



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

**MONITORAMENTO E CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA DURANTE O ARMAZENAMENTO
SIMULADO DE MISTURAS DIESEL/BIODIESEL
COM USO DE BIOCIDA**

*A*driane Zimmer

Bióloga - ULBRA

Mestre em Biologia Animal- UFRGS

Porto Alegre, Março de 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

**MONITORAMENTO E CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA DURANTE O ARMAZENAMENTO
SIMULADO DE MISTURAS DIESEL/BIODIESEL
COM USO DE BIOCIDA**

Adriane Zimmer

Bióloga - ULBRA

Mestre em Biologia Animal- UFRGS

Tese apresentada como requisito para obtenção
do grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente pela Universidade Federal
do Grande do Sul

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, Março de 2014

Insisto na caminhada. O que não dá é pra ficar parado. Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os ventos contrários. É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim. O destino da felicidade, me foi traçado no berço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e fortalecer na concretização de mais um objetivo.

A professora Fátima Menezes Bento pela confiança, pelos ensinamentos, pela dedicação, incentivo, apoio e principalmente pela paciência, amizade e exemplo profissional.

Aos professores Marco Flores Ferrão, Tânia Mara Pizzolato, Eduardo Tondo, Eduardo Homem Siqueira Cavalcanti, Alexandre Arenzon, Christine Claire Gaylarde e Gelsa Edith Navarro Hidalgo por compartilharem seus conhecimentos para o desenvolvimento deste trabalho.

A Ipiranga Produtos de Petróleo pelo apoio e pelo fornecimento dos combustíveis para elaboração deste estudo. Em especial ao **Sr. Sergio Luiz Camacho Viscardi e Roberta Miranda** pelo apoio, pela confiança e pelos incentivos que permitiram o desenvolvimento de um trabalho com qualidade.

Aos amigos e professores **Georgina Bond-Buckup, Ludwig Buckup, Paula Araújo, Eduardo Perico, Eliane Fraga e Cláudio Vinícius Gastal** (*in memoriam*), pelo apoio incondicional, pela confiança, pelos conselhos, incentivo e pela amizade que foram fundamentais na minha caminhada até aqui.

Aos colegas do LAB-BIO, á Saionara e em especial, às colegas **Aline Oliboni e Angélica Tamborsky** pelo auxílio na elaboração dos experimentos e principalmente, pela responsabilidade e dedicação.

Às amigas Ester Lopes e Natália Canal que compartilharam dos momentos mais difíceis, de angústias, dúvidas, perdas e desabafos, e permaneceram ao meu lado, com palavras de conforto e muito incentivo.

A toda minha família e amigos e ao meu amor Jackson Mello que estiveram presentes nos momentos mais exaustivos deste trabalho, sempre com grande incentivo, dedicação, paciência e amor e que puderam compreender minha ausência no período de elaboração da tese.

Ao PPGMAA pela oportunidade de realização deste trabalho, em especial, aos professores do curso que demonstraram grande dedicação no auxílio de algumas dúvidas existentes ao longo do percurso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

**MONITORAMENTO E CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA DURANTE O ARMAZENAMENTO DE MISTURAS
DIESEL/BIODIESEL COM USO DE BIOCIDA**

RESUMO

Os sistemas de armazenamento de combustível podem apresentar vulnerabilidade à contaminação tanto química quanto microbiana, comprometendo a qualidade final do produto. Este trabalho teve como objetivo selecionar antimicrobianos para utilização no controle da contaminação microbiana de misturas diesel/biodiesel armazenadas e monitorar a degradação química deste combustível. Foram estudados dezoito diferentes produtos antimicrobianos indicados para utilização em combustíveis, quanto ao seu espectro de ação e dosagens contra diferentes grupos microbianos em diferentes tipos de misturas diesel/biodiesel, através de testes em laboratório e em campo. A degradação química da fase oleosa foi monitorada através de testes específicos para algumas características indicativas de qualidade e a análise da degradação microbiana foi acompanhada com espectrometria de infravermelho. Foi realizada a avaliação de um KIT comercial para a detecção de ATP por bioluminescência com a bactéria *Pseudomonas* e um inóculo não caracterizado (ASTM1259-10) em fase aquosa (meio mineral e água de drenagem de tanques de estocagem). A toxicidade da fase aquosa que esteve em contato com a mistura B10 e um aditivo selecionado foi avaliada com o uso das espécies *Lactuca sativa* L. (alface) e *Artemia salina* Leach (micro-crustáceo), durante 30 dias. Um aditivo contendo 50% de oxazolidina como ativo antimicrobiano em sua formulação foi considerado efetivo para o controle preventivo da contaminação microbiana em misturas B10. Porém outras formulações contendo, isotiazolonas ou morfolinás podem constituir uma boa opção para tratamentos corretivos. O kit para determinação do ATP por bioluminescência testado neste estudo, na forma como está projetado, não é adequado para estimar o grau de contaminação microbiana da fase aquosa proveniente de tanques de combustíveis. Os resultados de toxicidade mostram que tanto a água que esteve em contato com o combustível tratado (com o aditivo) e não tratado apresentaram toxicidade para os organismos estudados. Porém, a água que esteve em contato com o combustível tratado com o biocida mostrou alta toxicidade aguda para ambos os organismos-teste utilizados.

Palavras chave: Estabilidade ao armazenamento, mistura diesel/biodiesel, Contaminação microbiana, biocida.

MONITORING AND CONTROL OF MICROBIAL CONTAMINATION DURING STORAGE OF MIXTURES DIESEL / BIODIESEL WITH USE OF BIOCIDES

ABSTRACT

The fuel storage systems may present vulnerability to chemical as well as microbial contamination, compromising final product quality. This goal was to select antimicrobials for use in the control of microbial contamination of diesel/biodiesel blends stored and monitor aspects of chemical degradation of the fuel. 18 different antimicrobial products suitable for use in fuels, as their spectrum of activity against different microbial groups and dosages, in different types of diesel/biodiesel blends by means of laboratory tests and field were studied. The chemical degradation of the oil phase was monitored using specific tests for certain characteristics indicative of quality and analysis of microbial degradation was monitored with infrared spectrometry. The evaluation of a commercial kit for the ATP bioluminescence detection in aqueous phase with *Pseudomonas* and a uncharacterized inoculum (ASTM1259 -10) (mineral medium and natural bottom water from storage tanks) was performed. The toxicity of aqueous phase which was in contact with the B10 blend and selected additive was evaluated with the use of the species *Lactuca sativa* L. (Lettuce) and *Artemia salina* Leach (microcrustacean) for 30 days. An additive containing 50% oxazolidine as antimicrobial agent in its formulation was considered effective for preventive control of microbial mixtures B10. But other formulations containing isothiazolones or morpholines could be a good option for corrective treatment. The kit for determination of ATP bioluminescence tested in this study as designed it's inappropriate to estimate the degree of microbial contamination of the aqueous phase from the fuel tank. The toxicity results show that both the water that was in contact with the treated fuel (with additive) and untreated showed toxicity to studied organisms. However, the water that was in contact with the biocide treated fuel showed high acute toxicity to both test organisms used.

Keywords: Storage stability, biodiesel blends, microbial contamination, biocide.

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de tabelas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xii
Introdução	1
1. Capítulo I - Revisão Bibliográfica.....	5
1.1 Combustíveis fósseis- Óleo diesel.....	5
1.2 Biodiesel.....	6
1.2.1 Misturas Diesel/ biodiesel.....	7
1.2.2 Processo de produção do biodiesel.....	8
1.2.3 Especificações do biodiesel a nível nacional/internacional.....	9
1.2.4 Propriedades físicas e químicas do biodiesel e suas misturas.....	10
1.3 Estabilidade ao armazenamento.....	13
1.4 Processos degradativos de origem química.....	14
1.4.1 Degradação térmica.....	14
1.4.2 Degradação oxidativa.....	15
1.4.3 Degradação hidrolítica.....	16
1.5 Processos degradativos de origem biológica.....	17
1.6 Contaminação microbiana de combustíveis.....	17
1.6.1 Condições para o desenvolvimento microbiano em combustíveis.....	22
1.6.2 Colonização do combustível.....	26
1.6.3 Consequências da contaminação microbiana de combustíveis.....	27
1.7 Monitoramento da contaminação microbiana em combustível.....	28
1.7.1 Métodos de detecção da contaminação microbiana.....	29
1.7.1.1 Bioluminescência pelo ATP.....	32
1.7.1.2 Quantificação de biomassa microbiana através do método bioluminescência do ATP.....	33
1.7.2 Níveis de contaminação.....	35
1.8 Métodos de controle da contaminação microbiana em combustíveis.....	36
1.8.1 Métodos de controle físico.....	36
1.8.1.1 Drenagem e limpeza dos tanques.....	36
1.8.2 Métodos de controle químico.....	37
1.8.2.1 Biocidas para uso em combustíveis.....	37
1.8.2.2 Seleção de moléculas biocidas para uso em combustíveis.....	40
1.8.2.3 Desvantagens no uso de biocidas.....	41
1.9 Considerações ambientais.....	42
1.9.1 Testes Ecotoxicológicos ou Bioensaios.....	43
1.9.1.1 Teste de toxicidade aguda.....	43
1.9.1.2 Teste de toxicidade crônica.....	44
1.9.2 Organismos-teste.....	45
1.9.2.1 Testes de toxicidade com <i>Artemia salina</i> Leach.....	45
1.9.2.2 Testes de Toxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i>	46
1.9.3 Toxicologia do óleo diesel, biodiesel e misturas.....	46
1.10 Referências bibliográficas.....	50

2. Capítulo II - Seleção de antimicrobianos para uso em misturas diesel/ biodiesel.....	76
Resumo.....	77
2.1 Introdução.....	78
2.2 Materiais e métodos.....	80
2.2.1 Seleção de biocidas – ensaios de susceptibilidade.....	80
2.2.1.1 Avaliação da CMI e CMB.....	80
2.2.1.2 Microrganismos.....	80
2.2.1.3 Preparação dos Inóculos.....	80
2.2.1.4 Preparo da Solução estoque do biocida.....	81
2.2.1.5 Preparação do CMI.....	81
2.2.1.6 Determinação de CMI e CMB.....	83
2.2.2 Seleção de biocidas - Ensaios de efetividade.....	83
2.2.2.1 Delineamento experimental.....	82
2.2.2.2 Frascos experimentais.....	82
2.2.2.3 Combustível.....	84
2.2.2.4 Biocidas.....	84
2.2.2.5 Níveis de contaminação.....	84
2.2.2.6 Controles.....	84
2.2.3 Análises.....	85
2.2.3.1 Fase oleosa.....	85
2.2.3.2 Fase aquosa.....	85
2.2.3.3 Interface.....	86
2.2.4 Análise estatística.....	86
2.3 Resultados e discussão.....	86
2.3.1 Seleção de moléculas – CMI/CMB.....	86
2.3.2. Efetividade das moléculas.....	91
2.3.2.1. Etapa 1- sistema óleo/ água 1:1; fase oleosa composta por biodiesel B100 ou mistura B5.....	91
2.3.3 Situação 2: sistema óleo/água 3:1(60ml:20ml); fase oleosa mistura B10.....	94
2.3.3.1 Aspectos físicos.....	94
2.3.3.2. Análises da fase aquosa.....	96
2.3.3.3.Tempo de morte.....	96
2.3.4 Efetividade do biocida no sistema óleo água.....	97
2.4 Considerações finais	104
2.5 Conclusões.....	105
2.6 Referências bibliográficas.....	107
3. Capítulo III - Monitoramento da eficácia de produtos antimicrobianos durante armazenamento simulado de diesel (b0), biodiesel (b100) e misturas (B7 e B10) em escala laboratorial.....	113
Resumo.....	114
3.1 Introdução.....	115
3.2 Materiais e métodos.....	117
3.2.1 Microcosmos.....	117
3.2.2 Combustíveis.....	117
3.2.3 Antimicrobianos.....	117
3.2.4 Inóculo.....	119

3.2.4.1 Níveis de contaminação microbiana.....	119
3.2.5 Análises.....	119
3.2.5.1 Fase combustível.....	119
3.2.5.2 Fase aquosa.....	120
3.2.5.3 Interface.....	120
3.3 Resultados e Discussão.....	121
3.3.1 Tipo e tempo de ação e duração de preservação.....	121
3.3.1.1 Meio Mineral.....	122
3.3.1.2 Água de drenagem.....	124
3.3.2 Efeito do produto antimicrobiano no desenvolvimento microbiano.....	126
3.3.3 HATR espectros FTIR.....	133
3.4 Conclusões.....	136
3.5 Referências bibliográficas.....	138
4. Capítulo IV - Monitoramento da atividade antimicrobiana de um aditivo multifuncional na mistura diesel/biodiesel (B10) em condições de armazenamento simulado – escala de campo.....	143
Resumo.....	144
4.1 Introdução.....	145
4.2 Materiais e métodos.....	146
4.2.1 Delineamento experimental.....	146
4.2.2 Análises.....	146
4.2.3 Combustível.....	147
4.2.4 Biocida.....	147
4.2.5 Inóculo microbiano.....	148
4.2.6 Níveis de contaminação.....	149
4.2.7 Temperatura interna dos tanques.....	149
4.2.8. Estimativa direta dos microrganismos.....	149
4.2.9. Biomassa.....	149
4.2.10 Análise Estatística.....	149
4.3 Resultados e Discussão.....	150
4.3.1 Estimativa do Desenvolvimento microbiano – UFC.....	150
4.3.2 Formação de biomassa.....	151
4.3.3 Análise dos parâmetros químicos.....	155
4.3.3.1 Temperatura, ph e umidade.....	155
4.3.3.2 Estabilidade química.....	155
4.4 Considerações finais.....	162
4.5 Conclusões.....	163
4.6 Referências Bibliográficas.....	164
5 Capítulo V - Avaliação da viabilidade de uso de um teste de bioluminescência do ATP para estimativa da Contaminação microbiana de combustíveis.....	168
Resumo.....	179
5.1 Introdução.....	170
5.2 Materiais e métodos.....	172
5.2.1 Teste de bioluminescência do ATP.....	172
5.2.1.1 Kit comercial para avaliação do teste do ATP.....	173
5.2.1.2 Ensaio de bioluminescência.....	174
5.2.1.3 Determinação de UFC/mL.....	175

5.2.2 Validação do teste do ATP em cultura de <i>Pseudomonas sp.</i>	175
5.2.2.1 Pré inóculo.....	176
5.2.2.2 Inóculo.....	176
5.2.3 Cultura mista em diferentes fases aquosas (matrizes).....	176
5.2.3.1 Inóculo não caracterizado.....	177
5.2.3.2 Água ultrapura com a mistura B10.....	177
5.2.3.3 Água de drenagem de tanques de armazenamento.....	177
5.2.4 Análise Estatística.....	178
5.3 Resultados.....	178
5.3.1 Detecção do ATP com cultura pura de <i>Pseudomonas sp.</i>	178
5.3.2. Diluições de um inóculo não caracterizado em água ultrapura.....	180
5.3.3 Diluições de um inóculo não caracterizado em água ultra pura em contato com combustível por 30 dias.....	182
5.3.4 Correlação entre ATP/UFC.....	183
5.3.5 Coeficientes de Variação (CV).....	185
5.4 Conclusões.....	187
5.5 Referências bibliográficas.....	189
6. Capítulo VI - Toxicidade de uma fase aquosa de armazenamento simulado com a mistura B10, tratada com um antimicrobiano (MBO 50%)	193
Resumo.....	194
6.1 Introdução.....	195
6.2 Materiais e Métodos.....	196
6.2.1 Análises de ecotoxicidade.....	197
6.2.1.1 Bioensaio de imobilidade da <i>A. salina</i>	197
6.2.1.2 Bioensaio de germinação de Sementes.....	198
6.2.3 Análise Estatística.....	202
6.3 Resultados.....	202
6.3.1 Teste de toxicidade frente a <i>A. salina</i>	202
6.3.2 Bioensaio de germinação Sementes com <i>L. sativa</i>	203
6.4 Discussão.....	205
6.5 Conclusões.....	207
6.6 Referências bibliográficas.....	209
7. Capítulo VII – Conclusões e considerações finais.....	214
7.1 Conclusões.....	215
7.2 Considerações Finais.....	217
7.3 Sugestões para trabalhos futuros.....	225
Anexos.....	226
Vita.....	240

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Conseqüências do desenvolvimento microbiano em combustíveis.....	28
Tabela 2.1 Principais grupos de antimicrobianos avaliados, princípios ativos e as designações utilizadas neste estudo.....	82
Tabela 2.2 Condições gerais do experimento de efetividade do biocida.....	83
Tabela 2.3 Formulações de antimicrobianos, princípios ativos e concentrações avaliados nas duas etapas do estudo.....	85
Tabela 2.4 Comparação entre as CMI dos biocidas testados sobre os microrganismos isolados e do consórcio não caracterizado.....	88
Tabela 2.5 Comparação entre as CMB dos biocidas testados sobre os microrganismos isolados e do consórcio não caracterizado.....	88
Tabela 2.6 Concentrações das formulações de antimicrobianos (ppm) na fase combustível (B100 e B5), estudadas em condição de armazenamento simulado em sistema óleo/ água contaminados com inóculo não caracterizado.....	92
Tabela 2.7 Avaliação do tempo de morte para os microrganismos em sistema bifásico água/óleo tratado com antimicrobiano.....	97
Tabela 3.1 Produtos antimicrobianos avaliados.....	118
Tabela 3.2 Tempo (dias) para o controle do desenvolvimento microbiano na fase aquosa (meio mineral) com MBO e MIT/CMIT nas concentrações de 400 e 1000 ppm.....	122
Tabela 3.3 Tempo (dias) para o controle do desenvolvimento microbiano na fase aquosa (água de drenagem) com MBO e MIT/CMIT nas concentrações de 400 e 1000 ppm.....	124
Tabela 3.4 Porcentagem de redução da biomassa formada entre o tratamento controle e tratamento com baixa contaminação.....	127
Tabela 3.5 Porcentagem de redução da biomassa formada entre o tratamento controle e tratamento com alta contaminação.....	127
Tabela 3.6 Aspecto do microcosmo com B0 tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.....	131
Tabela 3.7 Aspecto do microcosmo com B7 tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.....	131
Tabela 3.8 Aspecto do microcosmo com B10 tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.....	132
Tabela 3.9 Aspecto do microcosmo com B100 tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.....	132
Tabela 5.1 Valores dos coeficientes de correlação e variação obtidos nos ensaios ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.....	183
Tabela 6.1 Parâmetros medidos e os índices de toxicidade para bioensaio com <i>L. sativa</i> L.....	204
Tabela 7.1 Quadro comparativo entre os experimentos de laboratório e campo.....	217

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Diferentes formas que a água pode ser encontrada nos tanques de armazenamento de diesel B (adição de biodiesel).....	23
Figura 2.1 Aspecto da emulsão na interface (setas) em B100 após a adição do antimicrobiano Q.....	93
Figura 2.2 Aspecto da turbidez da mistura B10 após a adição dos biocidas designados D, E, F e G. 1a. aspecto do produto (Biocida) puro; 1b. Mistura B10 após 1 hora de contato com o biocida; 1c. Mistura B10 após 35 dias de contato com o biocida.....	95
Figura 2.3 Aspecto da solubilidade dos biocidas em mistura B10, uma hora após a aplicação dos biocidas. D, E, F e G. As setas mostram a formação de gotículas depositadas no fundo, mesmo após homogeneização (seta).....	95
Figura 2.4 Valores do peso seco (mg/L) da biomassa formada na interface óleo/água após 35 dias de estocagem simulada com alta e baixa contaminação CT. Controle; P. formulação P ; D. formulação D ; E. formulação E ; F. formulação F ; G. formulação G	98
Figura 2.5. Valores do peso seco em porcentagem de biomassa formada, após 35 dias nos tratamentos com biocidas testados em relação ao tratamento controle, sem biocida. CT. Controle; P. formulação P ; D. formulação D ; E. formulação E ; F. formulação F ; G. formulação G	99
Figura 3.1 Valores de biomassa formada após 7 e 60 dias em B0, B7, B10 e B100 com diferentes níveis de contaminação microbiana (como recebido, média e alta), com 400 e 1000 ppm do antimicrobiano AMMBO50%	128
Figura 3.2 Valores de biomassa formada após 7 e 60 dias em B0, B7, B10 e B100 com diferentes níveis de contaminação microbiana (como recebido, média e alta), com 400 e 1000 ppm do antimicrobiano MIT/CMIT	129
Figura 3.3 Porcentagem de redução da biomassa formada nos frascos experimentais com meio mineral como fase aquosa após 60 dias entre o controle (sem biocida) e o combustível tratado com 400 ppm do antimicrobiano MBO e MIT/CMIT	130
Figura 3.4 Espectros HATR-FTIR para mistura B10 (400 ppm do antimicrobiano MBO e meio mineral).....	133
Figura 3.5 Dendrograma do espectro B10 (T0: zero dias -vermelho, T1: 7 dias-verde, T2: 14 dias-azul, T3: 28 dias-azul claro e T4:60 dias-laranja).....	134
Figura 3.6 Porcentagem de degradação da mistura B10 tratada com 400 ppm do antimicrobiano MBO em meio mineral após 60 dias.....	134
Figura 4.1 Delineamento experimental. A, Tanques experimentais; B, Posicionamento do termômetro no interior dos tanques; C, Representação esquemática da montagem dos tanques experimentais.....	148
Figura 4.2 Monitoramento do crescimento microbiano na fase aquosa de mistura B10 em condição de armazenamento simulado, com e sem aditivo na condição de alta contaminação (10^7 UFC.L ⁻¹).....	150
Figura 4.3 Monitoramento do crescimento microbiano na fase aquosa de mistura B10 em condição de armazenamento simulado, com e sem aditivo na condição de baixa contaminação (10^3 UFC.L ⁻¹).....	151
Figura 4.4 Valores de peso seco médio da biomassa (g/L) formada nos tanques	152

com a mistura B10 após 90 dias de armazenamento simulado.....	
Figura 4.5 Aspecto da biomassa formada e aderida no fundo dos tanques após 90 dias (A: B10 contaminado sem aditivo; B: B10 recebido sem aditivo; C: B10 contaminado com aditivo; D: B10 recebido com aditivo)	153
Figura 4.6 Parâmetros químicos monitorados no tempo (T0) e após 90 dias. Tanques 1 a 4 sem aditivo (1 e 2 contaminados); tanques 5 a 8 com aditivo (5 e 6 contaminado). A linha pontilhada (...) informa o limite máximo do parâmetro analisado de acordo com a ANP.....	156
Figura 4.7 Aspecto da superfície dos tanques e a presença de borra (biológica/química). A, Tanque no tempo zero antes da adição do combustível; C tanque que recebeu combustível não tratado com AMMBO50% após 90 dias com alta contaminação microbiana a seta indica área onde houve a instalação de biofilme; D, borra química formada dias. Tanques 1 a 4 sem aditivo (1 e 2 contaminados); tanques 5 a 8 com aditivo (5 e 6 contaminado). A linha pontilhada (...) informa o limite máximo do parâmetro analisado de acordo com a ANP.....	161
Figura 5.1 Etapas utilizadas no delineamento experimental.....	175
Figura 5.2 Valores de RLU e UFC/mL (Log_{10}) obtidos para as diluições de uma cultura pura de <i>Pseudomonas sp.</i> em solução salina (A) e em água ultra pura (B).....	179
Figura 5.3 Distribuição dos valores de RLU em função do valores de UFC/mL obtidos através das leituras de uma cultura pura de <i>Pseudomonas sp.</i> em solução salina.....	180
Figura 5.4 Distribuição dos valores de RLU em função do valores de UFC/mL obtidos através das leituras de uma cultura pura de <i>Pseudomonas sp.</i> em água ultra pura	180
Figura 5.5. Valores de RLU e UFC (log_{10}) obtidos para as diluições em água ultra pura com inóculo não caracterizado	181
Figura 5.6 Distribuição dos valores de RLU em função do valores de UFC/mL obtidos através das leituras de diluições de um inóculo não caracterizado.....	181
Figura 5.7. Valores de RLU (log^{10}) obtidos para as leituras de diluições em água ultra pura com inóculo não caracterizado.....	182
Figura 6.1 Mortalidade de <i>A. salina</i> exposta a uma fase aquosa em contato com combustível tratado com o aditivo com biocida. Controle: água ultrapura salinizada (35g.L^{-1}) sem contato combustível ou biocida); A - água ultrapura e combustível não tratado; B - água ultrapura e combustível tratado com 0,05% de aditivo; C - água ultrapura e combustível tratado com 0,1% de biocida.....	203

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOM	Active Oxygen Method
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Adenosina Trifosfato
BPD	European Biocidal Products Directive
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
BTEX	benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
Bx	Misturas diesel/ biodiesel
CE ₅₀	Concentração efetiva mediana
CEN	Comité Européen de Normalisation
CIM	Corrosão Influenciada por Microrganismos
CL ₅₀	Concentração letal média
CMB	Concentração mínima biocida
CMI	Concentração Mínima Inibitória .
CMIT	5 - cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona
CNPE	Conselho Nacional De Política Energética
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional Do Meio Ambiente
CONSEMA	Conselho Estadual Do Meio Ambiente
CTN	Confederação Nacional Do Transporte
CV	Coeficiente de variação
DGGE	Desnaturing gradient gel electrophoresis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTGS	Sulfato Triglicina deuterado
EPA	Agencia de Proteção Ambiental
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FSA	Fração solúvel em água
FT	Fator de toxicidade
FTIR	Espectrometria de Infravermelho Transformada de Fourier
H ₂ S	Ácido sulfídrico

HATR	Reflectância total atenuada horizontal
HCl	Ácido clorídrico
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IATA	International Air Transport Association
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IP	Instituto do Petróleo
IPBC	Iodo propinil butil carbamato
ISO	International Organization for Standardization Kg – quilogramas
ITS 2	Regiões inter-espaçadora eucariotos (5,8S –28S)
KOH	Hidróxido de potássio
Kp	Coeficiente de partição
LSD	Low sulphur diesel
MBO	3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine
MEV	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)
mg	miligramas
MIT	-2-metil-4-isotiazolin-3-ona
mL	mililitros
mm ² /s	milímetros quadrados por segundo
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
N	Nitrogênio elementar
NBR	Normas Brasileiras
NH ₃	Amônia
NMP	Número mais provável
NOx	Oxidos de nitrogênio
O	Oxigênio elementar nascente
O ₂	Oxigênio molecular
OSI	Oil Stability Instrument
P-DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada
pH	Potencial hidrogeniônico
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
rDNA	DNA ribossomal
RLU	Unidades relativas de luz
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
Rrna	Ácido ribonucléico ribossomal

S	Enxofre elementar
SGS	Societe Generale de Surveillance
SINDICOM	Sindicato das distribuidoras de combustíveis
TCMTB	2-(Thiocyanomethylthio) benzothiazole
TDS	total de sólidos dissolvidos
UFC	Unidades formadoras de colônia
VOCS	Compostos orgânicos voláteis
ZnSe	Seleneto de zinco cristal

INTRODUÇÃO

O óleo diesel é o derivado de petróleo mais utilizado no Brasil, sendo responsável pela movimentação de todo o transporte de cargas e passageiros no país, geradores e máquinas de grande porte na agricultura e na indústria. A atual preocupação mundial com o esgotamento das reservas de petróleo e com os impactos do uso de combustíveis fósseis no meio ambiente tem impulsionado a busca por combustíveis alternativos. Os biocombustíveis, como são chamados os combustíveis provenientes de fontes renováveis, como o etanol e o biodiesel, apresentam grande potencial de substituição dos não renováveis, pois podem ser obtidos a partir de uma infinidade de matérias primas e de resíduos derivados de fontes animais ou vegetais. O etanol, produzido a partir da cana de açúcar (no Brasil) é geralmente utilizado em mistura com a gasolina, mas também pode ser adicionado ao óleo diesel (E-diesel). O biodiesel é produzido através da transesterificação metílica de óleos e gorduras e pode ser misturado ao óleo diesel em qualquer proporção. A utilização destas misturas gera ganhos ambientais, principalmente no que se refere a redução das emissões e redução dos conteúdos de chumbo e enxofre dos combustíveis.

No Brasil, atualmente a adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel é obrigatória. Embora o país seja considerado um dos maiores produtores mundiais de biodiesel, o aumento na proporção ainda está condicionado a desafios de ordem técnica, relacionados à matéria prima, processos de produção e estabilidade ao armazenamento.

O biodiesel apresenta baixa estabilidade ao armazenamento, principalmente aqueles com maior percentual de ácidos graxos insaturados em sua composição, como o biodiesel derivado da soja, principal matéria prima empregada no Brasil. A estabilidade química pode ser afetada por diversos fatores como exposição a luz, ar, metais e microrganismos. No entanto, sua exposição à alta temperatura e umidade, características do clima tropical brasileiro são os fatores que mais agravam este problema. Estas condições aceleram as reações que alteram suas propriedades químicas, promovendo a formação de gomas e compostos poliméricos indesejáveis e levando a um aumento da viscosidade e acidez do biodiesel. Desta forma o produto final perde

qualidade e pode ainda sair das especificações, perdendo seu valor comercial.

A contaminação microbiana durante o armazenamento pode acelerar os processos de degradação oxidativa sofrida pelo combustível estocado. A contaminação microbiana durante a estocagem do óleo diesel tem sido percebida e estudada por longos anos, porém com a introdução do biodiesel, uma maior suscetibilidade da nova mistura à contaminação microbiana foi constatada. Como consequências são observadas perdas consideráveis para produtores, revendedores e usuários finais devido ao comprometimento da qualidade final do produto. Uma das características e vantagem do biodiesel em relação ao óleo diesel é a biodegradabilidade. Em termos de impacto ambiental, a biodegradabilidade é uma vantagem, mas já é reconhecida pela comunidade científica como uma vulnerabilidade à contaminação microbiana durante o armazenamento.

Como uma forma de controle dos processos de degradação biológica, tem sido proposto o uso de antimicrobianos (biocidas), que são compostos químicos que tem como finalidade controlar e/ou erradicar o desenvolvimento microbiano. Porém, a eficácia destas moléculas antimicrobianas ainda não são conhecidas para utilização em combustíveis e biocombustíveis, gerando muitas dúvidas para o setor do petróleo e aos órgãos legisladores no Brasil. Questões como qual o biocida é o mais indicado, quais concentrações devem ser utilizadas, qual a fase a se tratar (fase oleosa, interface ou a fase aquosa), qual o tempo de preservação do combustível pelo biocida e quais os riscos ambientais envolvido ainda carecem de respostas. Neste sentido, são necessárias medidas rígidas que visem a manutenção do produto durante o armazenamento, com novas técnicas de monitoramento e prevenção da deterioração tanto do biodiesel quanto das misturas com óleo diesel.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar produtos antimicrobianos para o controle químico do desenvolvimento microbiano em misturas diesel/biodiesel armazenadas. Os objetivos específicos foram (A) determinar através de testes em meio de cultura a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima biocida (CMB) de antimicrobianos indicados para uso em misturas diesel/biodiesel; (B) avaliar a efetividade e concentrações de uso dos produtos antimicrobianos selecionados para controle do desenvolvimento microbiano em

misturas diesel/biodiesel em condições de armazenamento simulado (escala laboratorial); (C) avaliar a efetividade e concentração de uso do produto antimicrobiano selecionado para controle do desenvolvimento microbiano em misturas diesel/biodiesel em tanques de 20L (escala piloto); (D) avaliar metodologia de monitoramento e detecção da contaminação microbiana em fase aquosa baseada na técnica de bioluminescência. (E) avaliar a toxicidade aguda da fase aquosa em condições de armazenamento simulado de mistura B10 tratada com produto antimicrobiano através de testes ecotoxicológicos.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Combustíveis fósseis – Óleo diesel

O óleo diesel é um produto obtido através da destilação fracionada do petróleo na faixa de 270 a 350°C. É constituído genericamente por hidrocarbonetos com cadeias que variam de 8 a 38 átomos de carbono, onde aproximadamente 40% são de n-alcenos, 39% de iso e cicloalcenos, 25% de hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos (HPAs) e frações de isoproprenóides acíclicos (fitano; pristano) (Gaylarde et al., 1999; Fingas 2001; Speight, 2008; Petrobras, 2009). Em função da demanda do mercado nacional e internacional e da utilização do combustível, algumas frações de nafta ou querosene podem compor o diesel comercial, fazendo com que a sua densidade final seja alterada para mais leve ou mais pesada (Speight, 2008). O óleo diesel pode conter ainda diversos aditivos na sua composição final, tais como inibidores de corrosão, surfactantes e aditivos para melhorar a estabilidade e a ignição (Lee et al., 1992; Gaylarde et al., 1999). Mas, sua composição específica dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação (Lee et al., 1992; Fingas, 2001; Bento et al., 2006; Silva, 2010).

No Brasil o óleo diesel é utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas (ANP, 2010). Isto faz dele o principal combustível comercializado no mercado brasileiro com vendas na ordem de 55,9 milhões de m³ em 2012. É também o combustível mais produzido no País, tendo em 2012 uma produção na ordem de 45,5 milhões m³ (ANP, 2013).

Apesar de bastante eficiente, o diesel é uma das fontes de energia mais poluentes, pois sua queima produz compostos como o monóxido de carbono (CO), que tem impactos significativos sobre o meio ambiente e a saúde humana (ANP, 2010). O teor de enxofre (S) é hoje um dos principais problemas do diesel e por este motivo, órgãos reguladores ambientais vêm exigindo em diversos países a diminuição da concentração de enxofre no diesel visando a redução das emissões (Vargas, 2012). Em países como o Japão, por exemplo, o teor máximo

de enxofre permitido no diesel é de 10 mg/kg e em países da União Européia, desde 2005, todo o diesel comercializado tem concentração máxima de 7 mg/kg, já nos Estados Unidos, atualmente, o padrão é de 15 mg/kg. No Brasil, até 1994, o diesel possuía 13.000 mg/kg (CTN, 2011). Em 2005, o diesel comercializado no interior passou a ter 1.800 mg/kg (S1800) e o metropolitano (usado nas regiões com frotas maiores), no máximo, 500 mg/kg (S500). A partir de 2009, algumas regiões metropolitanas passaram a utilizar o diesel com 50 mg/kg (S50) (SINDICOM, 2010) e em 2013, para atender ao Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE - resolução CONAMA 403/2008 e 415/2009) o diesel S10, com no máximo 10 mg/kg de enxofre, substituiu integralmente o diesel S50. Em 2014, a previsão é de que o diesel S1800 seja substituído integralmente pelo diesel S500 (ANP, 2011).

Atualmente existem dois tipos de óleo diesel comercializados no país, o óleo diesel marítimo e o rodoviário. Desde 2005, o óleo diesel rodoviário vem recebendo a adição de biodiesel sendo que a mistura atual é de 5%. Todas estas mudanças na composição exigiram algumas alterações nas especificações do óleo diesel. A Resolução N° 50, de 23 de dezembro de 2013 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), resume no regulamento técnico 04/2013 (Anexo 1) as especificações de qualidade para todo o óleo diesel rodoviário comercializado em território brasileiro. De acordo com o artigo 2º desta Resolução, o óleo diesel rodoviário é classificado como tipo A (sem adição de biodiesel) ou tipo B (com adição de biodiesel). Assim, a designação de óleo diesel A, corresponde ao óleo diesel (puro, de origem fóssil, **B0**); óleo diesel B às misturas de óleo diesel e biodiesel (**misturas Bx**), o biodiesel puro é denominado **B100**.

1.2. Biodiesel

Biodiesel é um combustível renovável, composto por uma mistura de ésteres de ácidos graxos, produzido pela transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com catalisadores alcalinos (Bai et al., 2011; Oliveira et al., 2013). Ele pode ser usado misturado ao diesel em qualquer proporção, sem necessidade de qualquer alteração mecânica nos atuais motores Diesel (Demirbas, 2005;

Knothe , 2008; Oliveira et al., 2013). Pode conter baixas concentrações de compostos sulfurados e é praticamente isento de compostos aromáticos; apresenta alto número de cetanos, possui cerca de 11% de oxigênio; maior viscosidade, densidade e maior ponto de fulgor do que o óleo diesel. As emissões do biodiesel são também comparativamente menores que as do diesel, exceto pelas emissões de óxido de nitrogênio (NOx), mas os percentuais de redução variam de acordo com a quantidade de biodiesel adicionada ao diesel.

Suas principais desvantagens incluem o alto custo da matéria prima, menor estabilidade oxidativa, menor estabilidade ao armazenamento, menor poder calorífico e menor ponto de entupimento a frio (Conceição et al., 2005; Barreto et al., 2007; Altiparmak et al., 2007; Souza et al., 2009; Oliveira et al., 2013 Datta & Mandal, 2012). Muitas destas deficiências, porém podem ser mitigadas pelo emprego de aditivos, antioxidantes e pela mistura com o óleo diesel (Moser & Erhan, 2008; Tang et al., 2008).

A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira ocorreu a partir da criação do seu marco regulatório com o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) criado por Decreto Lei em 23 de dezembro de 2003 e complementado pela Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005.

1.2.1 Misturas Diesel/ biodiesel

O nome biodiesel muitas vezes é confundido com a mistura diesel + biodiesel (óleo diesel B), disponível em postos de combustíveis. A designação correta para esta mistura é óleo diesel BX, onde a letra B (do inglês *Blend*) indica que o combustível é uma mistura e a letra X refere-se ao percentual em volume de biodiesel que é misturado ao óleo diesel A. Assim, B5, B10 e B20 referem-se, respectivamente ao óleo diesel B, contendo 5, 10 e 20% de biodiesel, o biodiesel puro é denominado B100 (Suarez et al., 2007; ANP, 2010). No Brasil o percentual da mistura é determinada pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) e desde Janeiro de 2010, conforme a Resolução CNPE Nº 6 de 16/9/2009, atualmente este percentual é de 5% (B5). Quando o óleo diesel e o biodiesel são misturados as propriedades físico-químicas desta mistura são mais indeterminadas e diferem daquelas dos combustíveis puros. Estas diferenças (estabilidade oxidativa, biodegradabilidade, higroscopicidade, entre

outras.) estão relacionadas a proporção da mistura, matéria prima empregada e aos processos de produção dos combustíveis, principalmente do biodiesel (Yassine,2013).

1.2.2 Processo de produção do biodiesel

O biodiesel pode ser produzido a partir de uma infinidade de matérias primas oleosas tais como óleos vegetais, gordura animal, óleos de frituras, óleos residuais urbanos ou industriais e de sebo bovino, gordura de frango, banha de porco e óleo de peixe (Suarez et al., 2007; Zang et al., 2008; Singh e Singh, 2010; CNT, 2011) ou ainda, a partir de algas e microrganismos (Li et al., 2008; Mona et al., 2008; Peer et al., 2008; Suarez, 2011; Reda et al., 2013).

Na Europa e nos Estados Unidos, as principais matérias primas são a canola e a soja respectivamente (ANP, 2013). O Brasil dispõe de uma imensa variedade de espécies vegetais que podem ser empregadas na produção de biodiesel, como soja, milho, amendoim, algodão, babaçu, pinhão manso, mamona, palma etc. (Ferrari et al.,2005; Shahid & Jamal, 2008; Apolonário et al., 2012). Apesar disto o biodiesel brasileiro é obtido principalmente a partir da soja (73,4%), e da gordura bovina (19,6%) (ANP, 2013). Isto ocorre porque nem todas as matérias primas disponíveis apresentam uma composição de ácidos graxos adequada para gerar um biodiesel que atenda as especificações exigidas no Regulamento Técnico nº 4/2012, que integra a Resolução ANP Nº 14, de 11.5.2012 - DOU 18.5.2012. O biodiesel produzido a partir do dendê, por exemplo, possui um alto índice de ácidos graxos saturados, o da mamona produz um biodiesel com alto grau de viscosidade, o de pinhão manso possui um elevado índice de acidez, o girassol exibe alto índice de insaponificáveis e o babaçu tem alto índice de saponificação. Além da matéria prima utilizada, questões como o rendimento e o custo da matéria prima também interferem na escolha (Freitas, 2009).

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente de substâncias conhecidas como triacilgliceróis (ácidos graxos e glicerol), além de alguns ácidos graxos livres, fosfolipídeos, esteróis e tocoferóis (Moser, 2009). Seu uso direto como combustível para motores é problemático devido a sua alta viscosidade, maior densidade e baixa volatilidade (Costa Neto et al., 2000; Pinto et al., 2005;

Santos, 2010). Tais características geram vários problemas como combustão incompleta, formação de depósitos de carbono nos sistemas de injeção e diminuição da eficiência de lubrificação, causando obstrução nos filtros de óleo e sistemas de injeção e comprometimento da durabilidade do motor, e emissão de acroleína¹ (Jakeria et al., 2014). Estes problemas são eliminados quando o óleo “*in natura*” é processado.

O processamento do óleo “*in natura*” pode ser efetuado por diferentes métodos, porém, o biodiesel é produzido predominantemente por um processo denominado transesterificação. Na transesterificação, um triacilglicerídeo reage com o álcool na presença de catalisadores, dando origem a uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, liberando o glicerol. Os alcoóis mais freqüentemente empregados são os de cadeia curta, tais como metanol, etanol, propanol e butanol (Ferrari et al., 2005; Moser, 2009). O produto final desta transformação é uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos designados muitas vezes por FAME, abreviatura em inglês de “*fatty acid methyl esters*” (Zhang et al., 2003; Moser, 2009). Caso a reação de transesterificação seja incompleta ou caso a purificação seja insuficiente, o biodiesel produzido pode ficar contaminado com glicerol livre e retido, triglicerídeos, álcool e resíduos do catalisador (Schuchardt, 1998; Lima, 2004).

Atualmente a maior parte do biodiesel produzido no mundo deriva do óleo de soja, produzido por transesterificação, utilizando metanol e catalisador alcalino (Canakci et al., 2001; Apolinário et al. 2012).

1.2.3 Especificações do biodiesel em nível nacional/internacional

As propriedades físico-químicas (Anexo 2), do biodiesel dependem basicamente do tipo de matéria-prima, de sua composição de ácidos graxos e de seu processo de produção (Lin et al., 2008 e 2011; Demirbas, 2009; Atadashi et al., 2010; Torres-Jimenez, 2011; No, 2011). Considerando que a qualidade do biodiesel envolve muitas variáveis, foi necessário estabelecer padrões de qualidade para o combustível com a finalidade de garantir seu bom desempenho no motor (Balat & Balat, 2010; Lin et al., 2011). A Áustria foi o primeiro país do

¹ Acroleína: substância altamente tóxica e cancerígena, formada pela decomposição térmica do glicerol (Schwab et al., 1998)

mundo a definir e aprovar os padrões para ésteres metílicos de óleo de colza como aditivo para o óleo diesel. Logo, padrões de qualidade para a produção do biodiesel também foram definidos em outros países, como na Alemanha, Itália, França, República Checa e os Estados Unidos (Meher et al., 2006; Atadashi et al., 2010). Atualmente, as propriedades e qualidade do biodiesel devem seguir as especificações de padrão internacional. Estas especificações incluem as normas americanas (ASTM 6751-12) ou da União Europeia (EN 14214). No entanto, existem alguns outros padrões disponíveis globalmente, como os encontrados em Normas na Alemanha (DIN 51606), Áustria (ON) e República Checa (CSN) (Lin et al., 2010).

As especificações de qualidade para o biodiesel comercializado em território brasileiro seguem o Regulamento técnico 4/2012 descrito na Resolução ANP N° 14, de 11 de maio de 2012 (Anexo 2). Nesta Resolução são estabelecidas as principais características e propriedades do biodiesel, seus limites e as principais normas que devem ser aplicadas para suas determinações. A especificação brasileira é similar à europeia e americana, com alguma flexibilização para atender às características de matérias-primas nacionais. Apesar disto, a especificação europeia determina expressamente o uso de metanol para produção de biodiesel, já a especificação brasileira como a americana, não restringem o uso de álcool etílico e ambas apresentam limites mais restritivos para propriedades como viscosidade, número de cetano, índice de iodo e algumas outras características (Silveira, 2013).

1.2.4 Propriedades físicas e químicas do biodiesel e suas misturas

As propriedades físicas e químicas do biodiesel e suas misturas são características que definem a qualidade do combustível. Alguns autores sugerem que o monitoramento de alguns destes parâmetros como o índice de acidez, viscosidade e massa específica durante o armazenamento prolongado são bons indicativos do envelhecimento e consequência da perda de qualidade do combustível (Das et al., 2009; Pullen & Saeed, 2012).

