al.</i> (2010); White <i>et al.</i> (2011); Buker <i>et al.</i> (2014)
<i>Lactobacillus pentosus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. paraplantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. zeae</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Biodiesel e misturas	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Microbacterium sp.</i>	Biodiesel	Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Micrococcus sp.</i>	Diesel e biodiesel	White <i>et al.</i> (2011); Onuorah <i>et al.</i> (2013); Salgado <i>et al.</i> (2013); Soriano <i>et al.</i> (2015); Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Mycosphaerella</i>	Diesel e misturas	Azambuja <i>et al.</i> (2017)
<i>Ochrobactrum</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Salgado <i>et al.</i> (2013); Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Paludibacterium yongneupense</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	Misturas	Neves <i>et al.</i> (2020)
<i>Pseudomonas</i>	Diesel e misturas	Bento & Gaylarde (2001); White <i>et al.</i> (2011); Onuorah <i>et al.</i> (2013); Salgado <i>et al.</i> (2013); Buker <i>et al.</i> (2014); Lisiecki <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhizobium</i>	Diesel e misturas	White <i>et al.</i> (2011); Salgado <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodococcus</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Salgado <i>et al.</i> (2013); Buker <i>et al.</i> (2014)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Diesel	Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, (2016)

Continuação da Tabela 5. Microrganismos isolados de biodiesel, óleo diesel e misturas

<i>Sphingobacterium</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Lisiecki <i>et al.</i> (2014)
<i>Staphylococcus</i>	Diesel	Chao <i>et al.</i> (2010); White <i>et al.</i> (2011); Neves <i>et al.</i> (2020)
<i>Tepidimonas sp.</i>	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> (2015)
Fungos	Combustível	Referência
<i>Alternaria</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Bento & Gaylarde (2001)
<i>Alternaria alternata</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Bento & Gaylarde (2001)
<i>Aspergillus sp.</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Rodriguez-Rodrigues <i>et al.</i> (2010)
<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 sp.</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Candida dubliniensis</i>	Biodiesel, diesel e mistura	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Candida viswanathii</i>	Biodiesel e misturas	Mariano <i>et al.</i> (2008-A); Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Cladosporium sp.</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Rodriguez-Rodrigues <i>et al.</i> (2010); Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Engyodontium album</i>	Biodiesel	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Fusarium sp.</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Onuorah <i>et al.</i> (2013)
<i>Mucor</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Onuorah <i>et al.</i> (2013)
<i>Paecilomyces</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Rodriguez-Rodrigues <i>et al.</i> (2010); Buker <i>et al.</i> (2011)
<i>Paecilomyces saturatus</i>	Misturas	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Penicillium sp.</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); Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Penicillium corylophilum</i>	Biodiesel	Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Biodiesel	Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Penicillium citrinum</i>	Misturas	Cazarolli <i>et al.</i> (2018)
<i>Pichia anomala</i>	Biodiesel e misturas	Soriano <i>et al.</i> (2015)
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	Misturas	Soriano <i>et al.</i> (2015)

Continuação da Tabela 5. Microrganismos isolados de biodiesel, óleo diesel e misturas

<i>Pseudallescheria boydii</i>	Diesel e misturas	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Cazarolli <i>et al.</i> (2012); Boelter <i>et al.</i> (2018)
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	Biodiesel	Cazarolli <i>et al.</i> (2014)
<i>Sccharomyces sp.</i>	Diesel	Gaylarde <i>et al.</i> (1999)
<i>Rhizopus sp.</i>	Diesel	Onuorah <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodotorula sp.</i>	Diesel, biodiesel e mistura	Gaylarde <i>et al.</i> (1999); Buker <i>et al.</i> (2011)

Fonte: Adaptados de (Allsopp *et al.* 2016; Bento *et al.* 2016; Neves, 2018)

Vários são os estudos sobre a comunidade microbiológica em biodiesel, óleo diesel e misturas, durante armazenamento, transporte e estocagem. Contudo, o enfoque destes estudos é na composição microbiológica, detecção de metabólicos, biossurfactantes e produção de enzimas, e não em alternativas para controle destes microrganismos (Gaylarde *et al.* 1999; Dodos *et al.* 2012; Passman *et al.* 2013; Allsopp *et al.* 2016; Bücken *et al.* 2018).

A contaminação microbiológica ocasiona diversos problemas durante a cadeia de produção, transporte e uso do combustível, tais como: bloqueio de tubulações, válvulas, filtros e mangueiras; corrosão dos tanques; degradação do combustível; aumento do conteúdo de água; formação de sedimentos e sólidos suspensos; produção de surfactantes; incrustações em injetores; redução da vida útil de peças do motor (Zimmer, 2014; Neves, 2018).

3.5.1. Influência do teor de água

Uma das principais causas do processo de degradação microbiológica no combustível é a presença de água, sendo que o biodiesel por ser mais higroscópico, torna as misturas óleo diesel/biodiesel mais instável. O biodiesel apresenta afinidade com a água de diferentes maneiras, tais como: emulsionada, dissolvida/decantada e água livre dentro dos tanques de transporte e armazenamento. A forma emulsionada, aparece na interface óleo/água, na fase dissolvida pode ser encontrada em gotículas presentes no biodiesel ou decantada no fundo dos tanques de armazenamento e transporte, representada pela fase de água livre. Na Figura 5 são ilustrados os locais onde estão presentes as diferentes formas da água (Bento *et al.* 2016; Mahmudul *et al.* 2017).

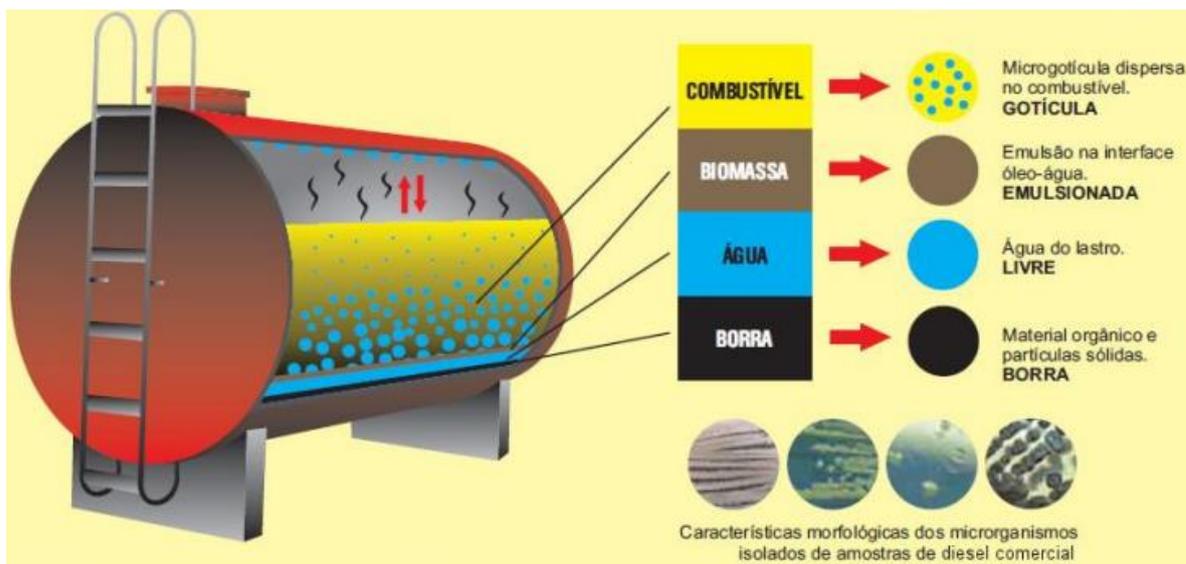


Figura 5. Demonstração de diferentes formas em que a água aparece em tanques de estocagem de combustível.

Fonte: Bento *et al.* 2016

O teor de água é avaliado durante a produção e estocagem do biodiesel, e a Resolução nº 45 da ANP determina limites de 200 mg kg⁻¹ de água para óleo diesel S10 e 500 mg kg⁻¹ para óleo diesel S500, com objetivo de evitar problemas relacionados, sendo os métodos ASMT D6304 e EN ISO 12937 formas de avaliação e medição da água em combustíveis.

A presença de água é um dos principais fatores que auxilia na proliferação microbológica, tornando o ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos durante processo de armazenamento e estocagem, sendo denominado como processo de biodeterioração (Passman, 2013; Bento *et al.* 2016; Cazarolli, 2019; Neves, 2018; Polinarski, 2020). Diante disso, muitos autores relatam que a adição do biodiesel ao óleo diesel, apesar das vantagens ambientais, apresenta desvantagem quando comparado aos problemas associados ao seu armazenamento (Passman & Dobranick, 2005; Pasqualino *et al.* 2006; Owsianiak *et al.* 2009; Bücken *et al.* 2011; Soriano *et al.* 2015)

Alguns autores relatam que o óleo diesel sem adição de biodiesel, pode conter até 50 ppm de água dissolvido, em contrapartida o biodiesel pode atingir valores de até 1500 ppm de água (Bhuiya *et al.* 2016). Tal informação já foi demonstrada em outros trabalhos, como Van Gerpen *et al.* (1996) que mostrou que o biodiesel obtido a partir do óleo de soja apresentam capacidade muito superior em absorver água, tornando um combustível óleo diesel/biodiesel mais suscetível

a contaminação por água. Atualmente, a porcentagem de biodiesel ao óleo diesel é de 10%, muitos estudos associam essa maior concentração do teor de biodiesel ao caráter higroscópico do combustível, auxiliando na oxidação e degradação por microrganismos. (Gerpen *et al.* 1996; Bento *et al.* 2004; Bucker *et al.* 2011; Delfino *et al.* 2018).

Diante do que foi exposto, a presença de água é associada diretamente no crescimento e proliferação de microrganismos presentes em combustível, visto que é relatado que teores de 1% é suficiente para auxiliar no desenvolvimento microbiológico (Gaylard, Bento e Kelley, 1999; Cazarolli *et al.* 2012) e conseqüentemente diminuindo a qualidade final do combustível, visto que tal degradação proporciona diversos tipos de corrosão e formação de material particulado, que interfere na qualidade do combustível (Fregolente; Maciel; Oliveira, 2015).

3.6. Formas de controle microbiológico

Atualmente existem algumas formas de controle microbiológico, que apresentam vantagens e desvantagens, que podem ser divididas em dois grupos: métodos físicos e métodos químicos.

Os métodos físicos são determinados por métodos de drenagens, limpezas, filtração e centrifugação dos combustíveis e tanques de armazenamento. Trata-se de um método que apresenta uma maior simplicidade e baixo custo, contudo, apresenta dificuldade de aplicação nos processos de drenagem e limpeza dos tanques, devido ao formato e tamanhos. Já nos métodos químicos são utilizados aditivos, biocidas e/ou antioxidantes, que são aplicados de duas formas, aplicação contínua (maior frequência com baixas concentrações) e aplicação choque (baixa frequência com alta concentração) (Buker *et al.* 2014; Zimmer 2014; Beker *et al.* 2016; Neves, 2018

Estes métodos químicos têm como objetivos eliminar e/ou inibir o crescimento microbiológico, contudo sua eficiência depende de conhecer a comunidade microbiológica presente no combustível. Este conhecimento auxilia no momento da escolha dos agentes químicos, visto que, pode-se encontrar agentes solúveis em água e/ou óleo. Contudo, os métodos químicos apresentam

desvantagens tais como: resistência da comunidade microbiológica, geração de resíduos e ser utilizados como nutrientes para proliferação (Buker, 2009; Buker *et al.* 2014; Zimmer, 2014; Beker *et al.* 2016; Neves, 2018).

Os biocidas podem ser classificados em oxidantes (ozônio, peróxidos de hidrogênio, compostos clorados) e não oxidantes (compostos sulfurados, estanhados, isothiazolonas, sais de cobre), apresentam ação letal ou inibitória, agindo em estruturas celular externas, membrana plasmática ou em estruturas citoplasmáticas dos microrganismos.

Já os antioxidantes apresentam uma ação de desaceleração, podem ser sintéticos ou naturais, classificados em relação ao mecanismo de ação: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos. São caracterizados por grupos fenólicos e com atividade microbiológica, tais como: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propia (PG) (Yemashova *et al.* 2007; Pullen e Saeed, 2012; Pinho, 2016; Neves, 2018).

Diante do que foi exposto, se vê a necessidade de uma forma eficiente para diminuir e/ou eliminar os microrganismos e facilitar o controle microbiológico dos combustíveis, facilitando o transporte e estocagem, ficando livre de contaminações microbiológicas.

3.6.1. Radiação ultravioleta

A radiação pode ser classificada de acordo com a frequência de suas ondas, formando um conjunto de ondas ao qual pode ser denominado espectro eletromagnético. Nesse espectro são encontradas três regiões que variam de acordo com o intervalo de comprimento de onda (λ): infravermelho (> 780 nm), luz visível (400 - 780 nm) e ultravioleta (100 - 400 nm) (Maltez, 2018; Balogh *et al.* 2011; Neves, 2018).

A radiação ultravioleta classificada é em três tipos: UVA (luz negra: 400 – 315nm), UVB (luz eritematogênica: 315 – 280nm) e UVC (radiação germicida: 280 – 100nm). Dentre as citadas, a UVC é o tipo de radiação mais germicida, podendo ser considerada a mais energética, com atuação direta na inibição microbiológica (Ponczek, 2014; Neves, 2018).

Sua ação germicida e/ou bactericida, está associada à quebra de moléculas ou catálises de reações químicas de moléculas, sendo que, diferentes moléculas (DNA, RNA, proteínas, dentro outras) dos microrganismos, podem absorver a radiação UVC, ocasionando reações fotoquímicas e interações secundárias, que apresentam ação carcinogênica e mutagênicas, impedindo a reprodução dos microrganismos (Balagh *et al.* 2011; Neves, 2018).

Alguns fatores influenciam diretamente na ação da radiação UVC, como: intensidade da radiação, capacidade de absorção de moléculas e o tempo de exposição à radiação. Alguns estudos demonstram a efetividade da ação germicida, quando comprimento de onda está em 260 nm. Esse comprimento de onda atua nas bases hidrogenadas do ácido desoxirribonucleico e ribonucleico, isto é, o DNA e RNA respectivamente (Bilotta & Daniel, 2006; Nyangaresi *et al.* 2019).