O índice de acidez é a medida de quantidade de substâncias ácidas no combustível. É medido como mg de KOH necessários para neutralizar os ácidos graxos livres em 1g de biodiesel. De acordo com a Norma ASTM D664 ou

a EN14104, o limite máximo de acidez é estabelecido em 0,5 mg de KOH/g para o biodiesel puro. Para as misturas não existem valores pré definidos. A formação de ácidos graxos livres, que tende a elevar este índice, está relacionada aos processos de hidrólise e por isto é também um indicativo da presença de água. Um aumento do índice de acidez durante o tempo de armazenamento indica degradação dos ésteres que compõe o biodiesel. Isto influencia na oxidação, afeta a estabilidade térmica na câmara de combustão e pode causar corrosão nos sistemas de armazenamento (pela presença de água) e no motor (Araujo et al., 2008; Souza *et al.*, 2009; Dunn, 2008a). O acompanhamento deste índice pode ser utilizado para monitorar a degradação de ésteres metílicos (Moretto, 1989; Mazumdar et al., 2013).

A **Viscosidade** é a medida da resistência do fluido ao escoamento. Quanto menor a viscosidade, mais facilmente o líquido irá fluir. A viscosidade cinemática é determinada como a razão entre a viscosidade dinâmica para a massa específica. Esta propriedade é usada no monitoramento da qualidade do biodiesel durante armazenamento, pois aumenta continuamente com o decréscimo da qualidade do combustível. O aumento da viscosidade é indicação direta da presença de material de alto peso molecular no óleo estando relacionada à formação de ácidos e compostos poliméricos, como resultado da oxidação, o que pode ainda levar à formação de gomas e sedimentos (Bouaid 2007, Jain & Sharma 2010, Mazumdar *et al.*, 2013). Isto é também uma clara indicação de degradação dos ésteres metílicos submetidos a longos períodos de armazenamento (Leung et al., 2006 , Lin et al., 2009).

A viscosidade pode ser utilizada também para selecionar o perfil de ácidos graxos, presentes na matéria-prima utilizada para a produção do biodiesel porque a viscosidade do biodiesel aumenta proporcionalmente com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação da molécula. Isto influencia no processo de queima na câmara de combustão, provocando a deposição de resíduos em partes internas do motor (Lin et al., 2009, Balat & Balat, 2010, Atabani et al., 2012). Por isto, matérias primas que contém ácidos graxos de cadeias carbônicas maiores que 22 ou com muitas insaturações na molécula não são adequadas para a produção do biodiesel.

A norma EN 14214 (método analítico EN ISO 3104) estabelece um intervalo aceitável de viscosidade de 3,0 a 6,0 mm²/s para a viscosidade do biodiesel (Demirbas, 2008) Para as misturas, é estabelecida uma viscosidade entre 2,0 a 5,0 mm²/s e o método indicado é ASTM D445.

A **Massa específica**, também chamada de densidade, de um material é definida como a massa por unidade de volume. Um aumento na massa específica de 860 para 885 kg/m³ para os ésteres metílicos de óleo vegetal ou biodiesel aumenta a viscosidade de 3,59 para 4,63 mm²/s e os aumentos são muito regulares. Existe uma elevada correlação entre os valores de densidade e viscosidade de ésteres metílicos de óleo vegetal. Para o biodiesel a densidade é especificada entre 850 e 900 kg/m³. Para as misturas, é estabelecida uma massa específica entre 815 e 865 kg/m³. O método analítico é o ASTM D1298 ou D4052.

A **Estabilidade oxidativa** é definida como a resistência de óleo ou gordura à oxidação. Ela é expressa pelo período de indução, tempo entre o início da medição e o momento em que ocorre um aumento brusco na formação de produtos da oxidação que é dado em horas. (Garcia-Mesa et al., 1993). Este período também reflete a capacidade de proteção do antioxidante presente no combustível.

Existem vários métodos para se determinar a resistência à oxidação de um óleo ou gordura, que são: Método de estufa e Active Oxygen Method (AOM), Rancimat, Oil Stability Instrument (OSI), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Infravermelho (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC) e outras técnicas que possibilitam a identificação destas degradações (Knothe, 2007). Para a determinação da estabilidade oxidativa, o método Rancimat, que estabelece a medida da estabilidade oxidativa a 110 °C é aceito como padrão na norma EN 14214. A Resolução Nº 14/2012 da ANP em seu regulamento técnico 4/2012 baseia-se na norma Européia e propõe o método EN 14112, com valor mínimo de período de indução de 6 horas para análise da estabilidade oxidativa do biodiesel puro (B100). A Sociedade Americana para Ensaio de Materiais (American Society for Testing Materials – ASTM) na Norma D 6751-12 descreve especificação similar para o parâmetro estabilidade oxidativa do biodiesel, no entanto o tempo de indução mínimo cai para 3 horas em uma temperatura de 90 °C. Atualmente, na

Europa, se sugere utilizar a Norma EN15751 para misturas de diesel/ biodiesel (B7) com um período de indução mínimo de 20 horas á 110°C (Karavakalis, 2011). O período de indução determinado por este método pode ser correlacionado a diferentes parâmetros de controle de qualidade do produto tais como: índice de peróxido, índice de anisidina, viscosidade cinemática, teor de ésteres, índice de acidez e teor de polímeros (Mittelbach & Schober, 2003; Buaid, 2007). A estabilidade oxidativa é um aspecto fundamental para a manutenção da qualidade dos combustíveis armazenados (Batts & Fathioni, 1991; Gog et al., 2007; Cavalcanti, 2009), pois está associada a mudanças nas propriedades físicas e químicas, nas propriedades de combustão e também na compatibilidade com outros combustíveis (Moser, 2009).

1.3 Estabilidade ao armazenamento

Logo após a fase de produção todo o combustível passa por uma série de etapas, envolvendo períodos de estocagem e transporte até poder chegar ao seu destino final, o consumidor (Dodos et al., 2011). Em vista disto, o tempo de armazenamento do combustível pode variar imensamente e durante estes períodos o combustível pode perder estabilidade, sofrendo alterações em suas características tanto de ordem química quanto biológica (Bento & Gaylarde, 2001). A estabilidade ao armazenamento de um combustível líquido é definida pela sua capacidade de resistir às alterações em suas características físico-químicas provocadas por sua interação com o ambiente (Jain & Sharma, 2010; Moser et al., 2011, Zuleta et al., 2012). Esta estabilidade depende da interação com compostos sulfurosos, nitrogenados e com o oxigênio, que pode levar a formação de sedimentos e alterações na cor, dependendo do tipo e da quantidade de materiais instáveis presentes. A presença de água, partículas sólidas e produtos de degradação química e biológica também influenciam a estabilidade (Ferrari & Souza, 2009). Esta é ainda uma questão crítica em relação ao sucesso na utilização e comercialização do biodiesel e suas misturas. O biodiesel apesar de ser considerado quimicamente estável, é mais susceptível a degradação química e biológica durante o armazenamento prolongado do que o óleo diesel. Dentre os possíveis mecanismos de degradação isolados ou concomitantemente

temos: (a) oxidação pelo contato com o oxigênio do ar, a luz e a metais provenientes da corrosão dos tanques; (b) decomposição térmica pela exposição a altas temperaturas; (c) hidrólise pelo contato com a água ou a umidade em tanques e linhas de combustível ou (d) degradação pela contaminação microbiana (Dunn, 2008b; Haseeb et al., 2010 a b; Almeida et al., 2011; Mazumdar et al., 2013).

1.4 Processos degradativos de origem química

Um dos principais problemas relacionados à manutenção da qualidade dos combustíveis armazenados é a possibilidade de deterioração. É grande a preocupação com relação à sua resistência à degradação oxidativa. As duplas ligações presentes na estrutura química do biodiesel conferem à molécula uma elevada reatividade com o oxigênio, principalmente, quando colocado em contato com o ar, umidade, metais, luz e calor ou mesmo em ambientes contaminados por microrganismos (Almeida et al., 2011; Haseeb et al., 2010 a e b, Pullen & Saeed, 2012).

Os principais processos de degradação química sofridos pelo combustível estocado são aqueles de ordem térmica, oxidativa e hidrolítica.

1.4.1 Degradação térmica

A temperatura tem um papel importante na degradação de ésteres metílicos. As temperaturas elevadas aceleraram o processo de oxidação, resultando no aumento da densidade, da viscosidade do combustível (Monyem et al., 2000; Jain & Sharma 2010) e de seu índice de acidez (Moser, 2011; Mazumdar et al., 2013). Mazumdar et al., (2013), demonstraram que a exposição prolongada de ésteres metílicos a elevadas temperaturas pode deteriorar a qualidade do biodiesel. Os autores perceberam um aumento significativo do índice de acidez em amostras de biodiesel de pinhão manso armazenadas por 12 meses, mantidas seladas e no escuro em temperaturas de 4°C, 25°C e 35°C. Em seus experimentos o índice de acidez inicial das amostras foi de 0,44 mg de KOH/g. Após 12 meses de armazenamento para as amostras mantidas a 4°C pode ser observado um índice de acidez de 4,8 mg de KOH/g, enquanto que para as amostras armazenadas a 25°C e 35°C, o índice de acidez foi de 14,1mg

de KOH/g e 20,1mg de KOH/g, respectivamente. Efeito semelhante foi observado em estudos anteriores, com ésteres metílicos de canola, palma, soja e girassol (Moser, 2011).

1.4.2 Degradação oxidativa

O óleo diesel é composto por longas cadeias de hidrocarbonetos que conferem estabilidade em relação aos processos oxidativos, porém o biodiesel é mais susceptível a autooxidação, principalmente pela presença do grupamento Ester em sua molécula (Knothe, 2006; Santos, 2010). A oxidação é causada pela reação do oxigênio atmosférico com os ácidos graxos insaturados. Esta reação pode ser intensificada pela exposição a altas temperaturas e luminosidade, pelo contato com íons metálicos, radiações ionizantes e agentes oxidantes (Liang et al., 2006). Os processos de degradação oxidativa do biodiesel dependem da natureza dos ácidos graxos utilizados na sua produção, do grau de insaturação dos ésteres que o compõem, do processo de produção adotado, umidade, temperatura, luz e da presença de antioxidantes intrínsecos, como os carotenos (Ferrari et al., 2005; Thomas et al., 2005; Sterpu, 2012).

O biodiesel derivado de óleos vegetais, apresenta um maior conteúdo de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3), enquanto aqueles derivados de gordura animal tem maior conteúdo de ácidos graxos saturados como ácido palmítico (C16:0) e ácido estereático (C18:0) (Ferrari et al., 2005; Thomas et al., 2005; Cavalcanti, 2009). Uma quantidade maior de ácidos graxos saturados (gordura bovina) aumenta a estabilidade à oxidação. A presença do éster metílico do ácido oleico em altas concentrações, comparativamente com ésteres de ácidos graxos com maior grau de insaturação, também tornam o biodiesel mais estável (Bondioli & Folegatti, 1996) e com maior capacidade de resistir à oxidação, fatores que são cruciais para o armazenamento do biodiesel durante grandes períodos de tempo.

No processo de degradação oxidativa, os sítios insaturados de uma cadeia de ácido graxo são atacados por radicais livres que retiram um átomo de hidrogênio da cadeia. O oxigênio presente no ambiente liga-se a este sítio, e ocorre a formação de um hidroperóxido. Uma vez formados, os hidroperóxidos se acumulam e, posteriormente, se decompõem e reagem entre si para formar

numerosos produtos de oxidação secundários, incluindo os aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos de cadeia curta e oligômeros de peso molecular mais elevado. Isto provoca um aumento do índice de acidez e viscosidade, redução no ponto de fulgor, aumento no número de cetanos, polimerizações e formação de gomas e borras (sedimentos insolúveis) (Bouaid 2007; McKormik et al., 2007; Cavalcanti, 2009; Bannister et al., 2010; Fattah et al., 2014). Bannister et al., (2010) também observaram que a oxidação do biodiesel leva a uma mudança na cor do combustível de amarelo para castanho, acompanhada de um cheiro avinagrado. Os ácidos e hidroperóxidos formados durante o processo de oxidação podem ainda acentuar os processos de corrosão, quando associados a água presente nos tanques (Dunn, 2008a).

Como forma de minimizar estes processos costuma-se alterar a composição do biodiesel por agentes externos, tais como os aditivos químicos, que possuem a finalidade de retardar o processo oxidativo (McCormick et al., 2007 ; Knotte et al., 2007, Pullen & Saeed, 2012).

1.4.3 Degradação hidrolítica

A presença de água no biodiesel contribui para a sua degradação (oxidação hidrolítica) (Mittelbach, 1996; Van Gerpen et al., 1996; Leung et al., 2006; Jakeria et al., 2014), mas o seu efeito é inferior ao da temperatura e exposição ao ar (Leung et al., 2006). A hidrólise do biodiesel provoca o acúmulo de ácidos graxos livres, incorporação de água dissolvida, turvação do combustível, aumento da acidez livre, formação de polímeros, precipitados, depósitos e corrosão em tanques de estocagem, podendo também facilitar a proliferação de microrganismos (Ambrozin et al., 2009; Zimmer et al., 2013).

O biodiesel é cerca de 30 vezes mais higroscópico que o óleo diesel A (Ambrozin et al., 2009), podendo conter até 0,15% de água dissolvida, enquanto que o óleo diesel pode incorporar cerca de 0,005%. Por este motivo o teor de água deverá ser monitorado durante o armazenamento (Mittelbach, 1996; Van Gerpen et al., 1996; Atabani et al., 2012). No Brasil são permitidos 0,02% de água (200µL/L) (Biodiesel puro e misturas com S10), a Norma Brasileira indica o uso do Método ASTM D6304 ou EN ISO12937. A solubilidade da água no óleo depende do comprimento das cadeias carbônicas que o compõe, da presença de

aromáticos e da temperatura (Robbins & Levy, 2004). Um biodiesel com um alto conteúdo de produtos intermediários da reação de transesterificação como os mono glicerídeos e diglicerídeos, terá tendência para absorver mais água, ficando assim ainda mais sujeito aos efeitos negativos já referidos (Bondioli et al., 1995; Bento et al., 2010).

1.5 Processos degradativos de origem biológica

Os processos de degradação química sofridos pelo combustível podem ser acelerados pela presença de microrganismos. Os microrganismos são significativamente responsáveis pela degradação do combustível através de inúmeros mecanismos, incluindo o acúmulo de biomassa, degradação de aditivos, produção de metabólitos corrosivos como ácidos orgânicos e inorgânicos (H₂S) (Cord-Ruwich et al., 1987, Gaylarde et al., 1999; Makareviciene & Janulis, 2003; Lutz et al., 2006; Rajasekar et al., 2007; Chao et al., 2010; White et al., 2011; Passman, 2013). A biodeterioração do combustível é mais problemática em sistemas de armazenamento com baixa rotatividade, onde o combustível permanece armazenado por um período superior a 30 dias (Chesneau, 1983). Em sistemas de combustíveis com taxas de rotação mais rápida, o risco de dano ao sistema de armazenamento é substancialmente maior do que o risco de biodeterioração do produto (Passman, 2013). Como foi dito anteriormente, a presença de água, (livre ou dissolvida) é a condição limitante para o desenvolvimento microbiano. Os principais problemas causados pela atividade microbiana são a formação de biofilmes (na interface óleo-água e sobre as paredes dos tanques) e a corrosão influenciada por microrganismos (CIM) nas estruturas metálicas (Aktas, 2010; Passman, 2013).

1.6 Contaminação microbiana de combustíveis

Os primeiros estudos sobre contaminação microbiana em combustíveis datam de 1895, quando Myoshe registrou o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* em parafina (Bento, 2001). Em 1930, foram relatados os primeiros problemas referentes à corrosão acelerada em sistemas de armazenamento de combustível de aeronaves por sulfuretos produzidos por

bactérias (Neihof, 1988). A presença de bactérias redutoras de sulfato em gasolina foi também observada por Tausson & Aleshina (1932) e Taysen (1939) apontou como causa indireta de uma explosão em um tanque de querosene, a formação de gás produzido por bactérias. Problemas de contaminação microbiana em gasolina e querosene também foram relatados por Bushnell & Hass (1941). Estes mesmos autores descobriram que muitos microrganismos poderiam crescer em hidrocarbonetos, utilizando-os como fonte de carbono e propuseram um meio mínimo composto de sais minerais, ainda hoje bastante utilizado, com o objetivo de isolar microrganismos crescendo em hidrocarbonetos. Um dos primeiros grupos microbianos identificados como deteriogênicos de combustíveis armazenados foram as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Durante a segunda Guerra mundial, diversos tanques de armazenamento de gasolina, localizados em áreas tropicais, estavam contaminados por bactérias redutoras de sulfato, e passaram a identificar o problema com a designação de gasolina “azedada”. Na década de 60 muitos outros trabalhos também associaram a presença de bactérias redutoras de sulfato com problemas de corrosão em gasolina de aviação (Hill, 1990).

Após a mudança da gasolina para querosene como combustível de aviação, tanto os microrganismos quanto os problemas mudaram. O querosene de aviação é menos tóxico aos microrganismos e contém mais água dissolvida, um pré requisito essencial para o desenvolvimento microbiano (Genner & Hill, 1981). O fungo filamentoso *Cladosporium resinae*, (hoje *Hormoconis resinae*), passou a ser uma espécie bastante estudada devido a sua contribuição na deterioração e corrosão de tanques com combustíveis, especialmente no querosene de aviação e óleo diesel. Muitos estudos (Bakanaukas, 1958; Prince, 1961; Hazard, 1961 e 1963; Guntheil, 1966; Klamme & Leonard, 1971), passaram a abordar principalmente problemas referentes à natureza dos sedimentos e material particulado que se formava nos tanques, provocando entupimentos de tubulações e filtros. Este fungo formava “tapetes” no fundo dos tanques, conseguindo sobreviver por longos períodos, mesmo em tanques aparentemente sem água (Nenhoff, 1988). Além deste, fungos do gênero *Aspergillus sp.* também foram detectados nestes combustíveis e as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*,

Flavobacterium e *Aeromonas* (Ferrari et al., 1998) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) foram detectadas na água do fundo dos tanques de armazenamento.

Dentre os estudos relacionados à biodeterioração de combustíveis mais de 80% demonstram a habilidade deteriorogênica de bactérias, sendo o conhecimento do processo envolvendo fungos e leveduras menos explorado (Atlas, 1981; Cerniglia & Crow, 1981; Gaylarde et al., 1999; Sutherland, 2004; Neilson & Allard, 2008). Vários trabalhos abordam as comunidades microbianas em combustíveis estocados (Edmonds & Cooney, 1967; Neihof & May, 1982; Pitcher, 1989; Haggett & Morchat, 1992; Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Rauch et al., 2006; Yemashova et al., 2007; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009, 2010). Na região da América do Sul alguns trabalhos em ambientes tropicais (Bento & Gaylarde, 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2006; Rodriguez et al., 2009, 2010; Bento et al., 2010; Bucker et al., 2011; Zimmer et al., 2011; Zimmer et al., 2013), também abordaram o papel deteriorogênico de outras espécies. A literatura mostra a participação de diferentes grupos microbianos, tais como os fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias e anaeróbias na composição do sedimento biológico depositado no fundo dos tanques de armazenamento.

A introdução do biodiesel provocou muitos problemas operacionais, principalmente devido a presença de uma molécula mais facilmente biodegradável, aumento no uso de aditivos e a negligência com as rotinas rígidas de manutenção dos tanques de armazenamento (Hill & Hill, 2009; Klinkson, 2009; Aktas, 2010; Sorensen et al., 2011; Bucker, 2011, Moser et al., 2011; Passman, 2013).

A maioria dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos é capaz de oxidar cadeias carbônicas entre C₁₀ a C₂₀ e por esta razão, o querosene e o óleo diesel (que contém alcanos com cadeias entre C₂₀ e C₂₁) são os mais atacados entre os combustíveis derivados de petróleo (Robbins & Levy, 2004; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Segundo a literatura, os problemas de contaminação microbiana em óleo diesel são crônicos e fatores como: presença em sua composição de uma grande variedade de fontes de carbono (hidrocarbonetos), diferentes tipos de aditivos, diferentes teores de enxofre, componentes com maior peso molecular (que não atuam como solventes de

membrana como os compostos da gasolina, por exemplo) (Leahy & Colwell, 1990; Gaylarde et al., 1999; Rodríguez-Rodríguez et al., 2010; Passman, 2013); presença de compostos aromáticos, que são mais solúveis e mais prontamente emulsionáveis em água podem promover melhores condições de crescimento (Leahy & Colwell, 1990; Smith, 1991; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Considerando a diversidade microbiana dos lodos biológicos, por outro lado, os compostos aromáticos, presentes em combustíveis com elevado teor de enxofre, podem inibir uma variedade de processos metabólicos em organismos anaeróbios (Londry & Sulfito, 1998).

Passman (2013), em trabalho de revisão, destaca a importância da complexidade, das mudanças na composição dos combustíveis e o reflexo sobre sua biodegradabilidade ao longo dos anos. Segundo Passman, (2013) a química do combustível tem sofrido profundas modificações tais como a redução do teor de enxofre (óleo diesel), do chumbo (gasolina) e a adição de biocombustíveis. Estas alterações foram também acompanhadas pela adição de diversos outros compostos (aditivos) com a função de garantir a estabilidade e a manutenção das propriedades do combustível. Desde meados da década de 1990, foi observado um aumento no total de sólidos dissolvidos (TDS). Passman (2013), sugere que esta mudança poderia estar relacionada ao aumento da solubilidade em água de aditivos de combustíveis utilizados para restaurar a lubrificidade, estabilidade oxidativa e propriedades anti corrosivas que foram perdidas após o hidrotreatamento (redução do teor de enxofre). Alguns estudos ainda sugerem que alguns destes aditivos para combustível podem aumentar a biodegradabilidade, pelo fato de disponibilizarem diferentes nutrientes (Hill e Hill, 1990; Rajasekar et al, 2007). Os aditivos organonitrogenados e organofosforados por exemplo, fornecem nitrogênio e fósforo, que são nutrientes limitantes em sistemas oligotróficos (Howarth, 1988). É incontestável que a remoção do chumbo aumentou biodegradabilidade da gasolina (Koenig, 1991; Hill & Koenig, 1995). No caso de óleo diesel, segundo alguns autores a redução dos teores de enxofre (que também reduz o teor de aromáticos) pode aumentar a biodegradabilidade do combustível (Hill & Koenig, 1995; Passman, 1999; Ali et al., 2006; Lee & Little 2010). No entanto, contrariando o que o mercado assumiu como uma verdade estabelecida nos últimos anos, um estudo publicado pela Universidade de

Oklahoma (Lyles et al., 2013), concluiu que o diesel com baixo teor de enxofre NÃO é mais sensível à contaminação microbiana. Segundo os autores, o conteúdo de compostos organossulfurados do diesel não influencia significativamente a biodegradação anaeróbica dos hidrocarbonetos.

Apesar disto, considerando a diversidade microbiana presente durante o processo de deterioração de combustíveis estocados são fundamentais estudos com os outros grupos microbianos deteriogênicos, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias.

As misturas de diesel com biodiesel são mais suscetíveis a biodeterioração do que o óleo diesel convencional de petróleo (Zhang et al., 1998; Makareviciene & Janulis, 2003; Pasqualino et al., 2006; Hill e Hill, 2009; Owsianiak et al., 2009; Schleicher et al., 2009; Prince, 2010; Bucker et al., 2011 Sorensen et al., 2011, Cyplick et al 2011; Lisiecki et al 2014). A adição do biodiesel ao óleo diesel disponibilizou uma nova fonte de carbono e nutrientes, que são mais facilmente reconhecidos (degradáveis) do que os hidrocarbonetos (Follis, 1994; Zhang, 1998; Hill & Hill, 2009; Aktas, 2010; Lisiecki et al., 2014). Estudos recentes mostram que em comparação com o óleo diesel A o biodiesel é mais rapidamente degradado por microrganismos, podendo ser até 98% biodegradado num período de três semanas, enquanto o óleo diesel A nas mesmas condições é apenas 50% degradado. Além disto, a capacidade das bactérias, archaea e mesmo de fungos em hidrolisar os ésteres que compõe o biodiesel é comum, não exigindo qualquer habilidade especial ou histórico de pré exposição (Makareviciene & Janulis 2003; Prince, 2008; Aktas, 2010; Rajasekar et al., 2012).

Schleicher et al., (2009) trabalhando com óleo diesel (B0) e as misturas B5 e B20 (biodiesel de Canola), constataram que a recuperação de microrganismos cultiváveis diminuiu com o aumento da concentração de biodiesel e que a recuperação de fungos cultiváveis aumentou. Os autores demonstraram que em geral, a estabilidade oxidativa foi perdida mais rapidamente nas misturas de biodiesel que no óleo diesel convencional. Alguns autores sugerem que a adição de biodiesel ao óleo diesel A, mesmo em pequenos percentuais, pode afetar a biodegradação do óleo diesel A, principalmente pelo mecanismo de cometabolismo, quando um segundo substrato (mais simples) é utilizado como fonte de carbono para degradar o primeiro (mais complexo e que necessita de

maior energia para degradação) (Zhang et al.,1998; Mudge & Pereira, 1999; Pasqualino et al., 2006). Apesar disto, não há um consenso geral sobre o grau em que várias porcentagens do biodiesel contribuem para biodegradabilidade do óleo diesel (Passman & Dobranic, 2005; Bücken et al., 2011). Owsianiak et al., (2009), observaram que a adição de mais de 50% de biodiesel à mistura não influenciou de qualquer forma a degradação das frações de hidrocarbonetos. O autor sugere que as diferenças nestes resultados podem estar associadas a escolha do consórcio microbiano para a realização dos estudos.

A adição do biodiesel ao óleo diesel fez com que surgisse um novo combustível exigindo da comunidade usuária uma maior atenção na manipulação e armazenamento. Com o crescimento previsto no consumo de biodiesel e introdução de novas matérias-primas (Subramaniam et al., 2010) o aumento dos problemas de biodeterioração são inevitáveis e muitos casos já foram relatados (Gaylarde et al., 1999; Bucker., et al 2011; Zimmer; et al 2013; Passman, 2013).

1.6.1 Condições para o desenvolvimento microbiano em combustíveis

O combustível estocado em condições não adequadas pode permitir o desenvolvimento de comunidades microbianas com diferentes exigências fisiológicas (Chesneau, 1988, 2000; Yemashova et al., 2007; Aktas, 2010). Dentre os fatores destacando-se:

Água: A presença de água nos tanques (no estado livre ou dissolvido) é o pré requisito fundamental para o desenvolvimento microbiano (Arnold, 1991; ASTM D6496; Yemashova et al., 2007 ; Bento et al., 2010; Bucker et al., 2011; Sorensen et al., 2011, ASTM, 6469; Passman, 2013). Apesar de esporos de fungos e bactérias permanecerem viáveis no combustível, eles apenas se desenvolvem e se reproduzem na fase aquosa. Segundo Siegert, (2009), apenas 100 ppm (0,1mL/L) de água são suficientes para a proliferação de microrganismos, enquanto 5 a 80 ppm de água são suficientes para a sobrevivência dos esporos. A água pode ser introduzida nos tanques por diferentes vias, (a) ela pode vir com o combustível, (b) por condensação do ar nas paredes, (c) por vazamentos; (d) a água pode entrar pelos respiros ou ser introduzida durante a lavagem dos tanques ou descarga de combustíveis ou (e) pode ainda ser colocada lá intencionalmente como lastro. Juntamente com esta

água também são levados sais inorgânicos e outros nutrientes com impurezas biológicas (Chesneau, 1988, 2000; Chung et al, 2000; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009; Siegert 2009). Uma outra forma da água penetrar no sistema é através do metabolismo microbiano. O fungo *H. resine*, por exemplo, é capaz de produzir 0,94g de água por litro de combustível num período de quatro semanas (Hill & Thomas , 1975). Mesmo em tanques aparentemente sem água, ela pode estar presente no interior dos biofilmes, em quantidade suficiente para dar suporte ao crescimento microbiano (Passman, 2003).

O biodiesel, tem maior tendência para absorver umidade do ambiente que o diesel, principalmente devido ao conteúdo de O₂ em sua molécula e a estrutura química polar de seus grupos carboxílicos. A água nos tanques de armazenamento de biodiesel pode ser encontrada sob três formas distintas: emulsionada, dissolvida e livre. Devido à sua natureza higroscópica o biodiesel pode conter até 30 vezes mais água na forma dissolvida quando comparada ao óleo diesel, porém, as misturas possuem menor poder de absorção de água (He et al., 2007). Na Figura 1.1 estão apresentadas as formas em que a água pode ser encontrada durante a estocagem de misturas de diesel e biodiesel.

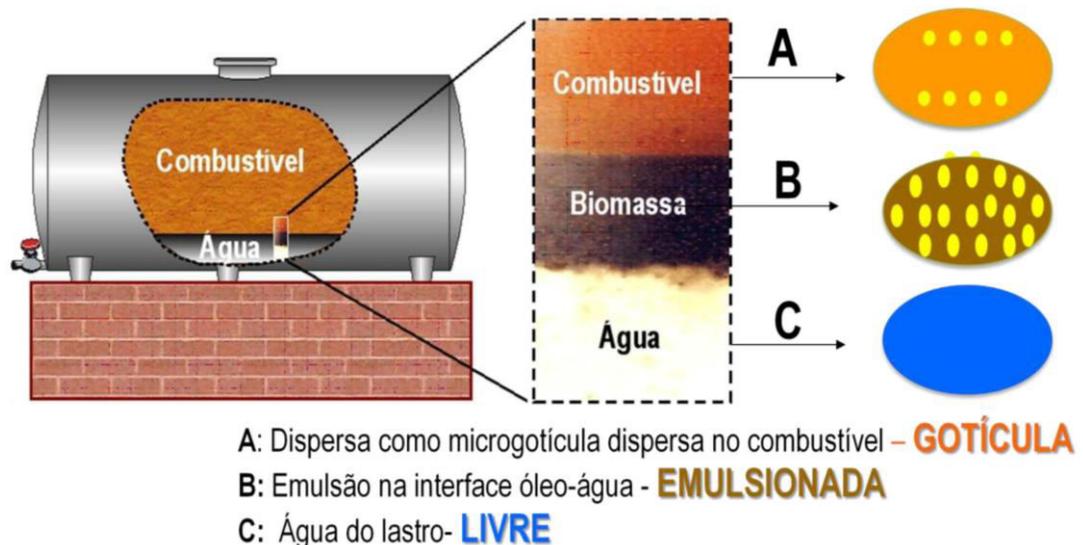


Figura 1.1 Diferentes formas que a água pode ser encontrada nos tanques de armazenamento de diesel B (adição de biodiesel).(Fonte: Bento & Cavalcanti, 2012).

As variáveis climáticas predominantes podem afetar o acúmulo de água no sistema e a oscilação da temperatura no interior do tanque possibilita a separação de fases. Estes efeitos são maiores em regiões quentes e úmidas e promovem o surgimento de uma fase de água livre que se deposita no fundo e favorece a corrosão de materiais e o desenvolvimento microbiano (Gaylarde et al., 1999; Chesneau, 2000; Allsop et al., 2004; Cavalcanti, 2009). Passman (2013) sugere critérios de classificação de risco de biodeterioração com base na precipitação média anual (baixo <64 cm, médio 64 e 190 cm e alto risco > 190 cm) e número de dias em que ocorre precipitação (baixo <100, médio 100 e 200 e alto risco > 200 mm).

Temperatura e pH: A temperatura, não é um fator determinante na biodeterioração de combustíveis (Chung et al., 2000; Passman, 2003). Microrganismos crescendo em combustíveis suportam uma grande variação de temperatura, entre quatro até 60°C, ou mais (Genner & Hill, 1981; Chung et al., 2000). A maioria se desenvolve em temperaturas entre 20° e 30°C, que é encontrada nos tanques de combustível nos dias mais quentes, isto também explica porque estes problemas são mais graves nos trópicos (Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Embora a ocorrência de corrosão influenciada por microrganismos (CIM) em ductos de transporte de combustível no Alaska (CIC Group, 2007), demonstre que as temperaturas baixas não impedem a biodeterioração no sistema de combustível. É mais provável que a temperatura afete as taxas de biodeterioração ao invés da incidência de contaminação microbiana (Passman, 2013).

A comunidade microbiana presente no combustível também sobrevive a uma grande variação de pH entre 4 e 9 (Boszczyk-Maleszak et al., 2006). A maioria das bactérias crescem em um pH neutro, já os fungos desenvolvem-se preferencialmente em condições ligeiramente ácidas (pH 4 - 6,5); o crescimento de bactérias redutoras de sulfato ocorrem em pH na faixa de 5 e 9 (Hill, 2000; Passman, 2003). O pH da água encontrado no fundo de um tanque de estocagem de combustível, encontra-se na faixa entre 6 e 9, mas pode variar bastante. A atividade metabólica de alguns fungos, por exemplo, pode baixar o pH da água devido a produção de ácidos orgânicos (Hill, 2000), sendo comum encontrar-se pH entre 4 e 5. Bento & Gaylarde (1999), registraram valores de pH

entre 3 e 5 na fase aquosa de tanques de armazenamento de uma empresa de transporte coletivo em Porto Alegre. Zimmer et al., 2013, observaram um pH de 4,5 em amostras de água de drenagem de tanques de armazenamento de óleo diesel. Esta condição ácida de ambiente pode determinar a sucessão microbiana bem como o estabelecimento de diferentes comunidades de microrganismos dentro do tanques, durante a biodeterioração (Passman, 2003; ASTM D1259).

Oxigênio: O oxigênio está normalmente presente no ambiente do tanque de combustíveis na porção superior dos tanques, dependendo do volume acondicionado. Também, o sistema de armazenamento é continuamente aerado cada vez que um combustível novo é adicionado, assim como ocorre a entrada de ar pelo sistema de ventilação (Hill,1987). Como o oxigênio é um aceptor final de elétrons para organismos aeróbios, sua presença contribui diretamente para o crescimento microbiano. Mesmo assim a ausência de oxigênio não impede os processos de degradação microbiana que seguem normalmente pela ação de microrganismos aeróbicos facultativos ou anaeróbios estritos, tais como as bactérias do gênero *Bacillus* e as redutoras de sulfato, respectivamente (Gaylarde et al., 1999; Watanabe et al., 2002; Rajasekar et al., 2012).

Nutrientes: Os microrganismos crescem no combustível e ou biocombustível, basicamente pela utilização dos hidrocarbonetos (alifáticos, aromáticos) e ésteres, como fonte de carbono (Yemashova et al., 2007; Das & Chandran, 2011). Alguns fungos foram observados crescendo na porção superior (vazia) dos tanques utilizando como nutriente os compostos voláteis do combustível (VOCS) (Passman, 2003). Aqueles microrganismos que não são capazes de metabolizar hidrocarbonetos podem crescer neste ambiente às expensas de outros compostos presentes no combustível tais como os ésteres de ácidos graxos do biodiesel ou metabólitos secundários de outros microrganismos. Porém além da fonte de carbono, outro fator limitante é a disponibilidade de nutrientes inorgânicos, como fósforo e nitrogênio que podem estar presentes em aditivos, contaminantes químicos residuais ou na água (Yemashova et al., 2007; Hill & Hill, 2009; Das & Chandran, 2011).

Composição química: A composição química do combustível pode determinar o grau de contaminação microbiana e conseqüentemente sua suscetibilidade aos processos deteriorogênicos. Com relação ao óleo cru, os óleos

leves com menor conteúdo de aromáticos são mais rapidamente degradados em comparação ao óleo pesado no qual o conteúdo de aromáticos pode ser até 50% maior. As cadeias carbônicas mais facilmente utilizadas são C₁₀-C₁₈, cadeias menores podem inibir o crescimento de alguns microrganismos (Cafone et al., 1973; Gaylarde et al., 1999). As condições físico-químicas que se estabelecem no tanque bem como a diversidade metabólica da população microbiana também podem interagir de forma significativa sobre a biodegradabilidade dos combustíveis (Passman, 2013).

1.6.2 Colonização do combustível

O combustível, tão logo que é processado, é estéril devido às altas temperaturas durante o processo de produção (Yemashova et al., 2007; Suarez, 2010; Dodos et al., 2011). Os microrganismos entram em contato com o combustível durante a estocagem principalmente através da poeira, água, ar e outro combustível contaminados (Gaylarde et al., 1999; ASTM D 6974:09; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Bactérias e leveduras são geralmente os primeiros organismos nesta colonização, seguidos por fungos filamentosos (Bento & Gaylarde, 2001). Uma vez dentro dos tanques eles podem se aderir às paredes (formando biofilmes) ou se estabelecer na interface óleo água. O maior desenvolvimento de microrganismos pode ser observado na água presente no fundo do tanque de armazenamento, enquanto a maior atividade microbiana e degradação são observadas na interface água óleo (ASTM 2004 a; Yemashova et al., 2007; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009; Dodos et al., 2011). Dependendo do grau de contaminação microbiana e das rotinas de manutenção dos tanques este desenvolvimento pode se expandir tanto para a fase aquosa quanto para o óleo (Siegert, 2009).

Alguns microrganismos produzem biossurfactantes, estas substâncias atuam como emulsificantes reduzindo a tensão superficial na fase aquosa e promovendo a emulsão do óleo na água, o que aumenta a disponibilidade dos hidrocarbonetos e facilita a penetração dos microrganismos na fase óleo, permitindo que a biodegradação ocorra (Van Hamme et al., 2006; Cameotra & Makkar, 2010; Allsop, et al., 2004; Llori, et al., 2008; Obayory et al., 2009; Rajasekar et al., 2012). Alguns fungos, como *H. resinae*, produzem hifas

especiais, denominadas “hifas de alimentação” que possuem um filme d’água circundante, gotículas de óleo podem ser observadas emulsionadas na água destas hifas que crescem em direção a fase óleo (Smith, 1991).

Tão logo os organismos com competência para degradar o combustível iniciam a quebra das moléculas que compõe o combustível, outros microrganismos presentes no sistema, mas que não são capazes de utilizar as fontes de carbono disponíveis diretamente iniciam a degradação dos fragmentos parcialmente degradados (processo de cometabolismo). A esta complexa comunidade microbiana, que se estabelece com interações que dependem das condições físicas e químicas, denominamos um **consórcio microbiano** (Robbin & Levy, 2004; Yemashova et al., 2007; Das & Chandran, 2011). A velocidade da degradação do combustível irá depender da competência dos organismos integrantes deste consórcio para degradação dos componentes do combustível e do grau de contaminação. Os microrganismos aeróbicos criam condições para os anaeróbicos, como as bactérias redutoras de sulfato, se estabelecerem no interior da biomassa (Passman, 2003; Olliver & Margot, 2005; Siegert, 2013).

Uma vez instalada, a contaminação pode ser facilmente passada de um tanque a outro, passando do tanque da refinaria para os tanques dos caminhões de transporte, destes para os tanques dos postos de abastecimento e em seguida para os tanques dos veículos.

1.6.3 Consequências da contaminação microbiana de combustíveis

Durante o processo de biodeterioração os hidrocarbonetos e/ou os ésteres são transformados, pois podem ser utilizados como fonte de carbono primária promovendo a formação de biomassa. A atividade microbiana no combustível contribui para um aumento da instabilidade química, acelerando reações que produzem mais sedimentos. O metabolismo microbiano contribui para um aumento no conteúdo de água e liberam ácidos e peróxidos que intensificam os processos de corrosão e alteram parâmetros de qualidade do combustível tais como a estabilidade química. Todos estes processos promovem o aumento de sólidos suspensos, a formação de lodo e produtos de corrosão, que promovem entupimentos nas tubulações, e mangueiras, saturação de filtros e

desgaste de bicos injetores (Bento & Gaylarde, 1999; Gaylarde et al., 1999; Chung et al., 2000; Chesneau, 2000; Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2006; Yemashova et al., 2007; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009; Siegert, 2009; Passman, 2013). Na Tabela 1.1 estão resumidos alguns dos principais problemas causados pela contaminação microbiana de combustíveis e seus agentes.

Tabela 1.1. Consequências do desenvolvimento microbiano em combustíveis

Problemas	Principais grupos de microrganismos envolvidos
Bloqueios de tubulações, válvulas, filtros e mangueiras	Fungos e bactérias produtoras de substâncias poliméricas
Corrosão dos tanques tubulações	Fungos e bactérias anaeróbicas
Degradação do combustível	Fungos e bactérias aeróbicas
Aumento do conteúdo de água	Todos
Formação de sedimentos	Todos
Produção de surfactante (emulsificação do óleo)	Fungos e bactérias aeróbicas
Produção de sólidos suspensos	Todos
Redução da vida útil de filtros	Todos
Incrustação em injetores	Fungos e bactérias aeróbicas
Aumento do conteúdo do enxofre do combustível	SBR
Redução da vida útil de peças do motor	Não determinado
Penetração do revestimento dos tanques	Fungos
Problemas de saúde	Bactérias produtoras de endotoxinas, patógenos oportunistas, SBR

Adaptado de Gaylarde et al., 1999 e Rajasekar et al., 2012

1.7 Monitoramento da contaminação microbiana em combustível

Para o monitoramento adequado da contaminação deve-se inicialmente inspecionar, sempre que possível, a condição interna dos tanques. Os tanques contaminados normalmente apresentam duas fases distintas, a fase aquosa e oleosa, que devem ser monitoradas separadamente (Bento & Gaylarde,

1999, 2001; Klinkspon, 2009; Bento et al., 2010). Embora o número de bactérias viáveis e fungos relatados na fase combustível, sejam muitas ordens menores do que aquelas reportadas para a fase água, microrganismos nesta fase são indicadores mais rapidamente disponíveis para avaliar a contaminação de combustíveis e é por esta fase que se deve iniciar um monitoramento. Em seguida, é importante também inspecionar a fase aquosa uma vez que é onde a maior contaminação está presente e também a interface óleo/ água a fim de se detectar a presença de sedimentos e formação de biomassa (Bento e Gaylarde, 1996; Yemashova et al., 2007; Hill & Hill, 2009).

1.7.1. Métodos de detecção da contaminação microbiana

Uma vez que a biomassa microbiana é difícil de medir diretamente, muitas técnicas diferentes são utilizadas para esta determinação, incluindo a técnica de contagem em placa, análise do número de células totais usando microscopia de epifluorescência e técnicas moleculares (Hobbie et al., 1977; Jasson, 2010; White et al., 2011). Porém, os métodos mais aceitos e amplamente utilizados atualmente para detecção e quantificação da contaminação em combustíveis baseiam-se na contagem direta de microrganismos em placa com meio de cultura sólido. Quando a fase amostrada é o combustível, adota-se a Norma ASTM D6974-09 ou a Norma IP 385/99 (Passman, 2003; Klofutar & Golob, 2007; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009), que consiste na filtração á vácuo de um volume conhecido de uma amostra de combustível através de uma membrana com 0,45µm de poro. Após a membrana é inoculada em placas com meios de cultura sólidos e as colônias crescidas são contadas. Para a detecção da contaminação na fase aquosa, pode-se utilizar o método padrão direto de contagem em placa ou técnicas de contagem indireta como a técnica do MNP (Brown & Bradock, 1990) e a estimativa de biomassa formada por peso seco (Bucker et al., 2011; Zimmer et al., 2013). Estes métodos são descritos com detalhes suficientes para permitir sua reprodução e os materiais podem ser adquiridos com facilidade. Além disto, não exigem uma infra-estrutura dispendiosa e os consumíveis também são relativamente acessíveis. Como desvantagem, são muito trabalhosos, exigindo o uso de grande volume de meios líquidos, sólidos e reagentes, pessoal especializado e muito tempo para obtenção

dos resultados. Por este motivo, o interesse para o desenvolvimento de métodos mais rápidos para estimativa do grau de contaminação tem aumentado.

Tendo como referência estes métodos "Padrão ouro" um "método rápido" pode ser definido como qualquer método ou um sistema que reduza o tempo necessário para se obter o resultado de um ensaio microbiológico ou um menor tempo para a detecção, mas também pode se referir a um melhor fluxo (Feng, 1996). Neste sentido, uma alternativa aos métodos de contagem em placa são os dipslides ou laminocultivos, fabricados por um grande número de empresas (BARTTM Dryocon Bioconcepts Inc., Canada; MicrobMonitor BP International Limited, UK; B-FTM Indicator Troy Corporation, USA etc). Estes laminocultivos geralmente contêm meio que é inoculado com uma amostra aquosa. Os dipslides são então incubados e interpretados de acordo com instruções de fabricante. Estas técnicas em geral, são demoradas e demandam mão de obra especializada para sua execução (Bailey & May 1979; Girotti & Zanetti 1998; Gaylarde et al., 1999; Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 2003). Juntamente com estes dipslides foi desenvolvido um método, baseado em imunofluorescência, especialmente para detectar a presença de *H. resinae* (Lopes & Gaylarde, 1996), este método é bastante rápido e sensível e não precisa de pessoal especializado para sua execução, porém não é indicado para quantificar microrganismos totais, uma vez que seria praticamente impossível ter anticorpos para todas as espécies (Yemashova et al., 2007).

Apesar de todos os esforços, os métodos de contagem direta não são satisfatórios no que diz respeito à quantificação, pois apenas uma pequena porcentagem (0,1% a 0,5%) dos organismos pode ser cultivada e portanto estes valores representariam apenas uma estimativa da contaminação real. (Ammam et al., 1995; Torsvik et al., 2002; Whyte et al., 2011). Algumas metodologias são básicas de detecção da contaminação; sendo ainda uma alternativa barata e confiável (Whyte et al., 2011). Porém devido ao crescimento e detecção dos microrganismos cultiváveis, informações importantes podem ser subestimadas e ou perdidas no processo de monitoramento (Gaylarde et al., 1999; Yemashova et al., 2007).

Os métodos moleculares atualmente disponíveis tem permitido a partir da análise de DNA de um microrganismo isolado, a identificação em nível de espécie

pele sequenciamento do gene 16S rRNA (Sanger Sequence). No entanto, é preciso que este organismo seja cultivável, ou seja, que possa crescer em meios de cultura. Para acessar as populações microbianas que não são cultiváveis, novas tecnologias de sequenciamento permitem a partir da extração direta do DNA total da amostra conhecer a diversidade e abundância de comunidades microbianas. Cada tipo de sequenciamento pode fornecer informações a partir das sequências obtidas tais como o pirosequenciamento dos amplicons (Tecnologia Roche-454 FLX Titanium Genome Analyser) (Pace et al., 1986; Lemke & Leff 2006; Duncan et al., 2009; Pham et al., 2009; Whyte et al., 2011) e a tecnologia Illumina (Hi-Seq-2000) (Bucker et al., 2014) Uma técnica que pode envolver o sequenciamento posterior é o DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis (Whyte et al., 2011; Sorensen et al., 2011). O DGGE é um método rápido e de baixo custo que permite conhecer o perfil da comunidade de diferentes amostras (Muyzer et al 1993).

Para quantificação de microrganismos totais ou grupos específicos de microrganismos as técnicas de DAPI (uso do corante 4',6-diamidino-2 phenylindole) e FISH (fluorescence in situ hybridization) vem sendo bastante empregadas (Lemke & Leff 2006; Holmkvist et al., 2011; Sorensen et al., 2011). Pelo método de DAPI é possível quantificar todos os microorganismos intactos que contém DNA (células vivas ou dormentes) em amostras líquidas, incluindo combustíveis (Larsen et al 2006). O procedimento é simples e pode ser executado em menos de um dia. Uma fração da amostra líquida é filtrada e as células são coradas com 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI), após as células podem ser contadas diretamente em microscópio de epifluorescência. Já quando há a necessidade de quantificar microrganismos específicos ou grupos de microrganismos, como as SBR, por exemplo, a técnica de FISH é um método bastante robusto. Nesta técnica, o DNA contido na amostra é hibridizado com sondas específicas para o 16S rRNA de cada microrganismo ou grupo de microrganismos, marcadas com fluoróforos. Após a hibridização, as amostras são contadas em um microscópio de epifluorescência e cada grupo é observado com uma cor específica. Para uma mesma amostra podem ser utilizadas diferentes sondas o que permite a quantificação de diferentes grupos de uma só vez (Sorensen et al., 2011). Esta mesma técnica pode ser ainda empregada para o

monitoramento de grupos funcionais, ou seja, microrganismos que compartilham uma função metabólica específica como a produção de metano, por exemplo (He et al., 2007; Sorensen et al., 2011).

As contagens de microrganismos totais também são possíveis através do uso de outras ferramentas como as análises de componentes celulares específicos, em particular quando a biomassa e seus componentes, ocorrem em proporções estáveis. A biomassa pode ser calculada, por exemplo, em relação à quantidade de DNA (Tranvik, 1997), lípidos da membrana (White et al., 1979), proteínas (Bradford, 1976) e trifosfato de adenosina (ATP) (Lundin et al., 1986).

Os métodos que empregam bioluminescência (ATP) vem sendo uma alternativa atraente particularmente por fornecerem um diagnóstico em tempo real, sendo menos trabalhosos (Delahaye et al., 2003; Costa et al., 2004; Passman et al., 2007; Geva et al., 2007; Passman, 2009; Mahato et al., 2011)

1.7.1.1 BIOLUMINESCÊNCIA pelo ATP

Todos os organismos vivos possuem trifosfato de adenosina (ATP), que é usado como a moeda universal de energia livre em sistemas biológicos. A enzima luciferase é capaz de hidrolisar ATP em AMP, libertando neste processo a energia armazenada como a luz visível. A luciferase pode, portanto, ser empregada para detectar rapidamente a presença ou ausência de microrganismos viáveis em uma amostra pela análise da intensidade desta reação pois a intensidade de luz produzida é proporcional à concentração de ATP e, portanto, o número de células microbianas. A luz produzida é medida utilizando-se um instrumento chamado "Luminômetro" (Desai, 2008).

Alguns métodos com base em bioluminescência foram desenvolvidos para a quantificação de microrganismos. Bastante utilizada como um indicador rápido para a presença de carga biológica, como um teste de passa/não passa (Calvert, 2000), esta técnica vem sendo amplamente utilizada para estimar a carga biológica em superfícies e utensílios hospitalares, superfícies de preparo de alimentos, alimentos crus ou industrializados, bebidas e águas residuais de efluentes industriais e hospitalares entre outros, fornecendo resultados em menos de 5 min (Vanstaen, 1980; Stanley, 1982; Vilder, 1989; Waes et al., 1984; Ogden, 1993; Siragusa et al., 1995; Bell et al., 1996; Murphy et al., 1998; Samkutty

et al., 2001; Fukuda et al., 2005; Aycicek et al., 2006; Chen & Godwin, 2006; Tebbutt et al., 2007; Vilar et al., 2008, Caputo et al., 2011; Lehto et al., 2011). Estes métodos têm sido aplicados com sucesso na detecção de contaminação microbiana na indústria alimentícia, na área médica e também na farmacêutica, para verificação da pureza de alguns produtos (Belyaeva et al., 1983; Frundzhan et al., 1997, 1999; Geva et al., 2007).

Atualmente, a metodologia que emprega bioluminescência do ATP é o método mais sensível para uma rápida detecção e quantificação de contaminação microbiana, mesmo sem identificar ou quantificar diretamente os microrganismos (Calvert, 2000). Na indústria do petróleo este método ainda enfrenta alguns problemas pela natureza bifásica das amostras. Mesmo assim, o método bioluminescente para determinação do ATP intracelular com luciferase tem sido utilizado na quantificação de microrganismos tanto isolados, quanto em culturas mistas (Egorov et al., 1985; Efremenko et al., 2002, 2005; Passman, 2007, Geva et al., 2007; Dodos et al., 2011; Dodos e Zannikos, 2013). No momento, o teste padrão para avaliação da contaminação de combustíveis por bioluminescência do ATP está descrito na Norma ASTM D7687-11 *Standart test method for measurement of cellular adenosine triphosphate in fuel, fuel/water mixtures and fuel – associate with sample concentration by filtration*. Este método utiliza tecnologia QGO-M kits da empresa IlluminUltra[®]. De acordo com esta norma a quantificação do ATP ocorre em amostras de combustível, envolvendo muitos passos e uma quantidade grande de reagentes, dificultando a realização da avaliação em campo por pessoal não especializado.

1.7.1.2 Quantificação de biomassa microbiana através do método bioluminescência do ATP

Este método mede a emissão de luz produzida devido à presença de ATP, que está envolvido numa reação enzima-substrato entre luciferina e luciferase (bioluminescência), devido à sua elevada sensibilidade e selectividade. A quantidade de luz produzida (medida em unidades relativas de luz - RLU) é proporcional à concentração de ATP e, portanto, para a carga biológica associada a amostra. A luciferase catalisa uma reação em dois passos que requer substratos luciferina (LH₂), Mg, ATP e oxigênio, resultando na produção de luz

amarelo esverdeada (Strehler, 2006). A reação da enzima luciferase tem uma resposta rápida (milissegundos) e uma ampla gama de detecção de ATP. Uma vez que outros nucleotídeos de adenosina como AMP ou ADP não reagem com a enzima, esta reação é altamente específica para o ATP. A sensibilidade é extremamente alta, porque o sinal de fundo é, teoricamente, zero (Wang et al., 2000). Apesar disto, encontrar uma correlação entre as quantidades de ATP obtidas com a carga microbiana existente, aferida pelos métodos de contagem tradicionalmente utilizados é uma questão central para o estabelecimento do uso e da interpretação das técnicas de bioluminescência (ATP) (Mulvey et al., 2010). De acordo com Carrascosa *et al.*, (2012), ensaios de bioluminescência do ATP podem ser usados para enumeração de contagem total, mas curvas de calibração devem ser estabelecidas (por tipo de matriz ou de superfície) para se correlacionar as medições de ATP para as contagens microbianas .

A medida do ATP pode incluir tanto o ATP intracelular, aquele produzido pelo microorganismo vivo, quanto o extracelular, aquele ATP que foi liberado fora da célula devido ao stress ou morte do microorganismo. Por este motivo, algumas matérias-primas e produtos finais podem conter elevados níveis de ATP não microbiano que podem interferir com a reação de bioluminescência. Devidamente configurado, o ensaio bioluminescência pode distinguir o ATP extra do intracelular pela hidrólise enzimática do ATP extracelular, utilizando a enzima apirase, antes da lise das células. Este passo de hidrólise também reduz interferências e produz um resultado mais reprodutível. A distinção entre ATP extra e intracelular pode ser de grande importância para algumas matrizes (amostras) (Desai, 2008).

A proporção de ATP/CFU difere muito de uma área de amostragem para outra, dependendo dos microrganismos presentes. Por exemplo, uma proporção de ATP/CFU muito baixa, pode indicar bactérias Gram-negativas ou presença de esporos, enquanto que uma relação ATP/CFU alta poderia significar bactérias gram-positivas, leveduras e fungos (Borguei & Hall, 2012). Esta correlação também pode ser influenciada pela correlação entre o volume das células microbianas e o seu conteúdo de ATP que podem variar em várias ordens de grandeza sob diferentes condições. Isto foi demonstrado para culturas de bactérias marinhas em água do mar artificial (Hamilton & Holm-Hansen, 1967).

1.7.2 Níveis de contaminação:

Apesar da contaminação microbiana nos tanques de armazenamento ser bastante comum, ainda não há padrões universalmente aceitos para definir o que constitui a contaminação microbiana significativa em combustível ou da água presente no fundo do tanque de armazenamento (Gaylarde et al., 1999, Bento et al., 2010; Passman, 2013). Diferentes entidades ligadas ao mercado de combustível, tais como o International Air Transport Association (IATA), o Instituto do Petróleo (IP) no Reino Unido e a ASTM nos EUA, têm sugerido diretrizes. Institute of Petroleum (1996), considera contagens de $<10^2$ UFC / L bactérias e $<10^3$ UFC / L fungos como aceitável para o óleo diesel armazenado por dois a três anos. Se um tempo maior de armazenamento é necessário, como no caso de reservas estratégicas e óleo diesel para uso agrícola, os níveis aceitáveis são menores ainda. Para a água do fundo dos tanques o IP considera que 10^9 - 10^{11} UFC/L de bactérias, 10^7 - 10^{10} UFC/L de leveduras, 10^6 UFC/L de fungos e 10^5 CFU/L de SRB, são uma contaminação aceitável (Instituto of Petroleum, 1996). A ASTM sugere que uma contagem de 10^5 CFU/mL (contagem total), pode ser, em muitos casos, aceito na água. Também a SGS (Societe Generale de Surveillance), empresas suíça de inspeção, teste e certificação, limita a valores menores que 3×10^3 CFU/L como aceitáveis para a contaminação de combustíveis. Tanto o IP quanto a ASTM reconhecem a falta de critérios para o que seria considerado contaminação microbiana significativa. Ao longo dos últimos anos alguns autores também tentaram estabelecer limites para classificação dos resultados das suas pesquisas que podem ser utilizados de forma comparativa para estudos nesta área. De acordo com Allsopp et al., (2004), o óleo cru e seus derivados podem ser classificados como contendo uma contaminação leve ou alta de acordo com o nº de microrganismos presentes na água do fundo do tanque. A estimativa de 10^6 - 10^7 CFU/L (fungos e leveduras) são considerados como contaminação leve e 10^7 - 10^9 CFU/L (fungos e leveduras) como contaminação alta. Hill & Hill, (2009) sugerem a seguinte classificação para o combustível: 10^4 CFU/L contaminação aceitável, entre 10^4 - 10^5 CFU/L indicativo de alerta e 10^6 CFU/L ou mais como um sistema altamente contaminado.

Rodríguez-Rodríguez et al., (2009) sugerem que para se estabelecer padrões de contaminação para o combustível seria necessário cruzar dados sobre a quantificação de microrganismos e as alterações físico químicas sofridas pelo combustível, porém os autores não especificam quais alterações seriam mais relevantes.

1.8 Métodos de controle da contaminação microbiana em combustíveis

Uma vez que ainda é praticamente impossível manter o combustível livre de microrganismos (Yemashova et al., 2007), um plano de manejo adequado do combustível estocado é fundamental na qualidade final dos combustíveis. O controle da contaminação microbiana em tanques de combustíveis envolve a adoção de métodos físicos e métodos químicos (Pasmman 2003, 2013; Bento et al., 2006; Yemashova et al., 2007; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009; Bento et al., 2010; Zimmer et al., 2011; Passman, 2013).

1.8.1 Métodos de controle físico

1.8.1.1 Drenagem e limpeza dos tanques

De todos os requisitos necessários para o crescimento microbiano em combustíveis, a água é o único que pode ser efetivamente eliminado (Swift, 1988, Gaylarde et al., 1999; Passman 2003). O volume de água dentro de um tanque de armazenamento pode variar muito dependendo do tamanho, tipo, idade, condição, localização (subterrâneo ou aéreo) e do tipo de proteção do respiro do tanque (flutuante ou fixo). Um tanque grande, (38.000L) pode conter entre 0,0001 a 0,001% de água, tanques menores, (75L), podem conter entre 0,0002 a 0,002% e os tanques pequenos, como aqueles de automóveis (com até 45L) podem conter entre 0,01 e 0,002% (Robbins & Levy, 2004). Ações de prevenção e controle são recomendadas na Norma Brasileira ABNT 15512.

A eliminação da água é uma forma efetiva de controlar o crescimento. A drenagem e limpeza física regular dos tanques podem garantir uma boa descontaminação do sistema, especialmente quando associada a procedimento de filtração e centrifugação do combustível (Pasmman, 2003). Porém, a

drenagem dos tanques muitas vezes é dificultada devido ao seu formato e localização. A maioria é subterrânea e não apresenta declividade, com isto, a água presente no fundo do tanque nunca é drenada totalmente (Gaylarde et al., 1999; Westbrook 2000; Robbins & Levy, 2004). Neste tipo de tanque, também é difícil detectar danos tais como, corrosão e vazamentos (Gaylarde et al., 1999).

1.8.2 Métodos de controle químico

O emprego de biocidas é o método químico mais amplamente recomendado na Europa e também nos Estados Unidos para o controle da contaminação nos tanques de armazenamento de combustíveis e biocombustíveis (Bento et al., 2006).

1.8.2.1. Biocidas para uso em combustíveis

De acordo com a Directiva 98/8/CE, produtos biocidas são definidos como substâncias e preparações que contenham uma ou mais substâncias ativas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao consumidor, destinados a destruir, tornar inofensivo, evitar a ação de, ou exercer um efeito de controle sobre qualquer organismo prejudicial por meios químicos ou biológicos.

No escopo deste estudo nossa proposta é limitar esta definição para apenas meios químicos e aplicar as seguintes definições:

- **Biocidas:** moléculas químicas que controlam o crescimento ou matam microrganismos podendo estar em sua forma pura e ou misturado em produto comercial.
- **Atividade antimicrobiana:** um efeito inibitório (bioestático) ou letal (biocida) de um produto biocida.

Os biocidas compreendem um grupo com amplo espectro de produtos, com componentes e estrutura química diversa (compostos orgânicos e inorgânicos) (Gaylarde et al., 1995; Bento et al., 2006). Eles são utilizados para controle da contaminação microbiana em combustíveis desde os anos 60, sendo empregados mais amplamente em combustíveis de aviação (Passman, 2003).

Alguns aditivos presentes no óleo podem exercer o papel de supressores do crescimento microbiano. Antidetonantes, anti congelantes,

inibidores de corrosão e até alguns antioxidantes são usados em combustível de aviação com algum sucesso (Passman, 2011).

Os biocidas são comumente classificados de acordo com seus organismos alvo. Alguns são mais efetivos em um grupo de microrganismos como fungos (fungicidas) ou bactérias (bactericidas) e outros podem ser efetivos contra um espectro maior envolvendo ambos os grupos, mas sua ação é mais efetiva quando eles atuam com um grupo microbiano específico. Alguns são solúveis em água, outros são solúveis em óleo e outros podem ser solúveis em ambas as fases (Passman, 2003).

O caráter químico dos biocidas permite que sejam classificados em duas categorias, oxidantes (ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos clorados) e não oxidantes (compostos sulfurados, estanhados, isotiazolonas, sais de cobre e outros (Gaylarde, 1995; Browne, 2011).

Existem no mercado cerca de 200 substâncias biocidas, cujo modo de ação depende do contato físico entre o produto químico e o microrganismo. A ação do agente químico na estrutura ou metabolismo do microrganismo pode destruí-lo (ação biocida), controlá-lo (ação biostática) ou repeli-lo (Leite & Murro, 1999, Canter, 2012). Assim, dependendo das suas características o biocida pode interagir com três alvos distintos na célula: com as estruturas celulares externas, como a parede celular; com componentes da membrana plasmática, ou com as estruturas citoplasmáticas (Yemashova et al., 2007). De acordo com seu modo de ação dos biocidas podem ainda ser divididos em quatro categorias, os oxidantes, os eletrofílicos, os líticos e os protonóforos. Os oxidantes promovem a morte rápida de microrganismos e seu modo primário de ação consiste em oxidar compostos constituintes das células microbianas, sendo consequentemente efetivos contra quase todos os tipos de microrganismos (amplo espectro). Os eletrofílicos (não oxidantes) incluem íons inorgânicos (prata, cobre, mercúrio) e orgânicos (formaldeídos e isotiazolonas) atuando sobre os microrganismos por interferência em seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular, geralmente são inibidores enzimáticos ou desnaturam proteínas (Gaylarde, 1995; Wiencek & Chapman 1999; Chapman, 2003). Os líticos (Clorexidina e sais quaternários de amônia, por exemplo) e protonóforos (fenoxietanol, ácido benzóico) atuam sobre componentes da membrana celular, alterando sua

permeabilidade. Os líticos desestabilizam a membrana promovendo a sua lise, enquanto os protonóforos interferem na habilidade da célula de manter o pH, resultando na acidificação de seu meio interno e conseqüente desequilíbrio metabólico (Chapman, 2003).

Dentre as principais moléculas biocidas para uso em “*metalworking fluids*”, que em geral, também são aplicados em combustíveis pode-se citar os aldeídos (Formaldeídos), os liberadores de formol (Trizinas, oxazolidinas, morfolinas e hemiformol), os compostos heterocíclicos N, S (isotiazolonas, benzoisotiazolinonas, octil isotiazolinonas e di octil isotiazolinonas) e carbamatos (IPBC iodo propinil butil carbamato) (Canter, 2012).

As **isotiazolonas** são amplamente utilizadas em uma variedade de aplicações industriais de tratamento de água para controle do crescimento microbiano e bioincrustação. O produto mais frequentemente utilizado é uma relação de 3:1 de 5 - cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMIT) e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MIT). CMIT / MIT tem eficácia de amplo espectro contra bactérias, algas e fungos. Um outro produto, a 1,2-benzisotiazolin-3-ona (BIT) têm sido utilizados em uma gama limitada de aplicações industriais que requerem preservação a longo prazo para o controle de bactérias, incluindo o processamento mineral e sistemas de arrefecimento de circuito fechado.

Antimicrobianos à base de isotiazolona funcionam como agentes biocidas eletrofílicos, exercendo uma ação biostática. A inibição do crescimento é o resultado da interferência com as principais rotas metabólicas da célula, inibindo enzimas específicas como as desidrogenases, que atuam no ciclo de Krebs (alpha desidrogenase, piruvato desidrogenase) e na inibição da geração de energia (NADH desidrogenase). Muitas destas enzimas estão presentes em microrganismos aeróbicos e anaeróbicos e por isto, formulações com este princípio ativo tem amplo espectro de ação (Williams, 2007).

As oxazolidinas são uma importante classe de compostos heterocíclicos, que apresentam propriedades antimicrobianas, sendo muito utilizadas na indústria farmacêutica (Zhang et al., 2005). A ação de biocidas com o princípio ativo baseado em oxazolidinas está relacionado à inibição da síntese de proteínas. A oxazolidina atua no centro peptidiltransferase de ribossomos mitocondriais e bacterianos (Wilson & Nierhaus, 2007).

1.8.2.2 Seleção de moléculas biocidas para uso em combustíveis

Na seleção de um biocida muitos fatores precisam ser avaliados, tais como tempo de morte, efeitos de inibição, tempo de proteção efetiva, ecotoxicidade, variedade de espécies inibidas e atuação sobre consórcios. Muitos estudos são conduzidos em condições de laboratório e extrapolados para situações de maior escala e complexidade como um tanque de armazenamento (Westbook et al., 1988; Bento & Gaylarde, 1996; Bento & Gaylarde, 2001). Além disto, a escolha de um biocida para utilização em combustíveis deve atender alguns critérios tais como 1) ter um amplo espectro de ação; 2) ser capaz de estar presente tanto na fase aquosa quanto na fase oleosa; 3) não apresentar corrosividade ao sistema; 4) não alterar as características químicas do combustível; 5) não apresentar risco ou apresentar risco reduzido ao ambiente (Jacobson & Williams 2000; Passman, 2003; Bento et al., 2006; Hill & Hill, 2009; Klinksporn, 2009; Siegert 2009; Bento et al., 2010; Passman, 2013).

O controle efetivo da contaminação microbiana em tanques de estocagem exige um programa de tratamento para curtos e longos tempos de preservação. Tratando-se de um sistema bifásico, onde a água é, em geral, a porção mais fortemente contaminada e o óleo a fase que se precisa preservar. As características de partição (solubilidade) dos biocidas devem ser levadas em consideração, pois durante a estocagem, concentrações teóricas de equilíbrio do biocida, vão atingir ambas as fases (aquosas e oleosas). Esta propriedade tem uma relação direta com a efetividade e tempo de preservação (Gaylarde, 1995; Gaylarde et al., 1999; Passman, 2003; Robbins & Levy, 2004).

Além disto, as estratégias antimicrobianas diferem de sistema para sistema e devem ser levadas em conta para a escolha do biocida (Siegert, 2009). A eficiência de um biocida pode variar bastante com relação ao grupo de microrganismos a ser tratado e até mesmo entre os diferentes gêneros, espécies e linhagens. De acordo com Yemashova et al., (2007), as bactérias gram negativas e fungos apresentam maior sensibilidade aos biocidas, enquanto algumas linhagens de *Mycobacterium* são as mais resistentes, entre os microrganismos que não formam esporos. Bento & Gaylarde (1996, 2001) destacam bactérias do gênero *Bacillus* e a levedura *Candida silvicola* como mais resistentes em um teste com um biocida à base de uma mistura de isotiazolonas.

Bento et al.,(2010), trabalhando com o mesmo produto, também relataram que a levedura *C. silvicola* foi o organismo mais resistente. Guiamet & Gaylarde (1996), demonstraram que a mesma mistura de isotiazolonas foi ativa contra biofilmes de *H. resinae*, mas foi menos eficiente quando as bactérias redutoras de sulfato estavam presentes. Bento (2001) cita os fungos *Aspergillus fumigatus* e *H. resinae* como mais resistentes ao mesmo produto. Outro fato importante é que microrganismos que vivem em produtos derivados de petróleo apresentam maior resistência devido ao contato prolongado com as substâncias tóxicas presentes no meio. Segundo Yemashova et al., 2007 o gênero *Penicillium* em geral é mais resistente que o gênero *Cladosporium*.

No Brasil, o uso de biocidas em combustíveis é ainda uma alternativa pouco conhecida e com muitas dúvidas a serem esclarecidas no setor de petróleo (Bento et al., 2006; Bento et al., 2010). Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas para se encontrar um biocida mais efetivo na preservação dos diferentes tipos de combustíveis (Siegert, 2009; Bento et al., 2010; Zimmer et al., 2010; Passman; 2011; Kenne & Browne, 2011; Zimmer et al., 2013).

1.8.2.3 Desvantagens no uso de biocidas

A principal desvantagem no uso de biocidas está no fato de se necessitar repetir o tratamento de tempos em tempos ou em cada vez que se recebe óleo novo. Além disto, a aplicação de biocidas em sistemas já contaminados pode provocar o entupimento de filtros por microrganismos mortos ou a produção de compostos tóxicos pelo acúmulo destes resíduos no fundo do tanque (Yemashova et al., 2007).

Uma das maiores preocupações do setor de combustíveis no que se refere à utilização de biocidas é como liberar um combustível tratado com biocida no ambiente de forma segura. Um problema com os biocidas solúveis em água, é que estes podem se acumular na água do fundo dos tanques e no momento da drenagem, esta água pode ser descartada sem tratamento, contaminando sistemas de esgoto e outros (Bento et al., 2010). No entanto, para a maioria das formulações modernas a orientação dos produtores é a de se diluir em água ou, em alguns casos, realizar a desativação com outros compostos (sais inorgânicos). No que diz respeito à fase oleosa, algumas empresas garantem que se o biocida

foi corretamente utilizado deveria ser transformado em produtos de combustão pelo motor, juntamente com o combustível sem alterar o padrão de emissões do mesmo (Siegert, 2009; Bento et al., 2010).

Atualmente, no Brasil a Lei nº 12.305/2010 que regulamenta a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), institui o princípio de responsabilidade compartilhada pelo ciclo de vida dos produtos, abrangendo fabricantes, importadores e comerciantes atacadistas e varejistas, além de consumidores e titulares dos serviços públicos de limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos. E, em paralelo, resoluções do CONAMA e normas ABNT que definem novos requisitos de Gestão de Áreas Contaminadas tem sido observados com seriedade pelo setor que já busca alternativas visando práticas mais seguras do ponto de vista ambiental (SINDICOM, 2010).

1.9 Considerações ambientais

Apesar da necessidade de seu uso, produtos antimicrobianos são percebidos pela opinião pública como perigosos e por isto, indesejáveis. Muitos ativos ou formulações têm sofrido restrições em alguns países como é o caso das triazinas e dos liberadores de formaldeído (Canter, 2012).

A utilização de qualquer produto antimicrobiano (biocidas ou pesticidas) requer seu registro junto aos órgãos de proteção ambientais. Nos Estados Unidos o órgão responsável é a Agencia de Proteção Ambiental (EPA) e na Europa, a European Biocidal Products Directive (BPD), no Brasil, o órgão responsável é o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, o IBAMA. Para a aplicação destes produtos em combustíveis ainda é necessária a permissão, de outros órgãos legisladores, como a ANP no Brasil.

Para a concessão das licenças, estes órgãos em geral requerem informações detalhadas sobre a composição química do produto e seus efeitos no ambiente, como degradabilidade, toxicidade e riscos à saúde humana (Canter, 2012). Estes testes, porém são muitos dispendiosos, com custos entre 0,5 e 1 milhão de dólares e podem levar até dois anos para se efetivarem. Por isto, somente se justificam para produtos que serão utilizados em grandes volumes (Passman, 2013).

Como forma de se avaliar os efeitos tóxicos de uma substância no ambiente são utilizados testes ecotoxicológicos. A ecotoxicologia é uma ferramenta de monitoramento ambiental, aplicada para gerenciar e estabelecer medidas de segurança na utilização de compostos químicos que asseguram a proteção do meio ambiente e da saúde humana (Azevedo & Chasin, 2003; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Kahru & Dubourguier, 2009).

1.9.1 Testes Ecotoxicológicos ou Bioensaios

Os bioensaios são a ferramenta mais comumente utilizada para se obter dados para avaliação de risco ecológico decorrente da exposição da biota a substâncias químicas (Florida, 2011). Comumente, o monitoramento ambiental é feito por meio de análises físico - químicas de águas residuais. Mas, nos últimos 20 anos, os testes de toxicidade com organismos aquáticos tornaram - se uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os organismos vivos, e de risco/periculosidade de agentes químicos, para o monitoramento da qualidade da água e estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes nos corpos hídricos (Zagatto, 1998).

Os ensaios de avaliação de toxicidade consistem na exposição de organismos-teste a diferentes concentrações das substâncias de interesse em condições rigorosamente padronizadas. Nestes ensaios analisa-se um efeito adverso específico causado sobre organismos-teste, como por exemplo, imobilidade, morte, alterações físicas e funcionais, entre outros por um período determinado de tempo. (ABNT, 2003; Matias, 2009; Florida, 2011).

Os testes de toxicidade aquática podem ser categorizados de acordo com o tempo de exposição, agudo ou crônico; situação de teste, estáticos ou em fluxo; efeitos a serem avaliados e organismos a serem testados (Rand, 1995; Veiga, 2010).

1.9.1.1 Teste de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda é, em geral, o primeiro estudo realizado, quando não se tem informações sobre as substâncias a serem estudadas. Estes ensaios necessitam de aparatos experimentais menos elaborados e têm como principal característica, períodos curtos de exposição (24

a 96 horas) dos organismos a um agente nocivo. O efeito agudo é uma resposta severa e rápida dos organismos ao agente estressor, sendo a imobilização e ou a morte dos organismos-teste os indicadores mais comumente avaliados (Knie & Lopes, 2004). Em ecotoxicologia aquática, estes estudos são geralmente realizados com peixes e invertebrados, sendo o efeito da mortalidade observado para peixes e imobilidade para invertebrados, pois são critérios de fácil avaliação e possuem significado ecológico para o ambiente (Matias, 2009). De acordo com a ABNT NBR 12713/2004, a imobilidade do organismo-teste é determinada através da incapacidade do mesmo em nadar na coluna d'água durante um período de até 15 segundos, após uma leve agitação do recipiente. O resultado dos testes de toxicidade aguda normalmente é expresso através da concentração letal média (CL₅₀) ou da concentração efetiva mediana (CE₅₀) (Costa et al., 2008; Matias, 2009; Florido, 2011) mas os efeitos também podem ser expressos por critérios quantificáveis, tais como o número de organismos imobilizados ou mortos e número de ovos eclodidos (Rand & Petrocelli 1985).

1.9.1.2 Teste de toxicidade crônica

Os ensaios de toxicidade crônica são utilizados quando se deseja avaliar os efeitos sobre as funções biológicas, tais como reprodução e crescimento. São experimentos de longa duração, que visam estudar os efeitos crônicos subletais, a partir da exposição prolongada a concentrações subletais do contaminante. Estes testes são avaliados através de análises específicas (histológicas, hematológicas, comportamentais, etc.), utilizadas para a detecção de alterações crônicas, como distúrbios fisiológicos, deformidades, alterações no crescimento, reprodução, entre outras, que não causam necessariamente a morte do organismo (Azevedo & Chasin, 2003). O período de exposição pode abranger todo ciclo de vida do organismo ou as fases iniciais de seu desenvolvimento (CONSEMA, 2006, Rubinger, 2009). A observação diária das mortalidades ocorridas no ensaio de toxicidade crônica também permite calcular a toxicidade aguda (Hartmann, 2004).

1.9.2 Organismos-teste

Em função da grande diversidade de espécies, existentes e das

inúmeras relações de dependência entre elas, preconiza-se que os testes sejam realizados com, no mínimo, três organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (produtores, consumidores primários, consumidores secundários e decompositores), de modo a obter o resultado com o organismo mais susceptível, estimando com maior segurança o efeito deletério (Rand, 1995; Aragão & Araújo, 2006). A utilização de testes de toxicidade com diferentes organismos teste, reduz os erros e incertezas associadas à extrapolação das respostas de laboratório para campo (Azevedo & Chasin, 2003; Oliveira Neto et al., 1998).

A seleção de um organismo teste deve seguir alguns critérios tais como, disponibilidade e abundância do organismo no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório, conhecimento da biologia da espécie, além da representatividade do organismo em relação a seu nível trófico (Rand, 1995; Bohrer, 1995, Costa et al., 2008). Outro princípio básico nesta escolha é a sensibilidade, é preciso que a espécie seja sensível a uma diversidade de agentes químicos (Domingues & Bertoletti, 2006). A sensibilidade de um organismo irá depender de diversos fatores como o nível nutricional, idade do organismo, sexo, fase de desenvolvimento, características genéticas, competição entre indivíduos ou espécies, além de fatores ambientais como luminosidade e temperatura (Castro, 2008).

1.9.2.1 Testes de toxicidade com *Artemia salina* Leach

O microcrustáceo *Artemia salina* Leach pertence ao filo Arthropoda, classe Crustácea, subclasse Branquiopoda, ordem Anostraca, família Artemidae e Gênero *Artemia* – Leach, 1819. Possui distribuição cosmopolita e caráter eurialino. Os organismos desse gênero atuam como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores. A espécie tem grande capacidade de adaptação à salinidade, ciclo de vida curto, alta capacidade de adaptação a condições ambiente adversas, alta fertilidade, reprodução bissexual ou partenogenética, tem tamanho pequeno e capacidade de adaptação a fontes de nutrição variadas (Veiga & Vital, 2002; Nunes et al., 2006). Além disto, a disponibilidade contínua de *Artemia* na forma de cistos, torna fácil utilizá-la em testes de toxicidade. Por se tratar de um animal de fácil manutenção em condições de laboratório e de ampla distribuição, *A. salina* tem sido amplamente

utilizada em testes de toxicidade destacando-se para a avaliação da toxicidade de efluentes e poluentes ambientais (Peters et al., 1997), mais recentemente foi comprovada também sua efetividade na detecção de toxinas produzidas por cianobactérias (Garcia-Rodriguez et al., 2004). *Artemia* é de longe um dos exemplos mais marcantes de organismos bem adaptados para práticas de laboratório, enquanto um controle rigoroso sobre procedimentos e metodologias é mantida. Por outro lado, a sua utilização como organismo teste é representativa do esforço de reduzir a escala dos organismos, com concomitante redução em volumes de teste, quantidade de resíduos produzidos e espaço necessário para executar os protocolos de ensaio (Blaise, 1998).

1.9.2.2 Testes de Toxicidade com sementes de *Lactuca sativa* L.

A planta *Lactuca sativa* (alface) pertence à Divisão Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida, Ordem Asterales, Família Asteraceae família das Cichoriaceae. A alface, como é popularmente conhecida, é uma hortaliça anual ou bianual, utilizada na alimentação humana desde cerca de 500 A.C. Originária do Leste do Mediterrâneo é mundialmente cultivada para o consumo em saladas, com inúmeras variedades de folhas, cores, formas, tamanhos e texturas. As sementes da espécie *L. sativa* são muito empregadas em ensaios de germinação, por ser facilmente obtida e por oferecer resultados rápidos e fáceis de ser avaliados (Garcia, 2006). A espécie é utilizada por ser um organismo muito sensível a distúrbios do meio ambiente, atuando como indicadores do funcionamento do ecossistema que fazem parte. O teste é realizado através da avaliação do efeito tóxico sobre a germinação e o crescimento da raiz causado pelas substâncias presentes em amostra líquidas ou sólidas.

1.9.3 Toxicologia do óleo diesel, biodiesel e misturas

Derramamentos de petróleo e seus derivados são os principais responsáveis pela contaminação orgânica presente nos corpos hídricos. Quando ocorre um derramamento de combustível no meio ambiente, este composto sofre inúmeros processos de partição ambiental que determinam o destino do poluente e seus possíveis impactos ambientais. São muitos os estudos que relacionam o uso do petróleo e seus derivados com impactos ambientais, demonstrando que

estes são tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e que possuem substâncias de baixa biodegradabilidade (Griffin & Calder, 1977; Gaur & Sighn 1989; Al-Yakoob et.al., 1996; Lockhart et. al., 1996; Lemos 2003; Vieira, 2004; Zhang et al., 2004; Kennedy & Farrel, 2005, Barsiené et. al., 2006; Vanzella et al.,2006; De Miranda, 2007; Simonato et al; 2008, Hollebone, 2009; Rodrigues et. al., 2010; Albertus, 2012; entre outros).

A dissolução da **fração solúvel em água (FSA)** dos combustíveis é responsável por grande parte da contaminação ambiental causada por esses acidentes (Griffin & Calder, 1977; Saeed & Al-Mutairi, 1999; Almeida-Val et. al., 2002; Navas et. al., 2006). O óleo diesel apresenta baixa solubilidade em água, porém sua FSA contém vários componentes tóxicos, como hidrocarbonetos e metais. Quando esta fração migra para a fase aquosa pode ocasionar sérios distúrbios em diversos níveis biológicos (Heath, 1995) pois os animais aquáticos podem entrar em contato com ela tanto de forma direta, pelo contato através das brânquias e da pele, quanto indiretamente, através da ingestão de alimento contaminado (Barron, 2003).

A FSA do óleo diesel apresenta uma toxicidade mais elevada quando comparada a FSA do óleo cru (Griffin & Calder, 1977; Gaur & Sighn 1989; Lemos 2003; Rodrigues et al., 2010). Na exposição aguda de peixes à FSA do petróleo cru e à FSA do óleo diesel, observou-se um alongamento das brânquias dos peixes, hiperplasia lamelar (Dede & Kaglo, 2001), anomalias nas pseudobranquias e nos tecidos do esôfago e fígado (Rodrigues et al., 2010).

A FSA do óleo diesel é composta por uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), monoaromáticos (BTEX- benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), fenóis e compostos heterocíclicos que contem nitrogênio e enxofre (Saeed & Al-Mutairi, 1999), além de metais, como o cobre e o níquel. Dentre os metais, o cobre merece uma maior atenção devido a sua toxicidade e potencial para bioacumular (Silveira et al., 2006). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como naftaleno e fenantreno estão entre os componentes que apresentam o maior risco ambiental (Lee & Anderson, 2005; Simonato et al., 2008).

A solubilidade em água dos compostos tóxicos presentes no petróleo e seus derivados pode ser aumentada devido a diversos fatores como a

presença de aditivos e/ou subprodutos de processamento que contenham átomos heterocíclicos como O, N, ou S, por um mecanismo chamado de cosolvência (Owen, 1989). Por isto, poderia-se acreditar que a adição de biodiesel ao óleo diesel poderia promover um aumento da solubilidade destes compostos tóxicos na água, uma vez que o mesmo é mais solúvel que o óleo diesel (pela presença de O na molécula) e também pela presença de aditivos em sua composição tais como antioxidantes e anticongelantes, necessários a manutenção de suas propriedades químicas (Mudge & Pereira, 1999). Estudos recentes, no entanto, têm sugerido que a adição do biodiesel ao óleo diesel pode reduzir a toxicidade aquática, sendo esta redução melhor observada com misturas acima de 20% de biodiesel no óleo diesel (Peterson & Muller, 2006; Khan et al., 2007; DeMello et al., 2007; Silva et al., 2007; Hollebhone et al., 2008, Muller, 2011; Leme et al., 2011).

Khan et al., (2007) estudaram os efeitos toxicológicos causados pelas FSA do biodiesel de óleos e gorduras recicláveis, óleo diesel e suas misturas sobre *Oncorlzyuichus mykiss* (peixe truta arco-íris) e *D. magna*, através de testes de toxicidade aguda. Eles observaram que a FSA do biodiesel é consideravelmente menos tóxica para os organismos aquáticos do que a FSA do óleo diesel, mas que ainda assim há risco substancial no caso de uma contaminação por biodiesel.

Os compostos antimicrobianos utilizados para controle de microrganismos são geralmente solúveis no combustível e na água. Quando o combustível tratado entra em contato com a água que se forma no fundo do tanque de armazenamento, frações do biocida migram para esta fase (Robins & Levi, 2004; Passman, 2013). Estes produtos, quando utilizados nas doses recomendadas e tomadas as devidas precauções no manuseio não devem apresentar riscos a saúde (Smith et al., 1983). Uma das maiores preocupações quanto a utilização de biocidas em combustíveis envolve o tratamento e eliminação do efluente drenado dos tanques de armazenamento de combustíveis tratados com antimicrobianos (Bento et al., 2010; Zimmer et al., 2013). No caso dos antimicrobianos a base de Isotiazolonas sugere-se a desativação do produto com metabisulfito sódico ou bissulfato de sódio ou ainda a diluição do efluente (Rohm & Haas, 1999). Na literatura existe uma escassez de informações sobre

este tema e completa ausência sobre os impactos que a utilização de biocidas nos combustíveis pode causar. Castro et al., 2011, chamam a atenção para o mesmo problema ocorrendo com biocidas utilizados em tintas e destaca a dificuldade de se realizar experimentos que permitam avaliações precisas uma vez que mais de um produto tóxico pode estar presente na amostra avaliada, propiciando o surgimento de efeitos sinérgicos ou aditivos.

1.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP (BRASIL). **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2013**. Rio de Janeiro: ANP, 221 p. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em 18 set. 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP **Folder Biocombustíveis**. 2010. Disponível em www.anp.gov.br. Acesso em 15 fev. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Resolução ANP** Nº 14, de 11 de maio de 2012 - DOU 18.5.2012. Regulamenta as especificações do biodiesel, contidas no Regulamento Técnico ANP nº 4/2012, e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 20 out. 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Resolução ANP** Nº 50, de 23 de dezembro de 2013. DOU 24.12.2013. Regulamenta as especificações do óleo diesel de uso rodoviário, contidas no Regulamento Técnico ANP nº 4/2013, e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2012.
- AKTAS, D.F. Anaerobic metabolism of biodiesel and its impact on metal corrosion. **Energy Fuels**, 24:2924-2928, 2010.
- ALBERTUS, R. M. C. Ecotoxicity and environmental fate of diesel and diesel blends produced by Sasol's Fischer-Tropsch processes using natural gas and coal as feedstock as well as biodiesel and biodiesel blends. University of Stellenbosch. 2012. (**Tese de doutorado**) - Department of Zoology, University of Stellenbosch, South Africa. 119p.
- ALI, M. F.; AL-MALKI, A.; EL-ALI, B.; MARTINIE, G. & SIDDIQUI, M. N. Deep desulphurization of gasoline and diesel fuels using non-hydrogen consuming techniques. **Fuel**, 85 (10–11): 1354–1363, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2005.12.006>
- ALLSOPP, D. S. K. & SEAL, K. J. **Materiais Naturais** in: **Introduction to biodeterioration**, 2a ed. Cambridge University Press, UK; London, Edward Arnold, Capítulo 2. 136p. 2004.
- ALMEIDA, E. S.; PORTELA, F. M.; SOUSA, R. M. F; DANIEL, D.; TERRONES, M. G. H. & RICHTER, E. M. Behaviour of the antioxidant tert-butylhydroquinone on the storage stability and corrosive character of biodiesel. **Fuel**, 90:3480–3484, 2011.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F; DUNCAN, A. L. & VAL, A. L. Crude Oil Effects on Fish of the Amazon: Current Status. *In: Tropical Fish: News and Reviews. International Congress on The Biology of Fish*. Vancouver, Canada, p. 49–60, 2002.