Na literatura o método de radiação ultravioleta para controle microbiológico é relatado em alguns líquidos, como águas residuais, esgoto, efluentes, sendo destaque como método de radioterapia. Atuando na desinfecção de águas e efluentes (Souza *et al.* 2012; Ferreira, 2015; Battistelli *et al.* 2016; Nyangaresi *et al.* 2019).

Souza *et al.* (2012) averiguaram o uso da radiação UV para a desinfecção de esgoto proveniente de uma estação de tratamento de esgotos (ETE). Os autores verificaram a eficiência da radiação na inativação de *Escherichia coli*, principalmente em níveis maiores de radiação. 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.

Ferreira (2015) incidiu radiação ultravioleta em um isolado bacteriano oriundo de esgoto hospitalar e sanitário. Para tanto, foi utilizado uma lâmpada UVC 15W e as amostras 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 destaca que a presença de sólidos nas amostras de esgoto pode interferir na eficiência do tratamento.

Neves *et al.* (2020) testou a eficiência da radiação UVC em combustível Diesel B8, utilizou lâmpadas UVC 40W com comprimento de onda de 253 nm em um reator 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 concluída a eficiência do tratamento, principalmente para o ensaio de 360 minutos de duração, onde a carga microbiológica diminuiu significativamente, passando de $1,5 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ para $3,33 \times 10^2$ UFC mL⁻¹.

Polinarski *et al.* (2022), avaliou a utilização da radiação ultravioleta para diminuir e/ou eliminar a concentração de microrganismos presentes em blends (11 e 20%) de óleo diesel/biodiesel, avaliando óleo diesel com dois teores de enxofre (S10 e S500) e duas concentrações de água (2500 e 10000 ppm). Foi utilizado um reator com uma lâmpada UVC 55W, o ensaio teve duração de 360 minutos, avaliando também períodos de estocagem antes e após o teste com reator de radiação ultravioleta. Para este estudo, foi possível determinar que amostras com maiores teores de enxofre apresentam uma concentração mais elevada de microrganismos durante o período de estocagem do combustível, para a utilização da radiação ultravioleta a maioria das amostras teve uma diminuição de 50% na concentração de microrganismos presentes. Quando analisado o efeito dos teores de enxofre e teor de água juntos, foi possível concluir que combustível com maiores teores de ambos promoveram um maior crescimento microbiológico nas amostras. Em todas as amostras a radiação ultravioleta não apresentou mudança nas propriedades físico-químicas do combustível. Para este estudo foi possível determinar que o método de controle alternativo com radiação ultravioleta foi eficiente para minimizar e/ou eliminar a carga microbiana.

Como observado, na literatura existem relatos de diversos trabalhos que comprovam a eficiência da radiação ultravioleta no controle e inativação de microrganismos, principalmente em águas residuária provenientes de esgotos. No entanto, poucos estudos relatam seus efeitos na eliminação de microrganismos presentes em combustíveis. Diante disso, este trabalho visa estudar a influência da radiação ultravioleta, utilizada como método de controle alternativo para contaminação microbiológica em combustíveis, e avaliar diferentes teores de biodiesel no aumento da concentração de microrganismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Toda a parte experimental deste estudo foi realizado 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.

4.1. Coleta e preparo das amostras de combustíveis

Neste estudo utilizou-se diferentes teores de biodiesel adicionados ao óleo diesel comercial S10, partindo do B11 atualmente comercializado com 11% de biodiesel, e blendas preparadas de biodiesel/óleo diesel com 25, 50 e 75% de biodiesel. Para cada blenda, avaliou-se dois teores de água, 1000 e 2500 ppm de água, teores estes acima dos limites especificados pela Resolução ANP n° 50/2013. O preparo das blendas foi realizado a partir do óleo diesel comercial S10 (B11) e biodiesel puro (B100). O óleo diesel comercial foi adquirido em um posto de abastecimento na cidade de Palotina – PR, e o biodiesel puro utilizado foi cedido pela Empresa BSBios.

Os combustíveis são coletados em galões de 10 litros, devidamente limpos e secos, as blendas preparadas em cabine de fluxo laminar, para evitar contaminações externas. Acondicionou-se as blendas em frascos de vidro de tampa de rosca (Schott) de 1000 mL, estéreis, limpos e secos, devidamente vedados. Todo o processo de preparo e coleta de amostras seguiu um critério de preparo e amostragem, com objetivo de evitar quaisquer interferências do ambiente exterior. Na tabela 6 são apresentadas um resumo das amostras avaliadas nos experimentos.

Tabela 6. Composição e identificação das amostras para cada ensaio.

Amostra	Biodiesel (%)	Teor de água (ppm)	Identificação das amostras
B11	11	Comercial	B11-C
		1000	B11-1000
		2500	B11-2500
B25	25	Comercial	B25-C
		1000	B25-1000
		2500	B25-2500
B50	50	Comercial	B50-C
		1000	B50-1000
		2500	B50-2500
B75	75	Comercial	B75-C
		1000	B75-1000
		2500	B75-2500

Na Figura 6 é relatado um fluxograma geral de todos os ensaios e análises realizados neste experimento.

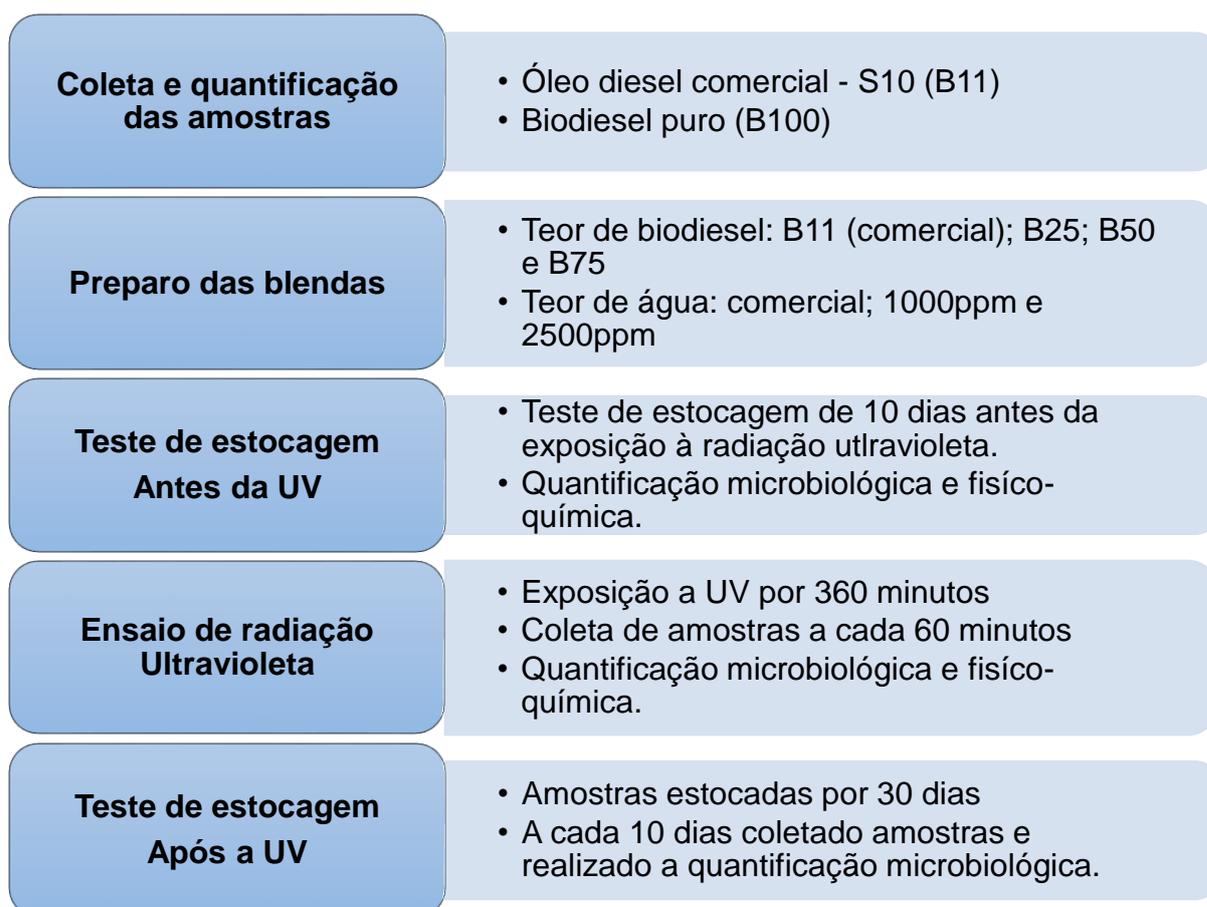


Figura 6. Fluxograma dos experimentos e análises

4.2. Reator de radiação ultravioleta

Abaixo é demonstrado o esquema ilustrativo do reator de radiação ultravioleta (Figura 7) utilizado nos ensaios de radiação.

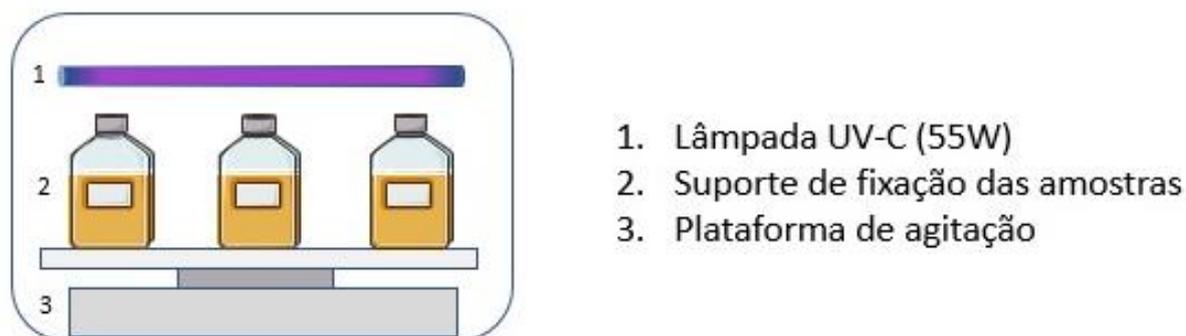


Figura 7. Esquema geral do reator de radiação ultravioleta.

O reator utilizado neste estudo foi baseado no aparato experimental utilizado no trabalho desenvolvido por Neves (2018), contudo, foi realizada uma adaptação com redução de escala, com objetivo de permitir um controle maior das variáveis do processo.

O reator foi elaborado pela adaptação de uma incubadora shaker, com variação de temperatura de 29 – 40° C e agitação de 100rpm. 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 reator também é composto por 3 suportes de fixação, para fixar as amostras na plataforma de agitação. O shaker é protegido de entrada e saída de luz, com objetivo de proteger e minimizar qualquer interferência do ambiente externo nas amostras.

4.3. Ensaio de radiação ultravioleta

Para os ensaios no reator, após o preparo das diferentes amostras de combustível, uma alíquota de 90 mL foi coletada para realizar as análises de quantificação microbiológica e características físico-químicas. Após, as amostras são estocadas em frascos de vidro com tampa de rosca e armazenadas em ambiente com ausência de luz e umidade, por um período de 10 dias, em temperatura ambiente. Ao fim deste período, uma nova alíquota foi coletada para as análises microbiológica e características físico-químicas.

Após o período de 10 dias, inseriu-se as amostras de combustíveis no reator de radiação ultravioleta, por 360 minutos, sendo retiradas alíquotas para análise microbiológica a cada 60 minutos, e ao final uma alíquota para as análises físico-químicas. Realizou-se as análises físico-químicas no tempo 0 e 360 minutos de cada amostra, com objetivo de avaliar se a incidência de radiação ultravioleta interfere nas características das diferentes amostras. O tempo de ensaio no reator foi baseado em estudo realizado anteriormente no grupo de pesquisa do Laboratório de Materiais e Energias Renováveis - LABMATER da UFPR – Campus de Palotina reportado por Neves *et al.* (2020) e Polinarski (2020).

4.4. Teste de estocagem do combustível após radiação ultravioleta

Ao final dos ensaios no reator de radiação ultravioleta estocou-se as amostras em temperatura ambiente, livre de luz e umidade, em períodos de 10, 20, e 30 dias. Em cada tempo de estocagem, uma alíquota foi coletada e realizada as análises microbiológicas, com objetivo de verificar a eficiência e o tempo de atuação da radiação ultravioleta sobre os microrganismos identificados nas diferentes amostras de combustível.

4.5. Determinação da presença de bactérias

Utilizou-se o método espectrofotométrico, para quantificar os microrganismos presentes e realizar a caracterização molecular para identificação. Para tais métodos se vê a necessidade de preparar uma suspensão bacteriana, esta suspensão tem objetivo de facilitar a passagem e isolamento dos microrganismos, que estão presentes na fase óleo (combustível) para fase água (meio de cultura).

4.5.1. Preparo da suspensão bacteriana

Com base na adaptação da Norma ASTM E1259-10, uma alíquota de 10 mL de combustível, nos diferentes tempos de reação, foi adicionada em 90 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) estéril e mantidos sob agitação a 100 rpm em incubadora shaker, a 35 °C, por um período de 18 horas (Vaz, 2010; Zimmer, 2014; Neves *et al.* 2020).

4.5.2. Método espectrofotométrico

A leitura em espectrofotômetro permite avaliar o aumento ou diminuição da absorvância que, por sua vez, reflete na concentração de células de microrganismos presentes no meio. Nesse sentido, um espectrofotômetro UV 5300PC foi utilizado na região de comprimento de onda de 600 nm (Neves *et al.* 2020) para verificar o aumento ou diminuição da turbidez da amostra.

Para realização desta técnica, 20 mL de suspensão bacteriana foi adicionada em tubos cônicos e centrifugadas a 3400 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando apenas a massa microbiana. Na sequência foi adicionado 10 mL de água salina (0,9%), ressuspendido e o processo de centrifugação realizado novamente sob as mesmas condições a fim de eliminar os resíduos de óleo que podem interferir na leitura. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e mais 10 mL de salina adicionado. Seguidamente, as amostras são agitadas em vortex por 60 segundos e coletado 4 mL para realização da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm.

4.6. Caracterização físico-química

As análises físico-químicas foi realizada nas amostras de combustível anterior e posterior exposição à radiação ultravioleta. São metodologias padronizadas para análise de combustível óleo diesel e biodiesel.

4.6.1. Temperatura das amostras

Durante a realização dos ensaios dentro do reator de radiação ultravioleta realizou-se um acompanhamento da temperatura. Foi utilizado um termômetro digital acoplado dentro do reator de radiação ultravioleta. Tal análise teve como objetivo verificar a variação da temperatura das amostras pelo efeito da lâmpada ultravioleta, e posteriormente verificar a interferência da temperatura nos microrganismos identificados em cada amostra.