-
- ALTIPARMAK, F.; DENGIZ, B. & BULGAK, A. A. Buffer allocation and performance modeling in asynchronous assembly system operations: An artificial neural network metamodeling approach. **Applied Soft Computing**, 7 (3): 946–956, 2007.
- AL-YAKOOB, S. N.; GUNDERSEN D. & CURTIS, L. Effects of the Water Soluble Fraction of Partially Combusted Crude Oil from Kuwait's Oil Fires (from Desert Storm) on Survival and Growth of the Marine Fish *Menidia beryllina*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 35, 142–149, 1996.
- AMBROZIN, A.R.P.; KURI, S. E. & MONTEIRO, M. R. Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. **Química. Nova**, 32 (7): 1910-1916, 2009.
- AMANN R. I. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. **Molecular Ecology**, 4(5):543–554, 1995. doi: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00255.x.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS- ASTM D1298-12B Standard Test Method for Density, Relative Density, or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2011, www.astm.org. doi: 10.1520/D1298-12B
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D7687 - 11 Standard Test Method for Measurement of Cellular Adenosine Triphosphate in Fuel, Fuel/Water Mixtures, and Fuel-Associated Water with Sample Concentration by Filtration. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2011, www.astm.org. doi: 10.1520/D7687-11
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D4052-11 Standard Test Method for Density, Relative Density, and API Gravity of Liquids by Digital Density Meter. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2011, www.astm.org. doi: 10.1520/D4052-11
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D6304-07 Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2011, www.astm.org. doi: 10.1520/D6304-07
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D664-11a Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2011, www.astm.org. doi: 10.1520/D0664-11A
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D6469 – 12 Standard guide for microbial contamination in fuels and fuel systems. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2012, www.astm.org. doi: 10.1520/D6469-12
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM D6751- 12 Standard Specification for Biodiesel Fuel. Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, USA, 2011. Disponível em: <<http://www.astm.org>>. doi: 10.1520/D6751-12.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM D 6974:09 (2013) Standard practice for enumeration of viable bacteria and fungi in liquid fuels-filtration and culture procedures. **ASTM International**, West Conshohocken, PA. www.astm.org. doi: 10.1520/D6974
-

-
- 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, www.astm.org. doi:10.1520/E1259-10.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS -ASTM D664-11A Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration. **ASTM International**, West Conshohocken, PA. www.astm.org. doi: 10.1520/D0664-11A
- APOLINÁRIO, F. D. B.; PEREIRA, G. F. & FERREIRA, J. P. Biodiesel e Alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. Bolsista de Valor: **Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e Fluminense**, Rio de Janeiro, 2 (1):141-146, 2012.
- ARAGÃO, M. A & ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.) **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 464 p.
- ARAÚJO, S.V.; MURILO T. F.; LUNA JR, E. M. R., AZEVEDO, D. C.S., & CAVALCANTE JR, C. L. A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration. **Fuel Processing Technology**, 90 (10):72–1277, 2009
- ARNOLD, D. Water key to microbe problem. **Marine Propulsion**, 28-29, 1991.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 15512: Norma “Armazenamento, Transporte, Abastecimento e Controle de Qualidade de Biodiesel e/ou Mistura Óleo Diesel/Biodiesel”. Rio de Janeiro: **ABNT**, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 12713: *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp. (Cladocera, Crustacea)*. Rio de Janeiro: **ABNT**, 2009.
- ATABANI A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H. & MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 16: 2070– 2093, 2012.
- ATADASHI, I. M., AROUA, M. K. & AZIZ, A. A. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14: 1999-2008, 2010.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons:an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, 45: 180–209, 1981.
- AYCICEK, H.; OGUZ, U. & KARCI, K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 209 (2): 203–206, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.09.007>
- AZEVEDO, F. A & CHASIN, A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: **Rima**. São Paulo: **InterTox**, 340p. 2003.
-

-
- BAI, R., S. WANG, F. MEI, T. LI, G. LI Synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate catalyzed by KF modified hydroxyapatite **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 17: 777-781, 2011.
- BAILEY, C. A. AND MAY, M. E. Evaluation of Microbiological Test Kits for Hydrocarbon Fuel Systems. **Applied And Environmental Microbiology**, 871-877,1979.
- BAKANAUKAS, S. Bacterial activity in JP-4 fuel. Wright air development centre technical report 58, 44, armed. **Services Technical Information Agency** Document N°151044, p.1-15, 1958.
- BALAT, M. & BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**; 87(6):1815–35, 2010.
- BANNISTER; C.D.; CHUCK; C.J.; BOUNDS, M. & HAWLEY, J.G. Oxidative stability of biodiesel fuel. **Proceedings of the institution of mechanical engineers**. Part D, Journal of automobile engineering, 225 (1): 1–16, 2010
- BARRETO, A.J.B.; MENDES, D.; JUNIOR, J.A.F.; SOUZA, J & COIMBRA, M.D.J. Estudo da adição de biodiesel do óleo de palma no óleo diesel. Disponível em www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007. 2007. Acesso em 03/03/2008.
- BARRON, M. G., CARLS, M. G., SHORT, J. W., AND RICE, S. D. Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed, weathered Alaska North Slope crude oil to Pacific herring eggs and larvae. **Environ. Toxicol. Chem.** 22, 650–660, 2003.
- BARSINIÈ, J. DEDONYT, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKÉNAIT, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, 78:99–104, 2006.
- BATTS, B. D. & FATHONI, Z. A. A literature Review on fuel stability studies with particular emphasis on diesel oil. **Energy & Fuels**. 5:2-21, 1991.
- BELL, C.; BOWLES, C.D.; TOSZEGHY, M.J.K. & NEAVES, P., Development of a hygiene standard for raw milk based on the lumac ATP-bioluminescence method. **International Dairy Journal**, 6 (7): 709–713, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)00007-6](http://dx.doi.org/10.1016/0958-6946(96)00007-6)
- BELYAEVA, Y.; BROVKO; L.; TRDATYAN, I.; UGAROVA, N.N. & RAININA, E.I. Means of cutting fluids biocontamination determination. Inventors certificate # 1150267.1983.
- BENTO F. M. & CAVALCANTI, E. H. S. Implicações da adição de 5% de biodiesel na qualidade do óleo diesel. 2012. Disponível em <http://www.cntdespoluir.org.br/Paginas/Artigos.aspx?n=7>
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, 47(2), 107-112, 2001.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Microrganismos e o armazenamento de óleo diesel. **Revista Petroquímica Petróleo, Gás & Química**, Rio de Janeiro 211: 70-77, 1999.
- BENTO, F. M.; VISCARDI, S.L.R.; DARODA, R. MENENDEZ, A.G. CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel á contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, São Paulo, 4, 24-26, 2006.
-

-
- BENTO, F.M.; BUCKER, F.; SANTESTEVAN, N.; CAVALCANTI, E.H.S.; ZIMMER, A. GAYLARDE, C.; CAMARGO, F. Impacto da adição do biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: Um enfoque microbiológico e controle. **Revista Biodiesel**, 47; Caderno técnico, 2010.
- BLAISE, C., Microbiotesting: An Expanding Field in Aquatic Toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 40: 115-119,1998.
- BOHRER, M. B. Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplânctônica. Tese (**Doutorado**) - UFSCar, São Paulo.1995. 469p.
- BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A., MIROSHNICHENKO, M.L; LEBEDINSKY, A. V.; CHERNYH, N. A.; NAZINA, T. N.; IVOILOV, V. S.; BELYAEV, S. S.; BOULYGINA, E.S.; LYSOV, Y. U.P.; PEROV, A. N.; MIRZABEKOV, A. D.; HIPPE, H.; STACKEBRANDT, E.; L'HARIDON, S. & JEANTHON, C. Radioisotopic, culturebased, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. **Applied Environmental Microbiology**, 69 (10): 6143–6151, 2003.
- BONDIOLI, P. & FOLEGATTI, L. Caratterizzazione chimica Del seme di Zapote (*Lucuma mammosa*). **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, 73: 229-230, 1996.
- BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; VERONESE, S. & SALA, M. Storage stability of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 72 (6): 699-702, 1995.
- BORGHEI, G. & HALL, E. A. H. ATP Measurement in Bio-Contamination. Portable Chemical Sensors.**NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology**, p.213-226, 2012. DOI 10.1007/978-94-007-2872-1_11
- BOSZCZYK-MALESZAK, H.; ZABOST, A.; WOLICKA, D. & KACIESZCZENKO, J. Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values. **Polish Journal of Microbiology**, 55 (1):69–73, 2006
- BOUAID, A.; MARTINEZ, M. & ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel** 86, 2596–2602, 2007.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248–254. 1976.
- BRASIL Lei nº 12.305/2010 que regulamenta a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) e estabelece diretrizes para reduzir a geração de lixo e combater a poluição e o desperdício de materiais descartados pelo comércio, pelas residências, pelas indústrias, por empresas e hospitais. Disponível em http://www.saude.rs.gov.br/upload/1346166430_Lei%2012.305_02082010_politica_residuos_solidos.pdf
- BRASIL. Lei nº. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras
-

- providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: Dez. 2009.
- BROWN, E. & BRADOCK, J. Sheen Screen, a most probable number method for enumeration of oil degrading microorganism. **Applied Environmental Microbiology**, 56: 3865-3896, 1990.
- BROWNE, A.B. Sustentable and effective preservation strategies for Ultra Low sulphur diesel biodiesel and unleaded gasoline. In IASH, 2011, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Sarasota, Florida, USA, October 16-20, 2011.
- BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N.A., ROESCH, L.F.; JACQUES, R.J.S.; PERALBA, M.C.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65, 172-178, 2011.
- BUSHNELL, C.D. & HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, 41, 654-674, 1941.
- CAFONE, L. (JN), WALKER, J.D. AND COONEY, J.J. Utilization of hydrocarbons by *Cladosporium resinae*. **Journal of General Microbiology** 76, 243-246, 1973.
- CALVERT, R. M., HOPKINS, H. C., REILLY, M. J., & FORSYTHE, S. J. Caged ATP e an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. **Letters in Applied Microbiology**, 30, 223-227, 2000.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR J. & MEHTA, S.K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 672:261-280, 2010.
- CANAKCI, M. & VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, 44, 1429, 2001.
- CANTER, N. The future of antimicrobial pesticides. **Tribology and Lubrication Technology**, March, 34-45. 2012. Disponível em: http://www.stle.org/assets/document/3-12_tlt_biocides_article_final.pdf acesso em dezembro, 2012.
- CAPUTO, P.; FERRI, E. N.; GIROTTI, S.; GOZZI, S.; & SARACINO, P. Application of luminescent ATP rapid checks at ready-to-eat foods producing plant. **Czech Journal of Food Sciences**, 29(4):382-390, 2011.
- CARRASCOSA, C.; SAAVEDRA, P.; MILLÁN, R.; JABER, J.R.; PÉREZ, E.; GRAU, R. RAPOSO, A.; MAURICIO, C. & SANJUÁN, E. Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies: Comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods. **Food Control** 28, 368-373, 2012.
- CASTRO, A. A. A. S. Avaliação ecotoxicológica de efluentes industriais utilizando *Danio rerio* Hamilton-Buchanam, 1822 (Teleostei, Cyprinidae). Dissertação (**Mestrado**). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2008. 63f.

-
- CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E. & FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, 34(6): 1021-1031, 2011.
- CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do Biodiesel e misturas – Abrangência, limitações dos métodos de avaliação e alternativas futuras. **Biodieselbr**, Curitiba, 71-73, 2009.
- CERNIGLIA, C. E. & CROW, S. A. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. **Archives of Microbiology**, 129: 9–13, 1981.
- CHAO, Y. N. LIU, T.; ZHANG, H. & CHEN, S. “Isolation and Characterization of Bacteria from Engine Sludge Generated from Biodiesel-Diesel Blends, **Fuel**, 89 (11), 3358-3364, 2010. doi:10.1016/j.fuel.2010.05.041.
- CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 51(2):133-138, 2003.
- CHEN, F.C. & GODWIN, S.L. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers’ refrigerators. **Journal of Food Protection**, 69: 2534-2538, 2006.
- CHESNEAU, H. L. “The Silent Fuel Killers (Stability and Microbiologicals),” **Proceedings of 2000 International Joint Power Generation Conference**. Miami Beach, Florida July 23-26, 2000.
- CHESNEAU, H. L. Fuel System Contaminants: An Introduction. *In*: H. L. Chesneau & M. M. Dorris (Eds.), **Distillate Fuel: Contamination, Storage and Handling**. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. 1988.
- CHUNG, Y. C., H. C. CHEN, Y. T. SHYU AND J. HUA Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. **Fuel**, 79 (12), 1525-1532, 2000.
- CIC GROUP, Commitment to corrosion monitoring year 2006, annual report to Alaska Department of Environmental Conservation. **BP Exploration** (Alaska), Anchorage, 166 pp. 2007.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DO TRANSPORTE – CNT. Procedimentos para a preservação da qualidade do óleo diesel B – Brasília : 2011. 56 p.: il. color. – (**Despoluir – Programa Ambiental do Transporte**) 1. Biodiesel – Brasil. 2011. Disponível em: www.cntdespoluir.org.br. http://issuu.com/despoluir/docs/biodiesel_completo. acesso em out , 2011
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **RESOLUÇÃO CONAMA 403/2008**, de 11 de novembro. Brasília: DOU 12.11.2008. Dispõe sobre a nova fase de exigência do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores - PROCONVE para veículos pesados novos (Fase P-7) e dá outras providências. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em fev. 2012.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA - **RESOLUÇÃO CONAMA 415/2009**. Dispõe sobre nova fase (PROCONVE L6) de exigências do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores-PROCONVE para veículos automotores leves novos de uso rodoviário e dá outras providências. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em fev. 2012.
-

-
- CONCEIÇÃO, M. M.; CANDEIA, R. A.; DANTAS, H. J.; SOLEDADE, L. E. B.; FERNANDES J.R., V.J. & SOUZA, A.G. Rheological behavior of castor oil biodiesel. **Energy & Fuels**, 19: 2185-2188, 2005.
- CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA (CNPE) **RESOLUÇÃO** CNPE nº 6 de 16/9/2009. CNPE – Conselho Nacional de Política Energética. 2008. Disponível em www.mme.gov.br/site/menu. Acesso em out. 2008.
- CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE -CONSEMA. **RESOLUÇÃO** nº. 129, de 24 de novembro de 2006. http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/smam/usu_doc/resolucao_consema_n129_06.pdf. Acesso em agosto 2011.
- CORD-RUWICH, R.; KLEINITZ, W. & WIDDEL, F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology**, 1, 97-106, 1987.
- COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F. & RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, 23(4): 531-537, 2000.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. & ESPINDOLA, E. J. G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Química Nova**, 31 (7), 1820-1830, 2008.
- COSTA, P. D.; ANDRADE, N. J.; PASSOS, F. J. V.; BRANDÃO, S. C. C. & RODRIGUES, C. G. F. ATP-bioluminescence as a technique to evaluate the microbiological quality of water in food industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47:399–405, 2004.
- DAS, L. M.; KUMAR, B. D.; SUBHALAXMI, P.; NALAYA, K. & NAIK, S. N. Long-term storage stability of biodiesel produced from Karanja oil. **Fuel**, 88 (11), 2315–2318, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2009.05.005>
- DAS, N. & CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview,” **Biotechnology Research International**, vol. 2011, Article ID 941810, 1-13, 2011. doi:10.4061/2011/941810 Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/btri/2011/941810/>.
- DATTA, A. & MANDAL, B. K. Biodiesel Production and its Emissions and Performance: A Review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, 1:(6): 1-6, 2012. ISSN 2229-5518. Disponível em: <http://www.ijser.org>.
- DE MIRANDA, G. R. Avaliação das Emissões Provenientes da Combustão de Diesel, Biodiesel de Resíduos de óleo de Fritura e suas Misturas. Dissertação (**Mestrado**)– Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007. 106 p.
- DEDE, E. B. & KAGLO, H. D. Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of Diesel fuel on *O. niloticus* fingerlings. **Journal of Applied Management Science**, 5: 93–96, 2001.
- DELAHAYE, E., WELTE, B., LEVI, Y., LEBLON, G., & MONTIEL, A. An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network, **Water Research**, 37(15), 3689–3696, 2003.
-

-
- DEMELLO, J. A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; NELSON, R. K.; AREY, J. S. & REDDY, C. M. "Biodegradation and Environmental Behavior of Biodiesel Mixtures in the Sea: An Initial Study". **Marine Pollution Bulletin**, 54, 894 – 904, 2007.
- DEMIRBAS A. Biodiesel: a realistic fuel alternative for Diesel engines. London: Springer; 2008. **ila Science and Energy**, Trabzon, Turkey, pp. 2-7.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in energy and Combustion Science**, 31(5-6), 466-487, 2005.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, 50, 14–34, 2009.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG - DIN 51606 - Liquid fuels - Diesel fuel of fatty acid methylester (FAME) – Specifications.
- DODOS, G. & ZANNIKOS, F. "Microbiological Growth Study of Biodiesel Fuel," **SAE International Journal of Fuels and Lubricants**, 6(2):419-429, 2013, doi:10.4271/2013-01-1148.
- DODOS, G.S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S & ZANNKOS, F. Effets of mcrobiological contamination in the quality of biodesel fuel. **Proceedings of the 12th Internatonal Conference on Environmental Science and Technology**, Rhodes, Greece, September, 2011.
- DOMINGUES, D. F. & BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. *In*: P. A. Zagatto & E. Bertoletti (eds.). **Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações**. 1^a ed. São Carlos: Editora Rima. p.153-184. 2006.
- DUNCAN C, LEARY R, LIN J, CUMMINS J, DI C, SCHAEFER C, WANG T, RIGGINS G, EDWARDS J, BIGNER D, et al.. Identification of microbial DNA in human cancer. **BMC Med Genomics** 2: 22. 2009, doi: 10.1186/1755-8794-2-22.
- EDMONDS, P. & COONEY, J. J. Identification of Microorganisms Isolated from Jet Fuel Systems. **Applied Microbiology**, 411-416, 1967.
- EFREMENKO, E. N.; AZIZOV, R. E.; RAEVA, A. A.; ABBASOV, V. M. & VARFOLOMEYEV, S.D. An approach to the express control of oil spill bioremediation by bioluminescent method of intracellular ATP determination. **International Biodeterioration and Biodegradation** 56: :94–100. 2005.
- EFREMENKO, E.; AZIZOV, R.; MAKHLIS, T.; KRUPIANKO, P. & VARFOLOMEYEV, S. Bioluminescent method for quantification and kinetic investigation of oil-degrading bacteria. **Process of Petrochemistry and Oil Refining** 4(11):79–83 .2002.
- EGOROV, N.S.; TOROPOVA, E. G.; UGAROVA, N.N.; BROVKO, L.Y.U.; MATYUSHA, G.V.; GERASIMENKO, A.A. & SAMUNINA, A. A. Method of quantitative assessment of lubricant oils biocontamination. **Inventors certificate # 1311259**. 1985.
- EN 14104:2003. Fat and oil derivates. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of acid value. **Requirements and Test Methods**, Europe, 2003
-

-
- EN 14214:2012 Automotive Fuels - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines. **Requirements and Test Methods**, Europe, 2009.
- EN 15751: Automotive fuels. Fatty acid methyl ester (FAME) fuel and blends with diesel fuel. Determination of oxidation stability by accelerated oxidation method (British Standard). 2009.
- EN ISO 3104:1994 Petroleum products - Transparent and opaque liquids -- Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity. (British Standard). 1994.
- EN ISO 12937:2000 Petroleum products - Determination of water - Coulometric Karl Fischer titration method (ISO 12937); (British Standard). 2000.
- FATTAH, I.M. 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**, 30:356-370, 2014.
- FENG, P. Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. **J. AOAC Int.**, 79 : 809-812, 1996.
- FERRARI, M. D.; NEIROTTI, E. & ALBORNOZ, C. Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in an aviation fuel handling system and its relationship with fuel fouling. **Revista Argentina de Microbiología**, 30 (3):105–114, 1998.
- FERRARI, R. A.; OLIVERIA, V.S. & SCABIO, O. A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, 28 (1):19-23, 2005.
- FERRARI, R.A. & SOUZA, W.L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, 32 (1), 106-111, 2009.
- FINGAS, M. The Basics of Oil Spill Cleanup, Second Edition. Charles, J. ed. CRC Press, 233p, 2001. ISBN 9781439862476
- FLORIDO, P. L. Tratamento do Efluente de Refinaria pelo Processo Combinado de Adsorção em Carvão Ativado e Biorreator com Membranas. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011. XVIII, 155 p.
- FOLLIS, P.A. an Investigation Into The Biodegradability of Soy Diesel Under Various Environmental Conditions. Dissertação (**Mestrado**). School of Natural and Environmental Sciences, Duesquesne University. 58p. 1994.
- FRUNDZHAN, V. G.; BROVKO, L. Y. U.; BABUNOVA, V. S.; KARTASHOVA, V. M. & UGAROVA, N. N. Bioluminescent assay for total bacterial contamination of crude milk. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 35 (3):358–365, 1999.
- FRUNDZHAN, V. G.; BROVKO, L. Y. U.; BABUNOVA, V. S.; KARTASHOVA, V. M. & UGAROVA, N. N. Bioluminescent assay for antibiotic sensitivity of microbe cells in the septic blood. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 4:455–460, 1997.
- FUKUDA, S., TATSUMI, H., IGIMI, S., YAMAMOTO, S. Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken meat samples. **Letters in Applied Microbiology**, 41: 379-384, 2005.
-

-
- GARCIA-RODRIGUEZ, A.; CAETANO, G. G. I.; BORGES, M.B.; SANTOS, C. Á. & CARDOSO, G. S.. Toxicidade por *Microcystis sp.* em Goiás: Estudo dos efeitos tóxicos em camundongos e *Artemia salina*. **Estudos**, Goiânia, 31 (9), 1595-1606, 2004.
- GARCIA, C. M.; Transesterificação de óleos vegetais. Dissertação (**Mestrado**), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.120p.
- GARCÍA MESA, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁRCEL, MIGUEL Determination of the oxidative stability of olive oil by use of a robotic station. **Talanta**, 40 (11):1595–1600,1993.
- GAUR, J. P.; SINGH, A. K. Comparative Studies on the Toxicity of Petroleum Oils and Their Aqueous Extracts Towards *Anabaena doliolum* . **Proceedings: Plant Sciences**, 99,(5):459-466, 1989.
- GAYLARDE, C.C.; BENTO, F. & KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, Rio de Janeiro, 30:01-10.1999.
- GAYLARDE, C. **Design, selection and use of biocides. In: bioextraction and biodeterioration of metals.** Gaylarde, C. & Videla, H. (Ed.). Cambridge University Press, New York, 1985.372p.
- GENNER, C. & HILL, E. C. Fuels and oils. In: A. H. Rose, (ed.), **Economic Microbiology**, Vol. 6, Microbial Biodeterioration, London, Academic Press, Vol. 6, pp. 259-306. 1981.
- GEVA, J.; GEISSMANN, E.; ITTAH, E.; NAKDIMON, I.; SAPIR, Y. & FASS, R. ATP analyses as a tool to determine the need to clean the fuel tanks of diesel motivated vehicles before refouling with biocides and stability improving additives. In: **IASH 2007-10th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Tucson, Arizona, October, 2007.
- GIROTTI, S. & ZANETTI, F. Wastewater and sludge: the rapid determination of microbial content by ATP bioluminescence. **Annali di Chimica**, 88, 291–298, 1998.
- GOG, A.; CHINTOANU, M.; ROMAN, M.; PITL. G.; LUCA, E. F. & IRIMIE, D. Biodiesel As Alternative Fuel – General Aspects. Agricultura – **StiinŃă si practică**, 3-4: 63-64, 2007.
- GRIFFIN, L.F. & CALDER, J. A. Toxic effects of water-soluble fractions of crude, refined and weathered oils on growth of a marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 33:1092-1096, 1977.
- GUTHEIL, N. G. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Uries em Querosene de aviação no Brasil. Porto Alegre, **Instituto Tecnológico do RS**. 4p.(Boletim n.9), 1966.
- HAGGET, R.D. & MORCHAT, R.M. Microbiological contamination: Biocide treatment in naval distillate fuel. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 29: 87-99.1992.
- HAMILTON, R.D. & HOLM-HANSEN, O. Adenosine triphosphate content of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, 10 (15): 838-863, 1967.
- HARTMANN, C.R. Avaliação de um efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas Dissertação (**Mestrado**). Curso de Pós-
-

Graduação em Ecologia, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.83p.

- HASEEB A.; MASJUKI H.H.; ANN, L. J. & FAZAL, M. A. Comparative corrosive characteristics of petroleum diesel and palm biodiesel for automotive materials. **Fuel Process and Technology**, 91:1308–1315, 2010a.
- HASEEB A.; MASJUKI, H.H.; ANN, L.J.; FAZAL, M. A.; Corrosion characteristics of copper and leaded bronze in palm biodiesel. **Fuel Process and Technology**, 91: 329 – 34, 2010b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>
- HASEEB, A.S.M.A.; H.H. MASJUKI, C.T. & SIANG, M. A. F. Compatibility of elastomers in palm biodiesel. **Renewable Energy**, 35, (10): 2356–2361, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.03.011>
- HAZZARD, G. F., Fungal growths in aviation fuel systems. Part 4. Fungi in aviation fuel systems in Australia and the Far East. **Defence Standards Lab. Report**. 252, 52 pp. 1963.
- HAZZARD, G.F. Fungal growths in aviation fuel systems, part 1. Report 257, Department of Supply, **Australian Defence Standards Laboratory**, 1–33, 1961.
- HE, B. B.; THOMPSON, J. C.; ROUTT, D. W.; VAN GERPEN, J. H. Moisture Absorption in Biodiesel and its Petro-Diesel Blends. **Applied Engineering in Agriculture**., 23, 71–76. 2007.
- HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2nd ed. Boca Raton, Florida. 1995. 373p.
- HILL, E. C. & THOMAS, A. R.,. Microbiological aspects of supersonic aircraft fuel. In: **Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium**. pp. 157–174. 1975
- HILL, E. C. Microbial Corrosion in Ships Tanks – Detection and Remediation. Web site # **ECHA Microbiology Ltd**, 2–14. 2000.
- HILL, E. C. Fuels. In: **Microbial problems in the off shore oil industry**. In E.C. Hill, J.L. Shennan, R.J. Watkinson. (Ed). New York. Wiley, 219-230. 1987.
- HILL, E.C. & HILL, G.C., Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels., In IASH, 2009, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, October, 2009
- HILL, E.C. Biocides for the future. **International biodeterioration**, 26 (2-4): 281-285. Special Issue: Biocides. 1990.
- HILL, E.C., KOENIG, J.W.J. Bacterial contamination of motor gasoline. In:Giles, H.N. (Ed.), **Proceedings of the Fifth International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Rotterdam, The Netherlands, October 1994.U.S. Department of Energy, Washington, pp. 173-181,1995.

-
- HOBBIE, J.E., DALEY, R.J., JASPER, S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. **Applied Environmental Microbiology**, 33: 1225-1228, 1977.
- HOLLEBONE, B. Biofuels in the Environment: A Review of Behaviors, Fates and Effects & Remediation Techniques. **Freshwater Spills Symposium**. St. Louis, MO, USA, 2009.
- HOLLEBONE, B. P.; FIELDHOUSE, B. & LANDRIAULT, M. "Aqueous Solubility, Dispersibility and Toxicity of Biodiesels". In **Anais da 20th International Oil Spill Conference**, Savannah, Georgia, USA, Maio 2008, pp. 929 – 935, 2008.
- HOLMKVIST, L.; ØSTERGAARD, J. J. & SKOVHUS, T. L. Which Microbial Communities Are Present? Using Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH): Microscopic Techniques for Enumeration of Troublesome Microorganisms in Oil and Fuel Samples. In: **Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems**. C. Whitby, T.L. Skovhus (eds.), Chapter 7, p. 55-61. 2011. doi: 10.1007/978-90-481-9252-6_7, C
- HOWARTH, R.W.,. Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics** 19, 89- 110. 1988. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.000513>.
- ILORI, M. O.; ADEBUSOYE, S. A. & OJO, A. C. "Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water," **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 24, (11): 2539–2545, 2008.
- JACOBSEN, A. & WILLIAMS, T.M. The environmental fate of isothiazolone biocides. **Chimica oggi**, Milano, 18 (10): 105-108, 2000.
- JAIN, S. & M.P. SHARMA, M.P. Stability of biodiesel and its blends: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 14: 667–678, 2010.
- JAKERIA, M. R., FAZAL, M. A. E 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. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.09.024>.
- JASSON, V., JACXSENS, L. ; LUNING, P.; RAJKOVIC, A. & UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria **Food Microbiology**, 27: 710-730, 2010.
- KARAVALAKIS, G.; HILARI,D.; GIVALOU,L.; KARONIS, D. & STOURNAS, S. Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants. **Energy**, 36, 369-374, 2011.
- KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, Estonia, p. 105-119, 2009.
- KEENE, P. & BROWNE, B.A. Effective preservation strategies for ultra low sulfur diesel, biodiesel and unleaded gasoline W.J. Bartz (Ed.), **Eighth International Fuels Colloquium**, Technische Akademie Esslingen, Ostfildern, Germany. 2011. on CD.
- KENNEDY, C.J. & A.P. FARRELL. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 323: 43-56, 2005.
-

-
- KHAN, N., WARITH, M., LUK, G., "A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms". **Journal of the Air and Waste Management Association**, 57(3) 286-296, 2007.
- KLAMME & LEONARD, J.M. Inhibitors for sulfate-reducing bacteria in shipboard fuel storage tanks. **Naval Research Laboratory**: Memorandum Report 2324. Washington DC. Us Navy, 1971.
- KLINKSPON, N. Impact of Biodeterioration on Diesel Fuel Systems. In: IASH 2009- 11th **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, October, 2009.
- KLOFUTAR, B. & GOLOB, J. Microorganisms in Diesel and in Biodiesel Fuels. **Acta Chimica Slovenica**, 54, 744-748. 2007.
- KNIE, J. L. W. & LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: **FATMA / GTZ**, p. 289, 2004.
- KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, Pennsylvania, 88 (7): 669-677, 2007.
- KNOTHE G. Designer biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy Fuel**, 22:1358-1364, 2008.
- KOENIG, J.W.J. A new generation of oil products for the 1990-ies and the risks of microbial growth during storage. In: Zakar, A. (Ed.), **Proceedings of the Conference on Microbiology in the Oil Industry**, September 1991, Sopron. Hungarian. Hydrocarbon Institute, Budapest, pp. 140-152. 1991.
- LARSEN, J.; SKOVHUS, T.L., AGERBÆK, M. THOMSEN, T.R.; NIELSEN, P.H. Bacterial diversity study applying novel molecular methods on Halfdan produced waters Corrosion, 2006. **NACE International** Houston, TX., Paper 06668. 2006.
- LEAHY, J.G. & R.R. COLWELL. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology. Review**. 54: 305-315, 1990.
- LEE, J. S.; RAY, R. I. & LITTLE, B. J. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. **Biofouling**, 26 (6):623-35, 2010.
- LEE, R.F. & ANDERSON, J.W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, 50: 705-772, 2005.
- LEE, L. S.; HAGWALL, M.; DELFINO, J. J.; RAO, P. S. C. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. **Environ. Sci. Technol.**, 26 (11): 2104-2110, 1992.
- LEHTO, M.; KUISMA, R.; MÄÄTTÄ, J.; KYMÄLÄINEN, H. R. & MÄKI, M. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. **Food Control**, 22, 469-475, 2011.
-

- LEITE, L.; MURRO, M. Nova tecnologia multifuncional para a proteção microbiológica de tintas em emulsão em 1999. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE TINTAS**, 6., 1999, São Paulo. *Anais*. São Paulo: ABRAFATI, 1999. p. 147-154.
- LEME, D. M.; GRUMMT, T.; OLIVEIRA, D. P.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; FERRAZ, E. R. A.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; ZOCOLO, G. J. & MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow_ kit (Litron) assay. **Chemosphere**, 86:512–520, 2011.
- LEMKE, M. J. & LEFF, L.G. Culturability of stream bacteria assessed at the assemblage and population levels. **Microb. Ecol.** 51: 365-374, 2006.
- LEMOS, P. M. M. Respostas Bioquímicas e Moleculares em Mexilhões *Perna perna* (Lineé, 1758) Expostos ao Óleo Diesel. Dissertação (**Mestrado**) apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003. 155 p.
- LEUNG, D.Y.C.; KOO, B. C. P.; GUO Y. Degradation of Biodiesel under Different Storage Conditions. **Bioresource Technology**, 97: 250-256, 2006.
- LIANG, Y. C.; MAY, C. Y.; FOON, C. S.; NGAN, M. A.; HOCK, C. C.; BASIRON, Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, 85, (5): 867-870, 2006.
- LI, Q.; DU, W. & LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiological Biotechnology**, 80:749–756. 2008.
- LIMA, P.C.R. O Biodiesel e a inclusão social. **Biblioteca digital da Câmara dos Vereadores**. 2004. Disponível em <http://bd.camara.gov.br> acesso em 01/02/2012.
- LIN, B. F.; HUANG, J.H. & HUANG, D.Y. Experimental study of the effects of vegetable oil methyl ester on DI diesel engine performance characteristics and pollutant emissions. **Fuel**, 88(9):1779–85, 2009.
- LIN, C.Y, CHIU, C.C. Effects of oxidation during long term storage on the fuel properties of palm-oil based biodiesel. **Energy Fuel**, 23, 3285–3289, 2009.
- LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S. & MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, 88(4):1020–1031, 2011.
- LIN, T., PAN, P., & CHENG, S. Ex-situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, 176:27–34, 2010.
- LIN Y. C.; TSAI C. H.; YANG C. R.; JIM WU C. H.; WU T. Y.; CHANG-CHIEN G. P. Effects on aerosol size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons from the heavy-duty diesel generator fueled with feedstock palm-biodiesel blends. **Atmos. Environ.** 42: 6679–6688; 2008. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.04.018
- LOPES, P. T. C. & GAYLARDE, C.C. Use of immunofluorescence to detect *Hormoconis resinae* in aviation kerosine. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 37: 37–40, 1996.

-
- LOCKHART, D. J.; DONG, H.; BYRNE, M. C., FOLLETTIE, M. T.; GALLO, M. V.; CHEE, M. S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M., NORTON, H. & BROWN, E. L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology** 14: 1675 – 1680, 1996. doi:10.1038/nbt1296-1675.
- LONDRY, K. L. & SUFLITA, J. M. "Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism", **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17:1199-1206, 1998
- LUNDIN, A., HASENSEN, M., PERSSON, J. & POUSETTE, A., Estimation of biomass in growing cell-lines by adenosine-triphosphate assay. **Methods Enzymol.** 133, 27–421, 1986.
- LUTZ, J.; CHAVARRA, M.; ARIAS, M. L. & MATA-SEGREDA, J. F. Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. **Revista de biologia tropical**, 54 (1):59–63, 2006.
- LYLES, C. N. ; AKTAS, D. F. ; DUNCAN, K. E. ; CALLAGHAN, A. V. ; STEVENSON, B. S. & SUFLITA J. M. Impact of Organosulfur Content on Diesel Fuel Stability and Implications for Carbon Steel Corrosion. **Environmental Science & Technology**, 47 (11): 6052–6062, 2013. doi: 10.1021/es4006702.
- MAKAREVICIENE V. & JANULIS, P. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. **Renewable Energy**, 28:2395–2403, 2003.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de sistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, jul. 2008. Disponível em: http://dialnet.unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=2882847&orden=0. Acesso em: 31 ago. 2011.
- MAHATO, P.; GHOSH, A.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, A., & DAS, A. Zn(II)-Cyclam Based Chromogenic Sensors for Recognition of ATP in Aqueous Solution Under Physiological Conditions and Their Application as Viable Staining Agents for Microorganism **Inorganic Chemistry**, 50 (9):4162–4170, 2011. doi: 10.1021/ic200223g.
- MATIAS, W. G. Apostila de Toxicologia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.
- MAZUMDAR, P.; BORUGADDA, V. B.; GOUD, V. V. & SAHOO, L. Effect of storage parameters on stability of Jatropha-derived biodiesel. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 4:13, 2013. doi:10.1186/2251-6832-4-13
- MCCORMICK, R. L. The impact of biodiesel on pollutant emissions and public health. **Inhalation Toxicology**, 19 (12):1033-1039, 2007.
- MEHER, L.; SAGAR, D. V. & NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 10, 248-268, 2006.
- MITTELBACH M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel. **Bioresource Technology**, 56 (1): 7–11, 1996.
-

-
- MITTELBAACH, M. & SCHOBBER, S. The influence of antioxidants on the oxidation stability of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 80 (8): 817–823, 2003.
- MONA K.G.; SANAA H.O. & LINDA M. A. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 24 (9):1703–1711, 2008.
- MONYEM A, CANAKCI M, VAN GERPEN J. Investigation of biodiesel thermal stability under simulated in-use conditions. **Applied Engineering in Agriculture**,16 (4):373–378, 2000.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. Rio de Janeiro: Livraria Varela, 1989.
- MOSER B. R. & ERHAN S. Z. Branched Branched chain derivatives of alkyl oleates: Tribological, rheological, oxidation, and low temperature properties. **Fuel**, 87 (10–11): 2253–2257, 2008.
- MOSER, B.R.; ELLER, F.J.; TISSERAT, B.H. & GRAVETT, A. Preparation of fatty acid methyl esters from osage orange (*Maclura pomifera*) oil and evaluation as biodiesel. **Energy Fuels**, 25:1869- 1877, 2011.
- MOSER, B. R. “Biodiesel Production, Properties, and Feedstocks”. **Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 45: 229 – 266, 2009.
- MOSER, B. R. Influence of extended storage on fuel properties of methyl esters prepared from Canola, palm, soybean and sunflower oils. **Renew. Energy**, 36, 1221–1226, 2011.
- MUDGE, S.M., PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & Technology Bulletin**, New York, 5 (5-6): 353–355, 1999.
- MULVEY, D.; REDDING, P.; ROBERTSON, C.; WOODALL, C.; KINGSMORE, P.; BEDWELL, D. & DANCER, S.J. Finding a benchmark for monitoring hospital cleanliness. **J. Hosp.Infect.** 77, 25–30. 2011.
- MÜLLER, J. B. "Avaliação da toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5%(B5)." Dissertação (**Mestrado**), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011, 112p
- MURPHY, S. C. ; KOZLOWSKI, S. M. ; BLANDER, D. K. ; BANDLER, D.K. & BOOR, K. J. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for troubleshooting fluid milk shelf-life problems. **Journal Food Science**, 81(3): 817-820,1998.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C. & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 59(3): 695-700, 1993.
- NAVAS, J. M.; BABÍN, M.; CASADO, S.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J. V. “The Prestige Oil Spill: A Laboratory Study about the Toxicity of the Water-Soluble Fraction of the Fuel Oil”. **Marine Environmental Research** 62: 352 – 355, 2006.
-

-
- NEIHOF, R. & MAY, M. Microbial and particulate contamination in fuel tanks on naval ships. **International Biodeterioration Bulletin**, 19: 59-68, 1983.
- NEIHOF, R. A. Microbes in Fuel: An Overview with a Naval Perspective. In H. L. Chesneau & M. M. Dorris (Eds.), **Distillate Fuel: Contamination, Storage, and Handling** (pp. 6-14). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 1988.
- NEILSON A. H. & ALLARD A. S. **Environmental degradation and transformation of organic chemicals**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida. 2008.710pp. ISBN 978-0-8493-7241-4
- NO S.Y. Inedible vegetable oils and their derivatives for alternative diesel fuels in CI engines: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 15(1):131-49, 2011.
- NUNES, B.S., CARVALHO, F.D., GUILHERMINO, L.M., & STAPPEN, G.V., 2006. Use of The Genus *Artemia* in Ecotoxicity Testing. **Environmental Pollution**, 144: 453-462.
- OBAYORI, O. S.; ILORI O., ADEBUSOYE, S. A.; OYETIBO, G. O.; OMOTAYO, A. E. & AMUND, O. O. "Degradation Of Hydrocarbons And Biosurfactant Production by *Pseudomonas* sp. strain LP1," **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25, (9): 1615-1623, 2009.
- OGDEN, K. Practical experiences of hygiene control using ATP-bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**, 99: 389-393, 1993.
- OLLIVER B, MAGOT M. **Petroleum microbiology**. American Society for Microbiology. Press, USA. 2005. 365p.
- OLIVEIRA, D.M.; ONGARATTO, D.P.; FONTOURA, L.A.M.; NACIUK, F.F.; SANTOS, V.O.B.; KUNZ, J.D. & MARQUES, V. P. Obtenção de biodiesel por transesterificação em dois estágios e sua caracterização por cromatografia gasosa: óleos e gorduras em laboratório de química orgânica **Química. Nova**, 36, (5), S1-S6, 2013.
- OLIVEIRA - NETO, A.L.; PASCHOAL, C.M.R.B.; FONSECA, A.L. Avaliação da toxicidade do sedimento do reservatório do Guarapiranga (São Paulo-SP) através de testes de toxicidade com organismos planctônicos, bentônicos e Nectônicos. *In*: ECOTOX. Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil, 5, 1998, Itajaí. Anais. Itajaí, 1998.
- OWEN, K. **Gasoline and Diesel Fuel Additives**; John Wiley & Sons: 1989
- OWSIANIAK M, CHRZANOWSKI Ł.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI A.; OLEJNIK- SCHMIDT, A. K., et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders :effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, 100:1497-500, 2009.
- PACE, N. R., D. A. STAHL, D. J. LANE, AND G. J. OLSEN. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, Vol. 9, Marshall, K. C., Ed. Plenum Press, New York, 1986.
- PASQUALINO, J.C., MONTANÉ, D. & SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, 30 (118), 874-879, 2006.

-
- PASSMAN, F. J. Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, Manual 47. **ASTM International**, WestConshohocken, 2003,114 p.
- PASSMAN, F. J.;MUNSON,G.L. & KAUFFMAN, R.E. Can non- quematic antimicrobial devices replace ou augment fuel treatment microbes? In: Morris, R.E. (Ed.),**Proceedings of the 11th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; Sarasota, Florida, USA, October, 2011. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- PASSMAN, F. J. Microbes and fuel retailing – The hidden costs of quality. 1999. Disponível em <http://www.biodeterioration-control.com>. acesso em jun 2011.
- PASSMAN, F.J., DOBRANIC, J., Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the 9th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; Sitges, Spain, September, 2005. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- PASSMAN, F.J., Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 81, 88-104, 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002>
- PASSMAN, F.J.; EGGER II, G.L.; HALLAHAN, S.; SKINNER, B.W. & DESCHEPPER, M. Real-Time Testing of Bioburdens in Metalworking Fluids Using Adenosine Triphosphate as a Biomass Indicator, **Tribology Transactions**, 52 (6): 788-792. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10402000903097486>.
- PASSMAN, F.J., ENGLISH, E., LINDHARDT, C., 2007. Using adenosine triphosphate as a measure of fuel treatment microbicide performance. In: Morris, R.E. (Ed.),**Proceedings of the 10th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; Tucson, Arizona, USA, October, 2007. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- PEER, M.; SKYE, R.; THOMAS, H.; EVAN, S.; UTE, C.; JAN, H.; CLEMENS, P.; OLAF, K. & BEN, H. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research** 1(1):20–43.2008.
- PETERS, E.C.; GASSMAN ,N. J.; FIRMAN, J.C.; R OBERT H. RICHMOND, R.H. & POWER, E. A. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 16 (1):12-40, 1997.
- PETERSON, C., MÖLLER, G., “Biodegradability, BOD5, COD and Toxicity of biodiesel fuels”. **Biodiesel Fuel Education**. University of Idaho. Department of Biological and Agricultural Engineering and Department of Food Science and Toxicology. 2004.
- PETROBRAS. Portal BR: Óleo diesel. Disponível em: <http://www.br.com.br>, Acesso em: 20 out. 2009.
- PETROLEUM INSTITUTE- IP 385/99. Determination of the viable aerobic microbial content of fuels and fuel components boiling below 390°C – Filtration and culture method. , 1999. In Passman, F. J. **ASTM International**. Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, Manual 47. West Conshohocken, 2003,114 p.
-

-
- PHAM, V.D., HNATOW, L.L., ZHANG, S. FALLON, R.D., JACKSON, S.C., TOMB, J.F., DELONG, E.F., KEELER, S.J. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. **Environmental Microbiology**. Jan;11(1):176-87, 2009. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01751.x.
- PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P; DE ANDRADE, J. B. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16 (6b): 1313-1330, 2005. ISSN 0103-5053.
- PITCHER, D.G. Industrial case histories of microbiological fuel contamination-Cause, effect and treatment. *International Biodeterioration*, 25: 207-218, 1989.
- PRINCE, A. E., Microbiological sludge in jet aircraft fuel. **Development of Industrial Microbiology**, 2: 197-203, 1961.
- PRINCE, R. C., HAITMANEK, C. AND COYLE LEE, C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere** 71, 1446-1451,2008.
- PULLEN, J. SAEED K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16: 5924–5950, 2012.
- 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 an Indian diesel-transporting pipeline. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23 (8):1065–1074, 2007.
- RAJASEKAR, A., MARUTHAMUTHU, S., TING, Y. P., BALASUBRAMANIAN R. & PATTANATHU, K. RAHMAN, S. M. Bacterial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. cap 13, p. 339-369. In: Singh, S. N. (ed.), *Microbial Degradation of Xenobiotics*, **Environmental Science and Engineering**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012. 483p. doi: 10.1007/978-3-642-23789-8_13.
- RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. 2a ed. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995. 1.125p.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.
- RAUCH, M. E.; GRAEF, H. W.; ROZENZHAK, S. M.; JONES, S. E.; BLECKMAN, C. A.; KRUGER, R. L. & NAIK, R. R. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 33: 29–36. 2006.
- REDA, A.I.; ABOU-SHANAB, MIN-KYU, J.; HYUN-CHUL, K.; KI-JUNG, P. & BYONG-HUN, J. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **Journal of Environmental Management**, 115(30): 257–264, 2013.
- ROHM & HAAS **Highly Effective Preservatives for Use in Household and industrial Products**. 1999. Disponível em [http://www.dow.com/assets/ attachments/business/biocides/preservatives_for_household_and_i-and-l/kathon_cg-icp_and_cg-icpii/tds/kathon_cg-icp-and-ii.pdf](http://www.dow.com/assets/attachments/business/biocides/preservatives_for_household_and_i-and-l/kathon_cg-icp_and_cg-icpii/tds/kathon_cg-icp-and-ii.pdf). acesso em nov 2013.
-

-
- ROBBINS, J. A., & LEVY, R. A review of the microbial degradation of fuel. In: **Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook** W. Paulus (Ed.), pp. 177-201, 2004.
- RODRIGUES, R. V.; MIRANDA-FILHO, K. C.; GUSMÃO, E. P. ; MOREIRA, C. B.; ROMANO, L. A. & SAMPAIO, L. A.. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of the Total Environment**, 408: 2054-2059, 2010.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ E. R.; RODRIGUEZ, E.; BLANCO, R.; CORDERO, I. & SEGURA, D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment **Journal of Environmental Sciences**, 22(10) 1595–1601, 2010.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E. & BLANCO, R. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, 57 (3): 489-504, 2009.
- RUBINGER, C. F. Seleção de métodos biológicos para avaliação toxicológica de efluentes industriais. Dissertação (**Mestrado**) - Programa de Pós - Graduação em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 89f.
- SAEED T. & T. AL-MUTAIRI. 1999. Chemical composition of the watersoluble fraction of leaded gasolines in sea water. **Environment International**, 25: 117-29.
- SAMKUTTY, P.J.; GOUGH, R.H.; ADKINSON, R.W.; MCGREW, P. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence. **Journal of Food Protection**, 64: 208-212, 2001.
- SANTOS, A. G.D. Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa do biodiesel de algodão, girassol, dendê, e sebo bovino. Dissertação (**Mestrado**). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós Graduação em Química. Natal, RN, 2010. 183p.
- SCHLEICHER, T., WERKMEISTER, R., RUSS, W. & MEYER PITTROFF, R. Microbiological stability of biodiesel - diesel mixtures. **Bioresource Technology**, 100 (2), 724-730, 2009.
- SHAHID, E.M., JAMAL, Y. 2008. A review of biodiesel as vehicular fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 12: 2484–2494.
- SIEGERT, W. Microbial Contamination in Diesel Fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009- **11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czeth Republic, 18-22, 2009
- SIEGERT, W. & ZIEGANN, Q. A comparison of three different actives as fuel microbicides in regards of their bactericidal and fungicidal effect In: IASH 2013- **13th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Rhodes, Greece, October, 2013. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- SILVA, E. P.; TAVARES, M. G. O., BRAGA, A. C., SOUZA, H. R., ATAÍDE J. F., CUNHA, I. N., CORREIA, K. M., FREITAS, R. A., CAVASIN, G. M. & ANTONIOSI FILHO, N. R. "Avaliação Ecotoxicológica e Histológica de Combustíveis Fósseis e Biocombustíveis

- Produzidos por Craqueamento Termo-Catalítico e Transesterificação do Óleo de Soja”. *In: Anais do II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, Brasília, Nov. 2007, 01 – 06.
- SILVA, P. M. F. Estudo dos principais fatores que influenciam na solubilização dos HPAs em águas. Dissertação (**Mestrado**) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2010 . 88p.
- SILVEIRA, E. L. C., L. B. CALAND, C. V. R. MOURA & E. M. MOURA. Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes. **Química Nova**, 29: 1193-1197, 2006.
- SILVEIRA, M. B. Estudo do sistema álcool + biodiesel + diesel (ab-diesel): equilíbrio e propriedades termofluidodinâmicas. Dissertação (**Mestrado**) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013. 136p.
- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, Physiological, and Histological Changes in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* Exposed to Diesel Oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 69: 112–120, 2008.
- SINDICATO DAS DISTRIBUIDORAS DE COMBUSTÍVEIS - SINDICOM, Os desafios do mercado do diesel. **Informe SINDICOM**, Ano 7, Nº 18:4-5. 2010. Disponível em http://www.sindicom.com.br/pub_sind/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=1450&sid=45. Acesso em 20 fev. 2011.
- SINGH, S.P., SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and sustainable Energy Reviews**, 14 (1):200-216, 2010.
- SIRAGUSA, G.R. & CUTTER, C.N. Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. **Journal of Food Protection**; 58:764-769, 1995.
- SMITH, R. N. Biodeterioration of Fuels. *In: Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*, W. B. Betts, (ed.), pp. 55–68, 1991.
- SMITH, J. D.; COKER, D. T.; GILKS, J.M.L.; IOBBI, F.; SENGERS, H.P.M.; SHORT, D.W.E.; SIMPSON, B. J. & WOLKE, W. Health aspects of lubricants. **Concawe report**, nº 1/83, 1983.
- SORENSEN ,G.; PEDERSEN, D.V.; NORGAARD,A.K.; SORENSEN, K.B. & NYGAARD,S.D. Microbial growth in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, 102: 5259-5264, 2011.
- SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E. & SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, 147: 1073-1078, 2007. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.003.
- SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M., “Transesterification of vegetable oils: a Review”, **Journal of Brazilian Chemistry Society**, 9(1), 199-210, 1998.
- STANLEY, P. A. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, 4 (1): 375–380, 1989.

-
- SPEIGHT, J. G.; **Synthetic Fuels Handbook—Properties, Process and Performance**. McGraw-Hill. United States of America. 2008.422p.
- STERPU, A.E.; DUMITRU, A. I. & POPA, M.P. Corrosion behavior of steel in biodiesel of different origin **Ovidius University Annals of Chemistry** 23, (2): 143-148, 2012. doi: 10.2478/v10310-012-0024-3.
- STREHLER, B. L. Bioluminescence Assay: Principles and Practice. *In* **Methods of Biochemical Analysis**, (ed D. Glick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA .2006. 532p. doi: 10.1002/9780470110348.ch2
- SUAREZ, P. A. Z. Biodiesel de algas: Promessa ou futuro? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22 (11), 2023-2024, 2011.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R.; Transformação de triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Quimica. Nova**, 30:667-676, 2007.
- SUBRAMANIAM, R.; DUFRECHE, S., ZAPPI, M., BAJPAI, R., Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial**, 37 (12):1271-87, 2010. doi: 10.1007/s10295-010-0884-5.
- SUTHERLAND, J.B. Degradation of hydrocarbons by yeasts and filamentous fungi. *In*: **Fungi Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications**. D. K. Arora (ed.). Marcel Dekker Inc., USA. 2004, 324pp.
- SCHWAB, A.W., DYKSTRA, G.J., SELKE, E., SORENSON, S.C., PRYDE, E.H. Diesel fuel from thermal-decomposition of soybean oil. **JAACS** 65 (11), 1781–1786, 1988.
- SWIFT, S. T. Identification and Control of Microbial Growth in Fuel Handling Systems. *In*: **Distillate Fuel Contamination, Storage and Handling**, H. L. C. M. M. Dorris (Ed.), pp 15-26, 1988.
- TANG H., R.C.D. GUZMAN, S.O. SALLEY, K.Y. SIMON NG, The oxidative stability of biodiesel:effects of FAME composition and antioxidant, **Lipid Technology**, 20: 249–252, 2008.
- TAUSSON, W. O., & ALESHINA, W. A. Uber die bakterielle Sulfatreduktion bei Anwesenheit der Kohlenwasserstoffe. **Microbiology U. S. S. R.**, 1, 229-261, 1932.
- TRANVIK, L.J. Rapid fluorometric assay of bacterial density in lake water and seawater. **Limnol. Oceanogr.** 42, 1629–1634, 1997.
- TORRES-JIMENEZ, E.; JERMAN, M. S.; GREGORC, A.; LISEC, I.; DORADO, M. P.; KEGL, B. Physical and chemical properties of ethanol–diesel fuel blends. **Fuel**, 90(2):795–802, 2011.
- TEBBUTT, G.; BELL, V. & AISLABIE, J. Verification of cleaning efficiency and its possible role in programmed hygiene inspections of food businesses undertaken by local authority officers. **Journal of Applied Microbiology**, 102: 1010-1017, 2007.
-

-
- THOMAS H, AHN, E.; MITTELBACH, M. AND SCHMIDT, E. Animal Fat perform well in diesel. **5th International Colloquium FUELS in Germany held**, January 12-13, 2005. www.rendermagazine.com.
- TORSVIK. V. & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current opinion in microbiology**, 5(3):240-245, 2002.
- VAN GERPEN, J.H.; HAMMOND, E.G.; JOHNSON, L.A.; MARLEY, S.J.; YU, L.; LEE, I.; et al. Determining the influence of contaminants on biodiesel properties. Disponível em: <http://aeg-biofuels.com/Pubs/bdgerpen96.pdf>; 1996 . Acesso em 12 ago., 1913.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, 24: 604-620, 2006.
- VANSTAEN, H. Applicability of bioluminescence for rapid detection of viable microorganisms. **Laboratory Practice**, 29, 12. 1980.
- VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, 631:36-43, 2007.
- VEIGA, L. F. & VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha**. Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 111-112, 2002.
- VIEIRA, F.C.S. **Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea)**. Dissertação (Mestrado) Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004. 72 p.
- VILAR, M. J.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L.; DIÉGUEZ, F. J.; SANJUÁN, M. L. & YUS, E. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. **International Journal of Food Microbiology**, 125: 357-361, 2008.
- WAES. G., R. BOSSUYT, AND J. MOTTAR. 1984. A rapid method for the detection of non-sterile UHT milk by the determination of the bacterial ATP. **Milchwissenschaft** , 39:707.1984.
- WANG, W.G.; LYONS, D.W.; CLARK, N.N. & GAUTAM, M. Emissions from nine heavy trucks fueled by diesel and Biodiesel blend without engine modification. **Environ Sci Technol.**, 34:933-939, 2000.
- WATANABE K, KODAMA YU, KAKU N .Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. **BMC Microbiology**, 2:23, 2002. Disponível em <http://link.springer.com/article/10.1186%2F1471-2180-2-23>.
- WESTBROOK, S.R., Compatibility and efficacy of selected diesel fuel biocides. In: **Proceedings of the Seventh International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Giles, H.N., Morris, R.E. (Eds.), Graz, Austria, September 24-29, 2000. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD. 2001.
-

-
- WESTBROOK, S. R.; BARBEE, J. G.; STAVINOHA, L. L.; LEPERA, M. E. & MENGENHAUSER J. V. Methodology for Identification of Diesel Fuel System Contaminants Related to Problems in the Field. *In: Distillate Fuel: Contamination, Storage and Handling*, ASTM STP 1005, H.L. Chesneau and M.M.Dorris. Proceedings Eds. American Society For Testing and Materials, Philadelphia, p.47-47, 1988.
- 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** 77 (13): 4527-4538, 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02317-10>.
- WHITE, D.C., DAVIS, W.M., NICKELS, J.S., KING, J.D., BOBBIE, R.J., Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. **Oecologia**, 40, 51–62, 1979.
- WIENCEK, K.M. & CHAPMAN, J.S. Water treatment biocides: how do they work and why should you care? Corrosion 99. **Proc. corrosion**, Paper 308, pp. 308/1–308/8. Nace international, Houston, TX, USA. 1999.
- WILLIAMNS , M.T. The mechanism of action of isothiazolone biocides. **Power Plant Chemistry**, 9:14-22, 2007.
- WILSON, D.N., & NIERHAUS, K.H. The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome. **Molecular Cell**, 26: 460-462, 2007.
- 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**, 6 (4): 315-337, 2007.
- YASSINE M. H.; WU, S.; SUIDAN, M. T., & VENOSA, A. D. Partitioning Behavior of Petrodiesel/Biodiesel Blends in Water **Environ. Sci. Technol.**, 46: 7487–7494, 2012. dx.doi.org/10.1021/es3009979.
- ZAGATTO, P. A. Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: resultados publicados. *In: 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia –Perspectivas da ecotoxicologia no Brasil, Itajaí.* 1998.
- ZHANG J. & JIANG L. Acid-catalyzed esterification of Zanthoxylum bungeanum seed oil with high free fatty acids for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 99: 8995–8998, 2008. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.004.
- ZHANG, H.; KALLIMANIS, A.; KOUKKOU, A. & DRAINAS, C. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65:124–31, 2004.
- ZHANG, X., PETERSON C., REECE, D., HAWS, R AND MÖLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, 41(5): 1423-1430, 1998.
- ZHANG, Y.; DUBÉ, M.A.; MCLEAN, D.D. & KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment, **Bioresource Technology**, 89, 1–6. 2003.
-

ZIMMER, A.; GALVES, F.; CANAL, N.; CORÇÃO, G. & BENTO, F. M. Monitoramento da contaminação microbiana em tanque subterrâneo com diesel e biodiesel (B4) *In: 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 7º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel*, 2010, Belo Horizonte. Anais do 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 7º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel. LAVRAS: UFLA, 2010, 3: 1505-1506.

ZIMMER, A.R., CAZAROLLI, J. ; TEIXEIRA, R. M.; VISCARDI, S.L.C.; CAVALCANTI, E. S. H.; GERBASE, A.; FERRÃO, M.F; PIATNICK, C.M.S.; BENTO, F.M. Monitoring of efficacy of biocides during storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *In: IASH, 2011, The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels*, Sarasota, Florida, USA, October, 2011.

ZULETA, ERNESTO C. A LIBIA BAENA, B LUIS A. RIOSA AND JORGE A. CALDERÓN
The Oxidative Stability of Biodiesel and its Impact on the Deterioration of Metallic and Polymeric Materials: a Review *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 23, No. 12, 2159-2175, 2012.

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA USO EM MISTURAS DIESEL-BIODIESEL

SELEÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA USO EM MISTURAS DIESEL-BIODIESEL

RESUMO

Após a adição do biodiesel os problemas de contaminação microbiana em óleo diesel, foram percebidos ao nível de consumidor final. A presença de água bem como a presença de ésteres e o acréscimo dos aditivos podem ter contribuído para a maior suscetibilidade da mistura. Como consequência é observada a presença de lodos biológicos, aumento na frequência de troca de filtros e peças e problemas de entupimentos nos motores devido ao desenvolvimento de populações microbianas. Os procedimentos físicos e químicos são indicados como formas de controle preventivo da contaminação microbiana. Uma alternativa de controle químico é o uso de biocidas, que tem sido recomendado nos Estados Unidos e Europa. No Brasil esta alternativa ainda é pouco conhecida e questões como qual o biocida, quais as concentrações indicadas, qual a fase a se tratar (oleosa, aquosa ou interface), entre outras ainda precisam de maiores estudos. Este estudo teve como objetivo avaliar 18 formulações de antimicrobianos com relação à preservação ou erradicação de microrganismos deteriorogênicos de combustíveis e selecionar antimicrobianos para tratamento de misturas diesel/biodiesel em condições de armazenamento simulado. Dentre as formulações testadas em caldo de cultura as formulações contendo misturas de isotiazolonas foram as mais eficientes, sendo efetivas em concentrações menores 500ppm. As formulações contendo os princípios ativos oxazolidina e morfolina também se mostraram eficientes antimicrobianos porém em concentrações acima de 500ppm. Para os experimentos de armazenamento simulado (sistemas água/óleo) foram avaliadas 8 formulações. Algumas destas formulações apresentam problemas de compatibilidade com a mistura B10 e outras necessitaram de concentrações maiores para tratamento do biodiesel puro comparado a mistura (B5). Um aditivo multifuncional contendo 50% de oxazolidina na formulação foi eficiente na concentração de 0,1% para misturas B10 em condição de estocagem simulada (laboratório).

Palavras chave: biocida, mistura diesel/biodiesel, aditivo, biodeterioração

2.1 INTRODUÇÃO

Durante o armazenamento de combustíveis podem ocorrer problemas de contaminação que afetam a estabilidade do produto (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Yemashova et al., 2007; Browne, 2011; Passman, 2013). No interior dos tanques de armazenamento podemos encontrar as condições necessárias para o desenvolvimento das populações microbianas tais como diferentes concentrações de oxigênio dissolvido; temperatura; pH, nutrientes (hidrocarbonetos, produtos metabólicos, sais inorgânicos, etc...) e principalmente a presença de água.

Historicamente, o óleo diesel é um dos combustíveis mais susceptíveis à biodeterioração (Rodriguez-Rodriguez et al., 2009). Recentemente, mudanças na composição química deste combustível, como a introdução do biodiesel, a redução dos teores de enxofre e o aumento do número de aditivos têm aumentado o risco de biodegradação (Dodos et al., 2011; Passman, 2013). O aumento da susceptibilidade deste combustível à degradação biológica deve-se principalmente ao fato de que o biodiesel pode ser facilmente degradado por uma ampla variedade de microrganismos (Pasqualino et al., 2006; Schleicher et al., 2009; Auffret et al., 2009; Aktas et al., 2010; Sorensen et al., 2011; Passman, 2013). Os problemas mais comuns associados à proliferação de microrganismos no combustível incluem turbidez, produção de sólidos visíveis (devido à biomassa biológica que pode se concentrar na interface óleo/água) e corrosão influenciada por microrganismos (CIM). Como resultado direto podemos encontrar problemas como entupimento de filtros e bicos injetores, corrosão de tanques e peças dos motores e perda de qualidade geral do combustível (Passman, 2003,1997; Hill & Hill, 2009; Klinksporn, 2009; Bucker et al., 2011). Estes problemas comprometem a qualidade final do produto e provocam um aumento nos custos de manutenção, limpeza e troca de peças e equipamentos (Lucchesi et al., 2012).

Uma vez que é impossível manter o combustível estéril, principalmente durante a etapa do armazenamento é necessária a adoção de medidas que visem uma maior garantia na preservação da qualidade do combustível armazenado (Siegert, 2009; Browne, 2011; Passman, 2013). Os métodos de controle físicos como a drenagem periódica dos tanques de armazenamento e a filtragem do

combustível são importantes medidas estratégicas. Os métodos de controle químico, como a adição de antimicrobianos, têm sido considerados em estudos, em especial para as misturas diesel/biodiesel (Passman, 2005; Bento et al., 2010; Zimmer et al., 2011; Passman, 2013; Zimmer et al., 2013).

Recentemente muitas empresas químicas atentas a esta nova necessidade do mercado, tem formulado antimicrobianos para uso nas misturas BX (diesel/biodiesel). Estas novas formulações, porém além de eficientes no controle do crescimento microbiano, devem atender a muitas outras exigências do mercado tais como: compatibilidade com a mistura, ter baixo custo e baixo risco a saúde ocupacional e ambiental (Canter, 2012). A seleção de um biocida adequado para uso em combustíveis envolve diversos estudos, tais como: definição de seu espectro de ação, dosagens, eficiência no sistema óleo/água coeficiente de partição óleo/água; compatibilidade com as misturas, toxicidade e biodegradabilidade, entre outros (Passman, 2003; Hill & Hill, 2008; Klinksporn, 2009; Siegert, 2009; Browne, 2011).

A utilização destes produtos em combustíveis já é conhecida e aprovada na Europa e nos Estados Unidos para alguns produtos, sendo seu uso regulamentado pela Diretiva de Produtos Biocidas (BDP, diretiva 98/8/EC) na Europa e pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos Estados Unidos (Schwingel & Eachus, 2010; Passman, 2013). No Brasil, a licença para uso de biocidas é concedida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente) e a permissão para sua adição em combustíveis somente pode ser concedida pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Até o momento, porém biocidas não são utilizados no Brasil, principalmente por ser ainda uma alternativa pouco conhecida e com muitas dúvidas para o Setor de Petróleo (Bento et al., 2010).

Este estudo teve como objetivo selecionar produtos antimicrobianos para uso em misturas de diesel/biodiesel. Na primeira etapa foram investigadas 18 diferentes formulações de biocida indicadas para uso em combustíveis quanto à sua capacidade de controlar o desenvolvimento microbiano (cultura pura e mista), em meio aquoso (caldo de cultura). Para cada formulação foram determinadas a Concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima

biocida (CMB). Em uma segunda etapa, a efetividade e a compatibilidade de 8 destas formulações foi determinada em microcosmos contendo óleo e água.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Seleção de biocidas – ensaios de susceptibilidade

Foram recebidas 18 amostras de produtos antimicrobianos contendo diferentes princípios ativos em formulações variadas para testes de susceptibilidade em caldo com microrganismos degradadores de diesel e biodiesel (Tabela 2.1).

2.2.1.1 Avaliação da CMI e CMB: O teste mais amplamente utilizado para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) é o teste de diluição em caldo de cultura, pois permite também a avaliação da concentração mínima biocida (CMB) (Spinel-Ingroff et al., 1991; Zimmer et al., 2013).

Neste método os antimicrobianos são submetidos a diluições sucessivas e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Mínima Inibitória (CMI). A concentração mínima biocida (CMB) é a menor concentração capaz de matar os microrganismos.

2.2.1.2 Microrganismos: A susceptibilidade às diferentes formulações de antimicrobianos foi testada com microrganismos isolados e com um consórcio microbiano não caracterizado. O inóculo não caracterizado foi obtido conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10. Foram avaliados o fungo filamentosso *Paecilomyces variotii*, a levedura *Candida silvicola* e a bactéria *Bacillus pumillus*. A escolha destes microrganismos como organismos teste para a seleção de biocidas, deve-se ao fato de terem sido apontados em estudos anteriores do grupo como importantes deteriogênicos de diesel e misturas diesel/biodiesel (Bento & Gaylarde, 1996; Bento, 2001; Bento et al., 2010; Bucker et al., 2011) e por pertencerem a gêneros comumente encontrados em combustíveis (Passman, 1997; Yemashova et al., 2007; Whyte, 2011).

2.2.1.3 Preparação dos Inóculos: As suspensões de esporos foram preparadas a partir de culturas com 7 dias, cultivadas em ágar malte. As suspensões de células de levedura e bactéria foram obtidas respectivamente a

partir da cultura com 2 dias em caldo malte e em caldo nutriente. O consórcio microbiano (não caracterizado) foi preparado conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10. Para sua preparação, alíquotas de igual volume de diversos lodos biológicos obtidos de tanques de armazenamento de óleo diesel, biodiesel e da mistura B5 de uma distribuidora de combustíveis foram adicionadas em 500mL do meio Bushnel Haas, contendo 1% da mistura B10 estéril. As amostras foram submetidas à agitação de 200 rpm a 28°C, durante 7 dias. Este procedimento resultou na obtenção de inóculo composto por diferentes espécies (fungos, bactérias e leveduras – não identificados) que compõe a microbiota “nativa” dos combustíveis estudados.

A contagem dos esporos e das células da levedura foi realizada em câmara de Neubauer. A padronização do inóculo para as células bacterianas e o consórcio foi realizada utilizando-se o padrão 0,5 da escala McFarland. As suspensões de esporos e celulares foram ajustadas para uma concentração final equivalente a 10^6 UFC.mL⁻¹, correspondendo ao um nível de contaminação microbiana, considerada alta para combustíveis armazenados (Hill & Hill, 2009).

2.2.1.4 Preparo da Solução estoque do biocida: O volume de 200µL do produto foi dispensado em um balão volumétrico com capacidade para 100mL. O volume do balão foi então completado com água destilada estéril e agitado por 30 segundos a fim de se obter uma solução estoque de concentração de 2000 ppm (em alguns casos esta solução estoque foi feita em concentrações maiores, 12.000 ppm, por exemplo). O valor máximo de 2.000 ppm foi estabelecido por se ambicionar selecionar produtos que atuassem em concentrações menores de 1.000 ppm. A solução foi acondicionada em frasco estéril devidamente identificada e mantida em geladeira.

2.2.1.5 Preparação do CMI: Em frascos de vidro estéreis, com capacidade para 15mL, foram adicionados 4mL de caldo de cultura, sendo caldo malte para testes com fungos e caldo nutriente para bactérias. Ao primeiro frasco da série foram adicionados 4mL da solução-estoque do biocida, correspondendo este frasco a uma diluição de 50% da solução estoque utilizada. Deste primeiro frasco foram retirados 4 mL e transferidos para o segundo frasco e assim sucessivamente, sendo que cada frasco da série apresentou sempre uma concentração 50% menor que a anterior. Um frasco, contendo apenas o caldo de

cultura, constituiu o controle do teste. Após, cada frasco recebeu um volume de inóculo correspondente a uma concentração final de 10^6 UFC.mL⁻¹. Os frascos foram incubados a 28°C, durante 10 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2.1: Principais grupos de antimicrobianos avaliados, princípios ativos e as designações utilizadas neste estudo

		*	Ingrediente Ativo	Nome (TIPO)
COMPOSTO HETEROCÍCLICO	ISOTIAZOLONAS	A	(CMIT/MIT) 5-chloro-2-metil-4-tiazoline-3-ketona (CMI) e 2-methyl-4-thiazoline-3-ketone (MI).	Biocida
		B	(CMIT/MIT) - 5-chloro-2-metil-4-tiazoline-3-ketona (CMI) e 2-methyl-4-thiazoline-3-ketone (MI).	Biocida
		C	(MIT/CMIT) 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one + 2-metil-2H-isotiazol-3-one	Biocida
		D	(BIT/CMIT/MIT/Bronopol)- 2-Benzisothiazolin-3-one (BIT) +5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one (CMIT) +2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)+ 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol (bronopol)	Biocida
		E	(BBIT/MIT) 1 ,2-Benzisothiazolin-3-one, 2-Butyl (BBIT) + 3:1 mixture of 5-chloro-2-methyl -2H-isothiazol-3-one and 2-methyl -2H-isothiazol-3-one 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)	Biocida
		F	(BBIT) n-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	Biocida
		G	(BBIT) 1 ,2-Benzisothiazolin-3-one, 2-Butyl	Biocida
		H	(MBM/ BBIT) N,N'- metilenebismorpholine + 2-n-butylbenzo[d] isothiazol-3-one	Biocida
LIBERADORES DE FORMOL	Amine formaldeyde reaction products	I	(NMEND) 4-(2-nitrobutyl)morpholyne e 4,4'-(2ethyl-2-nitrotrimethylene)-dimorpholine	Biocida
		J	(MBM) N,N-methilenebismorpholine 90%	Agente anticorrosão com propriedades biocida
		L	2,2',2-(hexahydro-1,3,5-triazine-tryl) triethanol	Biocida
		M	(MBO) 3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine) 100%	Biocida
		N	(MBO) 3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine) 90%	Biocida
		O	(MBO) Aditivo multifuncional com mistura de Oxazolidina (8% de ativo)	Aditivo multifuncional com propriedades biocida
		P	(MBO) Aditivo multifuncional com mistura de Oxazolidina (50% de ativo)	Aditivo multifuncional com propriedades biocida
Q	(TCMTB + IPBC) 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate + 2-thiocyanomethylthio) benzothiazole	Biocida		
Agente de superfície	R	Poly () hydrochloride (PHMB) hexamethylene biguanide	Biocida	
	S	2-pyridinethiol-1-oxide, sodium salt	Biocida	

* As formulações contendo o mesmo ingrediente ativo foram enviadas por diferentes fornecedores e por isto apresentam algumas diferenças (não especificadas pelo fabricante) em sua composição.

** As estruturas químicas podem ser observadas no anexo III.

2.2.1.6 Determinação de CMI e CMB: A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada visualmente tendo-se como critério a formação de biomassa para fungos e turvação do meio para leveduras e bactérias. A determinação da concentração mínima biocida (CMB) foi realizada com os frascos contendo as concentrações de biocida superiores a CMI observada. Destes frascos retirou-se uma alíquota de 20µL, que foi inoculada em placas contendo meio de cultura sólido. As placas foram incubadas a 28°C durante 3 dias para a leveduras e bactérias e 7 dias para o fungo e o consórcio. Foi considerada CMB a concentração onde não foi verificado crescimento. As avaliações foram realizadas em 24 e 48 h, 5, 7 e 10 dias.

2.2.2 Seleção de biocidas - Ensaios de efetividade

Os ensaios de efetividade foram conduzidos para avaliar o desempenho do antimicrobiano no controle da contaminação biológica em condições próximas a real, ou seja em sistema bifásico (óleo/água) com fase aquosa composta por água e sais minerais, tendo a mistura diesel/biodiesel como única fonte de carbono. Os produtos selecionados no experimento anterior foram testados em diferentes condições descritas na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Condições gerais do experimento de efetividade do biocida

	Óleo /água Volume (mL)	Fase oleosa
Etapa 1	20/20 (1:1)	Biodiesel B100 e mistura B5 (95% diesel S500 (500 ppm de enxofre) e 5% biodiesel soja/sebo) estéreis.
Etapa 2	20/60 (1:3)	Mistura B10 (Diesel S50 (50 ppm de enxofre)), com baixo teor de enxofre, e Biodiesel (B100) metílico soja e sebo) não estéreis, ou seja, conforme recebido.

2.2.2.1 Delineamento experimental: Todos os experimentos foram realizados com amostras destrutivas e três réplicas para cada tratamento. Todos os frascos foram previamente agitados para homogeneização do conteúdo e acondicionados em caixas fechadas mantidas em temperatura ambiente (28°C± 2°C).

2.2.2.2 Frascos experimentais: O experimento foi realizado em frascos de vidro com capacidade para 250mL cada. Em cada frasco foi

adicionado uma fase aquosa e uma fase oleosa. Como fase aquosa foi utilizado um meio sintético, composto de água e sais minerais (Bushnell-Hass,1941), estéril, pH 7,2. Como fase oleosa foi utilizado o combustível fornecido pela Ipiranga Produtos de Petróleo S/A.

2.2.2.3 Combustível: Para os experimentos, utilizou-se diferentes misturas de diesel/ biodiesel (Tabela 2.2), preparadas no laboratório (v/v). Todo o combustível necessário para cada experimento foi preparado em uma única vez. O combustível foi adicionado aos frascos sem esterilização, ou seja, conforme foi recebido.

2.2.2.4 Biocidas: As formulações dos antimicrobianos utilizados em cada etapa e suas respectivas formulações estão descritas na tabela 2.3. Todas as concentrações foram preparadas na fase oleosa. O volume necessário de combustível para cada concentração dos produtos avaliados foi preparado uma única vez e posteriormente, alíquotas do combustível tratado foram distribuídas nos frascos experimentais contendo a fase aquosa.

2.2.2.5 Níveis de contaminação: Na etapa 2 a efetividade dos antimicrobianos foi investigada em dois níveis de contaminação microbiana:

Baixa contaminação *Recebido (R)* combustível como recebido, sem adição de inóculo (concentração microbiana estimada em 10^3 UFC.mL⁻¹ conforme Norma IP385).

Alta contaminação *Inoculado (I)* combustível como recebido, inoculado com consórcio de microrganismos, na concentração de 10^5 UFC. mL⁻¹ de fungos e 10^7 UFC. mL⁻¹ de bactérias e leveduras.

2.2.2.6 Controles: Foram utilizados dois controles, (a) controle constituído de fase aquosa e fase oleosa sem adição de inóculo ou biocida; (b) controle constituído de fase aquosa e fase oleosa com inóculo e sem adição de biocida

Tabela 2.3: Formulações de antimicrobianos, princípios ativos e concentrações avaliados nas duas etapas do estudo.

Designação	Ingrediente Ativo	concentração (ppm)
Etapa 1 – óleo/água (1:1) 20mL Combustível B4; B100 – 28 dias		
A	(CMIT/MIT) 5-chloro-2-metil-4-tiazoline-3-ketona (CMI) e 2-methyl-4-thiazoline-3-ketone (MI).	100, 250,500,
B	(CMIT/MIT) - 5-chloro-2-metil-4-tiazoline-3-ketona (CMI) e 2-methyl-4-thiazoline-3-ketone (MI).	500,700,1100
D	(BIT/CMIT/MIT/Bronopol)- 2-Benzisothiazolin-3-one (BIT) +5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one (CMIT) +2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)+ 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol (bronopol)	500,800,1200
E	(BBIT/MIT) 1 ,2-Benzisothiazolin-3-one, 2-Butyl (BBIT) + 3:1 mixture of 5-chloro-2-methyl -2H-isothiazol-3-one and 2-methyl -2H-isothiazol-3-one 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)	250,500,750
F	(BBIT) n-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	250,750,1100
G	(BBIT) 1 ,2-Benzisothiazolin-3-one, 2-Butyl	250,750,1100
O	(MBO) Aditivo multifuncional com mistura de Oxazolidina (8% de ativo)	2000, 3000, 4000
Q	(TCMTB + IPBC) 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate + 2-thiocyanomethylthio) benzothiazole	750,1000,1500
Etapa 2 – óleo/água (3:1) 60mL/20mL Combustível B10 – 35 dias		
D	(BIT/CMIT/MIT/Bronopol)- 2-Benzisothiazolin-3-one (BIT) +5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one (CMIT) +2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)+ 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol (bronopol)	50, 100, 200
E	(BBIT/MIT) 1 ,2-Benzisothiazolin-3-one, 2-Butyl (BBIT) + 3:1 mixture of 5-chloro-2-methyl -2H-isothiazol-3-one and 2-methyl -2H-isothiazol-3-one 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)	50, 100, 200,
F	(BBIT) n-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	300, 400, 500
G	(BBIT) 1 ,2-Benzisothiazolin-3-one, 2-Butyl	200, 300, 400
P	(MBO) Aditivo multifuncional com mistura de Oxazolidina (50% de ativo)	500,1000

2.3 Análises

2.2.3.1 Fase oleosa: Foram realizadas, análises da turbidez utilizando-se a escala HAZE (ASTM D 4176-04). Este método consiste na análise visual do combustível e fornece dados **qualitativos** a respeito da presença de água e material particulado no combustível.

2.2.3.2 Fase aquosa: Foram realizadas na fase aquosa o acompanhamento das medidas de pH e o controle do processo de desenvolvimento microbiano ao final de cada tempo amostral. A medida do pH foi realizada utilizando-se fitas de pH universal, pois devido à presença de óleo

residual na amostra aquosa, o uso de eletrodo de pH não é recomendado.

A efetividade e o tempo de ação das concentrações dos biocidas testados foi avaliada através da ausência de desenvolvimento microbiano na fase aquosa. Da fase aquosa de cada frasco retirou-se uma alíquota de 20µL que foi inoculada em placas com o meio sólido PCA (Himedia) e incubadas a 28°C, durante até 5 dias. Após este tempo, identificou-se a presença ou ausência de crescimento microbiano. Este teste foi realizado a cada tempo amostral com todas as réplicas de cada tratamento do experimento.

2.2.3.3 Interface: A biomassa formada pelo desenvolvimento microbiano foi quantificada através do monitoramento de seu peso seco (mg/L). Após a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco, a biomassa formada foi retirada em discos de papel filtro, previamente pesados. Para a remoção do excesso de óleo, utilizou-se 4 mL de hexano, sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 30°C, durante 2 dias, para remoção da umidade e depois de transferidos diretamente para um dessecador, de onde foram retirados somente para pesagem. O cálculo para obtenção do crescimento através do acompanhamento do peso seco em função do tempo de imersão nos sistemas fase aquosa/óleo diesel foi:

$$\text{Variação de biomassa (mg)} = \text{Peso final} - \text{peso inicial}$$

2.2.4 Análise estatística

As médias e desvios padrão dos dados brutos foram obtidos com o uso do programa Microsoft Office Excel 2007.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Seleção da melhor formulação biocida – CMI/

Nesta etapa foram avaliadas as 18 formulações de biocida indicadas para uso em combustível, pertencentes a diferentes grupos químicos contra os principais grupos microbianos (bactéria, fungo filamentoso e levedura) e um consórcio. Para este estudo foi utilizada uma concentração de inóculo na ordem

de 10^6 UFC.mL⁻¹, simulando um sistema com alta contaminação para combustíveis armazenados (Williams et al., 1991; Hill & Hill, 2009). A comparação dos valores de CMI e CMB obtidos para os antimicrobianos testados podem ser observadas nas tabelas 2.4 e 2.5.

A ação inibitória e biocida dos antimicrobianos formulados a partir de misturas de isotiazolonas e morfolinis sobre os microrganismos do ensaio ocorreu em dosagens mais baixas (Tabelas 2.4), quando comparadas aqueles antimicrobianos classificados como liberadores de formol (Tabelas 2.5).

Dados da literatura (Williams, 2007; Browne, 2011; Raikos, 2012) descrevem que as isotiazolonas são efetivas no controle de diferentes grupos microbianos em concentrações muito baixas. De acordo com as recomendações do fabricante uma concentração de 0,03% (300 ppm) é suficiente para o tratamento de um sistema de combustíveis altamente contaminado. Browne, (2011) mostrou que a concentração de 0,04% (400 ppm) de uma mistura de isotiazolonas foi efetiva após 24h no controle de bactérias, fungos e leveduras em cultura pura, entre eles o fungo filamentoso *Hormoconis resiniae*, um dos mais importantes nos processos de corrosão influenciada por microrganismos. Bento & Gaylarde, 2001 mostraram que a mesma mistura de isotiazolonas (Kathon FP 1.5[®]) foi efetiva na concentração de 0.1 ppm (ingrediente ativo) durante 30 dias e na concentração de 1 ppm (ingrediente ativo) durante 400 dias no controle da contaminação microbiana em diesel.

Em outro estudo desenvolvido por Raikos et al., (2011) esta mesma mistura de isotiazolonas também foi efetiva contra 3 diferentes espécies de bactérias em cultura pura se desenvolvendo em sistema bifásico com 6% de água e combustível de aviação em concentrações entre 0,004% e 0,01%.

As formulações contendo morfolina como princípio ativo (H I e J), foram efetivas em baixas concentrações no controle da contaminação microbiana. Formulações com este princípio ativo apresentam amplo espectro contra fungos e bactérias, porém são altamente irritantes à pele e mucosas, devendo ser manipuladas com muito cuidado para evitar danos à saúde dos trabalhadores (Shennan, 1983). A mistura denominada NMEND, presente na formulação I (tabela 2.1), tem se mostrado efetiva contra bactérias em concentrações entre 50 e 200 ppm e entre 400 e 700ppm contra fungos e leveduras.

Tabela 2.4 Comparação entre as CMI dos biocidas testados sobre os microrganismos isolados e do consórcio não caracterizado.

Microrganismo	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>C. silvicola</i>	125/250	500/1100	125/125	300/600	250/250	600/600	150/300	125/125	31/31 5d
<i>P. variotii</i>	500/1000	500/1100	500/500	600/1200	500/500	600/1200	600/600	250/250	250/250 5d
<i>B. pumillus</i>	250/500	500/500	125/250	100/600 7D	500/1000	150/600	600/1200	125/125	125/125 5d
Inóculo não caracterizado	250/500	250/500	62/125 5 d	500/500	250/500	600/1200	600/1200	500/500 24h	62/62 5d

- não houve inibição do crescimento

Crescimento dos microrganismos em caldo malte para fungos e levedura, caldo nutriente para bactérias e caldo sabouraud para o consórcio.

Tabela 2.5. Comparação entre as CMB dos biocidas testados sobre os microrganismos isolados e do consórcio não caracterizado.

Microrganismo	J	L	M	N	O	P	Q	R	S
<i>C. silvicola</i>	2000/2000 24h	1000/1000 24h	1000/1000 7d	-	-	-	190/1500	62/250	500/1000
<i>P. variotii</i>	2000/2000 5d	1000/1000 24h	2000/2000 7d	-	-	-	190/750	125/500	250/250
<i>B. pumillus</i>	1000/1000 48h		500/500 5 d	500/1000 7d	-	6000/6000	375/1500	62,5/500	500/1000
Inóculo não caracterizado	-/1000 48h		500/500 5 d	500/500 48h	-	-	-	500/500	500/1000

- não houve inibição do crescimento

Crescimento dos microrganismos em caldo malte para fungos e levedura, caldo nutriente para bactérias e caldo sabouraud para o consórcio.

Este composto também pode neutralizar compostos ácidos produzidos por microrganismos reduzindo o risco de corrosão e por este motivo é também utilizada como um anticorrosivo (Eachus & Passman 2005).

As formulações classificadas como liberadores de formol avaliadas neste estudo foram menos eficientes comparados as misturas de isotiazolonas (tabela 2.5). Algumas não foram efetivas principalmente no controle da contaminação fúngica, como foi o caso das formulações designadas como N, O e P. Outras controlaram a contaminação, mas em altas dosagens, como as formulações L e M. Os liberadores de formol controlam o desenvolvimento microbiano através da liberação de formaldeído *in situ* (Schwingel & Eachus, 2010). Porém, a quantidade e a velocidade da liberação do formaldeído dependem do liberador e de sua concentração, do pH do meio e de outros constituintes da formulação. Em geral, esta liberação ocorre de forma lenta e contínua, promovendo uma proteção de longo prazo, principalmente para a fase combustível (Shennan, 1983; Schwingel & Eachus, 2010, Groot et al., 2010). Estes compostos também apresentam baixa toxicidade e menores riscos à saúde dos trabalhadores, porém, são menos ativos contra fungos e podem reagir com outros compostos do meio formando materiais resinosos (Schwingel & Eachus, 2010).

Algumas formulações foram eliminadas nesta fase por provocar problemas que inviabilizariam a aceitação do produto tratado. A **formulação R** formou precipitados no meio de cultura e a **formulação S** provocou intensa turvação da fase oleosa.

Os resultados obtidos em testes de CMI e CMB em caldo constituem apenas uma avaliação orientativa, uma vez que são conduzidos em condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos (pH, nutrientes, oxigênio, etc...). Sendo assim, as concentrações determinadas como inibitórias nesta condição, podem não corresponder às concentrações necessárias para controlar uma população em condições reais como a de um tanque (Bento et al., 2010). Os resultados obtidos para o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* podem exemplificar o que foi dito acima. Em nosso estudo *P. variotii* foi bastante resistente para a maioria das formulações testadas. Cabe ressaltar que este fungo é um importante deteriogênico de biodiesel, podendo produzir grande

volume de biomassa também em misturas diesel/biodiesel (Bucker et al., 2011) e por esta razão vem sendo utilizado por nosso grupo como organismo teste.

Em um estudo realizado por Bucker (2009) *P. variotii* também foi considerado o microrganismo mais resistente a um biocida contendo isotiazolonas. Em seu estudo a concentração de 10 ppm do produto foi capaz de inviabilizar células e esporos deste fungo após 48h. Resultado semelhante foi também obtido para o fungo *Aspergillus fumigatus*, porém após apenas 15 min de exposição. Em contraste com estes resultados, Menendez e Gaylarde (2000), apontaram *P. variotii* como o organismo mais sensível quando exposto a concentrações de 0,3% e 1% de isotiazolonas em tintas empregadas na pintura interna de tanques de armazenamento (diesel), concentrações estas, muito superiores as recomendadas pelo fabricante para aplicação em combustíveis. Já Bento (2001) testando a mesma mistura de isotiazolonas constatou que para uma concentração de 60 ppm do produto o organismo mais resistente foi *A. fumigatus*. É importante ressaltar que os testes realizados neste estudo, assim como aqueles realizados por Bucker (2009) foram efetuados em caldo de cultura (caldo malte), enquanto que aqueles realizados por Bento (2001) foram efetuados em meio mineral BH e diesel.

Os dados apresentados acima exemplificam como a ação de um determinado biocida sobre os microrganismos pode ser dependente das características específicas de cada sistema, da formulação do biocida e das características e composição da população microbiana e por isto, as concentrações indicadas pelos fabricantes, muitas vezes podem não ser adequadas para o sistema que se deseja proteger. A grande maioria das formulações biocidas indicadas na atualidade para utilização em combustíveis foram desenvolvidas para proteção de fluidos de corte empregados na indústria. Estes sistemas apesar de apresentarem uma fase aquosa e outra oleosa têm características completamente diferentes dos sistemas de armazenamento de combustíveis e por este motivo, testes mais específicos precisam ser realizados. Sendo assim foi conduzida uma segunda etapa, em um sistema contendo uma fase aquosa e uma fase oleosa. Nesta condição, de “estocagem simulada” foi possível estimar as concentrações que garantem a efetividade do produto, ao longo do tempo na proteção do combustível e também o comportamento da

molécula no sistema óleo/água nas condições estabelecidas.

2.3.2. Efetividade das formulações

Além das dosagens adequadas e do espectro de ação a selecção de um biocida adequado para uso em combustíveis envolve diversas etapas, entre elas, as interações com o combustível a ser tratado, a concentração utilizada (determina a ação biocida ou biostática) e velocidade de ação e atividade frente a diferentes níveis de contaminação microbiana (Doris & Pitcher, 1988; Browne, 2011).

Os estudos de efetividade visam conhecer o comportamento do biocida em condições de estocagem simulada. Neste contexto, algumas formulações foram testadas em sistemas bifásicos (óleo/água) com um consórcio microbiano não caracterizado conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10. Devido às muitas variáveis que podem influenciar o desempenho das moléculas no sistema e do carácter experimental de algumas formulações, este experimento foi realizado em duas etapas onde foram avaliadas diferentes características.

2.3.2.1. Situação 1- sistema óleo/ água 1:1; fase oleosa composta por biodiesel B100 ou mistura B5: Para esta etapa foram selecionadas diferentes misturas de isotiazolonas, representadas pelas **formulações A–G**, um aditivo multifuncional com 8% do ativo antimicrobiano MBO- (**formulação O**) e uma **formulação contendo TCMTB (Q)** (Tabela 2.2).

Neste estudo foi avaliado o tempo de morte dos microrganismos e a duração da protecção no sistema em dois tipos de combustíveis, biodiesel puro e a mistura diesel/biodiesel B5. Os resultados são apresentados na tabela 2.6.