4.6.2. Massa específica à 20° C

A análise de massa específica foi realizada a 20°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.

4.6.3. Viscosidade cinemática 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. A análise seguiu dois procedimentos para medição, de acordo com a velocidade de rotação do viscosímetro (H12 e H30). Quando o *spindle* entra em contato com a amostra, o equipamento é ligado e as leituras de Hx são realizadas de maneira visual. Após as leituras, com auxílio da equação 2, o valor de viscosidade relativa foi calculado.

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

Onde:

a_x = viscosidade relativa para cada Hx;

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

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

Após o cálculo da viscosidade relativa, o próximo passo é os cálculos para obtenção da viscosidade absoluta, onde a viscosidade relativa foi multiplicada pelo coeficiente, k, para cada step Hx (equação 3). O valor do coeficiente para H12 e H30 são 5 e 2 respectivamente.

$$n_x = k_x \times a_x$$

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.

4.6.4. Teor de água: Karl Fischer

O método de Karl-Fischer é um dos meios utilizados para determinar a presença de água em amostras. Constituído por uma mistura de iodo, dióxido de enxofre e peridina em metanol, o reagente Karl Fischer (RKF) é capaz de determinar pequenas quantidades de água. O procedimento baseia-se numa titulação visual

ou eletrométrica onde 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

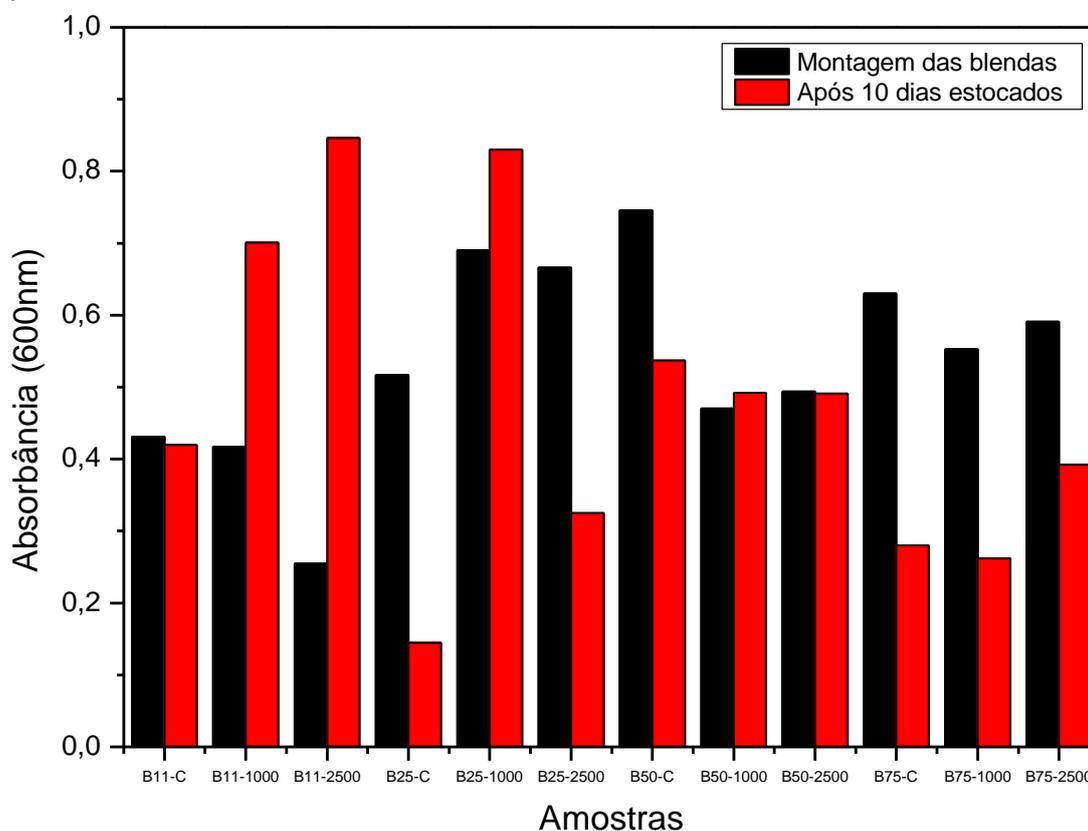
5.1. Ensaio de radiação ultravioleta

5.1.1. Determinação da presença de bactérias

A verificação da presença bacteriana nas amostras foi realizada por meio da técnica de absorbância, na qual as leituras são realizadas no comprimento de onda de 600 nm. Nesta técnica, a turvação do meio de cultura indica a presença ou ausência de microrganismos presentes na amostra, onde quanto maior a absorbância, maior a concentração celular de bactérias. (Ribeiro *et al.* 2015; Quatrin *et al.* 2016)

Antes de realizar o ensaio no reator de radiação ultravioleta, as amostras são estocadas por um período de 10 dias, com objetivo de padronizar as amostras e identificar se este período favorece a proliferação de microrganismos no combustível. O Gráfico 1 relaciona os dados de absorbância antes e após o teste de estocagem, sendo a leitura inicial realizada no momento de montagem das blendas

Gráfico 1. Leitura de absorbância das amostras na montagem das blendas (B11, B25, B50 e B75) e após 10 dias estocadas.



Correlacionando os diferentes teores de biodiesel adicionado ao óleo diesel, pode-se identificar que as blendas sem adição de água (B11-C, B25-C, B50-C e B75-C) após 10 dias estocados, apresentaram valores iguais ou menores para concentração de microrganismos. Já blendas B11 e B25 com adição de 1000 ppm de água tiveram um aumento na concentração de microrganismos e as blendas B50 e B75, apresentam valores iguais ou menores após a estocagem. Com adição de 2500 ppm de água, a blenda B11 foi a que apresentou uma maior concentração de microrganismos após 10 dias estocado, e as demais blendas tiveram uma diminuição em sua carga microbiológica.

Como foi relatado acima, para algumas amostras a presença de água favoreceu a proliferação dos microrganismos num período de 10 dias estocadas, contudo mesmo em amostras com a presença de água foi possível observar uma diminuição da concentração de microrganismos, principalmente em amostras com maiores teores de biodiesel (B75) adicionados. Com isso pode-se concluir que apesar da presença de água e teor de biodiesel serem fatores que torna o combustível mais suscetível à biodegradação, a condição de estocagem não favoreceu o crescimento de microrganismos para todas as blendas, contudo é um fator que influencia tanto quanto, visto que em amostras com presença de água e menores teores de biodiesel (B11-1000, B11-2500, B25-1000), a concentração de microrganismos aumentou.

Polinarski (2020) também avaliou a estocagem de 10 antes da incidência com radiação UV, e percebeu-se que as blendas onde ocorreu adição de água apresentou uma maior influência na concentração de microrganismos, e com formação de bora ao fundo dos frascos. Cazarolli *et al.* (2020) avaliou o potencial de degradação de um fungo isolado de éster metílico de soja (*Aureobasidium pullulans*) em biodiesel puro, óleo diesel puro e mistura B10, para este fungo em um período de 25 dias a presença de biomassa fúngica na interfase água/óleo foi biodeteriorogênica em biodiesel, utilizando éster metílicos de ácidos graxos como fonte de carbono, sendo que tais dados forneceram evidências de crescimento fúngico, produção de lipase e formação de biofilmes.

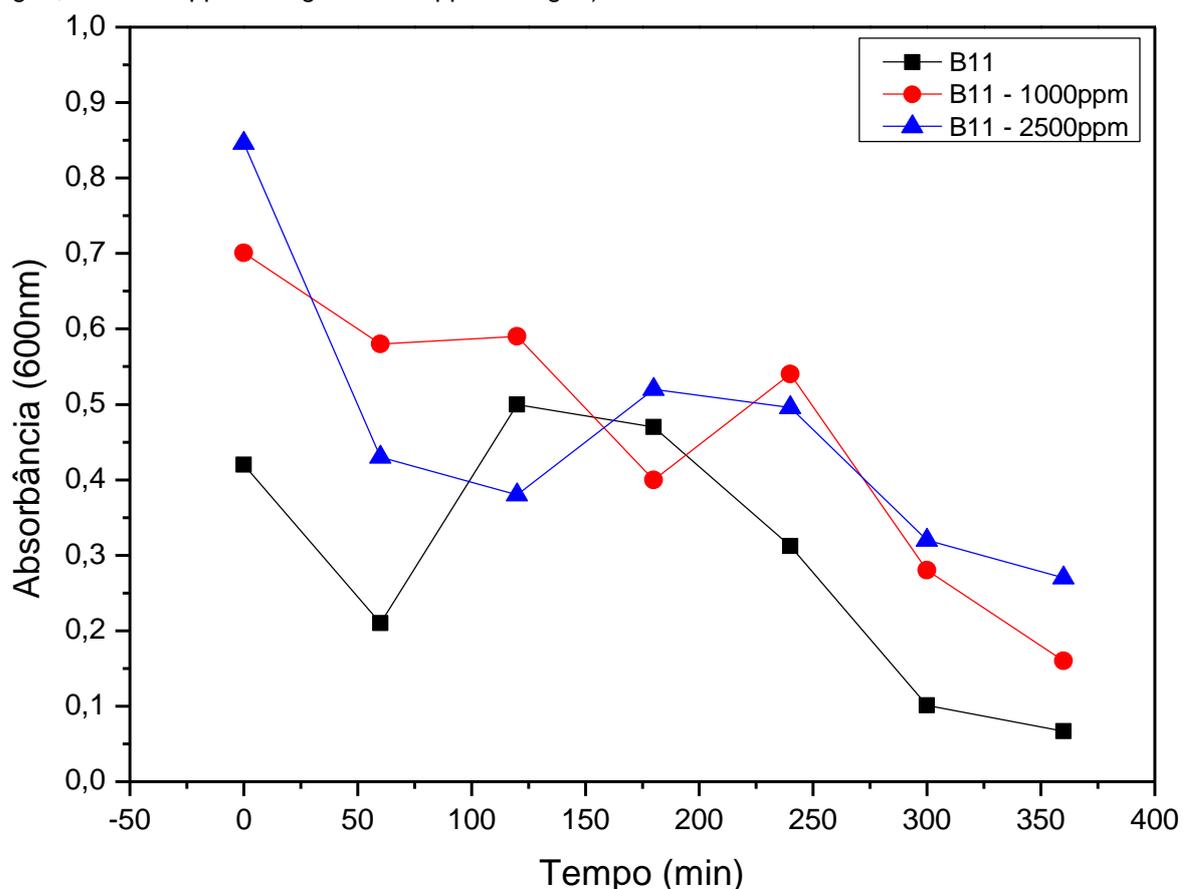
Boelter *et al.* (2018) avaliou o potencial de degradação de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* em óleo diesel puro (B0), biodiesel puro (B100)

e mistura (B10), durante o período de 45 dias de armazenamento. Para as amostras B100 e B10 o crescimento de microrganismos foi similar, no entanto sem a produção significativa de biossurfactantes, os resultados também apresentam um crescimento de *P. boydii* em função dos combustíveis, degradando B100 e B0, já para a *M. guilliermondii* ocorreu crescimento no B100 e B10, porém não apresentou potencial de degradação significativo do biodiesel.

Cazarolli *et al.* (2018) avaliou a composição química e biológica de lodo encontrado em tanques de armazenamento de biodiesel, isolando e identificando sete bactérias e cinco fungos filamentosos, contudo essa comunidade microbiana isolada não apresentou capacidade de utilizar o biodiesel puro como fonte de carbono e um meio mineral mínimo como fonte de nutrientes para produção de biomassa. Com isso, mesmo isolando esta comunidade microbiana do lodo de biodiesel, esta não apresentou capacidade de degradação suficiente, podendo estar atrelado tanto na baixa densidade microbiana inicial, quanto na capacidade que cada grupo de microrganismos tem em utilizar o biodiesel e/ou óleo diesel como fonte de nutrientes. Tais resultados podem ser corroborados com os encontrados neste estudo, visto que combustíveis com maiores teores de biodiesel, mesmo na presença de água, apresentaram uma diminuição da carga de microrganismos após o período de estocagem.

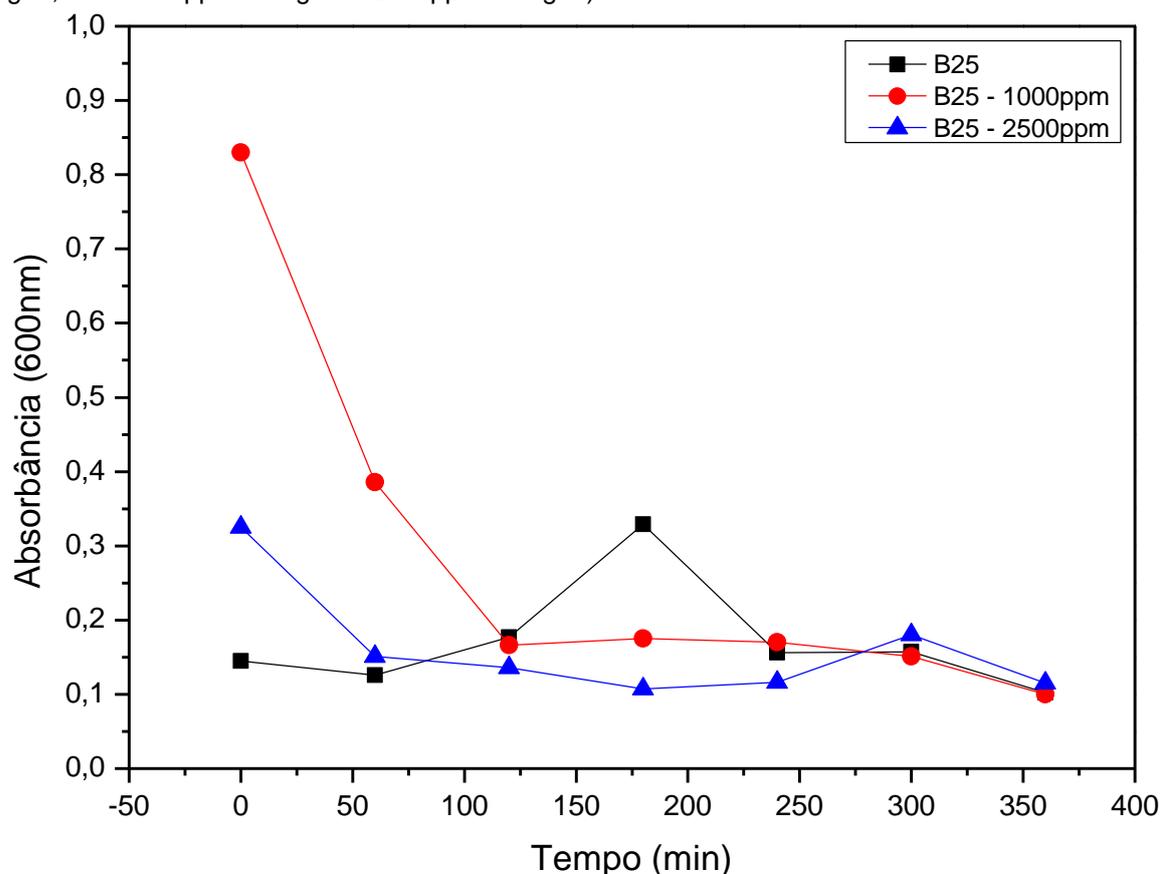
Após este período de estocagem as amostras são levadas ao reator de radiação ultravioleta e iniciado o teste por 360 minutos. O Gráfico 2 apresenta os dados para blenda B11 e os dois teores de água (1000 e 2500 ppm). Pode-se perceber que após 10 dias estocadas, as amostras com adição de água apresentaram inicialmente uma maior concentração de microrganismos quando comparado a amostra sem adição de água, principalmente para a amostra com 2500 ppm de água, onde para este teor de biodiesel a água favoreceu a proliferação de microrganismos presentes. Após os 360 minutos em contato com radiação UV, todas as amostras apresentaram diminuição na carga microbiológica, sendo a blenda sem adição de água com maior redução da concentração de microrganismos, 84%.