A avaliação do tempo de morte informa o tempo em que um produto mata (inviabiliza) todos os microrganismos, células e esporos no meio. Nesta situação os antimicrobianos **A, B, D** foram os mais efetivos no controle do consórcio microbiano avaliado, promovendo a morte dos microrganismos nas primeiras 24 horas de tratamento, em concentrações entre 250 e 500 ppm e mantiveram sua protecção durante os 28 dias do experimento.

O **antimicrobiano F**, também promoveu a morte dos microrganismos já nas primeiras 24 horas e manteve sua protecção ao longo dos 28 dias, porém em concentrações maiores, 750 ppm para B5 e 1100 ppm para B100.

Tabela 2.6 Valores das concentrações expressos em ppm de produto das formulações de antimicrobianos na fase combustível (B100 e B5), estudadas em condição de armazenamento simulado em sistema óleo/ água contaminados com inóculo não caracterizado.

Biocida	24h		48h		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
	B5	B100	B5	B100	B5	B100	B5	B100	B5	B100	B5	B100
A	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
D	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
E	250	500	250	500	250	500	500	750	500	-	-	-
F	750	1100	750	1100	750	1100	750	1100	750	1100	750	1100
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ foi constatado crescimento microbiano.

O **antimicrobiano E** promoveu a morte dos microrganismos nas primeiras 24 horas, em concentrações baixas, porém apenas manteve-se ativo até 21 dias em B5 e 14 dias em B100. As demais **formulações testadas (G, O e Q)** não foram efetivas no controle do consórcio microbiano, ocorrendo crescimento em todas as concentrações avaliadas. Para as **formulações E e F** observou-se que a concentração necessária para o controle da contaminação microbiana foi diferente em função do tipo de combustível (biodiesel ou mistura B5) presente no sistema.

Em ambos os casos foi necessária uma dosagem maior para o tratamento do biodiesel puro.

Observações semelhantes foram feitas por Passman et al., (2007), que verificou que um biocida a base de NMEND (mistura de morfolinas), foi bastante efetivo no controle da contaminação microbiana em gasolina, mas falhou na preservação de um diesel com baixo conteúdo de enxofre. Kenne & Browne, (2011) testaram 8 diferentes formulações em nove tipos de combustíveis e observaram que a atividade da maioria dos biocidas variou em função do tipo de combustível empregado. Zimmer et al., (2013), testaram uma mistura de isotiazolonas e um MBO em quatro diferentes combustíveis, diesel puro, biodiesel puro e as misturas diesel e biodiesel B7 e B10 e observaram que a atividade do

biocida MBO foi bastante reduzida nas misturas, quando comparadas ao combustível puro. Selvaraju et al., (2011) também verificaram diferenças na atividade de dois biocidas em diferentes fluidos de corte e sugeriram que estas diferenças estariam relacionadas à compatibilidade entre os biocidas e a composição dos fluidos. De acordo com Cloete et al., (1998) a atividade de um biocida depende das interações entre o ingrediente ativo do biocida, a composição do combustível e os organismos. Assim como o diesel, cuja composição química pode variar em função de diferentes fatores, tais como a procedência do óleo bruto, o processo de refino e os aditivos incorporados, a composição do biodiesel também é muito variável. O biodiesel estocado na refinaria possui origens e composição muito diversas. Este produto, muitas vezes, é comprado de diferentes produtores que utilizam processos de fabricação diferentes. Além disto, a matéria prima também pode variar tanto no tipo da semente empregada quanto na proporção que os óleos são misturados, adição de aditivos, as condições de estocagem etc. Todos estes fatores podem contribuir para que cada lote do combustível comercializado tenha uma composição única.

A adição do **antimicrobiano Q** em B100 provocou a formação de uma terceira fase nos frascos do experimento, uma emulsão (Figura 2.1).

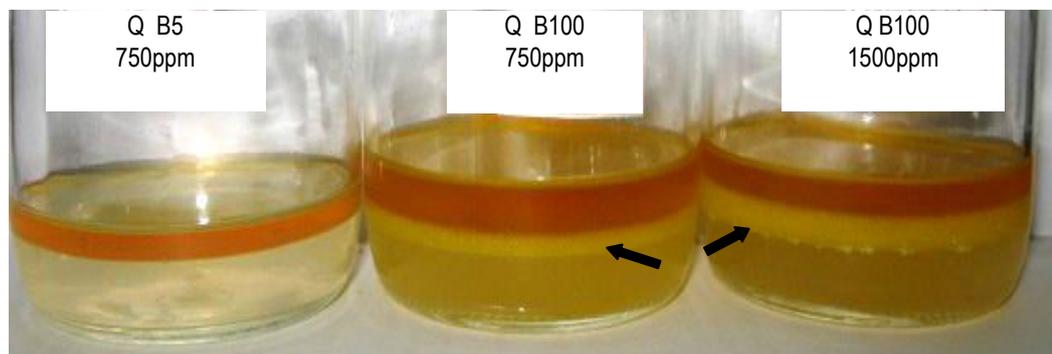


Figura 2.1. Aspecto da emulsão na interface (setas) em B100 após a adição do **antimicrobiano Q**.

Esta emulsão pode estar relacionada ao tipo de surfactante presente na formulação do produto. O ingrediente ativo desta formulação (TCMTB) associado a surfactantes tende a formar emulsões estáveis quando dissolvidos em água (Hansen et al., 1991). Além disto, esta formulação tem uma coloração leitosa que provocou forte turvação quando adicionada ao combustível e por isto

foi descartada para as próximas etapas (Figura 2.1).

2.3.3 Etapa 2: sistema óleo/água 3:1(60mL:20mL); fase oleosa mistura B10.

A efetividade de quatro formulações de biocida desenvolvidas a partir de misturas de isotiazolonas com diferentes surfactantes (conferindo diferentes graus de solubilidade em sistema água/óleo) e um aditivo multifuncional com ação antimicrobiana, foram avaliados utilizando-se um consórcio microbiano não caracterizado conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10 em condições de armazenamento simulado. Para este ensaio a proporção de água no sistema foi reduzida a fim de se obter condições mais próximas da real. Também foram avaliados dois níveis de contaminação, alto (10^6 UFC.mL⁻¹) e baixo (recebido, 10^3 UFC.mL⁻¹) (Williams et al., 1991; Hill & Hill, 2009). As interações do antimicrobiano com o combustível, o tipo e o tempo de ação e o volume de biomassa formado após 35 dias para cada formulação foram comparados.

2.3.3.1. Aspectos físicos: A avaliação das possíveis alterações visuais no combustível após a aplicação do antimicrobiano foi realizada utilizando-se a concentração mais alta de cada formulação testada. Aspectos como turbidez, cor e solubilidade foram avaliados no tempo 0 (zero) e ao final de 35 dias em frascos contendo apenas o combustível tratado (Figuras 2.2 e 2.3).

Foi observado que 1h após o início do experimento e homogeneização por agitação manual, os frascos com a mistura B10 tratada com **formulações D e G**, permaneceram turvos (Figura 2.2). Para as mesmas condições, as **formulações D e E**, foram pouco solúveis, formando soluções não homogêneas e deixando grânulos e gotículas no fundo do frasco (Figura 2.3). Este comportamento já havia sido observado em experimentos anteriores. A **formulação D** é um líquido espesso com uma cor castanho claro (Figura 2.2a), o que poderia explicar a turvação do combustível. A turvação observada neste caso poderia justificar uma não conformidade do produto de acordo com a norma ASTM D 4176+04, inviabilizando sua comercialização.

A turvação provocada pela presença do **antimicrobiano E**, classificada como de categoria 2 (Escala Haze), apresenta-se dentro dos limites permitidos para a comercialização do produto. Após 35 dias de avaliação, a mistura B10 no frasco

com o **antimicrobiano D** apresentou acentuada alteração de cor em comparação com o controle (mistura B10 sem biocida) e aos demais frascos, porém, o mesmo

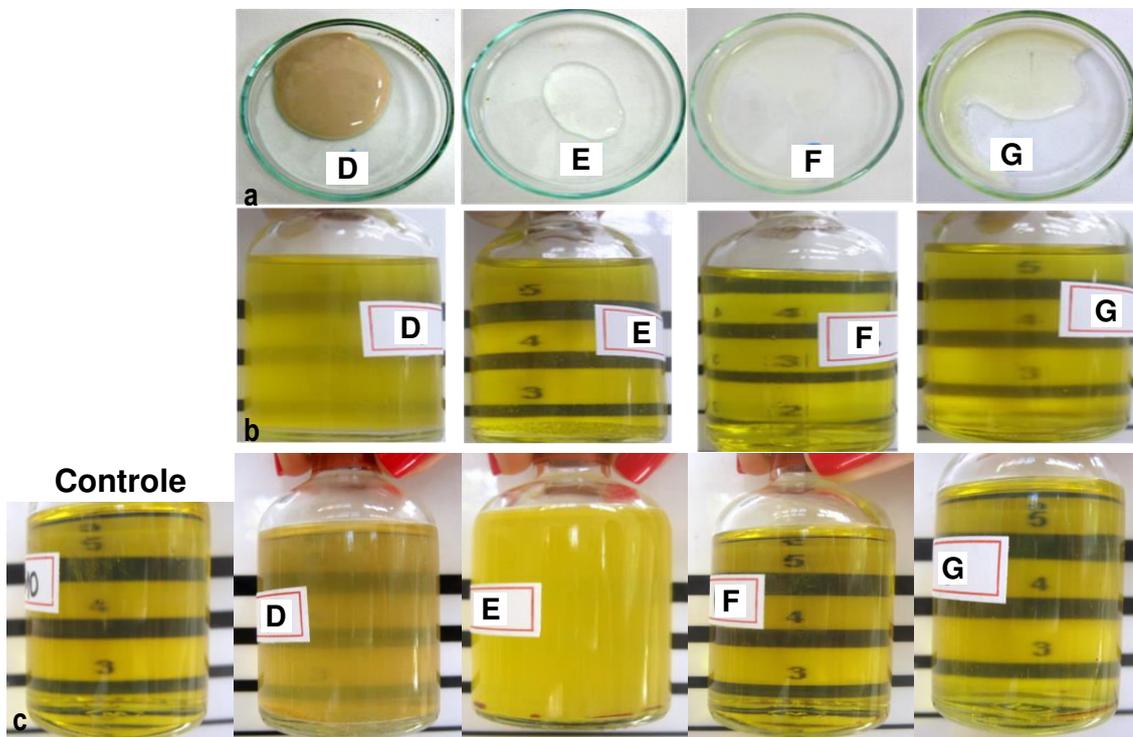


Figura 2.2. Aspecto da turbidez da mistura B10 após a adição dos biocidas designados D, E, F e G. 1a. aspecto do produto (Biocida) puro; 1b. Mistura B10 após 1 hora de contato com o biocida; 1c. Mistura B10 após 35 dias de contato com o biocida. Neste experimento foi utilizada a maior concentração testada do biocida conforme tabela 2.3.

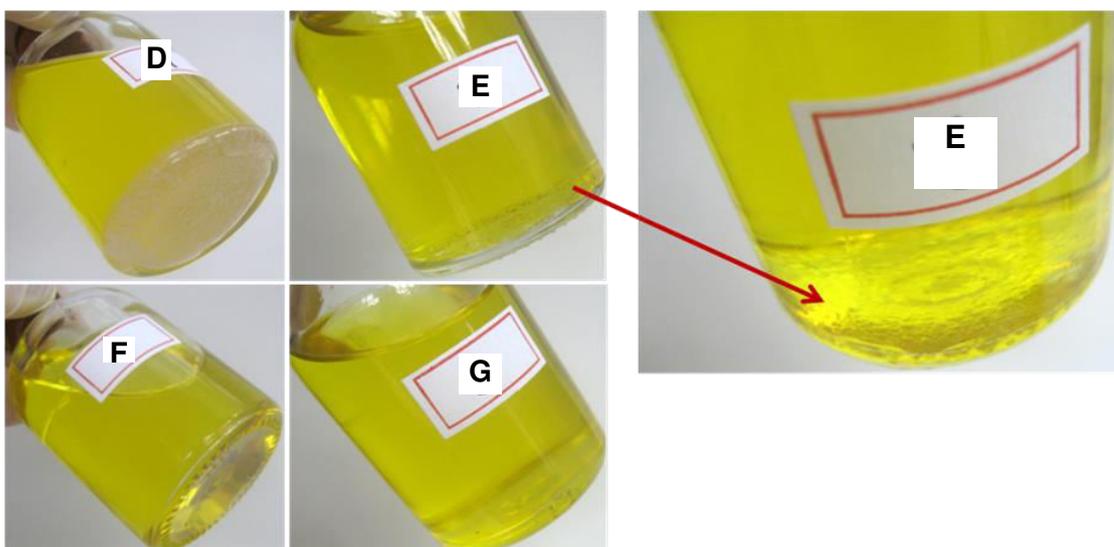


Figura 2.3. Aspecto da solubilidade dos biocidas em mistura B10, uma hora após a aplicação dos biocidas. D, E, F e G. As setas mostram a formação de gotículas depositadas no fundo, mesmo após homogeneização (seta).

não foi observado nos frascos experimentais. Uma possível explicação para isto é que tenha ocorrido uma foto-sensibilização do produto ao ser exposto a luz por um período superior aos frascos utilizados no experimento. Estes frascos foram expostos à luz em cada tempo amostral, enquanto os demais permaneceram em caixas fechadas até o momento de sua avaliação. Outra explicação poderia ser presença de água nos frascos amostrais, uma vez que a **formulação D** apresenta alta solubilidade em água, as características de partição do produto promovem a redução da concentração do produto no óleo eliminando assim o efeito de turvação e também os grânulos observados. A **formulação E**, que não apresentou turvação no tempo zero, ao final de 35 dias mostrou uma turbidez considerada de categoria 6 (Escala Haze), o que deixaria o produto fora das especificações para sua comercialização de acordo com a norma ASTM D 4176-04. Este tipo de avaliação, apesar de simples, não é comumente executada em estudos para selecção de antimicrobianos para uso em combustíveis, porém neste momento torna-se um ponto chave para escolha do produto mais adequado para tratamento do combustível, com relação às misturas de diesel/biodiesel.

Devido à baixa estabilidade química desta mistura e a sua grande susceptibilidade à degradação biológica a cor e a turbidez são importante critérios de avaliação. Principalmente porque para estas misturas, turbidez e alterações na cor são consideradas indícios da presença de água e degradação química, respectivamente (Cavalcanti, 2009; Passman, 2013).

2.3.3.2 Análises da fase aquosa: Na fase aquosa de cada frasco experimental foram avaliados o pH e o tempo de morte (Tabela 2.7).

O pH não apresentou variação na fase aquosa, mantendo-se em 7 até o final dos 35 dias de experimento para todos os tratamentos. Conforme Bento (2001) e Cazarolli et al., (2013) a composição do meio mineral BH utilizado como fase aquosa, apresenta efeito tampão devido às altas concentrações de fosfato (2 g/L) na sua composição que impedem variações bruscas no pH.

2.3.3.3 Tempo de morte: Os resultados de acompanhamento do tempo de ação e da efetividade dos biocidas testados foi monitorado pelo teste de viabilidade celular (teste de morte) e são apresentados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Avaliação do tempo de morte para os microrganismos em sistema bifásico água/óleo tratado com antimicrobiano.

Biocida	Tratamento	Concentração	Tempo de morte dos microrganismos
D	contaminado	todas	21dias
	recebido	todas	24horas
E	contaminado	*	*
	recebido	*	*
F	contaminado	todas	21 dias
	recebido	todas	14dias
G	contaminado	*	*
	recebido	*	*
P	contaminado	*	*
	recebido	*	*

l: contaminado 10^6 , r: recebido (10^3)

* Crescimento não controlado pelo biocida

Uma ação biocida, indicada pela ausência de crescimento microbiano em placa, somente foi observada para as formulações de **antimicrobianos D e F**. Para a condição de baixa contaminação (10^3 UFC.mL⁻¹), a **formulação D** foi efetiva após 24 horas de contato, enquanto que, para a mesma condição a **formulação F** foi efetiva somente após 14 dias. Na condição de contaminação alta (10^6 UFC.mL⁻¹), as **formulações D e F**, foram efetivas após 21 dias. As **formulações E, G e P** não apresentaram ação biocida sobre o consórcio estudado em nenhuma das concentrações testadas, porém foi constatada uma redução na diversidade do consórcio para as formulações E e P. Aos 14 dias foi possível recuperar em placa apenas um tipo de bactéria resistente, um bacilo gram positivo esporulado.

2.3.4 Efetividade do biocida no sistema óleo água

Formação de biomassa: A efetividade do biocida no controle do crescimento microbiano foi monitorada durante 35 dias pela produção de biomassa na interface óleo/ água através do peso seco (mg/L). A cada tempo amostral a biomassa formada foi filtrada, seca em estufa e pesada. Os valores do

peso seco da biomassa formada ao final dos 35 dias podem ser observados nos gráficos abaixo (Figuras 2.4 e 2.5).

O peso médio da biomassa após 35 dias no tratamento controle (sem biocida) foi de 445,8 mg/L nos tratamentos com baixa contaminação (10^3 UFC.mL⁻¹) e 800mg/L nos tratamentos com alta contaminação (10^6 UFC.mL⁻¹); Para fins de comparação, calculou-se o valor médio do peso seco da biomassa formada nos tratamentos com diferentes concentrações das formulações, obtendo-se para a formulação **P**, 275,0±17,7 e 381,3± 61,9; formulação **D**, 331,9 ± 9,1 e 283,3± 14,9; formulação **E**, 586,8 ±135,0 538,9 ±110,4 formulação **F**, 220,1 ±45,8 217,1 ±66,1 e para a formulação **G**, 374,3 ± 109,1 e 316,0± 127,1; respectivamente para baixa e alta contaminação (figura 2.4).

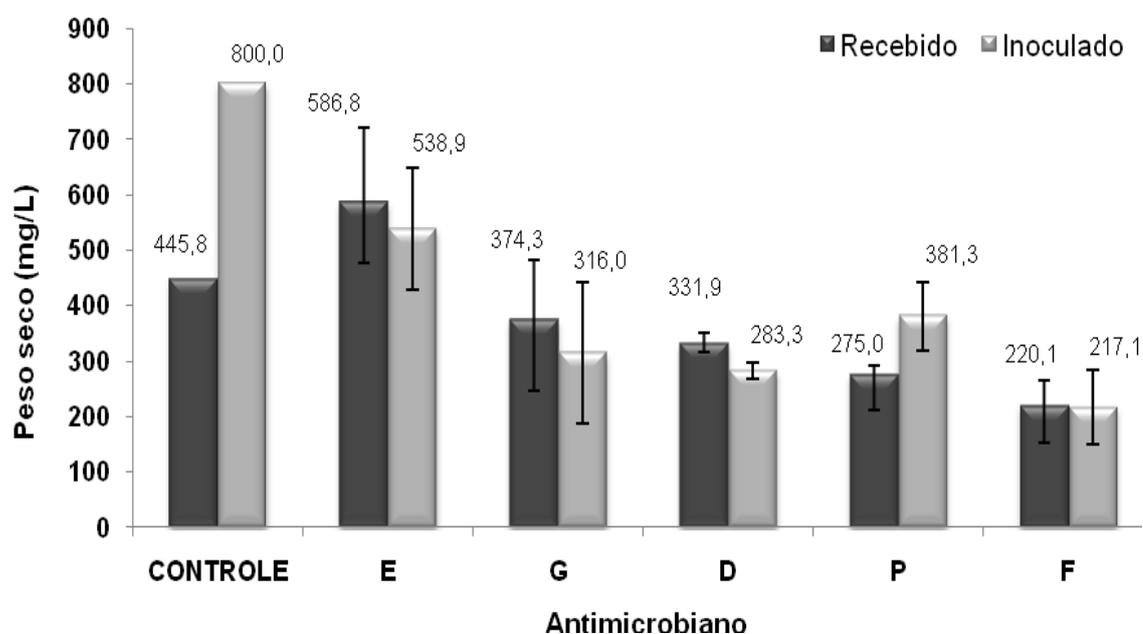


Figura 2.4. Valores do peso seco (mg/L) da biomassa formada na interface óleo/água após 35 dias de estocagem simulada com alta e baixa contaminação CT. **Controle**; **P. formulação P**; **D. formulação D**; **E. formulação E**; **F. formulação F**; **G. formulação G**. Valores representam a média de 3 réplicas

A figura 2.5 mostra a porcentagem de biomassa formada após 35 dias nos tratamentos com cada biocida testado em relação ao controle (sem biocida). Na condição de alta contaminação houve uma redução significativa da biomassa entre os tratamentos que receberam biocida e o tratamento controle sem biocida ($p \geq 0,5$). Na condição de baixa contaminação apenas o tratamento com biocida E

não apresentou uma redução da biomassa em relação ao tratamento controle.

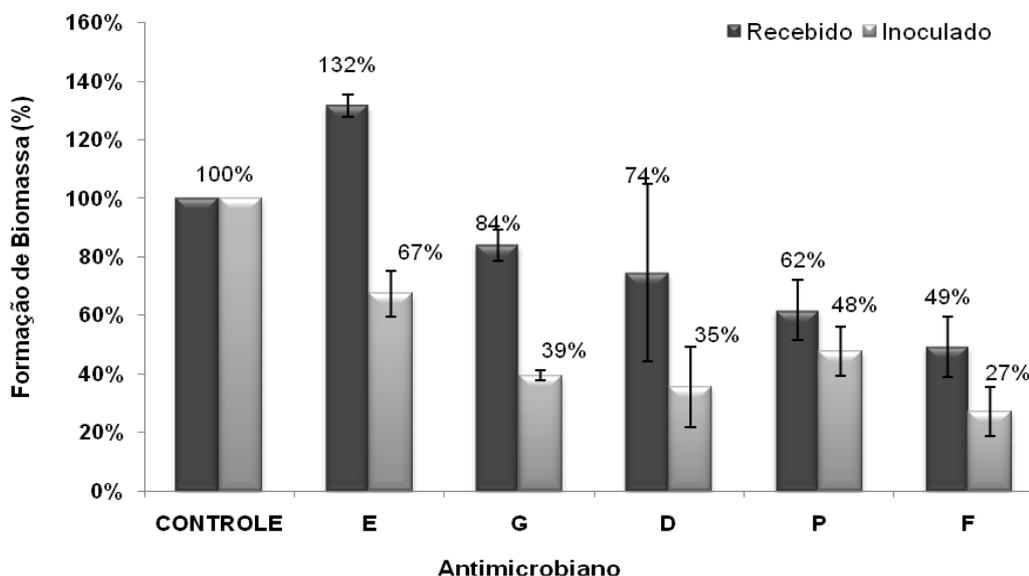


Figura 2.5. Valores do peso seco em porcentagem de biomassa formada, após 35 dias nos tratamentos com biocidas testados em relação ao tratamento controle, sem biocida. CT. **Controle**; P. **formulação P**; D. **formulação D**; E. **formulação E**; F. **formulação F**; G. **formulação G**. Valores representam a média de 3 réplicas

Na situação de baixa contaminação o biocida F foi o mais efetivo, promovendo uma redução de 51% na biomassa formada, seguido pelos biocidas P, D e G, com reduções de 38%, 26% e 16%, respectivamente. Na condição de alta contaminação o biocida F promoveu uma redução de 73%, na biomassa formada, seguido pelos biocidas D, G, P e E com reduções na ordem de 65%, 61%, 52% e 33%, respectivamente.

A ação de um biocida sobre a população microbiana é um importante fator a se considerar quando se busca um tratamento efetivo para a proteção do combustível. Um biocida pode apresentar ação biostática, inibindo o crescimento microbiano ou biocida promovendo a morte de células e esporos. Uma ação biocida rápida é importante principalmente no caso de sistemas altamente contaminados, pois elimina os microrganismos do sistema, possibilitando que o mesmo seja limpo e retome seu equilíbrio em um curto espaço de tempo (Doris & Pitcher, 1988). A efetividade de uma formulação biocida, porém é dependente de uma diversidade de fatores.

Todos os antimicrobianos testados nesta etapa (com exceção da

formulação P, um aditivo multifuncional) foram formulados com diferentes misturas de isotiazolonas, este ingrediente ativo é conhecido por apresentar um amplo espectro de ação contra bactérias, fungos e algas, apresentando efeito bacteriostático imediato e ação biocida num período médio de 4 – 12 horas (Williams, 2007). Diferentes estudos (Bento & Gaylarde, 2001; Browne, 2011; Raikos et al., 2011) apontam que as misturas de isotiazolonas podem controlar o desenvolvimento microbiano, reduzindo a população a níveis não detectáveis em períodos inferiores às 48h, um resultado semelhante foi observado neste estudo somente para a **formulação D** na condição de baixa contaminação. A maioria dos estudos citados acima, no entanto e outros ainda, realiza os experimentos utilizando microrganismos isolados. Um fator que interfere na resposta dos antimicrobianos é a própria comunidade microbiana. É de domínio público que microrganismos crescendo em cultura axênica são mais facilmente controlados quando comparados aos consórcios microbianos como o utilizado neste experimento. Além disto, os consórcios microbianos se desenvolvendo na interface óleo água podem produzir um biofilme que impede ou retarda a difusão do biocida para a fase aquosa alterando a eficácia do produto (Cloete et al., 1998; Kenee & Browne, 2011). Estes consórcios podem ainda representar um desafio maior, uma vez que as inúmeras interações entre os microrganismos podem lhes conferir maior resistência (Morchat et al., 1988; Stewart & Costerton, 2001; Chesneau, 2003; Browne, 2011).

Outro fator que desempenha um importante papel para a velocidade de ação e duração do efeito de um biocida é o seu coeficiente de partição. O coeficiente de partição descreve a afinidade de um produto pela fase aquosa ou pela fase orgânica. Um coeficiente de partição alto favorece a proteção da fase combustível enquanto um coeficiente de partição baixo favorece a fase aquosa (Doris & Pitcher, 1988, Passman, 2013). Embora o coeficiente de partição não seja o fator mais importante na seleção de um biocida, são justamente as diferenças no coeficiente de partição que melhor podem explicar o desempenho tão diferente entre as formulações avaliadas neste experimento. De acordo com informações do fabricante, a **formulação D** apresenta o menor coeficiente de partição entre as formulações avaliadas, permitindo que o biocida esteja presente em maior quantidade na fase aquosa. A **formulação B** tem alto coeficiente de

partição e por isto é praticamente insolúvel em água, desta forma, as concentrações deste biocida que chegam à fase aquosa são insuficientes para controlar o desenvolvimento microbiano. As outras duas **formulações (F e G)** apresentavam coeficientes de partição intermediários, o que poderia justificar a ação mais lenta do biocida F nos tratamentos com baixa contaminação.

Atualmente existe uma grande preocupação por parte dos órgãos fiscalizadores, distribuidoras e postos de combustíveis com o impacto ambiental que pode ser gerado pelo descarte da fase aquosa dos tanques que armazenam combustíveis tratados com agentes antimicrobianos. Neste sentido, um produto que se mantivesse restrito a fase oleosa poderia garantir a proteção do combustível, sendo queimado juntamente com o mesmo durante sua combustão no motor. Assim, tanto os riscos quanto os custos relacionados ao descarte de uma fase aquosa contaminada com traços do biocida poderiam ser reduzidos. O maior desenvolvimento microbiano ocorre na interface óleo/ água e a fase mais contaminada é geralmente a fase aquosa. Além disto, o combustível, ao longo de seu ciclo de vida, pode sofrer diversas transferências, passando por diferentes sistemas de armazenamento como o tanque das distribuidoras, do caminhão de transporte, do retalhista e por fim do tanque do veículo. Por isto, antimicrobianos com alto coeficiente de partição que podem se distribuir e manter sua efetividade em ambas as fases são os mais recomendados para tratamento de combustíveis armazenados (Rossmore, 1988; Doris & Pitcher, 1988; Passman, 2003; Passman, 2013).

Um outro fator que deve ser considerado são as interações entre as formulações testadas e o combustível. Como explicado anteriormente a composição das misturas diesel/biodiesel podem variar imensamente, principalmente em função da aplicação de diferentes aditivos. As misturas de isotiazolonas como MIT/CMIT, por exemplo, são incompatíveis com a presença de aminas, agentes oxidantes, agentes redutores e mercaptanas (Jacobson & Williams, 2000; Browne, 2011). A principal desvantagem destes ativos é a sua desativação por formas reduzidas de enxofre (Williams, 2007). Em nosso estudo não foi avaliada a presença de bactérias redutoras de sulfato, produtoras de ácido sulfídrico. Neste sentido, sugere-se que em estudos futuros seja conduzido a avaliação do consórcio microbiano na presença destas bactérias redutoras de

sulfato (BRS) com os antimicrobianos selecionados.

Os resultados da formulação P (baseada no ativo MBO) podem ser atribuídos a baixa concentração de antimicrobiano na formulação (50%) ou ainda a interações entre os demais componentes da formulação com o antimicrobiano. Muitas vezes, incompatibilidades entre o antimicrobiano e a composição química do fluido a ser tratado podem reduzir a eficácia do produto ou ainda provocar a sua desativação (Geva, 1992). O ativo MBO, por exemplo pode atuar como um sequestrante de sulfetos (Siegert & Ziegann, 2013), portanto, se este ou outros compostos afins estiverem presentes no meio o ativo será consumido de forma mais rápida, reduzindo sua eficácia como antimicrobiano. Para compreender a ação lenta deste produto devemos ainda considerar que, como foi explicado acima, trata-se de um biocida classificado como liberador de formol. Estes produtos em geral apresentam ação mais lenta e por um maior período de tempo, pois sua ação está relacionada ao tempo de prateleira de um produto (Eguchi, 2007). Assim, podemos dizer que as **formulações P e G** apresentaram uma ação biostática característica de um preservante.

O biocida F foi o mais eficiente na redução de biomassa, apesar de apresentar ação biocida apenas aos 14 dias. As isotiazolonas apresentam efeitos bioestáticos imediatos e este mesmo produto foi testado na primeira etapa, apresentando ação biocida após 24h na concentração de 750 ppm e mantendo sua proteção ao longo dos 28 dias da duração do experimento. Nesta condição este produto mostrou efetividade em concentrações mais baixas (300+500ppm), porém seu efeito biocida foi percebido após um maior intervalo de tempo.

A adição da **formulação E** nos tratamentos com baixa contaminação parece ter incrementado o crescimento microbiano nestes sistemas (Figura 2.5). Alguns aditivos, incluindo biocidas, se adicionados em concentrações sub-letais, podem ser utilizados como fonte de nutrientes pela população microbiana, acelerando o seu desenvolvimento (Hill & Hill, 1991). Este resultado ilustra os riscos de se adotar medidas corretivas inapropriadas para o sistema que se deseja tratar.

Neste experimento, a eficácia e a efetividade de diversas formulações de antimicrobianos foram avaliadas pela observação do tempo de morte e também pela formação de biomassa. Ambas as avaliações provaram ser

importantes ferramentas na avaliação de um biocida para utilização em combustíveis.

Os resultados obtidos pela análise do peso seco mostram que em termos práticos, o fato de a formulação biocida não ter a efetividade de um produto “cida”, não o desclassifica como um antimicrobiano eficaz. Deve-se considerar que um sistema de armazenamento o combustível nunca estará na condição de estéril, ou seja, livre de qualquer contaminação microbiana. Durante o armazenamento qualquer combustível pode conter populações microbianas em níveis baixos, considerados normais para o ambiente. Na condição hipotética de tanque com um nível de contaminação microbiana grau médio, o sistema somente evoluirá para uma condição de alerta, se não houver nenhuma rotina na manutenção, ou seja, sem drenagem da água que se forma naturalmente. Os procedimentos de limpeza e drenagens regulares são medidas físicas que impedem o acúmulo da água formada no fundo e constituem uma medida estratégica no controle da infecção microbiana (Passman, 2005; Siegert, 2009; Klinksporn, 2009; ANBT 15512).

A escolha de um biocida para utilização em um determinado sistema de combustíveis é uma tarefa bastante complexa dado o número de variáveis que podem interferir com a sua ação. Além das características citadas acima, ainda podemos acrescentar a solubilidade do biocida em ambas as fases e o tipo de combustível envolvido. A ação de um biocida para uso em combustíveis é dependente de inúmeros fatores tais como sua eficácia contra diferentes grupos microbianos (fungos, bactérias e leveduras), tempo de contato, concentração de uso, a intensidade da contaminação, solubilidade, quantidade de água presente no tanque, incompatibilidades com outros componentes do meio, as características da população microbiana presente no interior do tanque, toxicidade e degradabilidade (Browne 2011; Raikos et al. 2011). Como regra geral, a quantidade de biocida aplicada deve ser mantida no mínimo possível para reduzir o custo e minimizar o impacto ambiental (Laopaiboon et al., 2006). Uma determinada dose de um antimicrobiano é necessária para manter o controle sobre a comunidade microbiana em um sistema específico. Contudo, na prática, a concentração de ativos da maioria dos biocidas cai logo após sua adição devido a inúmeros fatores. Muitos biocidas reagem com os constituintes do meio tratado,

como proteínas e polissacarídeos da matriz do biofilme, superfícies metálicas ou com as células, resultando na depleção do biocida disponível. Como resultado, a concentração do biocida disponível no sistema a ser tratado é menor que a necessária na maioria do tempo e, portanto as comunidades microbianas são expostas a concentrações sub inibitórias de biocida (Brozel et al., 1995; Cloete et al., 1998). A susceptibilidade de bactérias a biocidas é reduzida após um período de aclimatação especialmente quando existe uma acumulação de biofilme na superfície. Para reduzir estes efeitos outros modos de aplicação do biocida, tais como dose de choque ou alternância de biocidas deve ser considerada (Laopaiboon et al., 2006).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas de armazenamento de combustível podem apresentar grande complexidade tanto por sua estrutura quanto pela complexidade do produto estocado. As recentes alterações na composição química dos combustíveis armazenados tem exigido a adição de uma série de outros químicos capazes de melhorar e garantir a sua integridade em situações de estocagem por longos períodos.

Assim como os demais aditivos, os biocidas devem ser aplicados logo no início do ciclo de armazenamento de forma a garantir a preservação do combustível e do sistema como um todo por mais tempo. O produto mais adequado para cada sistema vai depender do tipo de combustível a ser estocado e da ação esperada do produto. Por isto, para cada situação haverá um produto que melhor corresponda ao resultado esperado. Se o objetivo é proteger o sistema de forma preventiva, dentre os produtos aqui avaliados, o aditivo multifuncional com atividade antimicrobiana (formulação P) poderia ser uma indicação uma vez que apresentou um bom desempenho em sistemas com baixa contaminação e poderia ser introduzido no sistema juntamente com os demais aditivos, evitando alterações de ordem operacionais na distribuição do produto.

Nas condições experimentais aqui estudadas, a concentração de 0,1% (1000 ppm) seria suficiente para preservação do sistema por um período mínimo de 30 dias. Contudo, se o objetivo for a recuperação de um sistema já

contaminado, além das medidas de controle físico como drenagem e limpeza dos tanques o ideal seria a aplicação de um produto como aquele representado pela formulação F ou D. Outros possíveis candidatos seriam os produtos representados pelas formulações H e I que apresentaram resultados satisfatórios nos testes de susceptibilidade em caldo, mas não foram avaliados em sistema bifásicos neste estudo. Entretanto, deve-se considerar que a maioria das formulações biocidas indicadas para preservação de combustíveis foi inicialmente produzida para aplicação em fluidos de corte, cuja única semelhança com os sistemas de combustível é a natureza bifásica óleo/água. É necessário que se desenvolvam formulações mais específicas para esta nova geração de combustíveis.

2.5 CONCLUSÕES

Foram testadas 18 formulações e quase todas apresentam ação biocida sobre diferentes grupos de microrganismos crescendo em cultura pura ou mista em testes de susceptibilidade em caldo. A partir destes testes foram selecionadas 8 formulações com características diferentes para os testes de efetividade em sistemas bifásicos.

Os testes realizados em sistemas bifásicos (óleo/água) com diferentes tipos de combustíveis mostram que a efetividade da formulação pode variar de acordo com o tipo do combustível utilizado. Algumas misturas de isotiazolonas pouco solúveis em água e um aditivo multifuncional com baixa concentração de antimicrobiano falharam na preservação do combustível.

Para a preservação do biodiesel puro, em alguns casos são necessárias concentrações mais altas de antimicrobianos em comparação as concentrações utilizadas para a preservação das misturas de diesel com 5% de biodiesel.

Algumas formulações apresentam incompatibilidades com as misturas diesel/biodiesel, provocando a formação de emulsões e sólidos e a turvação do combustível.

Nos sistemas óleo/água contaminados com uma cultura microbiana mista a maioria das formulações apresenta efeito bioestático. As misturas de

isotiazolonas são efetivas em concentrações mais baixas e tem melhor desempenho mesmo em sistemas com alta contaminação. Formulações contendo oxazolidinas e morfolinas também apresentam bons resultados, porém as oxazolidinas são menos efetivas em sistemas com alta contaminação microbiana.

O aditivo multifuncional com propriedades antimicrobianas (formulação P) é efetivo na preservação das misturas B10 na concentração de 0,1% em condições de baixa contaminação. Para uma próxima etapa de testes, selecionamos esta formulação principalmente pelo fato de constituir um conceito novo, uma proposta de preservação integrada que permite a proteção do combustível em etapas iniciais de seu ciclo de vida, reduzindo o risco de agravamento da contaminação durante o tempo de seu armazenamento. A adoção de um produto deste tipo poderia ainda reduzir os custos operacionais, uma vez que não exige nenhuma modificação no processo de distribuição, reduz riscos pela manipulação do produto tóxico e evita desperdícios e prejuízos decorrentes do uso inadequado do produto.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAS ,D.F. Anaerobic metabolism of biodiesel and its impact on metal corrosion. **Energy Fuels**, 24, 2924+2928, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 15512: Norma “Armazenamento, Transporte, Abastecimento e Controle de Qualidade de Biodiesel e/ou Mistura Óleo Diesel/Biodiesel”. Rio de Janeiro: **ABNT**, 2008.
- ASTM D4176 - 04(2009) Standard Test Method for Free Water and Particulate Contamination in Distillate Fuels (Visual Inspection Procedures). **ASTM International**, West Conshohocken, DOI: 10.1520/D4176+04R09, disponível em, www.astm.org
- ASTM Standard E1259, 2010e. Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, DOI:10.1520/ E1259+10, Disponível em www.astm.org.
- AUFFRET, M., LABBÉ, D., THOUAND, G., GREER, C.W. & FAYOLLE+GUICHARD, F. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 75 (24), 7774 – 7782, 2009.
- BENTO, F. M. & GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 47(2), 107+112, 2001.
- BENTO, F. M. & GAYLARDE, C.C. Microbial contamination of stored diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, 27(3), 71+75, 1996.
- BENTO, F.M. Biocorrosão do aço ASTM A283-93 em sistemas diesel água e o efeito de um biocida. Porto Alegre: UFRGS,2001,192p. Tese (**Doutorado**) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PORTO Alegre, 2001.
- BENTO, F.M., BUCKER, F., SANTESTEVAN, N., CAVALCANTI. E.H.S., ZIMMER, A. GAYLARDE, C. & CAMARGO, F. Impacto da adição do biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: Um enfoque microbiológico e controle. **Revista Biodiesel**, 47, Caderno técnico. 2010.
- BROWNE, A.B. Sustainable and effective preservation strategies for Ultra Low sulphur diesel biodiesel and unleaded gasoline. In: **IASH, 2011, The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Sarasota, Florida, USA, October, 2011. Disponível em: <http://iash.omnibooksonline.com/>.
- BRÖZEL, V. S., PIETERSEN, B. & CLOETE, T. E. Resistance of bacterial cultures to non-oxidising water treatment bactericides by adaptation. **Water Science and Technology**, 31 (5+6):169–175,1995.
- BÜCKER, F. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. Porto Alegre: UFRGS, 2009,140p. Dissertação (**Mestrado**) – Instituto de Ciências Básicas da Saude. Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PORTO Alegre, 2009.
- BÜCKER, F., SANTESTEVAN, N. A., ROESCH, L.F., JACCQUES,R. J. S., PERALBA, M.

- C., CAMARGO, F. A. O. & BENTO, F. M. Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65, 172-178, 2011.
- BUSHNELL, C. D. & HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, 41, 654-674, 1941.
- CANTER, N. The future of antimicrobial pesticides. **Tribology and Lubrication Technology**, March, 34+45. 2012. Disponível em: http://www.stle.org/assets/document/3+12_tlt_biocides_article_final.pdf acesso em dezembro, 2012.
- CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do Biodiesel e Misturas + Abrangência, Limitações dos Métodos de Avaliação e Alternativas Futuras. **Revista Biodiesel**, 3, 71-73. 2009.
- CAZAROLLI, J. C.; GUZZATTO, R.; SAMIOS, D.; PERALBA, M. C. R.; CAVALCANTI E. H. S & BENTO, F. M. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2014 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.025> acesso em Dez. 2013.
- CHESNEAU, H. L. Remediation techniques. In: **Manual 47+Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**. Passman, F. J. (Ed.), p.24-31, 2003. ASTM International, West Conshohocken
- CLOETE, T. E., JACOBS, L., & BROZEL, V. S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, 9, 23-37, 1998.
- GROOT, A., GEIER, J., FLYVHOLM, M. A., LENSEN, G. & COENRAADS, P. J. Formaldehyde+releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Metalworking fluids and remainder. Part 1. **Contact Dermatitis**, 63:117-128. 2010 DOI: 10.1111/j.1600+0536.2010.01714.x
- DODOS, G. S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S & ZANNKOS, F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuel. **Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology**, Rhodes, Greece, September, 2011.
- DORRIS, M. M., PITCHER, D. Effective Treatment of Microbially Contaminated Fuel Storage Tanks. In: **Distillate Fuel Contamination, Storage and Handling**. H. L. Chesneau and M. M. Dorris (Eds.), ASTM Special Technical Publications, 146-156, 1988
- E.U., Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February. Concerning the Placing of Biocidal Products on the Market. 1998.
- EACHUS, A. C. & PASSMAN, F. J. "Applications of a Morpholine-Derivative Product in Fuel Preservation." In: Bartz, W. J. Ed. "Fuels 2005 – 5th International Colloquium." **Technische Akademie Esslingen**, Ostildern, Germany. 477+481, 2005.
- EGUCHI, J. Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, 22, 35-39, 2007. Disponível em: http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm. Acesso em Nov. 2011.