Gráfico 2. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B11 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).



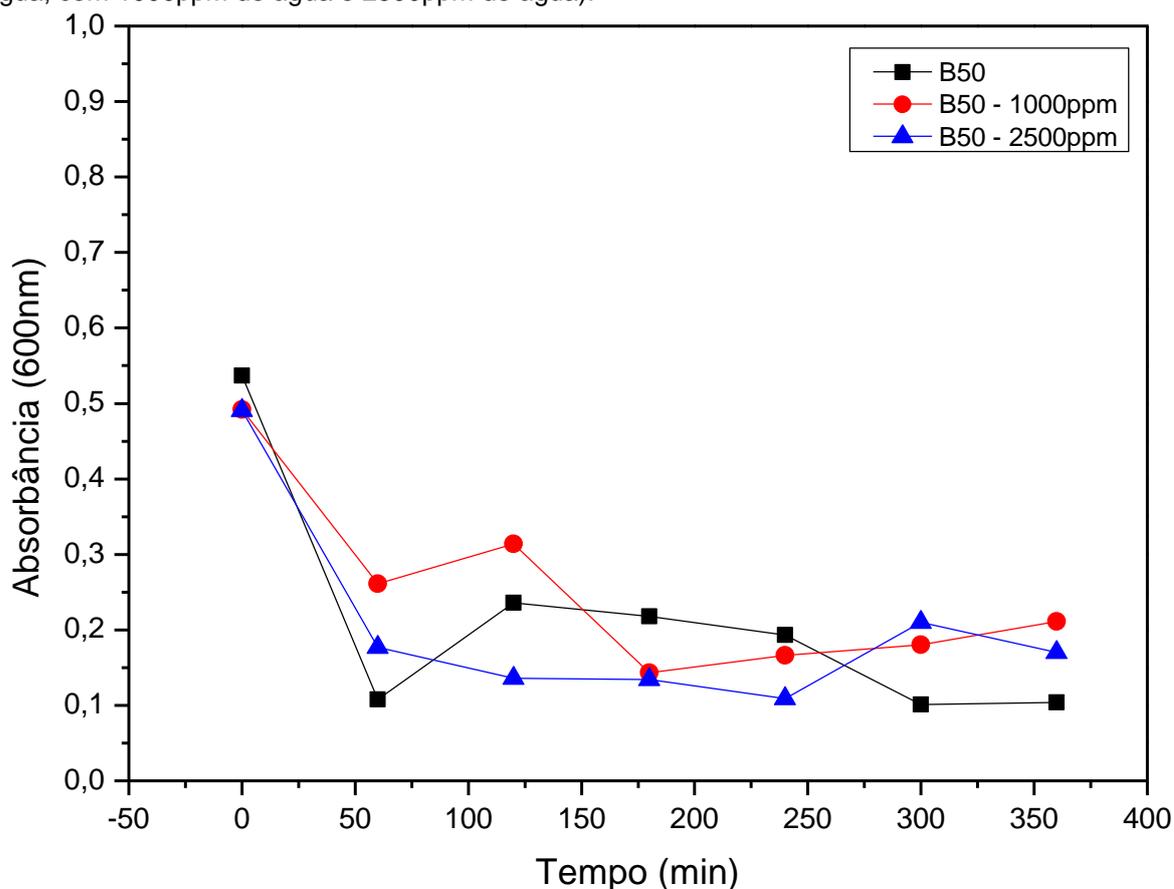
O Gráfico 3 relaciona os dados para as amostras B25. Para este grupo de combustível, a amostra com teor de água de 1000 ppm apresentou maior concentração inicial de microrganismos do que a amostra com 2500 ppm. Contudo, após 360 minutos de contato com a radiação ultravioleta todas as amostras obtiveram uma diminuição da concentração de microrganismos chegando a valores semelhantes ao final do ensaio. Essa diferença na concentração de microrganismos presentes nas amostras com teores de água pode estar relacionada com a comunidade de microrganismos presentes, visto que o para alguns grupos de microrganismos é necessário um maior tempo em contato com o combustível para se proliferarem, mesmo estes estando na presença de maiores concentrações de água.

Gráfico 3. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B25 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).



Para a blenda B50 (Gráfico 4), o aumento da concentração do teor de biodiesel adicionado ao óleo diesel contribuiu para uma maior concentração inicial de microrganismos, em amostras sem e com adição de água. Contudo, ao final do período de 360 minutos ocorreu a diminuição da concentração de microrganismos em todas as amostras, o que indica a eficiência da radiação ultravioleta como alternativa ao tratamento antibacteriano. Quando comparado os dados em relação a porcentagem de diminuição da carga microbiana, percebe-se que para os três ensaios ocorreu uma diminuição maior que 50%, sendo que no ensaio sem adição de água a diminuição foi de 80%.

Gráfico 4. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B50 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).

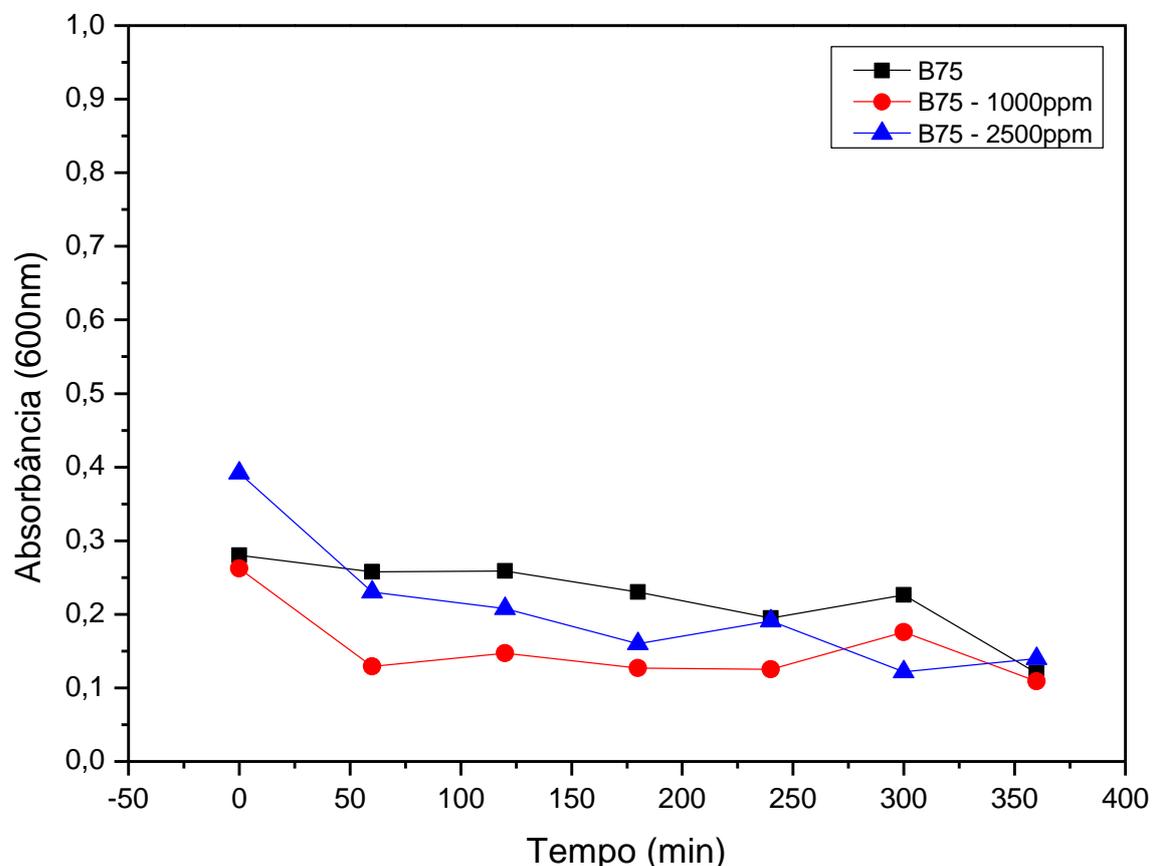


O Gráfico 5 demonstra os dados para blenda B75, onde uma maior concentração de água (2500 ppm) resultou em uma maior concentração de microrganismos inicialmente, contudo para as amostras deste ensaio, os valores iniciais estão abaixo de outros ensaios e após 360 minutos de radiação UV todas amostras apresentaram valores menores que os encontrados inicialmente para concentração de microrganismos.

Mesmo que o teor de biodiesel seja maior para esta blenda, o motivo da carga microbiológica ser menor pode estar atrelado ao fato de o período de estocagem inicial (10 dias) ser insuficiente para que ocorra a proliferação dos microrganismos presentes no combustível. Uma vez que amostra com maior teor de água favoreceu o desenvolvimento dos microrganismos, como visto anteriormente, um maior teor de biodiesel atrelado a maiores concentrações de água, podem ou não apresentar influência direta na proliferação de microrganismos, visto que cada comunidade microbiana apresenta uma

capacidade diferentes em utilizar o biodiesel e/ou óleo diesel como fonte de carbono (Cazarolli *et al.* 2018).

Gráfico 5. Leitura de absorvância (600nm) da amostra óleo diesel/biodiesel B75 (sem adição de água, com 1000ppm de água e 2500ppm de água).



Em todas amostras de combustíveis é possível perceber um pico no aumento da concentração de microrganismos ao longo do ensaio com radiação ultravioleta. Este aumento está relacionado a resistência que alguns microrganismos apresentam em relação a radiação UV ou pela morte de microrganismos iniciais, favorecendo assim a disponibilidade de nutrientes para que outros microrganismos possam se desenvolver (Batista *et al.* 2016; Fonseca *et al.* 2019; Polinarski, 2020; Neves *et al.* 2020).

Comparando os dados de absorvância antes e após a radiação UV (Tabela 7) conclui-se que as amostras B11-C, B25-1000 e B50-C são as blends que apresentaram diminuição maior de 80% após a radiação UV, a blenda B25-C foi a única dentro do grupo de amostras que apresentou valor inferior, comparando os dados antes e após a radiação UV, de 29,66% de redução. As demais amostras apresentaram valores superiores a 50%.

Tabela 7. Absorbância das blendas antes e após a radiação ultravioleta e % de diminuição da concentração de microrganismos.

Amostras	Absorbância		↓ da absorbância (%)
	Antes da radiação UV	Após a radiação UV	
B11-C	0,420	0,067	84,05
B11-1000	0,701	0,160	77,18
B11-2500	0,846	0,270	68,09
B25-C	0,145	0,102	29,66
B25-1000	0,830	0,100	87,95
B25-2500	0,325	0,115	64,62
B50-C	0,537	0,104	80,63
B50-1000	0,492	0,211	57,11
B50-2500	0,491	0,170	65,38
B75-C	0,280	0,120	57,14
B75-1000	0,262	0,109	58,40
B75-2500	0,392	0,140	64,29

Polinarski (2020) relatou que amostras com teores de 11% e 20% de biodiesel sem adição de água, apresentaram uma diminuição de 56% e 14% respectivamente após 360 minutos de radiação UV. Ao comparar com os dados deste experimento, para blenda B11 a diminuição foi de 84,05% e para a blenda B25 foi de 29,66%. Ao relacionar os dados encontrados por Polinarski (2020) e os relatados neste trabalho, é possível perceber a semelhança dos resultados, na qual a eficiência da radiação ultravioleta foi maior para as blendas comerciais (B11). A literatura aponta que o acréscimo de teor de biodiesel no diesel fóssil tende a aumentar a presença de microrganismos devido as propriedades do biocombustível, mas em ambos os casos a adição de biodiesel não favoreceu o aumento microbiano.