- GAYLARDE, C. C., BENTO, F. M., & KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, 30: 01-10. 1999.
- GEVA, J., PROPES, J., PAPIER, J., BUSANNI, M., ZEHAVI, E. & FASS, R. Effects of stabilizing additives on the susceptibility of diesel fuels to microbial attack. In: Giles, H. N. (Ed.) **Proceedings of the 4th International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Orlando, Florida, November 1992. U.S. Department of Energy, Washington, 139–152, 1992.
- HANSSEN H.W., N. D. HENDERSON, & J. E. H.WARD. 1991. A review of the environmental impact and toxic effects of TCMTB. Prepared for B.C. Ministry of the Environment, **Environmental Protection Division**. Disponível em http://wlapwww.gov.bc.ca/epd/epdpa/ipmp/technical_reports/antisapstain _ chemicals/TCMTB.pdf .
- HILL, E.C. & HILL, G. C. Microbial contamination and associated corrosion in fuels during storage distribution and use. **Advanced Materials Research**, 38: 257-268, 2008.
- HILL, E.C. & HILL, G.C., Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. In IASH,2009, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**,Prague, Czech Republic, October, 2009.
- HILL, E.C. Biocides for the future. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 26: 281–285, 1990.
- JACOBSON, A. & WILLIAMS, T. M. The enviromental fate of isothiazolone biocides. **Chimica oggi**, Milano, v.18, n.10, p. 105-108, 2000.
- KEENE, P. & BROWNE, B.A. Effective preservation strategies for ultra low sulfur diesel, biodiesel and unleaded gasoline W.J. Bartz (Ed.), **Eighth International Fuels Colloquium, Technische Akademie Esslingen**, Ostfildern, Germany. 2011. on CD
- KLINKSPON, N. Impact of biodeterioration on diesel fuel systems. In IASH,2009, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, October, 2009. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- LAOPAIBOON L., PHUKOETPHIM, N. & LAOPAIBOON, P. Effect of glutaraldehyde biocide on laboratory+scale rotating biological contactors. **Electronic Journal of Biotechnology**, 9:1–12, 2006.
- LUCCHESI, E.G, EGUCHI, S.Y. & MORAES, A.M. Influence of a triazine derivative+based biocide on microbial biofilms of cutting fluids in contact with different substrates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 39 (5): 743-748. 2012.
- MENENDEZ, A.G. & GAYLARDE, C.C. Control of deteriogenic biofilms in diesel/waters systems. **Proceedings of the Seventh International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Graz, Austria, September, 2000. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- MORCHAT, R.M., HEBDA, A.J., JONES, G.M. & BROWN, R.G.,. Biocides for microbiological contamination control in naval distillate fuel. in: Hiley, R.W., Penfold,

- R.E. & Pedley, J.F. (Eds.), **Third International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, London, September, 1988. Institute of Petroleum, London, pp. 164-177.
- PASQUALINO, J.C., MONTANÉ, D. & SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil+derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, 30 (118), 874–879, 2006.
- PASSMAN, F. & DOBRANICK JK. Relative Biodegradability of B-100 Biodiesel and Conventional Low Sulfur Diesel Fuels. In: IASH 2005: **9th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**. Sitges, Espanha, Setembro, 2005. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- PASSMAN, F.J. Introduction to fuel microbiology. In: Passman, F.J. (Ed.), **Manual 47+Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**. 1-13, 2003. ASTM International, West Conshohocken.
- PASSMAN, F.J., ENGLISH, E. & LINDHARDT, C., 2007. Using adenosine triphosphate as a measure of fuel treatment microbicide performance. In: Morris, R.E. (Ed.). **Proceedings of the 10th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**, Tucson, Arizona, USA, October, 2007. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- PASSMAN, F.J., McFARLAND, B. L. & HILLYER, M.J. Ability of fuel and water soluble biocides to prevent microbial succession changes to oxygenated gasoline and synthetic tank water bottom chemistry in laboratory microcosms. In: IASH 2007+ **6th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Vancouver, Canadá, October, 1997. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD
- PASSMAN, F.J., Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 81, 88-104, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002>
- PETROLEUM INSTITUTE+ **IP 385/99**. Determination of the viable aerobic microbial content of fuels and fuel components boiling below 390°C – Filtration and culture method. , 1999. In Passman, F. J. **ASTM International**. Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, Manual 47. West Conshohocken, 2003,114 p.
- RAIKOS, V., VAMVAKAS, S. S., SEVASTOS, D., KAPOLOS, J., KARAIKAKIS, G., KOLIADIMA, A. Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. *Fuel*, 2012, 93, 559–566. doi:10.1016/j.fuel.2011.10.028 Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236111006466>.
- RODRÍGUEZ+RODRÍGUEZ, C. E., RODRÍGUEZ+CAVALLINI, E. & BLANCO, R. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. **Revista De Biologia Tropical** Vol. 57 (3), 489-504, 2009.
- ROSSMOORE, H. W., WIREMAN, J. W., ROSSMOORE, L. A., & RIHA, V. F. "Factors to Consider in Testing Biocides for Distillate Fuels," *Distillate Fuel: Contamination, Storage and Handling*, ASTM STP 1005, H.L. Chesneau and M.M.Dorris Eds.

- Proceedings American Society For Testing and Materials**, 95+104, Philadelphia, 1988.
- SCHLEICHER, T., WERKMEISTER, R., RUSS, W. & MEYER PITTROFF, R. Microbiological stability of biodiesel - diesel mixtures. **Bioresource Technology**, 100 (2), 724-730, 2009.
- SCHWINGEL, W. R., EACHUS, A.C. Antimicrobial additives for metalworking lubricants. In: Rudnick LR (ed) **Lubricant additives: chemistry and applications**, 2nd ed. CRC, Boca Raton, 383–397, 2009.
- SELVARAJU, S.B., KHAN, I.U. & YADAV, J.S. Susceptibility of Mycobacterium immunogenum and Pseudomonas fluorescens to Formaldehyde and Non+Formaldehyde Biocides in Semi+Synthetic Metalworking Fluids. **International Journal of Molecular Sciences**, 12(1), 725-41, 2011. doi: 10.3390/ijms12010725.
- SHENNAN, J.L. Selection and evaluation of biocides for aqueous metal+working fluids. **Tribology International**, 16 (6), 317-330, 1983.
- SIEGERT, N. Microbial Contamination in Diesel Fuel + Are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009 **11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czeth Republic, October, 2009. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD
- SIEGERT, W. & ZIEGANN, Q. A comparison of three different actives as fuel microbicides in regards of their bactericidal and fungicidal effect In: **IASH 2013- 13th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Rhodes, Greece, October, 2013. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- SORENSEN ,G.PEDERSEN, D.V.NORGAARD,A.K., SORENSEN, K.B. & NYGAARD,S.D. Microbial growth in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, 102(8), 5259-5264, 2011. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.017.
- SPINEL INGROFF, I. T., KERKERING, M., GOLDSON, P. R. & SHADOMY, S. Comparison Study of Broth Macrodilution and Microdilution Antifungal Susceptibility Tests. **Journal Of Clinical Microbiology**, 29 (6), 1089-1094, 1991. DOI: 0095+1137/91/061089+06\$02.00/0
- STEWART, P. S. & COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, 358:135-138. 2001. Disponível em: <http://instructional1.calstatela.edu/tsalmas/Micr%20331/Stewart%20and%20Costerton%202001.pdf> acesso em abril ,2011.
- WHITE, J., GILBERT, J., HILL, G., HILL, E., HUSE, S. M., WEIGHTMAN, A., & 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**, 77(13) 4527–4538, 2011. doi:10.1128/AEM.02317+10
- WILLIAMNS , M.T. The mechanism of action of isothiazolone biocides. **Power plant**

chemistry, 9, 14-22. 2007.

WILLIAMS, T. HAACK, T.K. & ROBBINS, J.A. Biocide treatment control of microbial contamination and fuel quality problems. *In: Proceedings of the 4th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels*, Orlando, Florida, USA, November, 1991. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.

YEMASHOVA, N.A., MURYGINA, V. P., ZHUKOV D. V., ZAKHARYANTZ, A.A., GLADCHENKO, M.A., APPANNA, V. AND KALYUZHNYI, S.V. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 6 (4), 315-337, 2007.

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**, 112, 153-162, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.062>

ZIMMER, A.R., CAZAROLLI, J. , TEIXEIRA, R. M., VISCARDI, S.L.C., CAVALCANTI, E. S. H., GERBASE, A., FERRÃO, M.F, PIATNICK, C.M.S., BENTO, F.M. Monitoring of efficacy of biocides during storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). In: IASH, 2011, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Sarasota, Florida, USA, October, 2011.

CAPÍTULO III

**MONITORAMENTO DA EFETIVIDADE DE
PRODUTOS ANTIMICROBIANOS DURANTE
ARMAZENAMENTO SIMULADO DE DIESEL (B0),
BIODIESEL (B100) E MISTURAS (B7 E B10) EM
ESCALA LABORATORIAL**

MONITORAMENTO DA EFETIVIDADE DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS DURANTE ARMAZENAMENTO SIMULADO DE DIESEL (B0), BIODIESEL (B100) E MISTURAS (B7 E B10) EM ESCALA LABORATORIAL

RESUMO

O combustível pode ser preservado pela aplicação de produtos químicos (biocidas) que inibem ou controlam o crescimento microbiano durante a estocagem. Após estudo envolvendo 18 moléculas antimicrobianas microbianas, dois produtos foram selecionados e avaliados em condições simuladas de armazenamento quanto ao tipo de ação (microbicida ou microbiostática), tempo de ação, duração de preservação e efeito sobre o crescimento microbiano. O objetivo do estudo foi a avaliação da efetividade de um biocida contendo MBO como ingrediente ativo (em pacote multifuncional) e outro na forma pura contendo a mistura de isotiazolonas MIT / CMIT. As concentrações de 400 e 1000 ppm dos produtos foram testados em biodiesel (B100 – 60%soja, 40% sebo), diesel convencional (B0- 50 ppm de enxofre) e misturas B7 e B10. A eficácia de ambos biocidas foi determinada pela avaliação das alterações em um conjunto de parâmetros por um período de 60 dias de exposição a um inóculo microbiano não caracterizado em microcosmos contendo uma fase combustível (B0, B100, B7 ou B10) e uma fase aquosa (água de drenagem ou meio mineral) com três níveis de contaminação microbiana: baixo , médio e alto. A fase combustível tal como recebido e sem adição de biocida com a fase aquosa, estéril, foi usada como controle. A fase combustível foi avaliada através da escala HAZE e análise de infravermelho (FTIR). Os parâmetros analisados na fase aquosa foram: viabilidade microbiana, presença de emulsão/biofilme e peso seco da biomassa formada na interface óleo/água. Os resultados mostraram que o aditivo com o antimicrobiano MBO exerceu ação biocida apenas na condição de baixa contaminação. O biocida contendo a mistura MIT/CMIT como ativo n aconcentração de 400 ppm erradicou a população nas condições de baixa, média e alta contaminação microbiana.

Palavras chave: biocida, mistura diesel/biodiesel, controle microbiano, MIT/CMIT, MBO.

3.1 INTRODUÇÃO

O uso de fontes alternativas de energia tem sido estimulada em todo o mundo devido as preocupações com altos níveis de emissões de gases do efeito estufa, poluição do ar e da dependência dos combustíveis fósseis. O biodiesel, vem sendo utilizado por vários países como promessa de um biocombustível renovável, sustentável e menos poluente. No Brasil, o biodiesel foi introduzido pela primeira vez no mercado em 2004. Desde 2010, os veículos a diesel no país têm usado a mistura B5, com predominância de biodiesel de soja. O biodiesel é um bom substituto para o petrodiesel por causa de sua melhor biodegradabilidade e menor emissão de CO². No entanto, o biodiesel, especialmente o tipo predominante no mercado nacional (soja), é extremamente instável, particularmente quando exposto à umidade e oxigênio do ar (Cavalcanti, 2009; Bento et al., 2010; Bento & Cavalcanti, 2012). A reação com o oxigênio conduz à formação de oligômeros solúveis e insolúveis, sob a forma de depósitos e borras, que provocam entupimentos e consequentes perdas econômicas. Devido à natureza higroscópica do biodiesel, a água se acumula no combustível que é armazenado por longos períodos. Altos níveis de água dissolvida levam à formação de micro-gotas, o que culmina na produção de uma segunda fase de água livre no fundo do tanque, condição essencial para a proliferação de microorganismos.

Historicamente, a contaminação microbiana durante o armazenamento tem sido percebida como um problema crônico no diesel (Hill & Hill, 1993; Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2010; Passman, 2003; Dodos et al., 2012). Com a introdução do biodiesel no diesel, um aumento na susceptibilidade para o crescimento microbiano foi observado (Mariano et al., 2009; Siegert, 2009; Klinkson, 2009; Bucker et al., 2011). Como consequências temos: entupimento do filtro, presença de bio-sedimentos e corrosão influenciada por microorganismos (CIM) (Passman, 2000). Outras consequências, tais como a redução na estabilidade química ou aumento da corrosividade do combustível, geralmente ocorrem concomitantemente (Hill & Hill, 2008).

Esses processos deteriorogênicos são observados pelos produtores, comerciantes e distribuidores de combustíveis e exigem atenção redobrada

através da análise, acompanhamento contínuo e adoção de medidas de mitigação, particularmente o uso de aditivos, tais como antioxidantes (Cavalcanti, 2009). Segundo Cavalcanti (2009) a condição quente e úmida que prevalece em grande parte do Brasil, bem como a exposição a climas frios e temperados predominantes no sul do País, podem produzir mudanças significativas nas características originais do produto. Neste sentido, ações preventivas e de controle são recomendadas na Norma ABNT NBR-15512. Segundo Cavalcanti (2009), um biodiesel produzido originalmente em conformidade com a especificação brasileira pode tornar-se inadequado para adição ao diesel e para utilização como misturas. O combustível pode ser preservado pela aplicação de produtos químicos (biocidas) que inibem ou controlam o crescimento microbiano (Robbins & Levy, 2004; Bento & Cavalcanti, 2012; Passman, 2013). No entanto, é preciso que o produto antimicrobiano atenda as seguintes exigências: matar microrganismos na fase combustível e na fase aquosa, possuir um amplo espectro de atividade (contra fungos, bactérias aeróbias e anaeróbias), manter o seu efeito inibidor na presença de outras substâncias no ambiente em condições de funcionamento semelhantes, não ser corrosivo para o sistema, ter baixo custo, ser seguro para manipulação e de baixo impacto ambiental (Passman, 2003; Siegert, 2009; Klinkson, 2009; Hill & Hill, 2008; Bento et al., 2010). A exigência de utilização de combustíveis com menor teor de enxofre também resultou em demandas para produtos antimicrobianos sem enxofre, aspectos quanto a biodegradabilidade e a ausência de metais pesados.

Algumas companhias garantem que se o produto antimicrobiano é usado adequadamente, vai ser transformado em produtos de combustão do motor, juntamente com o combustível (Siegert, 2009).

O uso de produtos antimicrobianos em combustíveis e biocombustíveis tem sido recomendado nos Estados Unidos e na Europa (Doris & Pitcher, 1988; Passman, 2003; Siegert, 2009; Hill & Hill, 2009; Bento et al., 2010). Dois produtos antimicrobianos utilizados atualmente em combustível e aprovados para uso sob especificações militares (MIL SPEC - EUA) são baseados em misturas de isotiazolonas (MIT/CMIT) e oxazolidinas (MBO) (Passman, 2013). Ambos foram submetidos para aprovação sob os procedimentos pelo BPD (Biocidal Products Directive- Europa). No entanto, isotiazolonas não são permitidas nos termos da

regulamentação nacional alemã, que restringem o uso de aditivos clorados no combustível (Hill & Hill, 2009).

O objetivo deste estudo foi a avaliação de um produto na forma de um aditivo multifuncional para o combustível, tendo como ingrediente ativo (MBO) e um produto biocida convencional (MIT / CMIT) no controle do desenvolvimento microbiano em biodiesel (B100 - 60% da soja e 40% de sebo bovino), petrodiesel convencional S50 (B0 - baixo teor de enxofre de 50 ppm) e as misturas diesel/biodiesel B7 e B10.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Microcosmos: Frascos de vidro com capacidade de 250 mL (microcosmos) foram utilizados para simular a estocagem dos combustíveis. A fase aquosa (20 mL) consistiu-se de meio mineral Bushnel-Hass (g. L⁻¹: KCl , 0,7 , KH₂PO₄ , 2,0 ; Na₂HPO₄ , 3,0; NH₄NO₃ , 1,0 , mais 1 mL solução de micronutrientes g.L⁻¹: MgSO₄ , 4,0; FeSO₄ , 2,0; MnCl₂ , 0,2 ; CaCl₂ , 0,2 - pH 7,2), ou água de drenagem (pH 5,0- anexo IV), que foi coletada a partir tanques de armazenamento de combustível (diesel S500). Esta fase aquosa foi dispensada em frascos de 250 mL com 60 mL de combustível perfazendo um microcosmo com volume total de 80 mL. Os microcosmos foram incubados no escuro à temperatura ambiente (30 ° C ± 3°C) durante 60 dias, preparados em triplicata, com amostras destrutivas.

3.2.2 Combustíveis: todos os combustíveis foram fornecidos pela empresa Ipiranga Produtos de Petróleo, S.A (Brasil). Os combustíveis utilizados foram: diesel (B0 , 50 ppm de enxofre), biodiesel (B100) a partir de soja e sebo (60:40) e as misturas diesel / biodiesel B7 e B10, que foram preparados no laboratório. Todos os combustíveis utilizados foram dispensadas nos frascos como recebidos, sem esterilização. O combustível foi armazenado no mesmo ambiente, sob as mesmas condições que os microcosmos ao longo do estudo.

3.2.3 Antimicrobianos (Tabela 3.1): O produto antimicrobiano MIT / CMIT é um agente antimicrobiano bem conhecido e estudado, amplamente utilizado para tratamento do sistemas de combustível que é eficaz entre 100 a 400 ppm de produto. Este produto foi utilizado neste estudo como um padrão

comparativo e , por isto, as doses utilizadas foram as mesmas que as do produto selecionado para o teste - MBO nas concentrações de 400 e 1000 ppm.

Tabela 3.1. Produtos antimicrobianos avaliados.

Biocida	MBO	MIT/CMIT
Ingrediente ativo	3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine)	5-Chloro-2-methyl-4- isothiazolin-3-one + 2- Methylisothiazol-3(2H)-one
Abrev.	MBO	MIT/CMIT
% ingrediente ativo (i.a.)	50	1,5
Grupo de Substancia	N-formal	Isotiazolinonas
Concentrações de uso (ppm)	400 -1000	100 – 400
Concentrações de uso (ppm) ingrediente ativo	200 – 500	1,5 – 6
Concentrações avaliadas (ppm)		400 -1000
Concentrações avaliadas (ppm) ingrediente ativo	200 – 500	6- 15
Biodegradabilidade	Rapidamente biodegradável (OECD301A, 301D)	Essencialmente biodegradável. Não passabiodegrada facilmente I(OECD301A, 301D)
Conteúdo de enxofre	Sem enxofre, sem halogênios, sem metais pesados (no MBO)	1,4 ppm de enxofre a cada 400ppm de produto
Observações	O produto é uma mistura de diferentes aditivos, incluindo um antimicrobiano	Produto apenas com propriedades antimicrobianas

O ingrediente ativo MBO recentemente foi aprovado para uso em combustíveis e sistemas de combustível e poucos estudos mostrando a sua efetividade em óleo diesel (Geva et al., 1992; Siegert, 1995; Passman et al., 2007; Siegert, 2009). Neste trabalho, o MBO foi adicionado a um pacote multifuncional de outros aditivos para diesel e misturas diesel / biodiesel nas concentrações de 400 e 1000 ppm na fase combustível. Estas concentrações foram determinadas após a execução da avaliação da concentração mínima inibitória com os micro-

organismos isolados (trabalho anterior), com um consórcio microbiano não caracterizado e por orientação do fabricante.

3.2.4 Inóculo: Um inóculo não caracterizado foi preparado conforme sugerido na Norma ASTM E1259 -10. Resumidamente, um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo Bushnell Haas (Bushnell & Hass, 1941), suplementado com 2% da mistura B10 estéril foi inoculado com 5 mL da mistura de borras microbianas obtidas a partir de diferentes combustíveis (diesel e misturas B5) e incubados a 28 ° C , 100 rpm durante 7 dias.

3.2.4.1 Níveis de contaminação microbiana: a fase aquosa correspondente para os tratamentos foram preparadas com meio mineral e 3 níveis de contaminação (baixa, média e alta) e a água de drenagem com dois (baixa e média contaminação microbiana).

Baixa - combustível como recebido - 10^3 CFU/L

Média - combustível como recebido com inóculo na concentração de 10^3 CFU/mL de fungos e 10^5 CFU/mL de bactérias e leveduras;

Alta- combustível como recebido com inóculo na concentração de 10^6 CFU/mL de fungos e 10^8 CFU/mL de bactérias e leveduras;

A fim de se obter a concentração mais alta, 1×10^6 UFC / mL de fungos e 5×10^8 UFC / mL de bactérias e leveduras (a maior concentração microbiana), o inóculo preparado como descrito acima foi ajustado para uma turbidez padrão McFarland 0,5 (600 nm), utilizando meio mineral Bushnell- Hass. O meio foi diluído a 1:1000 para produzir o nível de contaminação médio (1×10^3 UFC/mL de fungos e 5×10^5 CFU/mL de bactérias e leveduras) (Klepser et al., 1998; NCCL, 2002; NCCL, 2003). A contaminação microbiana do combustível "como recebido " foi determinada de acordo com a norma IP385. As amostras foram tomadas aos 0, 7 , 14, 21 , 42 e 60 dias. O combustível "tal como recebido" foi utilizado como controle, sem inóculo ou biocida.

3.2.5 Análises: Em cada tempo amostral o combustível, a água e a interface foram analisados separadamente.

3.2.5.1 Fase combustível: A turbidez do combustível foi medida utilizando a Escala HAZE (ASTM D 4176-04). As alterações químicas na fase combustível foram analisados por FTIR. Os espectros FTIR foram obtidos usando o espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 400, equipado com sulfato Triglicina

deuterado (DTGS) e um detector de reflectância total atenuada horizontal (HATR) com seleneto de zinco cristal (ZnSe). Os espectros foram recolhidos em duplicata 650-4000 cm^{-1} à temperatura ambiente. A resolução óptica do espectro IR foi de 4 cm^{-1} e 16 varreduras foram acumulados para cada espectro. Espectros de “*background*” foram obtidos para cada amostra imediatamente antes de coletar a amostra espectro. Dados de infravermelho (IV) foram subsequentemente analisados por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA) na região espectral de 1800-650 cm^{-1} utilizando o software Matlab 7,11 (The Mathworks) e software PLS_Toolbox 6.0 (Research Eigenvector) .

3.2.5.2 Fase aquosa: Testes de tempo de morte foram realizados através do monitoramento de células viáveis em placas de 96 poços, contendo caldo de cultura específico para bactérias, fungos ou contagem total. Resumidamente, uma alíquota de 10 μL de água foi removida de cada microcosmos e adicionada aos poços com 240 μL de caldo de cultura para neutralizar o ingrediente ativo. Foram utilizados como meio de cultivo caldo plate count para contagem total, caldo malte para fungos e leveduras e caldo nutriente para bactérias. As placas foram incubadas a 28°C durante 2 dias para bactérias e 10 dias para fungos. A ausência de turvação nos poços foi medida como sem crescimento microbiano (-). Poços com meio de cultura e sem adição de inóculo constituíram o controle do teste. A turbidez da fase aquosa também foi classificada através da escala HAZE (ASTM D 4176-04) e observações de sua aparência (limpido ou turvo) foram feitas de acordo com Passman & Dobranic (2005).

3.2.5.3 Interface: A interface óleo/água foi inspecionada para a presença de uma camada de espuma, película, membrana ou ambos , tal como sugerido por Passman & Dobranick (2005). As características da interface foram relatadas como presença (S ou N) e consistência (floculante, membranoso). No final dos experimentos, após 60 dias de incubação, todo o conteúdo de cada microcosmos (80 mL) foi filtrado separadamente através de discos de papel filtro previamente pesados. Para remover o combustível aderido a biomassa, os discos de papel filtro foram lavados com 4 mL de hexano. Após foram colocados em estufa a 30°C durante 48 horas e transferidos para um dessecador durante 24

horas para remover a água e o peso seco foi registrada. O volume de biomassa(mg/L) foi calculado como:

$$\frac{\text{peso final (mg)} - \text{peso inicial(mg)}}{80 \text{ (volume total do frasco)}} \times 1000$$

O peso final foi obtido pela média do peso das triplicatas para cada tratamento.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Grupos químicos testados, tempo de ação e duração de preservação

Os biocidas não são utilizados para controlar o crescimento microbiano em combustíveis no Brasil. Porém pacotes de aditivos, contendo agentes tensoativos, inibidores de corrosão, melhoradores do índice de cetano, etc são muito utilizados pois tem a função de melhorar a qualidade do óleo diesel.

A escolha de um produto antimicrobiano deve atender várias exigências tais como apresentar amplo espectro de atividade (contra fungos, bactérias aeróbias e anaeróbias) e ser eficaz contra microrganismos tanto na fase planctônica quanto sésil (biofilmes). Somente moléculas de baixo peso molecular, neutras ou biocidas catiônicos podem se difundir livremente a partir de uma solução aquosa através do gel formado na interface e no interior da matriz de gel (Gaylarde et al., 1999; Bento e Gaylarde, 2001). Os biocidas utilizados na proteção do combustível podem ser classificados em duas categorias: biocidas solúveis em água e biocidas solúveis em óleo. Os biocidas solúveis em óleo, com um coeficiente de partição (Kp) entre 0,5 e 80, são os biocidas mais recomendadas porque permitem uma melhor distribuição do ingrediente ativo, entre a fase aquosa e o combustível (Williams et al., 1991; Chesneau et al., 1994). Atualmente, misturas de isotiazolonas (MIT / CMIT) e oxazilidinas (MBO) são biocidas solúveis no combustível aprovados para uso sob especificações militares (MIL SPEC) nos EUA (Passman, 2013) . Apesar disso, em estudos anteriores têm mostrado que muitos parâmetros podem afetar a atividade biocida, como o tempo de contato, concentração, razão água/ óleo, inóculo, tipo de combustível e composição química da fase aquosa (Rossmore et al., 1988; Williams et al., 1991; Alexander, 1993; Chesneau et al., 1994; Gaylarde et al.,

1999; Bento et al., 1999; Hill & Hill, 2000; Passman et al., 2001; Passman & Dobrianic, 2005; Passman et al., 2007; Browne, 2011; Keene & Browne, 2011; Raikos et al., 2012). Neste caso, o desempenho de cada produto antimicrobiano depende essencialmente do tipo de fase aquosa, mas o tipo de combustível e nível de contaminação microbiana também mostrou algumas diferenças. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3.

3.3.1.1 Meio Mineral (Tabela 3.2): Três níveis de contaminação microbiana foram avaliados nesta fase aquosa. O meio mineral sintético contém nutrientes tais como fósforo, nitrogênio, microelementos, e possui um pH de 7,2 (Anexo III). Esta é a fase aquosa mais utilizada para testes de avaliação de antimicrobianos para uso em combustíveis, já que tem as condições ideais para dar suporte ao desenvolvimento microbiano. Nesta fase aquosa, o antimicrobiano contendo a mistura de isotiazolonas MIT / CMIT como ingrediente ativo, foi rapidamente eficaz para controlar o desenvolvimento microbiano em concentrações de 400 e 1000 ppm em todos os níveis de contaminação e em todos os tipos de combustível, tal como foi previamente observado em estudos anteriores (Bento & Gaylarde, 1996; Bento & Gaylarde, 2001; Passman & Dobrianic, 2005; Passman et al., 2007; Gaylarde et al., 1999; Williams et al., 1991; Browne, 2011; Keene & Browne, 2011; Raikos et al., 2012).

Tabela 3.2. Tempo (dias) para o controle do desenvolvimento microbiano na fase aquosa (**meio mineral**) com MBO e MIT/CMIT nas concentrações de 400 e 1000 ppm

Concentração (ppm)		400		1000	
Fase combustível	Nível de contaminação microbiana	MBO	MIT/CMIT	MBO	MIT/CMIT
B0	Baixa	21	7	14	7
	Media	*	7	21	7
	Alta	*	7	21	7
B7	Baixa	21-42	7	21	7
	Media	*	7	*	7
	Alta	*	14	*	7
B10	Baixa	21	7	42	7
	Media	*	7	*	7
	Alta	*	7	*	7
B100	Baixa	21	7	7	7
	Media	*	7	21	7
	Alta	*	7	*	7

* indica que não foi verificada ação biocida para o produto avaliado

Para esta mesma fase aquosa o aditivo contendo oxazolidina (MBO) na concentração de 400 ppm mostrou um efeito microbicida para a condição de baixa contaminação após 21 dias (Tabela 3.2), em todos os tipos de combustível, com exceção da mistura B7, onde foi observado apenas um efeito inibitório. Nenhum efeito inibitório foi observado para os níveis de contaminação microbiana média e alta em qualquer tipo de combustível nesta concentração (400 ppm). Na concentração de 1000 ppm, este mesmo produto apresentou um efeito microbicida em B0 para todos os níveis de contaminação microbiana. Em B100 o efeito microbicida foi observado para baixa e média contaminação e em B7 e B10 somente para baixa contaminação. Estes resultados discordam daquele relatados por Passman et al., (2007) e Siegert (2009) para o diesel, onde o produto MBO controlou o crescimento microbiano em um nível de contaminação microbiana de 10^5 CFU/mL com bactérias em cultura pura ou mista, enquanto apenas 400 ppm foi efetivo contra fungos. A possível explicação para estas diferenças é a composição do produto MBO, que não é meramente um biocida mas um pacote multifuncional, contendo outros aditivos que melhoram o desempenho do combustível e biocombustível. Geva et al. (1992) observaram que a presença de um biocida tendo como princípio ativo **NMEND** (4- (2-nitrobutyl) morpholyne e 4,4'- (2ethyl-2-nitrotrimethylene) – dimorpholine) e um aditivo de combustível no mesmo produto, resultou na desativação do biocida. Os autores constataram que elementos como fósforo e enxofre presentes na composição do aditivo migraram para fase aquosa, servindo de nutrientes para a população microbiana. Este fato também levou os autores a sugerir que uma interação entre os componentes do aditivo e o biocida na mistura provocou a inativação do biocida. Do mesmo modo, no presente estudo a interação entre os aditivos e MBO provavelmente afetou a atividade do biocida, porém o mesmo não pareceu ser inativado, mas apenas apresentou ação mais lenta e por menor tempo.

São muitas as explicações possíveis para ação observada do ativo biocida MBO, mas todas elas carecem de uma investigação mais específica não contemplada neste estudo. Uma possível explicação é que a interação entre os componentes da fórmula reduziu tanto a velocidade de transferência do ingrediente ativo quanto a sua disponibilidade na fase aquosa já que o produto MBO mostrou ação antimicrobiana a 1000 ppm para todos os tipos de

combustível depois 21 dias. É possível que o biocida tenha sido desativado mais rapidamente pela interação com outras moléculas presentes no meio. De um modo geral um biocida atua ligando-se a sítios específicos na célula microbiana provocando sua lise ou impedindo seu desenvolvimento (Williams, 2007). Se moléculas similares estiverem presentes no meio, ocorrerá uma competição entre as moléculas alvo dispersas no meio e aquelas presentes nas células microbianas, fazendo com que o ativo antimicrobiano seja desativado mais rapidamente, sem no entanto cumprir sua função.

3.3.1.2 Água de drenagem (Tabela 3.3). Dois níveis de contaminação microbiana foram avaliados nesta fase aquosa. A água de drenagem foi usada para simular condições reais de um tanque de armazenamento, tal como sugerido na norma ASTM 1259-10 . Esta fase aquosa contém os elementos minerais, tais como fósforo, nitrogênio, potássio, enxofre e alguns metais como ferro, cobre, zinco e manganês e o pH registrado foi de 5,0, em condições reais, mas estas características podem variar amplamente. Geralmente, apenas um efeito inibitório transitório pode ser observado para os produtos MBO e MIT/CMIT nesta fase aquosa. O efeito inibitório de MBO durou durante 14 e 28 dias a 400 e 1000 ppm, respectivamente e para o MIT/CMIT durou 21 e 35 dias a 400 e 1000 ppm, respectivamente (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Tempo (dias) para o controle do desenvolvimento microbiano na fase aquosa (**água de drenagem**) com MBO e MIT/CMIT nas concentrações de 400 e 1000 ppm.

Concentração (ppm)		400		1000	
Fase combustível	Nível de contaminação microbiana	MBO	MIT/CMIT	MBO	MIT/CMIT
B0	baixa	7-21	7	7	7
	media	7-21	21-42	7-21	7
B7	baixa	*	21-42	14-42	7-42
	media	*	21-42	*	7-42
B10	baixa	*	21-42	14-42	21-42
	media	*	21-42	14-42	7-42
B100	baixa	7-21	7-42	7	7-42
	media	7-21	7-42	*	7-42

* indica que não foi verificada ação biocida para o produto avaliado

Nesta fase aquosa testada, ambos produtos anti-microbianos não exerceram atividade biocida nem bioestática, o que provavelmente deve-se a possíveis interações químicas (fase aquosa com pH 5,0) (Rossmore et al., 1988; Jacobson & Williams, 2000). No entanto, uma vez que a desativação completa não ocorreu, a mais provável explicação é que a faixa ácida de pH registrado pode ter provocado alteração no coeficiente de partição dos biocidas, levando a redução tanto da velocidade de transferência do ingrediente ativo quanto a sua disponibilidade na fase aquosa (Jacobson & Williams, 2000). De acordo com Hill et al. (2000), o pH é um fator crítico que pode afetar a efetividade do biocida. MIT/CMIT foi eficaz em B0 com 400ppm para o nível de contaminação microbiana baixa e 1000 ppm para os dois outros níveis de contaminação. A 400 ppm um efeito inibidor foi observado apenas entre 7 a 42 dias para B100 e entre 21 e 42 dias para B7 e B10. Para B0 e B100, 400 ppm do produto contendo MBO mostrou ação inibitória até 21 dias para ambos os níveis de contaminação microbiana, baixa e média. Em 1000 ppm, um efeito microbicida foi observado, mas apenas para a condição de baixa contaminação microbiana. Para misturas de B7 e B10, não foram observados efeitos inibitórios em 400 ppm. Em 1000 ppm foi observada inibição entre 14 a 42 dias. Não houve qualquer efeito para as misturas B7 e B10 tratadas com 400 ppm do produto contendo MBO. O efeito microbicida foi observado apenas para o diesel puro (B0) com baixa contaminação microbiana, para ambos produtos antimicrobianos, exceto para MBO em 400ppm. Provavelmente, uma interação entre o produto biocida e o biodiesel puro (B100) e misturas (B7 e B10) poderia explicar a baixa efetividade demonstrada pelo produto contendo MBO nestes tipos de combustível em ambas as fases aquosas avaliadas.

A biomassa foi medida como peso seco após 7 e 60 dias de incubação. Toda a biomassa formada nos microcosmos foi medida em cada tempo amostral (dados não mostrados) e o critério utilizado para determinar o potencial preservante foi a capacidade dos produtos antimicrobianos para reduzir a biomassa após 60 dias. Para a água de drenagem, este procedimento não foi realizado. As Figuras 1 e 2 resumem os resultados para B0, B100, e mistura B7 e B10 tratados com 0, 400 e 1000 ppm de produto biocida contendo MBO ou MIT / CMIT em meio mineral. O produto contendo MBO reduziu o crescimento quando

a população microbiana inicial foi baixa (Tabela 3.4), porém, com densidades microbianas superiores não foi detectada nenhuma ação antimicrobiana a 400 ppm ou 1000 ppm, exceto em B100 (Tabela 3.5). Não foram encontradas diferenças significativas (teste t $p < 0,05$) na redução da biomassa (%) para combustíveis tratados com 400 ou 1000 ppm, exceto para o diesel puro (B0) e mistura B7, sugerindo que 400 ppm seria adequado um tratamento preventivo em B100 e misturas B10, quando o meio mineral é a fase aquosa (Tabela 3.4).

3.3.2 Efeito dos antimicrobianos no desenvolvimento microbiano

O produto contendo MIT/CMIT controlou a biomassa a 400 e 1000 ppm em todos os três níveis de contaminação microbiana. No entanto, a porcentagem de redução de biomassa para os combustíveis tratados com 1000 ppm do produto contendo MIT/CMIT foi menor do que tratado com apenas 400 ppm (Tabelas 3.4 e 3.5). Raikos et al. (2012), trabalhando com um biocida baseado MIT/CMIT, também observaram que quando foram usadas concentrações mais elevadas de biocida a sua eficácia foi reduzida. Os autores relacionaram este fato com as mudanças observadas nas características de separação do produto, que resultou em uma menor disponibilidade de ingrediente ativo na fase aquosa. De acordo com El- Zanfaly et al. (1986), as concentrações mais elevadas de biocidas podem requerer algum ajuste do pH, a fim de assegurar o perfil de atividade. Além disto, as misturas MIT/CMIT podem ser inativadas pela presença de sulfetos no meio (Siegert & Ziegann, 2013)

A biomassa formada em B100 (controle) após 60 dias foi, em média, 3,5 vezes maior do que aquela formada nas misturas B7 e B10 e no diesel puro (B0) (Figuras 3.1 e 3.2). Apesar disso, nos frascos tratados com produtos antimicrobianos o aumento da biomassa foi maior a medida que aumentou a porcentagem de biodiesel nas misturas. Isto sugere que a elevada biomassa formada no controle B100 está mais relacionada com a maior susceptibilidade do biodiesel a degradação microbiana do que as diferenças no desempenho dos agentes antimicrobianos. O biodiesel tem se mostrado uma melhor fonte de carbono para dar suporte ao desenvolvimento microbiano que o óleo diesel puro (Pasqualino et al., 2006; Owsianiac et al., 2009; Bucker et al., 2011; Sorensen et al., 2011).

Tabela 3.4. Porcentagem de redução da biomassa formada entre o tratamento controle e tratamento com baixa contaminação.

Tipo de combustível	MBO		MIT/CMIT	
	400 ppm	1000 ppm	400 ppm	1000 ppm
0	26%	49%	71%	53%
7	24%	*	7%	40%
10	27%	28%	46%	40%
100	66%	70%	72%	67%

- Não foi observada redução na biomassa formada em relação ao tratamento controle

Tabela 3.5. Porcentagem de redução da biomassa formada entre o tratamento controle e tratamento com alta contaminação.

Tipo de combustível	MBO		MIT/CMIT	
	400 ppm	1000 ppm	400 ppm	1000 ppm
0	*	*	36%	59%
7	*	*	43%	25%
10	*	*	58%	51%
100	42%	64%	78%	68%

- Não foi observada redução na biomassa formada em relação ao tratamento controle

Foi observada uma redução significativa (t- teste de $p < 0,05$) no desenvolvimento da biomassa após 60 dias para a condição de baixa contaminação microbiana em todos os tipos de combustíveis tratados com ambos os produtos antimicrobianos em comparação ao controle não tratado (tabela 3.4). Porém, na condição de alta contaminação microbiana, apenas aqueles frascos com combustível tratado com o antimicrobiano MIT/CMIT apresentaram redução na biomassa após 60 dias, (tabela 3.5). Figuras 3.3 e 3.4 mostram a efetividade de MBO e MIT/CMIT em 400 e 1000 ppm para a condição de baixa contaminação microbiana.

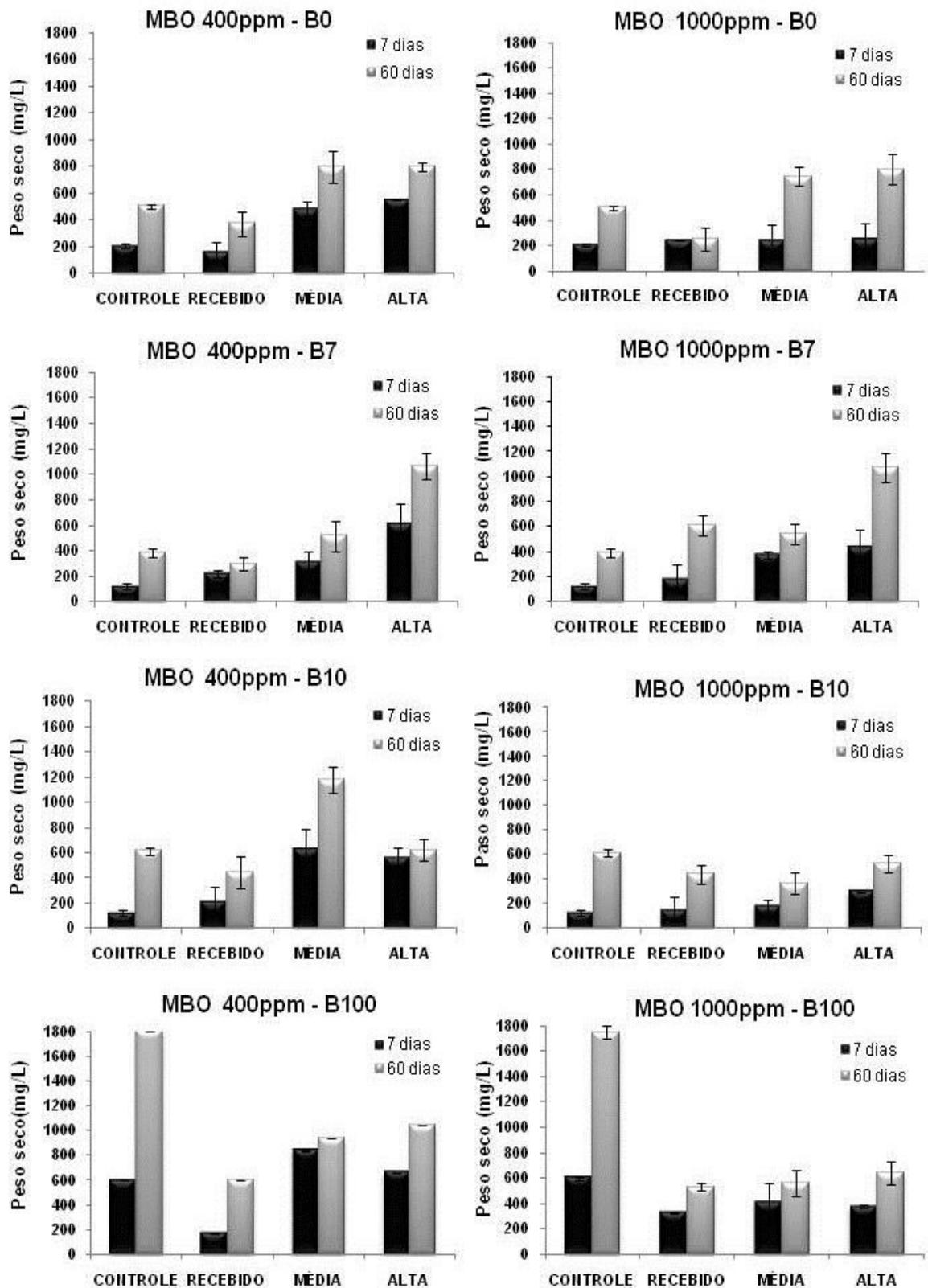


Figura 3.1. Valores de biomassa formada após 7 e 60 dias em B0, B7, B10 e B100 com diferentes níveis de contaminação microbiana (como recebido, média e alta), com 400 e 1000 ppm do antimicrobiano **AMMBO50%**

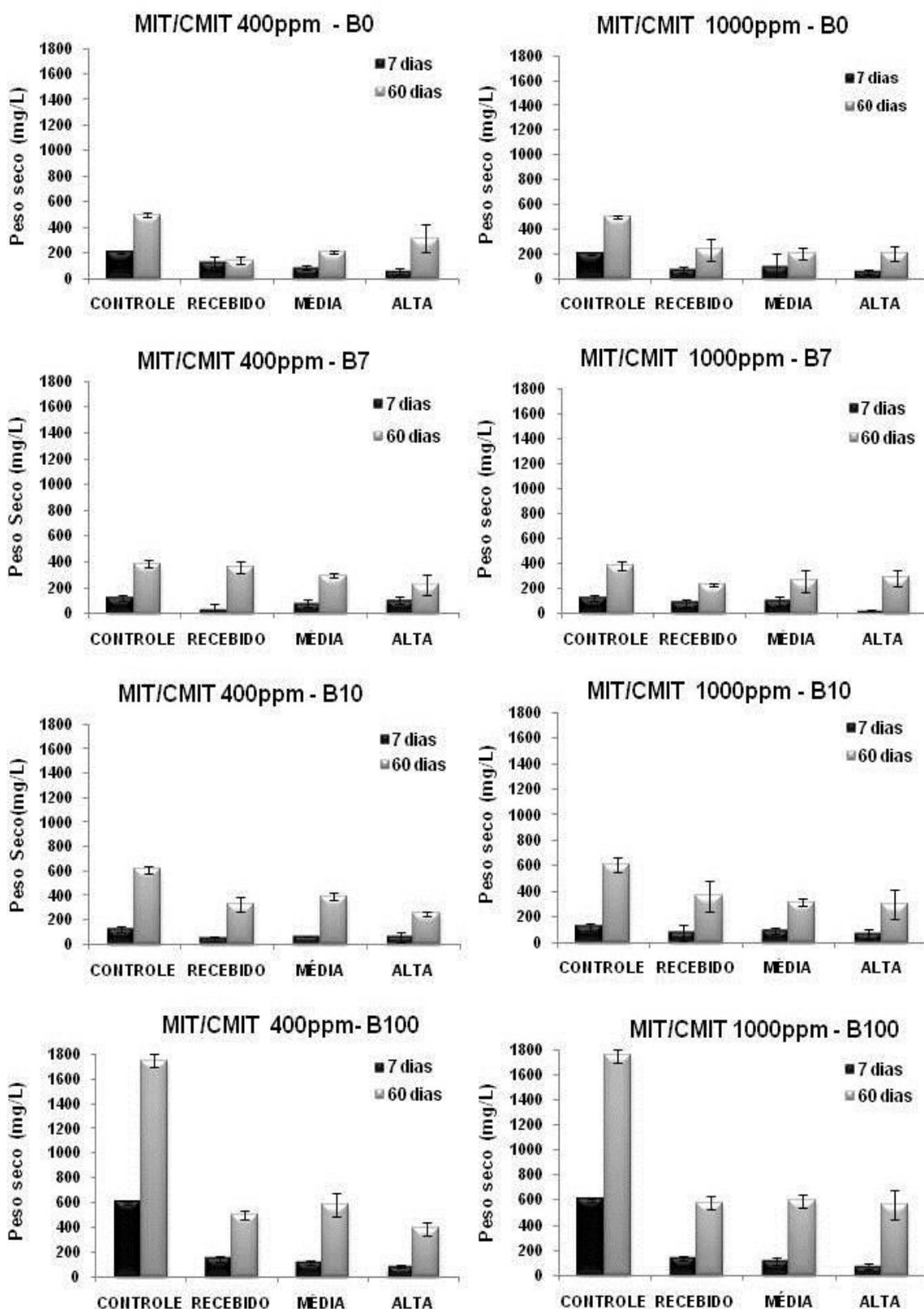


Figura 3.2. Valores de biomassa formada após 7 e 60 dias em B0, B7, B10 e B100 com diferentes níveis de contaminação microbiana (como recebido, média e alta), com 400 e 1000 ppm do antimicrobiano **MIT/CMIT**.