Já Neves *et al.* (2020) com amostras de blenda B8%, tiveram uma diminuição de 99% após 360 minutos em contato com a radiação UV. Comparando com dados do presente experimento, nenhuma das amostras conseguiu atingir tal diminuição da concentração de microrganismos. Contudo, as amostras deste experimento apresentam maiores concentrações de biodiesel adicionado ao óleo

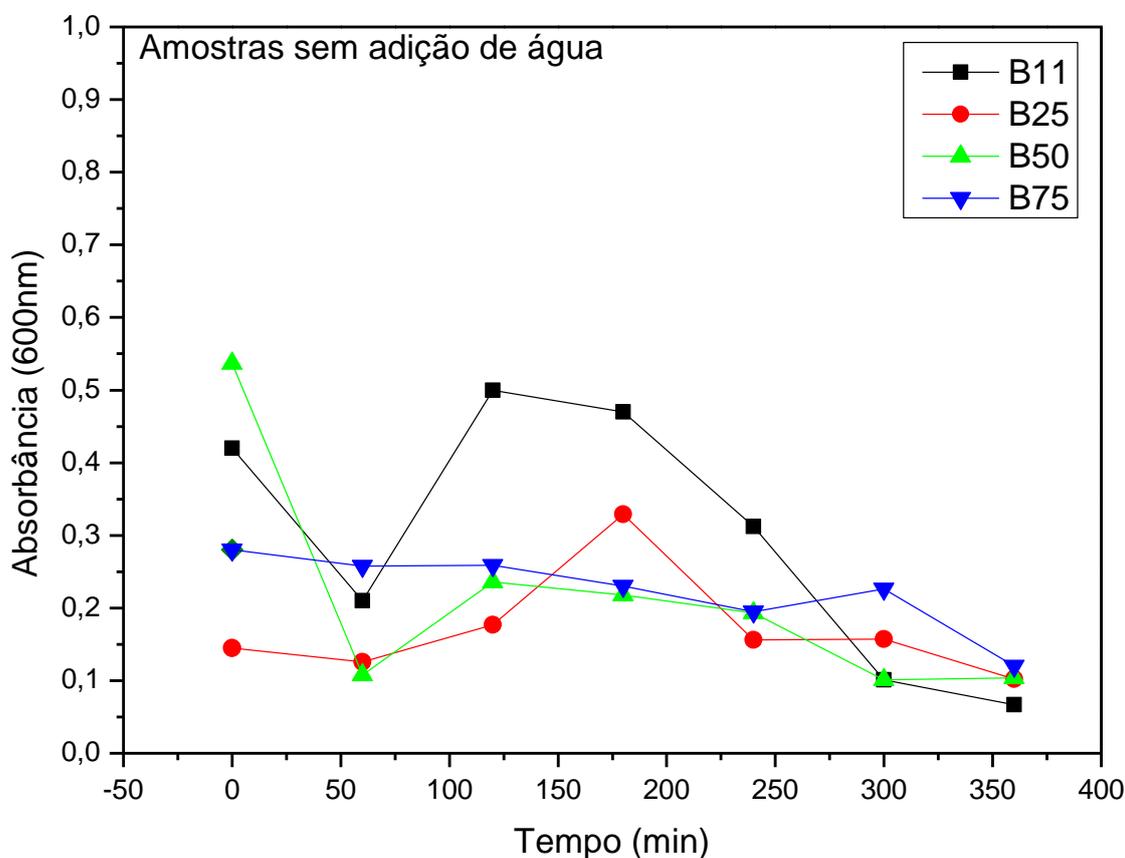
diesel, e a técnica utilizada para determinar a concentração de microrganismos não foi a mesma.

5.1.2. Influência do teor de água na presença de microrganismos

Os dados de crescimento de bactérias também são relatados de acordo com os teores de água presentes em cada blenda. A legislação da ANP determina os valores máximos para teor de água dos combustíveis, para óleo diesel S10 de 200 mg/Kg⁻¹ e para biodiesel puro 200 mg/Kg⁻¹. Neste trabalho utilizou-se valores superiores de teor de água, 1000 e 2500 mg/Kg⁻¹, com objetivo de verificar a influência que altos teores de água promovem na proliferação de microrganismos.

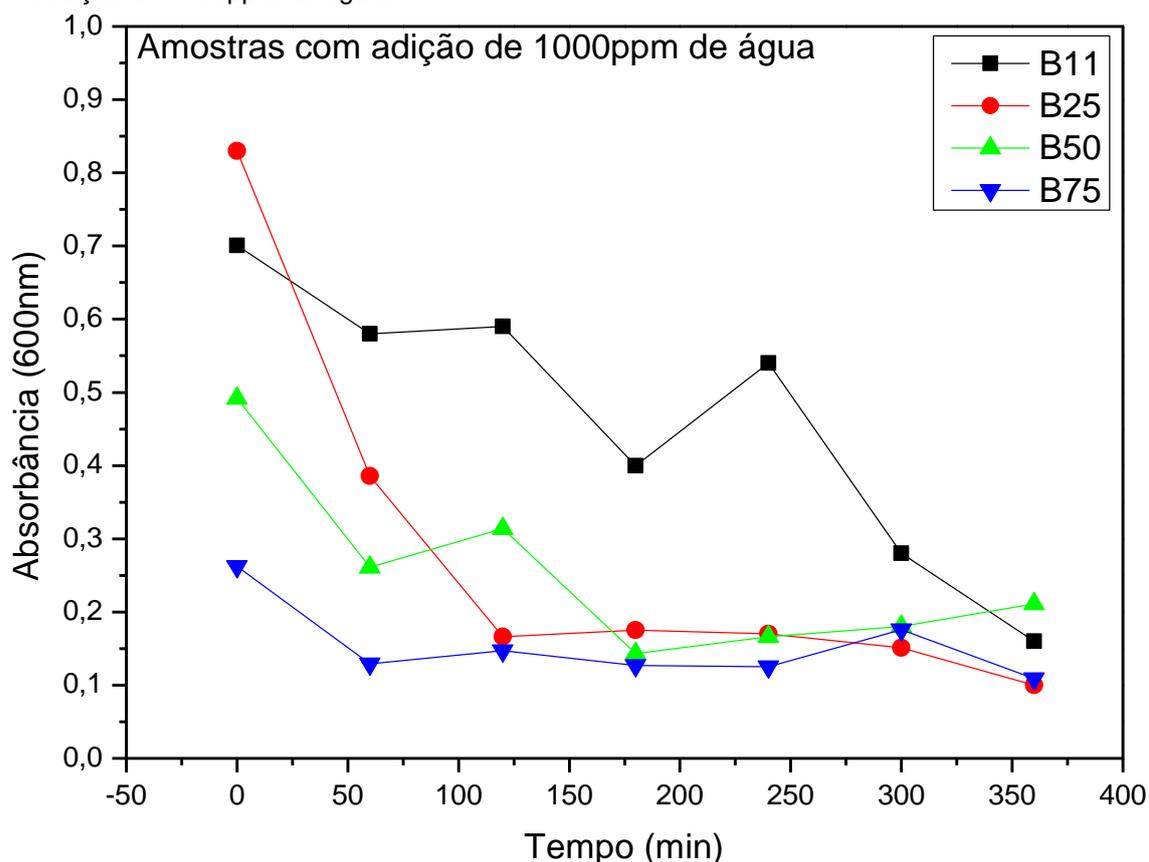
No Gráfico 6 os dados de concentração de microrganismos para as blendas onde não houveram a adição de água. Para este grupo de amostras foi possível observar que inicialmente a blenda B50 teve uma carga inicial maior de microrganismos (0,537), e ao final de 360 minutos com radiação UV todas as amostras tiveram uma diminuição na concentração de microrganismos.

Gráfico 6. Leitura de absorvância (600nm) das blendas óleo diesel/biodiesel (B11, B25, B50 e B75) sem adição de água.



Já para as amostras onde houve um acréscimo de 1000ppm de água (Gráfico 7), a blenda B25 foi a que apresentou maior valor inicial de concentração de microrganismos (0,830). Em todas amostras foi possível observar a diminuição da concentração de microrganismos, sendo que na blenda B50 foi a que apresentou menor valores de diminuição.

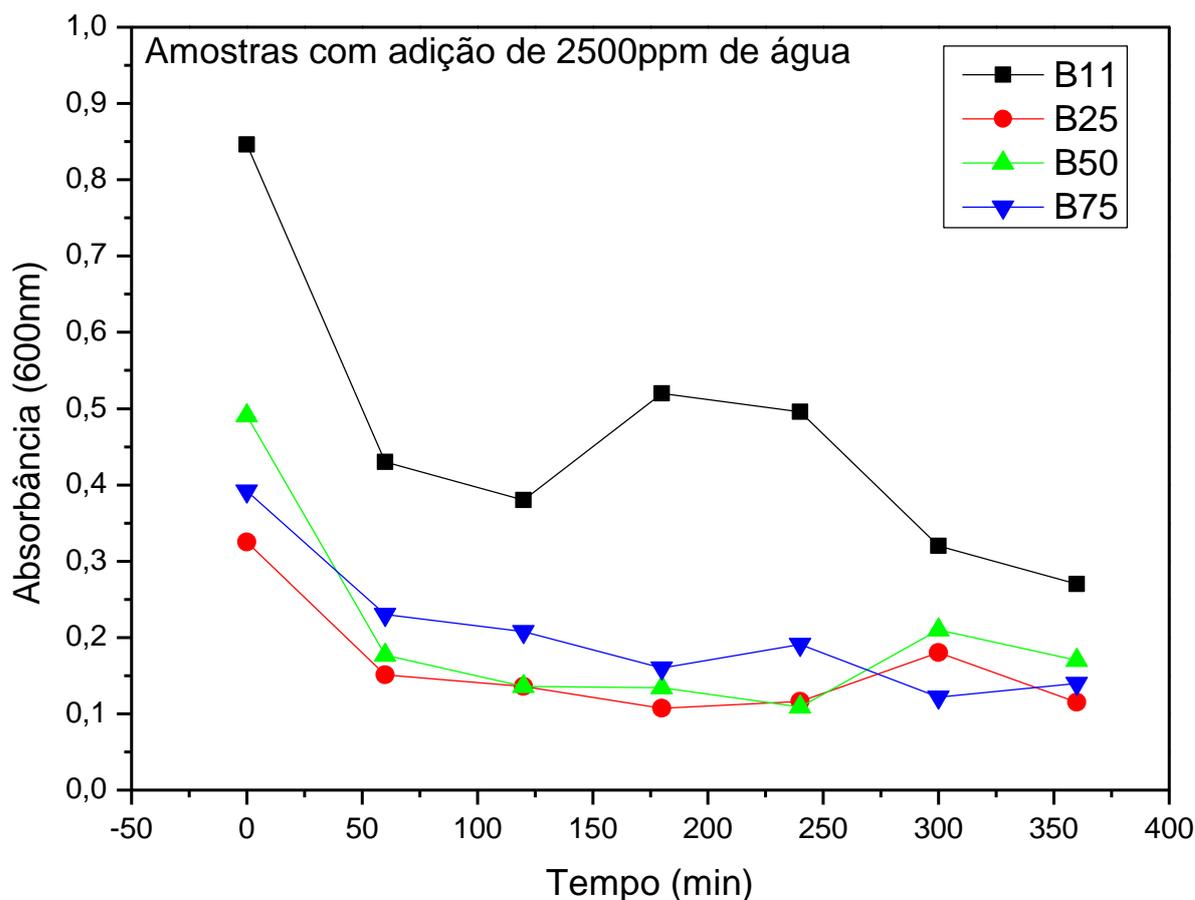
Gráfico 7. Leitura de absorvância (600nm) das blendas óleo diesel/biodiesel (B11, B25, B50 e B75) com adição de 1000ppm de água.



Nas amostras com adição de 2500ppm de água (Gráfico 8) a blenda comercial B11 foi a que apresentou concentração inicial maior que as demais amostras, tanto com e sem adição de água. Contudo, mesmo com alto teor de água adicionado em diferentes teores de biodiesel foi possível observar uma diminuição da concentração de microrganismos de 64,29 a 68,09% nas amostras.

Polinarski *et al.* (2022), observou que em amostras com adição de 2500ppm de água em blendas B11 e B20 houve uma diminuição de 73 e 54% respectivamente da concentração microbiana, correlacionado com 68 e 64% para blendas B11 e B25 deste experimento. Já em amostras com adição de 10000ppm de água, a concentração microbiana reduziu 95% para B11 e 29% para B20.

Gráfico 8. Leitura de absorvância (600nm) das blendas óleo diesel/biodiesel (B11, B25, B50 e B75) com adição de 2500ppm de água.



É relatado na literatura que uma maior concentração de água adicionada a misturas de óleo diesel e biodiesel promove uma maior contaminação microbiológica, visto que a água é um fator que influencia diretamente na proliferação de fungos e bactérias, ocasionando diversos impactos ao combustível (Bento *et al.* 2004; Bento *et al.* 2006; Dodos *et al.* 2011; Fregolente *et al.* 2012; Restrepo-Florez *et al.* 2013; Zimmer *et al.* 2013; Bucker *et al.* 2014; Lisieck *et al.* 2014; Passman, 2013; Bento *et al.* 2016; Cazarolli, 2019; Neves, 2018; Polinarski, 2020; Cazarolli *et al.* 2020).

A análise de especificações dos combustíveis determinada pela ANP é realizada preferencialmente após o processo de produção, contudo a contaminação de água ocorre principalmente nos tanques de armazenamento e transporte até os postos de abastecimento (Bento *et al.* 2016; Mahmudul *et al.* 2017). Como é descrito na literatura, o biodiesel apresenta capacidade 30 vezes maior em absorver água que o óleo diesel (Bhuiya *et al.* 2016), com isso é proposto que quanto mais elevado seja o teor de biodiesel ao óleo diesel, maior devem ser

os cuidados em relação aos teores de água durante toda a cadeia de produção, transporte e armazenamento do combustível.

5.1.3. Identificação molecular das amostras

Na identificação molecular, foi possível isolar duas colônias de óleo diesel e uma colônia de biodiesel puro após a exposição com a radiação ultravioleta. Com os dados do sequenciamento genético destas amostras ocorreu a comparação com os dados fornecidos pelo banco do *GenBank*. Esta comparação permitiu a identificação dos gêneros dos microrganismos isolados das amostras de combustível, e os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Identificação molecular das amostras de Óleo diesel S10 e Biodiesel puro

Amostra	Espécie referencia	%ID*
Óleo diesel S10	<i>Solobacillus spp</i>	98
	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	98
Biodiesel puro	<i>Pantoea spp</i>	96

* % de identificação da sequência genética encontrada com os microrganismos identificados no *GenBank*.

Para as amostras de óleo diesel identificou-se dois microrganismos distintos, as bactérias do gênero *Bacillus* já relatadas em diferentes amostras de óleo diesel, biodiesel e misturas (White *et al.* 2011; Onuorah *et al.* 2013; Salgado *et al.* 2013; Buker *et al.* 2014; Soriano *et al.* 2015; Martin-Sanches, Gorbushina Toepel, 2016; Azambuja *et al.* (2017); Cazarolli *et al.* (2018); Neves *et al.* (2020)).

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* favorecem a formação de emulsão em meios líquidos que contém óleos, como o caso do óleo diesel e biodiesel. *Solobacillus sp.* é descrito como um microrganismo produtor de biossurfactante, utilizados em técnicas de biorremediação, se desenvolvem em óleos, utilizando-os como fonte de hidrocarbonetos, a produção de biossurfactantes também promove a redução da tensão superficial (Queiroga *et al.* 2003; Beltrão 2005; Keber, 2020).

A *Exiguobacterium acetylicum* (gram +) é uma bactéria anaeróbia facultativa, identificada com alto potencial de biorremediação e alta eficiência na degradação de petróleo bruto (Cai *et al.* 2017-a; Cai *et al.* 2017-b; Delegan *et al.* 2021). Muitas bactérias deste gênero são isoladas de locais extremos, com condições ambientais não adequadas para a maioria dos microrganismos, podendo apresentar adaptação a diferentes ambientes, altas e baixas temperaturas, altas e baixas

pressões atmosféricas (Rodrigues *et al.* 2006; Vishnivetskaya, Kathariou & Tiedje, 2009; Selvakumar *et al.* 2010; OH *et al.* 2018).

Gutiérrez-Preciado *et al.* (2017), identificou uma cepa isolada de um lago nos Andes, caracterizado por apresentar altas altitudes e elevada radiação ultravioleta. Su *et al.* 2021 isolou a bactéria *Exiguobacterium aurantiacum* de um campo petrolífero, apresentando alto potencial de degradação de hidrocarbonetos. As bactérias deste gênero apresentam alta resistência a diferentes variações de temperatura, pH, metais pesados e radiação ultravioleta, podendo está a ser uma explicação para este microrganismo apresentar atividade de desenvolvimento e crescimento após a exposição à radiação ultravioleta (Ordoñez *et al.* 2013; Su *et al.* 2021).

Para os microrganismos identificados na amostra de biodiesel puro, a *Pantoea spp* gênero de bactérias Gram (-) anaeróbias facultativa, podem ser isoladas de diversas fontes geográficas e ecológicas, e produzem biossurfactantes (Almeida *et al.* 2015). Pizzolante *et al.* 2018 isolou *Pantoea* de azeite de oliva extra virgem e avaliou a produção de biossurfactantes. Jacobucci *et al.* 2009, isolou bactérias do gênero *Pantoea* de solos contaminados com óleo, e identificaram a produção de biossurfactantes utilizando fontes de carbono provenientes de querosene e azeite de oliva.

Com base nos dados de identificação molecular, pode-se concluir que as bactérias identificadas já relatadas posteriormente em combustíveis, e apresentam características de resistência a radiação ultravioleta e também a baixas condições de crescimento e desenvolvimento. Também se conclui que as bactérias identificadas apresentam alta eficiência na produção de biossurfactantes, e alto potencial de utilização para biorremediação. Como relatado acima, os microrganismos identificados em amostras de óleo diesel, biodiesel e suas misturas, apresentam sempre uma carga microbiológica diferente, visto que a contaminação microbiológica pode ocorrer devido a diversos fatores dentro da cadeia de produção e transporte dos combustíveis.

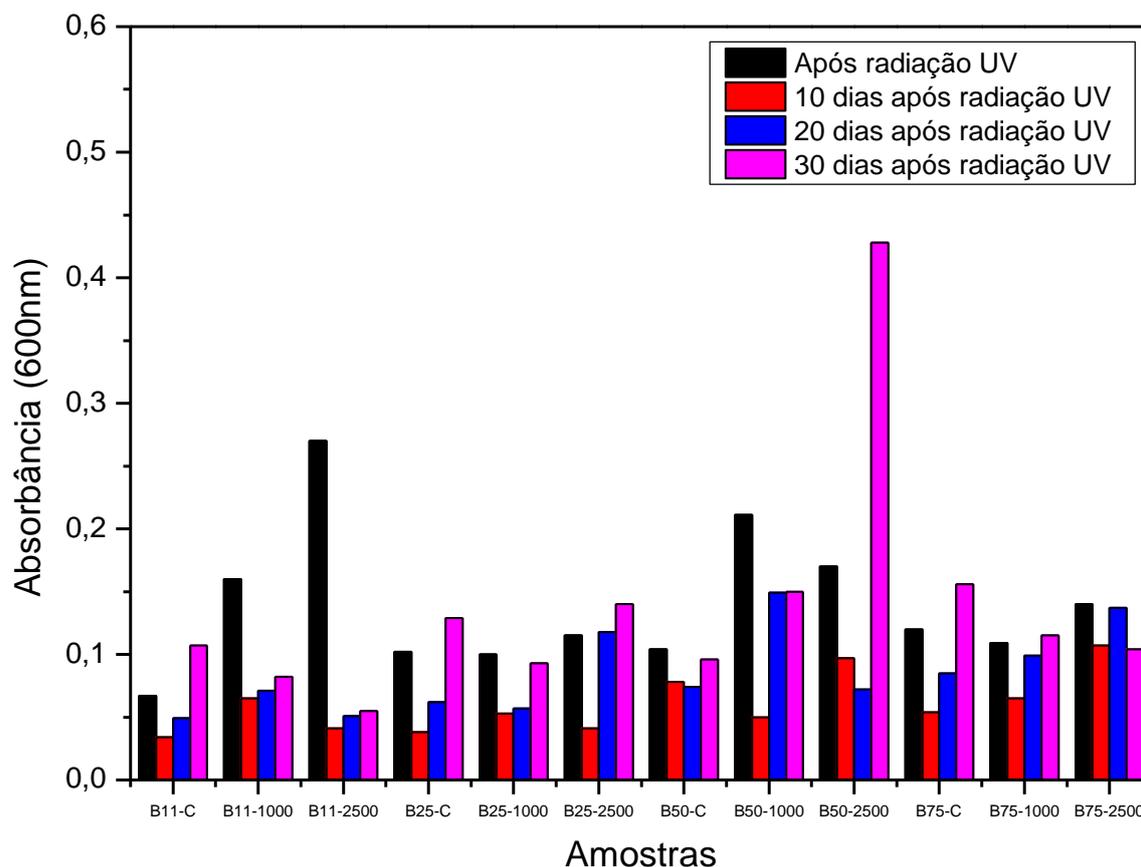
As contaminações por microrganismos muitas vezes são provenientes das diferentes matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel, ao qual dependendo da localidade de produção, fornecendo ao combustível diferentes

propriedades e sedimentos químicos, utilizados posteriormente como fonte de nutrientes, e também características como higroscopicidade, biodegradabilidade e poder de solvência, que auxiliam na facilidade de proliferação dos microrganismos (Hill e Hill, 2009; Jakeria *et al.* 2014; Neves *et al.* 2020).

5.2. Teste de estocagem do combustível após radiação ultravioleta

Após as amostras saírem do reator de radiação ultravioleta, ocorreu o acondicionamento novamente por um período de 10, 20 e 30 dias, para simular uma estocagem do combustível e realizar um monitoramento do crescimento de microrganismos presentes após o período de radiação ultravioleta. O Gráfico 9 relata a concentração das amostras em períodos de estocagem após a radiação ultravioleta.

Gráfico 9. Leitura de absorbância das amostras após 10, 20 e 30 dias estocadas.



Para as blendas B11 foi possível perceber que nos períodos de 10 e 20 dias os valores a absorbância se manteve abaixo do valor encontrado imediatamente após a radiação ultravioleta. Contudo após 30 dias do tratamento, na amostra B11-C houve um aumento da concentração de microrganismos em relação ao valor

depois da radiação ultravioleta, e nas outras duas amostras B11, mesmo ocorrendo este aumento, os valores se mantiveram abaixo do valor obtido após a radiação UV. Para o grupo de amostras da blenda B25, observa-se que em 30 dias as amostras B25-C e B25-2500 tiveram um aumento da concentração de microrganismos em relação aos valores após a radiação UV, sendo somente a amostra B25-1000 apresentando valores inferiores mesmo em 30 dias.

No grupo de blendas B50, as amostras B50-2500 em 30 dias teve valores bem superiores aos valores de concentração após a radiação UV. Para as outras amostras 10, 20 e 30 dias, mesmo tendo um aumento a concentração se manteve abaixo dos valores de concentração após a radiação UV. E nas blendas B75, as amostras B75-C e B75-1000 somente em 30 dias a concentração ficou acima dos valores após a radiação UV. Já na amostra B75-2500 mesmo depois de 30 dias de estocagem a concentração se manteve abaixo dos valores após a radiação UV.

Em linhas gerais, foi possível observar que após o tratamento com radiação ultravioleta, durante um período de 10 dias de estocagem o tratamento continuou apresentando efeitos no controle da concentração de microrganismos no combustível. No entanto, após este período (20 e 30 dias), mesmo algumas amostras mantendo os valores de concentração abaixo dos valores imediatamente após a radiação ultravioleta, as mesmas tiveram um aumento da concentração em relação ao período de 10 dias. Tal informação, também foi relatada no trabalho de Polinarski (2020), que em amostras avaliando teor de biodiesel (11 e 20%), teor de enxofre (S10 e S500) e teor de água (2500 e 10000 ppm) apresentou mesmo resultados em relação ao tempo de estocagem, onde após 10 dias de estocagem ocorreu um aumento da concentração de microrganismos em relação aos valores após a radiação ultravioleta. Sendo então recomendado um novo tratamento com radiação ultravioleta após este período de estocagem.

5.3. Caracterização físico-química

5.3.1. Temperatura das amostras

A Tabela 9 apresenta os valores de temperatura do reator de radiação ultravioleta durante o período de 360 minutos dos diferentes ensaios realizados.

Tabela 9. Valores de temperatura das amostras de combustíveis nos ensaios com radiação ultravioleta.

Amostras	Temperatura média do ensaio (°C)
B11	33.9 ± 1,62
B25	33.3 ± 1,55
B50	31.9 ± 2,67
B75	36.4 ± 1,69

A temperatura das amostras é um fator que contribui diretamente no crescimento de microrganismos, sendo a faixa de 20 a 40°C dada como ideal para o desenvolvimento dos microrganismos mesófilos, sendo este grupo de microrganismos a maioria dos presentes em combustíveis (Rodriguez-Rodriguez *et al.* 2010). Em relação aos microrganismos foi possível identificar a presença e o desenvolvimento de microrganismos em todos os ensaios devido as oscilações dos valores de absorvância, que representam o aumento ou decréscimo da presença desses microrganismos.

A temperatura não tem influência direta nas propriedades físico-químicas do combustível, entretanto o óleo diesel e biodiesel apresentam valores para ponto de fulgor de 38°C e 100°C respectivamente, sendo estes valores a menor temperatura onde ocorre o início da combustão quando na presença de chama. Para o ensaio com maior temperatura apresentada (B75) não chegou ao valor de ponto de fulgor dos combustíveis. Polinarski (2020) relatou que durante o tratamento com radiação ultravioleta com combustíveis B11 e B20 a temperatura do combustível durante o tratamento não afetou as propriedades físico-químicas.

5.3.2. Massa específica à 20°C

Realizou a análise de massa específica à 20°C das amostras antes e após a radiação ultravioleta, e todas as amostras apresentaram valores dentro dos estabelecidos pela normatização.

De acordo determinações específicas estabelecidas pela ANP, os valores de massa específica são determinados pela Resolução n° 50 (23/12/2013) para o óleo diesel de 817,8 a 865,0 kg.cm⁻³ e pela Resolução n° 45 (25/08/20214) para o biodiesel, de 850 a 900 kg.cm⁻³.

Na Tabela 10 é demonstrado os valores de massa específica para cada amostra, pode-se observar que mesmo em altas concentrações de biodiesel (75%) com adição do maior teor de água (2500ppm) não ocorreu alteração em relação aos valores determinados pela Resolução. A legislação determina valores de até 865,0 kg.cm⁻³ para óleo diesel e 900 kg.cm⁻³ para biodiesel, e na amostra com maior concentração de biodiesel e água o valor após a radiação atingiu 862 kg.cm⁻³. As amostras com maiores concentrações de biodiesel (50 e 75%) tiveram maiores valores de massa específica, contudo dentro dos valores máximos da normatização.

Tabela 10. Massa específica à 20°C das amostras de combustíveis nos ensaios antes e após o contato com radiação ultravioleta

Amostras	Massa específica à 20°C (kg.cm ⁻³)	
	Antes da radiação UV	Após a radiação UV
B11-C	0,832 ± 0	0,835 ± 0
B11-1000	0,834 ± 0	0,833 ± 0
B11-2500	0,835 ± 0	0,834 ± 0
B25-C	0,840 ± 0	0,840 ± 0
B25-1000	0,840 ± 0	0,840 ± 0
B25-2500	0,840 ± 0	0,842 ± 0
B50-C	0,850 ± 0	0,851 ± 0
B50-1000	0,850 ± 0	0,851 ± 0
B50-2500	0,848 ± 0	0,847 ± 0
B75-C	0,861 ± 0	0,861 ± 0
B75-1000	0,861 ± 0	0,861 ± 0
B75-2500	0,862 ± 0	0,862 ± 0

Neves *et al.* (2020) e Polinarski *et al.* (2021) também avaliaram a massa específica de amostras de combustível em contato com radiação ultravioleta, e não tiveram alterações significativas. Diante dos dados acima expostos foi possível concluir que as amostras não apresentaram alterações dos valores de massa específica determinados pela normatização, sendo assim pode-se afirmar que a radiação ultravioleta não ocasiona alteração na propriedade físico-química.

5.3.3. Viscosidade cinemática à 20°C

A viscosidade cinemática em combustíveis tem relação direta com o tempo que o combustível apresenta para escoar, e a alteração dessa propriedade afeta diretamente a automação e lubrificação do sistema de injeção.

A Resolução nº 50 de 23/12/2013 estabelece valores para uma viscosidade cinemática à 40°C de 1,9 – 4,1 (mm²/s), isto para um óleo diesel S10 com teor de biodiesel de 11%. Já para biodiesel puro, a resolução nº 45 de 25/08/2014 estabelece valores de 3,0 – 6,0 (mm²/s).

Na Tabela 11 estão apresentados os valores de viscosidade para todas as amostras antes e após a radiação ultravioleta. Pode-se observar que todas as amostras após a radiação ultravioleta permaneceram com valores dentro do estabelecido pela regulamentação, mesmo para as amostras com alto teor de biodiesel e água (B75-2500).

Tabela 11. Viscosidade cinemática à 20°C das amostras de combustíveis nos ensaios antes e após o contato com radiação ultravioleta

Amostras	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	
	Antes da radiação UV	Após a radiação UV
B11-C	2,8 ± 0,71	3,2 ± 0,00
B11-1000	2,8 ± 0,71	3,2 ± 0,00
B11-2500	2,8 ± 0,71	3,2 ± 0,00
B25-C	4,0 ± 0,00	3,2 ± 0,00
B25-1000	3,6 ± 0,71	3,6 ± 0,71
B25-2500	4,4 ± 0,71	3,2 ± 0,00
B50-C	4,8 ± 0,00	3,2 ± 0,00
B50-1000	5,2 ± 0,71	3,2 ± 0,00
B50-2500	4,8 ± 0,00	3,6 ± 0,00
B75-C	4,4 ± 0,71	3,2 ± 0,00
B75-1000	4,0 ± 0,00	3,6 ± 0,71
B75-2500	4,4 ± 0,71	4,0 ± 0,00

Para as amostras antes da radiação ultravioleta, foi possível observar que as amostras B25-2500, B50-C, B50-1000, B50-2500, B75-C e B75-2500 apresentaram valores superiores a regulamentação. Este aumento pode estar

relacionado com a adição de água nas amostras, visto que quando ocorre um acréscimo na concentração de água ocorre a formação de uma emulsão, sendo essa proveniente do aumento da viscosidade líquidos diferentes (Bastos, 2013; Ronchi, 2014; Neves, 2018). Também está relacionado com o aumento da concentração de biodiesel adicionados nestas amostras em específico. Para o biodiesel puro os valores de viscosidade cinemática são de 3,0 a 6,0 (mm²/s), e nestas amostras a mistura de biodiesel ao óleo diesel são de valores acima dos estabelecidos pela legislação, sendo assim, a viscosidade cinemática ainda está dentro dos valores estabelecido ao biodiesel puro.

Nos trabalhos de Neves *et al.* (2020) e Polinarski *et al.* (2022) não foi relatado alteração significativa para viscosidade cinemática após o período de radiação ultravioleta, sendo que ocorreu algumas alterações somente antes da radiação ultravioleta, provenientes principalmente pela adição de água e maiores teores de biodiesel. Entretanto, após os períodos de radiação ultravioleta os valores permaneceram dentro do regulamentado pela ANP.

5.3.4. Teor de água: Karl Fischer

O teor de água foi realizado utilizando o método de Karl Fischer, e analisada as amostras antes e após a radiação ultravioleta, com teor de água comercial, adição de 1000ppm e 2500ppm de água.

A regulamentação para propriedades físico-químicas dos combustíveis determina que para o óleo diesel S10 e biodiesel puro o teor de água permitido é de 200 (mg.Kg⁻¹) máximo. Na Tabela 12 estão relacionados os valores de teor de água nas amostras antes e após o contato com radiação ultravioleta.

Tabela 12. Teor de água: método de Karl Fischer das amostras de combustíveis nos ensaios antes e após o contato com radiação ultravioleta.

Amostras	Teor de água (ppm)	
	Antes da radiação ultravioleta	Após a radiação ultravioleta
B11-C	330,88 ± 20,36	396,05 ± 3,95
B11-1000	392,96 ± 30,61	375,92 ± 6,85
B11-2500	331,04 ± 9,54	370,94 ± 3,77
B25-C	486,85 ± 10,75	511,02 ± 14,28
B25-1000	505,56 ± 8,00	489,62 ± 15,79
B25-2500	526,57 ± 8,55	527,33 ± 25,49
B50-C	917,69 ± 6,95	869,33 ± 13,44
B50-1000	890,51 ± 68,21	874,03 ± 16,38
B50-2500	708,83 ± 16,55	676,52 ± 21,75
B75-C	1337,61 ± 14,48	1304,96 ± 16,60
B75-1000	1262,07 ± 6,19	1266,13 ± 20,06
B75-2500	1264,85 ± 4,29	1292,98 ± 12,25

Todas as amostras apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela normatização, isto está relacionado principalmente pela forma ao qual a alíquota de combustível foi coletada para realizar a análise de Karl Fischer.

Visto que, o combustível (óleo diesel e biodiesel) não são miscíveis com a água, não podendo determinar exatamente a quantidade de água presente no combustível quando retirado só uma alíquota para análise, já que ela pode estar no fundo dos tanques (lastro), microgota dispersas no combustível e até em uma interface óleo/água formando uma emulsão (Bento *et al.* 2016; Polinarski 2020; Polinarski *et al.* 2022; Neves *et al.* 2021).

Nas amostras sem a adição de água foi possível perceber que quanto maior o teor de biodiesel adicionado ao óleo diesel, maior o teor de água presente inicialmente, nos teores de 25, 50 e 75% de biodiesel, o teor de água foi de 486,85, 917,69 e 1337,61 respectivamente. Isso está relacionado com a alta higroscopicidade do biodiesel com a água, que é a capacidade de absorver água do combustível, levando a formação de depósitos no fundo dos tanques,

principalmente pelo desenvolvimento e crescimento microbiológico (Carvalho *et al.* 2016; Fu *et al.* 2016; Polinarski, 2020; Neves *et al.* 2020).

6. CONCLUSÃO

Pelos experimentos realizados foi possível observar que para uma estocagem de 10 dias antes da radiação ultravioleta as blendas sem adição de água apresentaram valores menores ou semelhantes na concentração de microrganismos. Quando houve a adição de água acima dos padrões da legislação (1000 ppm) em alguns teores de biodiesel (B11 e B25) ocasionou um acréscimo na concentração, quando comparado com as blendas com maiores teores de biodiesel (B50 e B75) o acréscimo de água não apresentou influência na concentração de microrganismos. Com isso, para baixos teores de biodiesel a presença de água influencia diretamente na concentração de microrganismos, contudo para altos teores de biodiesel essa influência aparece discretamente, não podendo ser correlacionada.

Já nos ensaios com a radiação ultravioleta todas as amostras apresentaram diminuição da concentração de microrganismos após 360 minutos de incidência. Sendo que para as amostras B11-C, B25-1000 e B50-C o percentual de redução foi superior a 80%, podendo concluir que a radiação ultravioleta tem efeito tanto em amostras sem água e com água, somente para a amostra B25-C que o percentual foi inferior a 50%.

Quando analisado os dados antes e após a radiação ultravioleta em relação a água adicionada, percebe-se que a adição de 1000 ppm foi a que apresentou maior influência na concentração inicial dos microrganismos, entretanto mesmo para estas amostras a diminuição da presença de microrganismos foi observada.

Para o processo de estocagem do combustível após a radiação ultravioleta foi possível concluir que o tratamento com a radiação apresenta ação por até 10 dias, sendo que nos períodos de 20 e 30 dias ocorreu aumento da concentração de microrganismos, sendo necessário uma nova incidência de radiação após este período.

Foi possível identificar diferentes microrganismos nas amostras de óleo diesel e biodiesel puro, tais como: *Solobacillus spp.*, *Exiguobacterium scetylicum* e *Pantoea spp.* Todas bacterias identificadas são relatadas em amostras de solo contaminado com petróleo, óleos vegetais, e também combustíveis. São microrganismos identificados como produtores de biossurfactantes, utilizados na

biorremediação e com alta eficiência na degradação de hidrocarbonetos provenientes dos combustíveis.

Para as análises físico-químicas, observou-se que a incidência de radiação ultravioleta por 360 minutos não ocasionou alterações nas propriedades físico-químicas estudadas neste trabalho, contudo ainda são necessários estudos de outras propriedades para validar que seja um processo que não altera a qualidade do combustível. Contudo, a adição de altos teores de água e biodiesel, acima da legislação, promoveram algumas alterações do combustível.

Diante do exposto, é possível concluir que o método de controle com radiação ultravioleta apresenta eficiência na diminuição e/ou eliminação de microrganismos presentes em blendas de óleo diesel/biodiesel. A presença de água acima dos limites estabelecidos pela legislação, em diferentes teores de biodiesel, favorece o desenvolvimento microbiológico nos combustíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDHAIDHAWI, M., CHIRIAC, R., BĂDESCU, V., DESCOMBES, G., & PODEVIN, P. **Investigation on the mixture formation, combustion characteristics and performance of a Diesel engine fueled with Diesel, Biodiesel B20 and hydrogen addition.** International Journal of Hydrogen Energy, 2017.

ALLSOPP, D. S. K.; SEAL, K. J.; GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; SHIRAKAWA, M. **Biodeterioração de materiais refinados e processados. Em: Introdução a Biodeterioração.** Editora da UFRGS, Porto Alegre. Ed. 1º, Cap. 3, p. 59-131, 2016.

ALMEIDA, F. C. G., SILVA, T. A. L., GARRARD, I., SARUBBO, L. A., CAMPOSTAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. **Optimization and Evaluation of Biosurfactant Produced by Pantoea sp. Using Pineapple Peel Residue, Vegetable Fat and Corn Steep Liquor.** J. Chem. Chem. Eng, v. 9, p. 269-279, 2015.

ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2020. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuario-estatistico/2019/2019-anuario-versao-impressao.pdf>. Acesso em 15 de maio de 2021.

ANTUNES, G. A., DOS SANTOS, H. S., DA SILVA, Y. P., SILVA, M. M., PIATNICKI, C. M., & SAMIOS, D. **Determination of iron, copper, zinc, aluminum, and chromium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry using a microemulsion preparation method.** Energy & Fuels, v. 31, n. 3, p. 2944-2950, 2017.

AOCS – American Oil Chemists' Society, Oil Stability Index (OSI) Revised, **AOCS Method Cd 12b-92**, 2013.

ASTM – American Society for Testing, materials – **ASTM e1259** – 10 Standard Practice for evaluation of antimicrobials in liquid fuels boiling below 390°C. ASTM International, 2010, West Conshohocken, PA. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

AZAMBUJA, A. O.; BUKER, F.; QUADROS, P. D.; ZHALININAK, K.; DIAS, R.; VACARO, B. B.; CORREA, C.; FERRÃO, M.; CAMARGO, F. A. O.; TRIPLET, E.; BENTO, F. M. **Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel**

of varying sulfur content, analysed by illumina Hi-Seg. Fuel, v. 189, p. 340 – 349, 2016.

AZAMBUJA, A. O.; CAZAROLLI, J. C.; TABELAS, P. D. DE; BUCKER, F.; CORREA, C.; CASAGRANDA, J. C.; FERRÃO, M. F.; CELIKKOL, S.; OGAWA, A.; BONIFAY, V.; SUNNER, J. A.; BEECH, I. B.; BENTO, F. M. **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.

BALOGH, T. S., VELASCO, M. V. R., PEDRIALI, C. A., KANEKO, T. M., & BABY, A. R. **Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

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

BATTISTELLI, A. A., DE SOUSA VIDAL, C. M., DE SOUZA, J. B., & CAVALLINI, G. S. **Tratamento Avançado de Efluente de Reator UASB por Membrana de Microfiltração Associado à Desinfecção por Radiação Ultravioleta.** Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 37, n. 1, p. 45-54, 2016.

BAUTISTA, L. F., VARGAS, C., GONZÁLEZ, N., MOLINA, M. C., SIMARRO, R., SALMERÓN, A., & MURILLO, Y. **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.

BELTRÃO, E. P. S. **Estudo do impacto do óleo diesel em solo do manguezal de vila velha- Itamaracá.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2005.

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., PERALBA, M. C. R., FERRÃO, M. F., ZIMMER, A. R., AZAMBUJA, A. O., BARBOSA, C. S., BUKER, F., CAZAROLLI, J. C., QUADROS, P. D. & BEKER, S. A. **Diagnostico, monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento**. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico – CDT, UnB, Cap. 5, p. 111 – 174, 2016.

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.

BENTO, F.M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., & FRANKENBERGER, W. T. **Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil**. *Microbiological Research*, v. 160, n. 3, p. 249–255, 2005.

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.; 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. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 30 de 23 de junho de 2016. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 45 de 25 de agosto 2014. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 50 de 23 de dezembro de 2013. Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 798 de 01 de agosto de 2019. Disponível em <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2019/agosto&item=ramp-798-2019>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

BRASIL. Conselho Nacional de Políticas Energéticas (CNPE). Resolução nº 4 de 09 de abril de 2021. Disponível em <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/conselhos-e-comites/cnpe/resolucoes-do-cnpe/arquivos/2021/Resol42021.pdf>. Acesso em 23 de junho de 2022.

BRASIL. Lei nº 13.263 de 23 de março de 2016. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/L13263.html. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

BRAUN, J. V., SANTOS, V. O. B., SILVA, M. W., ONGARATTO, D. P., & FONTOURA, L. A. M. **Avaliação da estabilidade oxidativa de blendas de biodieses 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.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. p. 140, 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., DE MOURA, T. M., DA CUNHA, M. E., DE QUADROS, P. D., BEKER, S. A., CAZAROLLI, J. C., & BENTO, F. M.. **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.

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.

CAI, B. ZHANG, B. CHEN, Z. ZHU, W. LIN, T CAO. **Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments.** Mar. Pollut. Bull., v. 86, p. 402-410, 2014.

CAI, B. ZHANG, B. CHEN, Z. ZHU, Y. ZHAO. **A novel bioemulsifier produced by Exiguobacterium sp. strain N4-1P isolated from petroleum hydrocarbon contaminated coastal sediment.** RSC Adv., v.7, p. 42699-42708, 2017-b.

CAI, X. YE, B. CHEN, B ZHANG. **Complete genome sequence of Exiguobacterium sp. strain N4-1P, a psychrophilic bioemulsifier producer isolated from a cold marine environment in North Atlantic Canada.** Genome Announc., v. 5, 2017-a.

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

CÁRDENAS, O. **Estudo comparativo da combustão de sebo bovino e diesel em fornalha calorimétrica flamotubular.** Tese. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, p. 89, 2011.

CARVALHO, A. L., CARDOSO, E. A., ROCHA, G. O., TEIXEIRA, L. S., PEPE, I. M., & GROSJEAN, D. M. **Carboxylic acid emissions from soybean biodiesel oxidation in the EN14112 (Rancimat) stability test.** Fuel, v. 173, p. 29-36, 2016.

Cazarolli, J. C. **Potencial deterigênico da microbiota nativa de biodiesel de soja (RS), Brasil.** Tese. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS, Porto Alegre, p. 234, 2019.

CAZAROLLI, J. C., BOELTER, G., DE LIMA, A. M., HENGLES, T., CORREA, C., PERALBA, M. C., ... & BENTO, F. M. **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, p. 2034-2045, 2018.

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., GUZATTO, R., SAMIOS, D., PERALBA, M. D. C. R., DE SIQUEIRA CAVALCANTI, E. H., & BENTO, F. M. **Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 95, p. 364-372, 2014.

CAZAROLLI, J. C., SILVA, T. L., DA CAMARA RIBAS, R. K., COSTA, L. D. F. X., DE MOURA, T., GALEAZZI, C. F. & BENTO, F. M. **Deterioration potential of *Aureobasidium pullulans* on biodiesel, diesel, and B20 blend.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 147, p. 104839, 2020.

CHAO, Y., LIU, N., ZHANG, T., & CHEN, S. **Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends.** Fuel, v. 89, n.1, p. 3358–3364, 2010.

CHEN, J., JIA, L., GUO, X., XIANG, L. & LOU, S. **Production of novel biodiesel from transesterification over KF---modified Ca---Al hydrotalcite catalyst.** Royal Society of Chemistry Advances, v. 4, p. 60025---60033, 2014.

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.

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

DELEGAN, Y., KOCHAROVSKAYA, Y., BOGUN, A., SIZOVA, A., SOLOMENTSEV, V., IMINOVA, L., ... & SOLYANIKOVA, I. **Characterization and genomic analysis of Exiguobacterium alkaliphilum B-3531D, an efficient crude oil degrading strain.** Biotechnology Reports, v. 32, 2021.

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.** International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece. 2011.

FATTAH, I. R., MASJUKI, H. H., KALAM, M. A., HAZRAT, M. A., MASUM, B. M., IMTENAN, S., & ASHRAFUL, A. M. **Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 30, p. 356-370, 2014.

FERREIRA, J. C. **Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina – PR, p. 162, 2015.

FOCKE, W. W., VAN DER WESTHUIZEN, I., & OOSTHUYSEN, X. **Biodiesel oxidative stability from Rancimat data.** Thermochemica Acta, v. 633, p. 116-121, 2016.

FONSECA, M. M. B., MINNICELLI, C. F., SILVA-PORTELA, R. D. C. B., DE FARIAS, M. F., DOS SANTOS, P. R. S., FERNANDES, G. J. T., & AGNEZ-LIMA, L. F. **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.

FU, J., TURN, S. Q., TAKUSHI, B. M., KAWAMATA, C. L. **Storage and oxidation stabilities of biodiesel derived from waste cooking oil.** Fuel, v. 167, p. 89-97, 2016.

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

GUTIÉRREZ-PRECIADO, A., VARGAS-CHÁVEZ, C., REYES-PRIETO, M., ORDOÑEZ, O. F., SANTOS-GARCÍA, D., ROSAS-PÉREZ, T., VALDIVIA-ANISTRO, J., REBOLLAR, E. A., SARALEGUI, A., MOYA, A., MERINO, E., FARÍAS, M. E., LATORRE, A., SOUZA, V. **The genomic sequence of Exiguobacterium chiriquicha str. N139 reveals a species that thrives in cold waters and extreme environmental conditions.** PeerJ, v. 5, p. e3162, 2017.

Hill, E. C.; Hill, G. C. **Estrategias for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesel.** The 11^o International Conference on Stability Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, 2009.

JAKERIA, M. R.; FAZAL, M. A.; HASEEB, A. S. M. A. **Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 30, 154–163, 2014.

KEBER, S. S. **Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com BTX (benzeno, tolueno e xileno).** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 76, 2020.

KNOTHE, G., & RAZON, L. F. **Biodiesel fuels**. Progress in Energy and Combustion Science, v. 58, p. 36-59, 2017.

KOZLOWSKI, L. S., DE MACEDO, K. S., BORBA, D. T. M., SOARES, R. B., ALVES, R. N., & ALVES, G. J. T. **Ação antioxidante de extratos dos frutos de palmeiras da região amazônica no biodiesel**. Revista de Empreendedorismo & Inovação, v. 1, p. 38 – 53, 2019.

LISIECKI, P., CHRZANOWSKI, Ł., SZULC, A., ŁAWNICZAK, Ł., BIAŁAS, W., DZIADAS, M., ... & JELEŃ, H. **Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms**. Fuel, v. 116, p. 321-327, 2014.

LOFTHUS, S., NETZER, R., LEWIN, A. S., HEGGESET, T. M., HAUGEN, T., & BRAKSTAD, O. G. **Biodegradation of n-alkanes on oil-seawater interfaces at different temperatures and microbial communities associated with the degradation**. Biodegradation, v. 29, n. 2, p. 141-157, 2018.

MAHMUDUL, H. M.; HAGOS, F. Y.; MAMAT, R.; ADAM, A. A.; ISHAK, W. F. W.; ALENEZI, R.. **Production, Characterization and Performance of Biodiesel as an Alternative Fuel in Diesel Engines: A Review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.72, p.497–509, 2017.

MALT, F. I. E., & SOUZA, C. B. D. **Tecnologia sustentável na produção de biodiesel**. Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade, v. 6, n. 13, p. 385-392, 2019.

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**. Dissertação de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, p. 91, 2018.

MARIANO^A, A. P., TOMASELLA, R. C., DE OLIVEIRA, L. M., CONTIERO, J., & DE ANGELIS, D. D. F. **Biodegradability of diesel and biodiesel blends**. African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 9, 2008.

MARIANO^B, A. P., BONOTTO, D. M, ANGELIS, D. F., PIRÔLLO, M. P. S. E CONTIERO, J. **Biodegradabilidade de óleos comerciais e degradados**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, p. 133-142, 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.

MEIRA, M., SANTANA, P. M. B., SILVA, D. S., CATARINO, F. B. S., BORGES, L. F. J., & MOREIRA, L. B. **Aditivos melhoradores da estabilidade oxidativa e corrosividade do biodiesel e da lubrificidade da suas misturas com diesel**. Revista Educação, Tecnologia e Cultura-ETC, v. 14, n. 14, 2016.

MIRANDA, E. L. **Óleo de gomado de grãos de soja sem defeitos e partidos para produção de biocombustível**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, p. 58, 2018.

MME – Ministério de Minas e Energia. Disponível em <https://www.udop.com.br/noticia/2019/11/07/biodiesel-abiove-setor-deve-produzir-20-mais-em-2020-para-atender-demanda.html>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

NEVES, A. C. **Avaliação da radiação ultravioleta na inativação de microrganismos presentes em óleo diesel**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, p. 68, 2018.

NEVES, A. C.; POLINARSKI, M. A. ; ROSADO, F. R. ; ROSADO, A. F. ; SILVA, E. A. ; ALVES, H. J. . **Effect of ultraviolet radiation on inactivation of microorganisms present in brazilian diesel fuel**. Biofuels, Bioproducts And Biorefining, v. 14, p. 1152-1162, 2020.

NYANGARESÍ, 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.

OH, S. Y., HEO, N. S., SHUKLA, S., KANG, S. M., LEE, I., LEE, H., ... & HUH, Y. S. **Multi-stress radioactive-tolerant Exiguobacterium acetylicum CR1 and its applicability to environmental cesium uptake bioremediation**. Journal of Cleaner Production, v. 205, p. 281-290, 2018.

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.

Ordoñez, O.F.; Lanzarottid, E.; Kurtha, D.; Gorritia, M.F.; Revalec, S.; Cortez, N.; Vazquez, M.P.; Farías, M.E.; AG, T. **Draft Genome Sequence of the Polyextremophilic Exiguobacterium sp. Strain S17, Isolated from Hyperarsenic Lakes in the Argentinian Puna. %J Genome Announcements.** Genome Announc. V. 1, p. 2037–2042, 2013.

OWSIANIAK, M., CHRZANOWSKI, Ł., SZULC, A., STANIEWSKI, J., OLSZANOWSKI, A., OLEJNIK-SCHMIDT, A. K., & HEIPIEPER, H. J. **Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type of blend and the addition of biosurfactants.** Bioresource technology, v. 100, n. 3, p. 1497-1500, 2009.

PASQUALINO, J. C., MONTANE, D., & SALVADO, J. **Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels.** Biomass and bioenergy, v. 30, n. 10, p. 874-879, 2006.

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

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

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.

PIZZOLANTE G, DURANTE M, RIZZO D, DI SALVO M, TREDICI SM, TUFARIELLO M, DE PAOLIS A, TALÀ A, MITA G, ALIFANO P, DE BENEDETTO

GE. **Characterization of two Pantoea strains isolated from extra-virgin olive oil.** *AMB Express*, v.10, n. 8, p.113, 2018.

POLINARSKI, M. A. **Influência dos teores de água e enxofre no controle microbiológico de combustíveis diesel bx utilizando radiação ultravioleta.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, p. 82, 2020.

POLINARSKI, M. A., NEVES, A. C., FIORINI, A., ROSADO, F. R., SILVA, E. A. ALVES, H. J. **Ultraviolet radiation as an antimicrobial treatment in Brazilian diesel oil: Effect of biodiesel, sulfur, and water contentes.** *Fuel*, v. 308, p. 122076, 2022

PONCZEK, M. **Degradação de compostos orgânicos voláteis em fase gasosa através da fotocatalise com luz UV, TiO₂ e TiO₂/Pt.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UNICAMP. Campinas, p. 165, 2014.

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

QUATRIN, P. M., COMIM, V. M., LOPES, L. Q. S., GÜNDEL, A., DE ALMEIDA VAUCHER, R., & SANTOS, R. C. V. **Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes in vitro de Pseudomonas aeruginosa.** *Disciplinarum Sciential*, v.16, n.2, pg. 191-203. 2016.

RAJASEKAR, A; BABU, T. G.; MARUTHAMUTHU, S.; PANDIAN, S. T. K.; MOHANAN, S.; PALANISWAMY, N. **Biodegradation and corrosion behaviour of Serratia marcescens ACE2 isolated from na Indian diesel-transporting pipeline.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 8, p. 1065-1074, 2007.

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.

RESTREPO-FLÓREZ, J. M., BASSI, A., REHMANN, L., & THOMPSON, M. R. **Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system.** *Bioresource technology*, v. 147, p. 456-463, 2013.

RIBEIRO, C. B., BURATTO, W. G., GUERI, M. V. D., SCABURI, G. R., & GONZELI, F. V. **Fermentação alcoólica do caldo da cana: parâmetros operacionais de resposta no processo.** Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental, v. 4, p. 465-472. 2015.

RODRIGUES, D.F. GORIS, J. VISHNIVETSKAYA, T. GILICHINSKY, D. THOMASHOW, M. F. TIEDJE, J. M. **Characterization of exiguobacterium isolates from the siberian permafrost. description of exiguobacterium sibiricum sp.** Extremophiles, v. 10, p. 285-294, 2006.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., RODRÍGUEZ, E., BLANCO, R., CORDERO, I., & SEGURA, D. **Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment.** Journal of Environmental Sciences, v. 22, n. 10, p. 1595-1601, 2010.

RONCHI, R. P. **Avaliação da eficiência do ultrassom no processo de separação de fases em água produzida e em emulsões sintéticas do tipo O/A.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Energia. Universidade Federal do Espírito Santos. P. 109, 2014.

SALGADO, B. G. A., GÓMEZ, P. J. H. & RESTREPO-FLORES, C. E. **Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío.** Revista Lasallista de Investigación, v. 9, n. 2, 2013.

SALUJA, R. K.; KUMAR, V.; SHAM, R. **Stability of biodiesel–A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 62, p. 866-881, 2016.

SANTOS, V. C. **Investigação e uso de sólidos baseados em compostos inorgânicos para a obtenção de ésteres metílicos a partir da catálise heterogênea de esterificação de ácidos graxos.** Tese. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, p. 96, 2014.

SELVAKUMAR, G S. KUNDU, P. JOSHI, et al. **Growth promotion of wheat seedlings by Exiguobacterium acetylicum 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas.** Indian J. Microbiol., v. 50, p. 50-56, 2010.

SHAHRIARET, M.; HAQUE, R.; KABIR, S.; DEWAN, I.; BHUYIAN, M. A. **Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains.** Stamford J Pharm Sci. vol. 4, p.53–57, 2011.

SØRENSEN, G., PEDERSEN, D. V., NØRGAARD, A. K., SØRENSEN, K. B., & NYGAARD, S. D. **Microbial growth studies in biodiesel blends.** Bioresource technology, v. 102, n. 8, p. 5259-5264, 2011.

SORIANO, A. U., MARTINS, L. F., DE ASSUMPÇÃO VENTURA, E. S., DE LANDA, F. H. T. G., DE ARAÚJO VALONI, É., FARIA, F. R. D., ... & DO CARMO, F. L. **Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 99, p. 102-114, 2015.

SOUZA, D. M. **Avaliação de extratos naturais na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel e antimicrobiana na fermentação alcoólica.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Toledo, PR, p. 109, 2019.

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.** Seminario: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 33, n. 2, p. 117-126, 2012.

SU, Z. WANG, S. YANG, S. YIN. Y. CAO, Y. LI, G. MA, T. **Genetic and Comparative Genome Analysis of Exiguobacterium aurantiacum SW-20, a Petroleum-Degrading Bacteria with Salt Tolerance and Heavy Metal-Tolerance Isolated from Produced Water of Changqing Oilfield, China.** Environmental Microbiologuy, v. 10. P. 66, 2021.

SUPRIYONO, H. S., KRISNANDI, Y. K., & GUNLAZUARDI, J. **Preparation and characterization of transparent conductive SnO₂-F thin film deposited by spray pyrolysis: relationship between loading level and some physical properties.** Procedia Environmental Sciences, v. 28, p. 242-251, 2015.

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.

VARÃO, L. H. R., SILVA, T. A. L., ZAMORA, H. D. Z., & PASQUINI, D. **Vantagens E Limitações Do Sebo Bovino Enquanto Matéria-Prima Para a Indústria Brasileira De Biodiesel.** *Holos*, v. 7, p. 39-54, 2017.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. **A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 71-83, 2017.

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

VISHNIVETSKAYA, T. A. KATHARIOU, S. TIEDJE. J. M. **Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography.** *Extremophiles*, v. 13, p. 541-555, 2009.

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.

YAAKOB, Z., ALI, E., ZAINAL, A., MOHAMAD, M., & TAKRIFF, M. S. **An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture.** *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, v. 21, n.1, 2014.

YANINA DELEGAN, YULIA KOCHAROVSKAYA, ALEXANDER BOGUN, ANGELIKA SIZOVA, VIKTOR SOLOMENTSEV, LEILA IMINOVA, NIKITA LYAKHOVCHENKO, ALINA ZINOVIEVA, MIKHAIL GOYANOV, INNA SOLYANIKOVA. **Characterization and genomic analysis of Exiguobacterium alkaliphilum B-3531D, an efficient crude oil degrading strain.** *Biotechnology Reports*, 32, 2021.

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. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiental, Porto Alegre – RS, p. 257, 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.