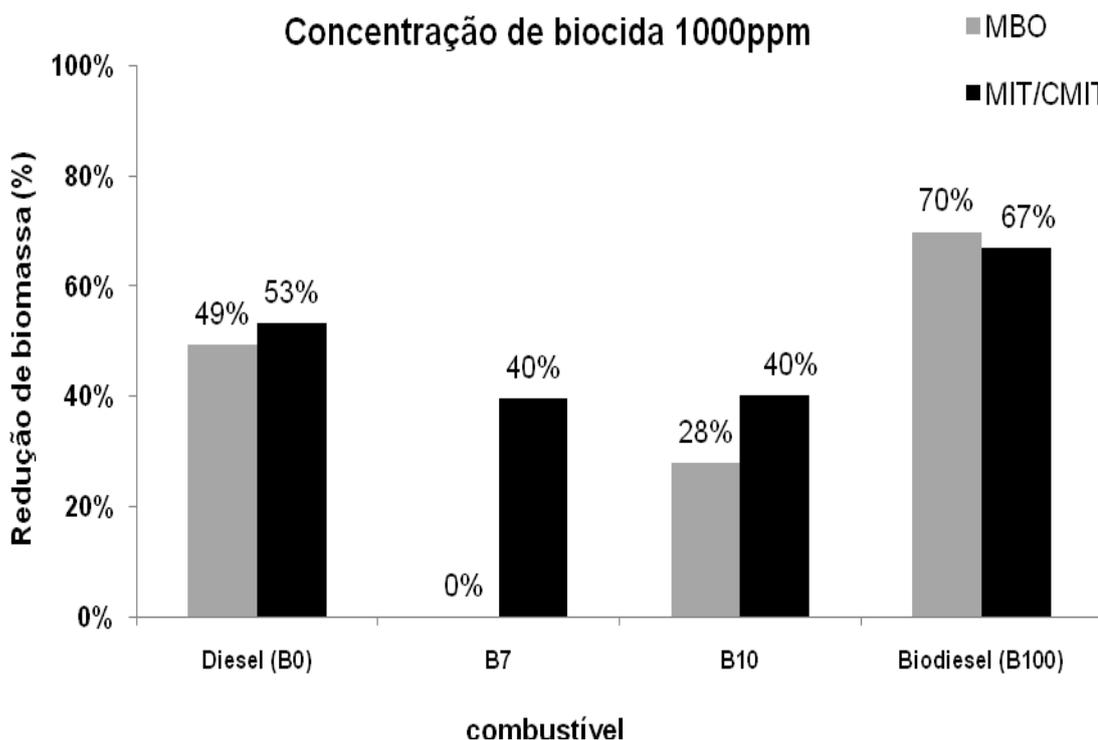


Figura 3.3. Porcentagem de redução da biomassa formada nos frascos experimentais com meio mineral como fase aquosa após 60 dias entre o controle (sem biocida) e o combustível tratado com 1000 ppm do antimicrobiano **MBO** e **MIT/CMIT**.

A análise visual do combustível tratado com antimicrobianos é importante para a escolha do produto adequado. O tratamento não deve induzir a turvação do combustível, mudanças de cor, ou a formação de partículas sólidas. A análise visual também pode fornecer dados importantes sobre a aparência, quantidade e distribuição da biomassa microbiana nos microcosmos estudados, permitindo uma melhor compreensão do problema como um todo. Tabelas 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9 resumem as observações feitas por microcosmos B0, B7, B10 e B100. Aos 60 dias, quando os produtos antimicrobianos controlaram o desenvolvimento microbiano, o combustível perdeu um pouco de sua cor e o valor de HAZE diminuiu (redução da turbidez). A aparência da interface óleo/água variou de acordo com o nível de contaminação microbiana a partir de uma camada membranosa contínua bem definida até uma zona floculada e descontínua.

Tabela 3.6. Aspecto do microcosmo com **B0** tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.

B0	Antimicrobiano	MBO				MIT/CMIT				
		Concentração	1000ppm		400ppm		1000ppm		400ppm	
		Tempo (dias)	7	60	7	60	7	60	7	60
Baixo	Haze (combust.)	3	1	2	1	2	1	3	1	
	Interface	N	N	N	N	N	N	N	N	
	Fase aquosa	limpo	limpo	limpo	turvo	limpo	limpo	limpo	limpo	
Médio	Haze (combust.)	3	1	2	1	2	2	3	1	
	Interface	N	N	Floculado	fina	N	N	N	N	
	Fase aquosa	limpo	turvo	turvo	turvo	limpo	limpo	limpo	limpo	
alto	Haze (combust.)	2	1	2	2	2	3	2	1	
	Interface	N	N	floculado	fina	N	N	N	N	
	Fase aquosa	limpo	turvo	turvo	turvo	limpo	turvo	limpo	turvo	
Controle – não tratado	Haze (combust.)	1	1							
	Interface	N	espuma							
	Fase aquosa	limpo	limpo							

N interface não observada

Tabela 3.7. Aspecto do microcosmo com **B7** tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.

B7	Antimicrobiano	MBO				MIT/CMIT				
		Concentração	1000ppm		400ppm		1000ppm		400ppm	
		Tempo (dias)	7	60	7	60	7	60	7	60
Baixo	Haze (combust.)	4	2	4	2	2	3	2	1	
	Interface	N	espuma	N	espuma	N	N	N	espuma	
	Fase aquosa	limpo	turvo	limpo	turvo	limpo	limpo	limpo	turvo	
Médio	Haze (combust.)	6	2	3	2	2	2	1	1	
	Interface	N	fina	N	fina	N	espuma	N	espuma	
	Fase aquosa	turvo	turvo	turvo	turvo	limpo	turvo	limpo	turvo	
alto	Haze (combust.)	4	2	6	3	3	2	2	1	
	Interface	N	fina	N	fina	N	espuma	N	espuma	
	Fase aquosa	turvo	turvo	turvo	turvo	limpo	turvo	limpo	turvo	
Controle – não tratado	Haze (combust.)	2	1							
	Interface	N	espuma							
	Fase aquosa	turvo	turvo							

N interface não observada

Tabela 3.8. Aspecto do microcosmo com **B10** tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.

B10	Antimicrobiano	MBO				MIT/CMIT			
		Concentração		400ppm		1000ppm		400ppm	
Nível de contaminação	Tempo (dias)	7	60	7	60	7	60	7	60
Baixo	Haze (combust.)	3	2	3	1	2	1	2	1
	Interface	N	N	N	espuma	N	N	N	N
	Fase aquosa	limpo	turvo	limpo	turvo	limpo	limpo	limpo	limpo
Médio	Haze (combust.)	6	3	2	2	3	1	3	4
	Interface	N	espuma	N	fino	N	espuma	N	espuma
	Fase aquosa	turvo	turvo	turvo	turvo	limpo	limpo	limpo	limpo
alto	Haze (combust.)	4	2	3	3	2	1	2	1
	Interface	espuma	fina	espuma	fina	N	espuma	N	espuma
	Fase aquosa	turvo	turvo	turvo	turvo	limpo	limpo	limpo	turvo
Controle – não tratado	Haze (combust.)	4	1						
	Interface	N	filme						
	Fase aquosa	turvo	turvo						

N interface não observada

Tabela 3.9. Aspecto do microcosmo com **B100** tratados com 0, 400 e 1000 ppm dos antimicrobianos MBO e MIT/CMIT.

B100	Antimicrobiano	MBO				MIT/CMIT			
		Concentração		400ppm		1000ppm		400ppm	
Nível de contaminação	Tempo (dias)	7	60	7	60	7	60	7	60
Baixo	Haze (combust.)	3	3	5	2	2	3	3	1
	Interface	N	N	N	N	N	N	N	N
	Fase aquosa	limpo	turvo	limpo	turvo	limpo	limpo	limpo	limpo
Médio	Haze (combust.)	4	2	2	1	1	1	3	1
	Interface	N	N	fino	fino	N	N	N	N
	Fase aquosa	turvo	turvo	turvo	turvo	limpo	limpo	limpo	limpo
alto	Haze (combust.)	3	2	5	2	1	1	2	1
	Interface	N	N	filme	fino	N	fino	N	N
	Fase aquosa	limpo	turvo	turvo	turvo	limpo	turvo	limpo	limpo
Controle – não tratado	Haze (combust.)	3	1						
	Interface	N	fino						
	Fase aquosa	turvo	turvo						

N interface não observada

3.3.3 - HATR espectros FTIR

Os espectros HATR -FTIR da fase combustível analisados usando técnicas de análise multivariada (PCA e HCA), evidenciaram a degradação sofrida pelo biodiesel quando o desenvolvimento microbiano não foi controlado. A Figura 3.4 mostra os espectros da mistura B10 MBO para a concentração de 400 ppm em meio mineral e alta contaminação microbiana (10^8 UFC / mL), onde o crescimento microbiano não foi controlado. O sinal do grupo carbonila do biodiesel (1745 cm^{-1}) diminui com o tempo e um novo sinal, o produto de degradação do biodiesel aparece e aumenta. O dendrograma para estes espectros B10 (Figura 3.5) mostra que o biodiesel é consumido ao longo do tempo, uma vez que a banda de carbonila do biodiesel diminui a partir de zero a 7, 14, 28 e 60 dias. Após 60 dias, cerca de 30 % do biodiesel foi degradado (figura 3.6). Para o mesmo tratamento, quando o desenvolvimento microbiano foi controlado pelo antimicrobiano MIT/CMIT, nenhuma degradação do biodiesel foi observada após 7 dias. Estes dados confirmam a necessidade de utilizar produtos que promovem uma rápida e eficaz de controle do crescimento microbiano nos combustíveis armazenados, especialmente de biodiesel e suas misturas, a fim de evitar perdas econômicas.

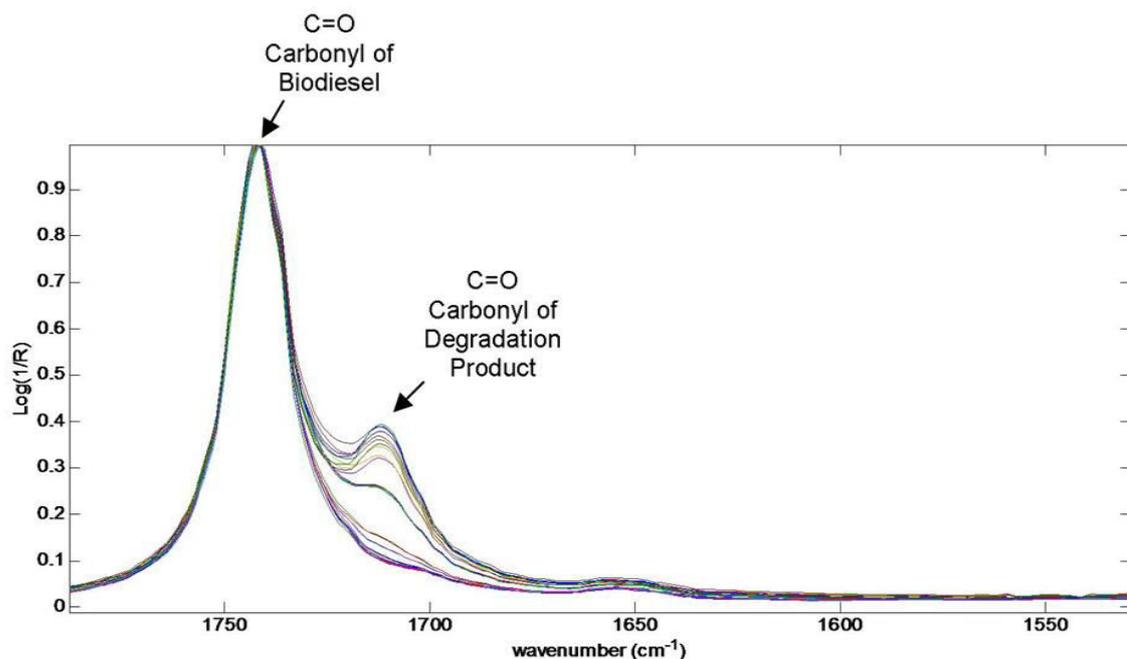


Figura 3.4 Espectros HATR-FTIR para mistura B10 (400 ppm do antimicrobiano MBO e meio mineral)

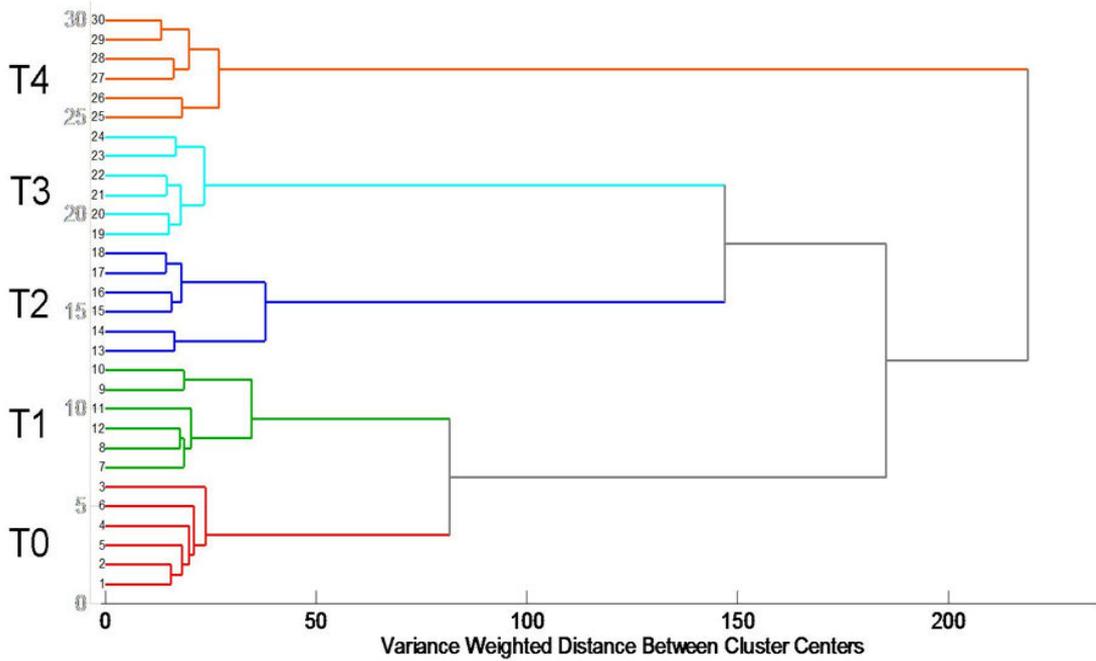


Figura 3.5. Dendrograma do espectro B10(T0: zero dias -vermelho, T1: 7 dias-verde, T2: 14 dias-azul, T3: 28 dias-azul claro e T4:60 dias-laranja).

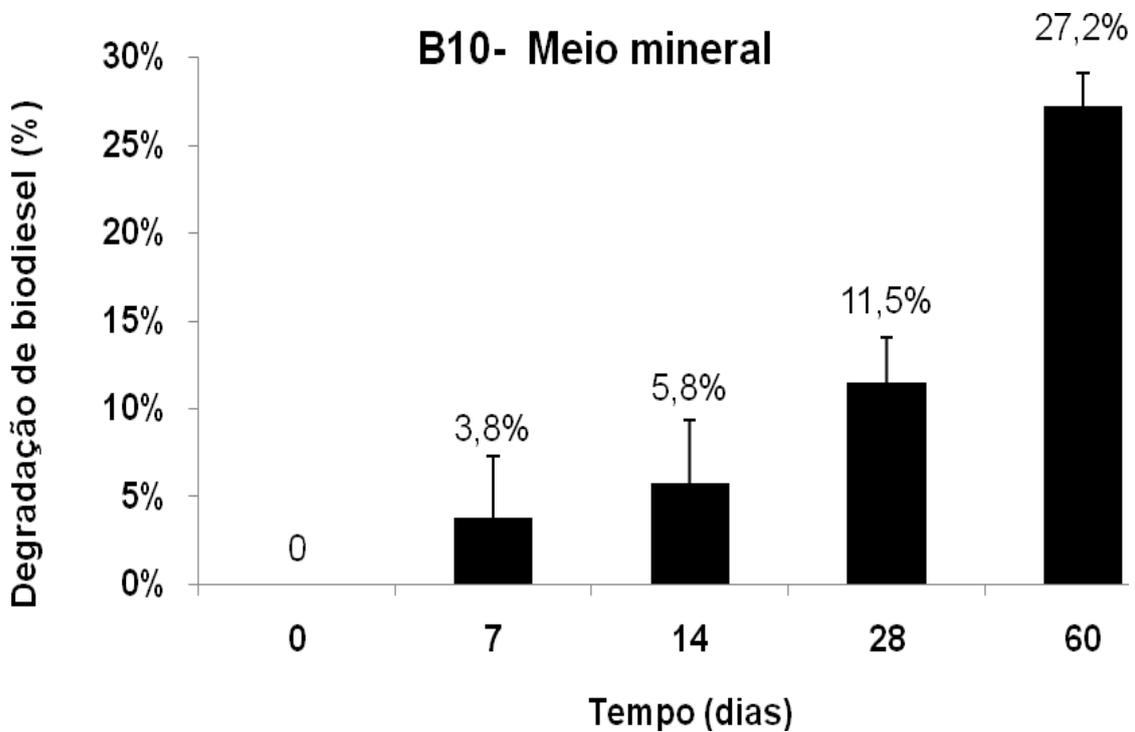


Figura 3.6. Porcentagem de degradação da mistura B10 tratada com 400 ppm do antimicrobiano MBO em meio mineral após 60 dias.

Neste estudo, o desempenho dos antimicrobianos contendo os ingredientes ativos MBO ou MIT/CMIT foi avaliado em um teste laboratorial com base na Norma ASTM E 1259. A eficácia de ambos os produtos antimicrobianos para diesel (B0), biodiesel (B100) e misturas B7 e B10 foi avaliada contra um inóculo não caracterizado em três diferentes níveis de contaminação microbiana e em duas fases aquosas diferentes. As conclusões baseiam-se principalmente em quatro aspectos: tipo de ação (microbicida ou microbiostática), tempo de ação, duração de preservação e efeito sobre o crescimento microbiano, avaliado como biomassa. O biocida MIT/CMIT foi considerado mais efetivo que o MBO. A efetividade de ambos os produtos antimicrobianos foi afetada de modo adverso quando a fase aquosa foi água de drenagem, enfatizando que o sistema deve ser drenado antes do tratamento com qualquer agente antimicrobiano. Ambos os produtos antimicrobianos foram capazes de proteger todos os tipos de combustível avaliados, mas algum tipo de interação entre as misturas B7 e B10 e o antimicrobiano MBO, principalmente na água drenagem pode ter ocorrido, o que requer uma investigação mais aprofundada. Estudos anteriores mostram que MBO quando utilizado puro tem um desempenho comparável ao MIT/CMIT (Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2013; Doris & Pitcher, 1988; Hill & Hill, 2009). O produto MBO utilizado no nosso estudo continha muitos outros aditivos para combustível, destinados a mais ampla ação de controle para diesel e biodiesel. Isso pareceu reduzir a atividade antimicrobiana do MBO. No entanto, nas condições experimentais avaliadas, em meio mineral e na concentração de 400 ppm, esta pode ser considerada uma boa estratégia para o tratamento preventivo de diesel e biodiesel.

É importante destacar que os problemas no combustível, não se limitam a contaminação microbiana, mas incluem também a oxidação e perda de capacidade de lubrificação que pode causar danos nos motores, o que reforça a necessidade de um produto multifuncional. A crescente demanda por combustíveis e a introdução do biodiesel vai levar a crescentes problemas de biodeterioração. Níveis relativamente altos de biodiesel no diesel fóssil já são obrigatórios no Brasil (B5) e Europa (B7) e percentagens ainda mais elevadas estão em discussão (B20). Este cenário precisa ser investigado e levado em consideração durante a construção de soluções para sistemas de combustíveis

no futuro.

Embora não constando do escopo do presente trabalho, as exigências ambientais são outro aspecto que recebe cada vez mais importância e devem ser consideradas quando se escolhe um preservante para utilização em combustíveis. Neste sentido, segundo Siegert & Ziegann (2013), o antimicrobiano MBO é mais aceitável do ponto de vista ecológico do que o as misturas MIT/CMIT, uma vez que se degrada rapidamente no ambiente e não contém enxofre (Tabela 3.1). No que diz respeito à saúde, não há relatos de problemas a saúde do trabalhador envolvendo o uso de MBO, ao contrário do que ocorre com os produtos contendo as misturas MIT/CMIT.

3.4 CONCLUSÕES

Neste estudo, o desempenho dos antimicrobianos contendo os ingredientes ativos MBO ou MIT/CMIT foi avaliado em um teste laboratorial com base na norma ASTM E-1259. A eficácia de ambos os produtos antimicrobianos para diesel (B0), biodiesel (B100) e misturas B7 e B10 foi avaliada contra um inóculo não caracterizado em três diferentes níveis de contaminação microbiana e em duas fases aquosas diferentes. As conclusões baseiam-se principalmente em quatro aspectos: tipo de ação (microbicida ou microbiostática), tempo de ação, duração de preservação e efeito sobre o crescimento microbiano, avaliado como biomassa.

O produto contendo o ativo antimicrobiano MIT/CMIT em sua formulação foi eficaz no controle da contaminação microbiana na concentração de 400 ppm, em todos os tipos de combustíveis avaliados e para os três níveis de contaminação propostos após sete dias, mantendo sua ação até o final do experimento.

O produto contendo o ativo antimicrobiano MBO na sua formulação apresentou melhor desempenho na concentração de 1000 ppm. Para este produto no entanto, não foi constatado efeito biocida para as misturas B7 e B10, principalmente na fase aquosa constituída de água drenagem. Isto sugere que alguma interação entre estas misturas e o antimicrobiano MBO pode ter ocorrido, porém este fato ainda requer uma investigação mais aprofundada. Para os níveis de contaminação mais altos, este mesmo produto mostrou-se pouco eficiente no

controle de desenvolvimento microbiano mesmo na maior concentração avaliada (1000 ppm). Apesar disto, nas condições experimentais avaliadas, em meio mineral e baixa contaminação a concentração de 1000 ppm, pode ser considerada uma boa estratégia para o tratamento preventivo de diesel e biodiesel.

Para ambos os produtos antimicrobianos testados foi constatado uma redução na efetividade quando a fase aquosa foi água de drenagem, enfatizando que o sistema deve ser drenado ao máximo possível antes do tratamento com qualquer agente antimicrobiano. Este fato enfatiza que mesmo quando estratégias mitigatórias são necessárias as boas práticas de manutenção que incluem inspeções e drenagem periódica dos tanques não devem ser negligenciadas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT NBR 15552. Norma “Armazenamento, Transporte, Abastecimento e Controle de Qualidade de Biodiesel e/ou Mistura Óleo Diesel/Biodiesel”, **ABNT**, 2008.
- ALEXANDER, M. Compatibility and Efficacy of Biocides Qualified Under Military Specification MIL-S-53021. **U.S. Army Belvoir Research**, Development and Engineering Center, Fort Belvoir, 16 pp. 1993.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM D4176 - 04(2009) Standard Test Method for Free Water and Particulate Contamination in Distillate Fuels (Visual Inspection Procedures). **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2009, doi: 10.1520/D4176-04R09. Disponível on line em www.astm.org.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM E1259, 2010. Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, doi:10.1520/ E1259-10, Disponível em: www.astm.org.
- BENTO, F. M. & GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, 47(2), 107-112, 2001.
- BENTO, F. M. & GAYLARDE, C.C. Microbial contamination of stored diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, 27(3), 71-75, 1996.
- BENTO F. M. & CAVALCANTI, E. H. S. Implicações da adição de 5% de biodiesel na qualidade do óleo diesel. 2012. Disponível em <http://www.cntdespoluir.org.br/Paginas/Artigos.aspx?n=7>
- BENTO, F.M.; BUCKER, F.; SANTESTEVAN, N.; CAVALCANTI. E.H.S.; ZIMMER, A.; GAYLARDE, C. *et al.* Impacto da adição do biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: Um enfoque microbiológico e controle. **Revista Biodiesel**, 47, 1-5, Caderno técnico, 2010.
- BENTO, F. M; ENGLERT, G.E.; GAYLARDE, C.C. & MULLER, I.L. Microrganismos e o Armazenamento de óleo diesel. **Petro & Química**, 211, 70-77, 1999.
- BROWNE, A.B. Sustainable and effective preservation strategies for Ultra Low sulphur diesel biodiesel and unleaded gasoline. In IASH, 2011, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Sarasota, Florida, USA, October, 2011. <http://iash.omnibooksonline.com/>.
- BÜCKER, F.; Santestevan, N.A., Roesch, L.F.; Jacques, R.J.S.; Peralba, M.C.; Camargo, F.A.O. & Bento, F.M. Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65,172-178, 2011.

-
- BUSHNELL, C. D. & HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, 41, 654-674, 1941.
- CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do Biodiesel e Misturas - Abrangência, Limitações dos Métodos de Avaliação e Alternativas Futuras. **Revista Biodiesel**, 3, 71-73, 2009.
- CHESNEAU, H.L., Passman, F.J., Daniels, D.A. Case study: use of isothiazolinone and nitro-morpholine biocides to control microbial contamination in diesel and gasoline storage and distribution systems. *In*: Giles, H.N. (Ed.), **Proceedings of the Fifth International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Rotterdam, The Netherlands, October 1994. U.S. Department of Energy, Washington, pp. 113-128.
- DODOS, G.S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S. & ZANNIKOS F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Global NEST Journal**, 14(2), 175-182. 2012. Disponível on line em http://www.gnest.org/journal/Vol_14_no_2/175-182856NRG10_Dodos_14-2.pdf.
- DORRIS, M. M. & PITCHER, D. Effective Treatment of Microbially Contaminated Fuel Storage Tanks. *In*: Distillate Fuel Contamination, Storage and Handling. H.L. Chesneau and M.M. Dorris (Eds.), **ASTM Special Technical Publications**, 146-156, 1988.
- EL-ZANFALY, H. T. E., KASSIM, E. A. & HASSAN, H. M., The effect of selected biocides on sulfate-reducing bacteria. **Environmental Toxicology Water Quality**, 1: 455-464, 1986. doi: 10.1002/tox.2540010406
- GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M. & KELLEY, J. Microbial Contamination of Stored Hydrocarbon Fuels and its Control. **Revista de Microbiologia**, 30, 1-10, 1999.
- GEVA, J. PROPES, J. PAPIER, M. BUSANNI, E. ZEHAVI, R. & FASS, A.D. Effects of stabilizing additives on the susceptibility of diesel fuels to microbial attack H.N. Giles (Ed.), **Proceedings of the Fourth International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Orlando, Florida, November 1991, U.S. Department of Energy, Washington 139-152, 1992.
- HILL, E.C. & HILL, G.C. Microbiological problems in distillate fuels. **Transactions of Institute of Marine Engineers**, 104, 119-130, 1993
- HILL, E.C. & HILL, G.C. Detection and remediation of microbial spoilage and corrosion in aviation kerosene - from refinery to wing. *In*: Giles, H.N., Morris, R.E. (Eds.), **Proceedings of the Seventh International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Graz, Austria, September, 2000. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD. Disponível on line em <http://iash.omnibooksonline.com/>.
-

-
- HILL, E.C. & HILL, G.C. Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels During Storage Distribution and Use. **Advanced Materials Research**, 38, 257-268, 2008.
- HILL, E. & HILL, G. Strategies for solving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesel. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the 11th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; October 2009, Prague, Czech Republic. Disponível on line em <http://iash.omnibooksonline.com/>.
- JACOBSON, A. & WILLIAMS, T. M. The environmental fate of isothiazolone biocides. **Chimica oggi**, Milano, 18 (10):105-108, 2000.
- KEENE, P. & BROWNE, B.A. Effective preservation strategies for ultra low sulfur diesel, biodiesel and unleaded gasoline W.J. Bartz (Ed.), **Eighth International Fuels Colloquium**, Technische Akademie Esslingen, Ostfildern, Germany. 2011. on CD.
- KLEPSE, M. ERNST, E.J; LEWIS, R.E.; ERNST, M.E. AND PFALLER, M.A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 1207–1212, 1998.
- KLINKSPON, N. Impact of biodeterioration on diesel fuel systems. In IASH,2009, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, October, 2009. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- MARIANO, P.A; JUNIOR, J.S; ANGELIS, D.F. Biodegradation of Biodiesel/Diesel Blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**; 8: 2774-2778, 2009.
- NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standards - Second Edition. **NCCLS document M27-A2**, Report No.: 2nd. 2002.
- NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Growth Aerobically; Approved Standards - Sixth Edition. **NCCLS Document M7-A6**, Report No.: 6th, 2003.
- NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. **NCCLS document M38-A**. 2002.
- OWSIANIAK M, CHRZANOWSKI L, SZULC A, STANIEWSKI J, OLSZANOWSKI A, OLEJNIK-SCHMIDT AK, *et al.* Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the

- addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, Barking, 100(3), 1497-1500, 2009.
- PASQUALINO, J.C., MONTANÉA, D. & SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, 30 (10): 874-879, 2006.
- PASSMAN, F.J. & DOBRANIC, J., Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the Ninth International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; September, Sitges, Spain. 2005. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- PASSMAN, F.J. New guides for diagnosing and controlling microbial contamination in fuels and in fuel Systems. In: IASH 2000- **7th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Graz, Austria, September, 2000. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. on CD.
- PASSMAN, F.J., MCFARLAND, B.L. & HILLYER, M.J. Oxygenated gasoline biodeterioration and its control in laboratory microcosms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 47 (2), 95-106, 2001.
- PASSMAN, F.J., ENGLISH, E. & LINDHARDT, C. Using adenosine triphosphate as a measure of fuel treatment microbicide performance. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the 10th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; Tucson, Arizona, USA, October, 2007. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD. 2007.
- PASSMAN, F.J. Introduction to fuel microbiology. In: Passman, F.J. (Ed.), **Manual 47-Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**. 1-13, 2003. ASTM International, West Conshohocken.
- PASSMAN, F.J., Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 81, 88-104, 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002>
- PETROLEUM INSTITUTE- IP 385/99. Determination of the viable aerobic microbial content of fuels and fuel components boiling below 390°C – Filtration and culture method. , 1999. In: Passman, F. J. **ASTM International**. Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, Manual 47. West Conshohocken, 2003,114 p.
- RAIKOS, V.; VAMVAKAS, S. S.; SEVASTOS, D., KAPOLOS, J. ; KARAIKAKIS, G.;KOLIADIMA, A. Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, 93: 559–566, 2012. doi:10.1016/j.fuel.2011.10.028 Disponível on line em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236111006466>

-
- ROBBINS, J., LEVY, R. A review of the microbiological degradation of fuel. Part One. W. Paulus (Ed.), **Directory of Microbicides for the Protection of Materials** (second ed.), Springer Verlag, Berlin, 177–201, 2004.
- ROSSMOORE, H.W. WIREMAN J.W., ROSSMOORE, L.A RIHA V.E. Factors to consider in testing biocides for distillate fuels. *In: Distillate Fuel: Contamination, Storage and Handling*, H.L. Chesneau, M.M. Dorris (Eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 95–104, 1988.
- SIEGERT, W. Microbial Contamination in Diesel Fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? *In: IASH 2009- 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels*, Prague, Czeth Republic, October, 2009. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD
- SIEGERT, W. & ZIEGANN, Q. A comparison of three different actives as fuel microbicides in regards of their bactericidal and fungicidal effect *In: IASH 2013- 13th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Rhodes, Greece, October, 2013*. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- SIEGERT, W. Biocidal treatment and preservation of liquid fuels. H.N. Giles (Ed.), **Proceedings of the Fifth International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Rotterdam, The Netherlands, 3–7 October 1994, U.S. Department of Energy, Washington. 1995; 183–194
- SØRENSEN, G., PEDERSEN, D.V., NØRGAARD, A.K., SØRENSEN, K.B., NYGAARD, S.D. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, 102 (8), 5259-5264, 2011.
- WILLIAMNS, M.T. The mechanism of action of isothiazolone biocides. **Power plant chemistry**, 9:14-22. 2007.
- WILLIAMS, T.M.; HAACK, T.K.; ROBBINS, J.A.; GROPP, R.W. Antimicrobial product Treatment for Control of Microbial Contamination and Fuel Quality problems. R.E. Morris (Ed.), **Proceedings of the 4th International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, November 1991. Orlando, Florida, USA. Disponível on line em <http://iash.omnibooksonline.com/>

CAPÍTULO IV

**MONITORAMENTO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE UM ADITIVO MULTIFUNCIONAL NA MISTURA
DIESEL/BIODIESEL (B10) EM CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO SIMULADO – ESCALA DE CAMPO**

MONITORAMENTO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM ADITIVO MULTIFUNCIONAL NA MISTURA DIESEL/BIODIESEL (B10) EM CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SIMULADO- ESCALA DE CAMPO

RESUMO

A contaminação microbiana no óleo diesel armazenado tem-se agravado ao longo dos tempos devido às mudanças em sua composição química. A recomendação para evitar problemas com micro-organismos é a eliminação total de água, através de rotinas rígidas de drenagem dos tanques. A utilização de antimicrobianos também tem sido indicada, porém no Brasil ainda não temos produtos liberados e licenciados para uso. O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade de um aditivo multifuncional designado (AMMBO50%) com propriedades antimicrobianas no controle da contaminação microbiana em condição de armazenamento simulado. O experimento foi conduzido em escala piloto em tanques de aço carbono (capacidade de 20 L) com a mistura B10 tratada e não tratada com 0,1% de um aditivo multifuncional contendo um antimicrobiano na formulação e dois diferentes níveis de contaminação microbiana, mantidos em condição de armazenamento simulado durante 90 dias. Foram monitoradas a efetividade do aditivo no controle da contaminação microbiana e as alterações nos parâmetros estabilidade oxidativa, teor de água, densidade e viscosidade. Os resultados mostraram que o produto avaliado (AMMBO50%), foi eficiente no controle do desenvolvimento microbiano na concentração de 0,1%, apresentando uma ação biocida após 7 dias para os tanques com baixa contaminação microbiana e uma ação bioestática para os tanques com alta contaminação. Nos tanques tratados com o aditivo, não foi observada a formação de biofilme na interface óleo/água ou alterações significativas nos parâmetros de qualidade como estabilidade oxidativa, teor de água, viscosidade e densidade.

Palavras chave: biocida, mistura diesel/biodiesel, controle microbiano, aditivo multifuncional, oxazolidina.

4.1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana de combustíveis tem sido relatada desde o início do século e é considerada como um dos principais problemas relacionados à manutenção da qualidade dos combustíveis armazenados. O impacto desta contaminação para o sistema depende principalmente do tipo de combustível estocado e do tempo de estocagem do produto. Atualmente, a crescente preocupação mundial com o meio ambiente e a sustentabilidade levou a busca por combustíveis renováveis e menos agressivos do ponto de vista ambiental. Como parte desta iniciativa, a formulação do óleo diesel, tem sido alterada ao longo do tempo, principalmente pela redução dos teores de enxofre e pela adição de biodiesel. A adição de biodiesel tem sido reportada como uma das mudanças que ocasionaram uma maior susceptibilidade das misturas diesel/biodiesel à degradação química e biológica (Liu & Suflita 1994; Passman, 2013). Como recomendação de Boas Práticas em diferentes países, tem-se reforçado a necessidade de procedimentos de manutenção e rotinas rígidas como a drenagem periódica e limpeza dos tanques de armazenamento. O uso de antimicrobianos pode estar associado a estes procedimentos quando se deseja estabelecer e manter o controle do desenvolvimento microbiano. A utilização destes compostos porém, deve seguir a regulamentação dos órgãos governamentais de cada país. No Brasil, a autorização e registro para uso destes compostos é dada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e a Agência Nacional de Petróleo deve autorizar seu uso em combustíveis. Um antimicrobiano utilizado em combustíveis, registrado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) e recentemente aprovado para uso sob Especificação Militar (MIL SPEC) pelo US military é baseado em oxazolidina (MBO) (Passman, 2013). O ingrediente ativo 3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine) (MBO), apesar de ser classificado como um liberador de formol, tem uma liberação baixa e contínua de formaldeído, garantindo uma preservação efetiva e de longa duração com reduzida toxicidade ao ambiente (Eguchi, 2007; Groot et al., 2010; 2012). O ingrediente ativo MBO apresenta um coeficiente de partição tanto na fase oleosa como aquosa (Siegert, 2009). Um pacote multifuncional com 50% deste

ingrediente ativo 3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine) (MBO – 50%) em sua formulação vem sendo estudado pelo grupo em diferentes avaliações em laboratório, onde foram definidas as dosagens adequadas para seu uso e testada sua eficiência em sistemas bifásicos (Zimmer et al., 2011; 2013). O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade de um aditivo multifuncional (AMMBO50%) no controle da contaminação microbiana da mistura B10 (10% biodiesel e 90% óleo diesel com 50 ppm de enxofre (LSD) em condições de armazenamento simulado durante 90 dias .

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Delineamento experimental Os experimentos foram conduzidos em 8 tanques especialmente construídos em aço carbono, jateados com granalha de ferro com capacidade para 20L (Figura 4.1). A estes tanques foram adicionados 19,6L da mistura B10 e 400mL (2%) de água de drenagem de tanques de armazenamento de diesel S500 (pH 4,5), fornecidas pela Ipiranga Produtos de Petróleo S.A. Um conjunto de quatro tanques recebeu combustível tratado com aditivo na concentração de 0,1%, e os outros quatro tanques receberam combustível não tratado, sendo considerados os controles do experimento. A água de drenagem (400mL) foi adicionada em todos os tanques 24 horas após o tratamento com o aditivo. Quatro tanques receberam a água de drenagem não estéril (tratamento com baixa contaminação), outros quatro tanques receberam a água de drenagem com inóculo na concentração de 10^5 UFC. mL⁻¹ de fungos e 10^7 UFC. mL⁻¹ de bactérias e leveduras (tratamento com alta contaminação). No interior de cada tanque, ao centro foi posicionado um termômetro. Os tanques foram mantidos em uma área coberta, protegidos da incidência direta de luz solar e de chuva. As amostras foram tomadas aos 1, 2, 7,14, 21, 28, 60 e 90 dias.

4.2.2 Análises: A cada tempo amostral foram anotadas as temperaturas interna e externa de cada tanque, a umidade relativa do ar, o pH e o tempo de morte dos microrganismos na fase aquosa foram avaliados em cada tempo amostral. O desenvolvimento microbiano na interface (biomassa) foi quantificado através do peso seco ao final dos 90 dias.

Na fase oleosa avaliaram-se alguns parâmetros químicos no tempo zero (0) dias e após 90 dias do experimento, seguindo protocolos recomendados pela ANP: Teor de água (ASTM D6304); Estabilidade oxidativa (EN 15751), Viscosidade (alterar ASTM D664) e densidade. A degradação do biodiesel foi investigada utilizando-se análise de infravermelho.

As amostragens foram realizadas com auxílio de pipetas de vidro estéreis. Em cada tempo amostral, de cada tanque foram retiradas alíquotas da fase oleosa (100mL) e acondicionados em tubos de polietileno com capacidade para 50 mL. Da fase aquosa, foram retirados 10 mL e acondicionados em tubos de polietileno com capacidade para 15 mL. Todas as amostras foram armazenadas em gelo a 4°C e transportadas para o laboratório para processamento.

4.2.3 Combustível: A mistura B10, composta por 90% de diesel S50, com baixo teor de enxofre e 10% de biodiesel (B100) metílico, 75% soja e 25% de sebo (v/v) conforme recebido (não estéreis), fornecidos pela Ipiranga Produtos de Petróleo foi realizada na área especificada para o experimento nas dependências da Base da Ipiranga em Canoas, RS. Imediatamente após a preparação, a mistura foi acondicionada nos tanques experimentais.

4.2.4 Biocida – Aditivo Multifuncional MBO 50% (AMMBO50%): O produto selecionado para utilização nos experimentos foi um aditivo químico com múltiplas funções para estabilização química de diesel e biodiesel. Este aditivo apresenta em sua formulação 50% do ingrediente ativo 3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine) (MBO), um antimicrobiano de amplo espectro, indicado para controle químico da contaminação microbiana em combustíveis. Todas as concentrações testadas do produto foram preparadas na fase oleosa. A escolha do produto utilizado neste estudo, bem como sua concentração foi feita com base em experimentos anteriores realizados em laboratório por este grupo (Zimmer et al., 2011; 2013), mas principalmente pelo fato do mesmo representar uma estratégia de tratamento global para o combustível o que lhe confere uma importante vantagem prática, pois favorece o pré-tratamento do combustível, eliminando a manipulação do produto nos pontos de venda.



A

B

C

Figura 4.1 Delineamento experimental. A, Tanques experimentais; B, Posicionamento do termômetro no interior dos tanques; C, Representação esquemática da montagem dos tanques experimentais.

4.2.5 Inóculo microbiano: Um inóculo não caracterizado foi preparado conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10 (ASTM, 2010). Resumidamente, um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo Bushnell-Haas (Bushnell & Hass, 1941) suplementado com 2% da mistura diesel e biodiesel - B10 (previamente esterilizada por filtração) foi inoculado com 5 mL de uma mistura de borra microbiana obtida a partir de diferentes combustíveis (diesel e misturas B5) e incubados a 28 ° C, 100 rpm durante 7 dias. O inóculo preparado foi ajustado para uma turbidez padrão McFarland 0,5 (600 nm) utilizando meio mineral Bushnell Hass, a fim de se obter, aproximadamente, 10^6 UFC. mL⁻¹ de fungos e 10^8 UFC. mL⁻¹ de bactérias e leveduras. Em seguida, uma diluição de 1:10 foi realizada com água de drenagem para obter uma concentração final nos microcosmos de 10^5 UFC. mL⁻¹ de fungos e 10^7 UFC. mL⁻¹ de bactérias e leveduras (Zimmer et al., 2013).

4.2.6 Níveis de contaminação: A efetividade do aditivo como antimicrobiano foi investigada em dois níveis de contaminação: baixa, combustível

conforme recebido (estimada em 10^3 UFC.L⁻¹ conforme Norma IP 385); e alta, com adição de inóculo microbiano na concentração de 10^5 UFC. mL⁻¹ de fungos e 10^7 UFC. mL⁻¹ de bactérias e leveduras (Siegert, 2009; Hill & Hill, 2009).

4.2.7 Temperatura interna dos tanques: A verificação da temperatura interna dos tanques foi realizada com termômetros que foram mantidos imersos na fase óleo no centro de cada tanque. Para a temperatura externa e umidade relativa do ar foi utilizado um termo-higrômetro.

4.2.8. Estimativa direta dos microrganismos: Foram realizadas diluições seriadas, em solução salina (0,85%), e inoculadas em triplicata em placas de petri contendo Agar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram então, incubadas a 30°C, por até 15 dias. Após este tempo, fez-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), calculou-se a média das três réplicas e o valor final foi expresso em logaritmo das UFC.

4.2.9. Biomassa: A biomassa formada na interface óleo-água de cada um dos tanques foi removida pela drenagem juntamente com o combustível ao final dos 90 dias. Após a separação da fase óleo, a biomassa foi filtrada e colocada em filtros de papel previamente secos em estufa e pesados. Após a filtração, foi adicionado 50 mL de hexano á biomassa, para a remoção do excesso de óleo. Após este procedimento, os filtros foram colocados em estufa a 30°C, durante 7 dias, para secagem completa e transferidos para um dessecador, de onde foram retirados após 48h para pesagem (Zimmer et al., 2013). O cálculo para obtenção do crescimento através do acompanhamento do peso seco em função do tempo de imersão nos sistemas fase aquosa/óleo diesel foi:

$$\text{Variação de biomassa (mg)} = \text{Peso final-peso inicial}$$

4.2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados empregando-se o teste de Tukey (comparação de médias) com um nível de confiança de 95%, utilizando-se o programa Statistica 7.1

4.3 Resultados

4.3.1 Estimativa do Desenvolvimento microbiano – UFC

O desenvolvimento microbiano na fase aquosa foi acompanhado pela contagem em placa de células viáveis (Unidades formadoras de colônia - UFC). Os resultados obtidos podem ser observados nas figuras 4.2 e 4.3.

Na condição de alta contaminação (10^7 UFC.L⁻¹) (figura 4.2), não foram constatadas diferenças no desenvolvimento microbiano entre os tanques tratados com AMMBO50% e os não tratados. Já na condição de baixa contaminação (10^3 UFC.L⁻¹) (Figura 4.3), a adição de 0,1% de AMMBO50%, promoveu uma redução da população microbiana que chegou a níveis não detectáveis ($<10^2$ UFC.L⁻¹) após 7 dias.

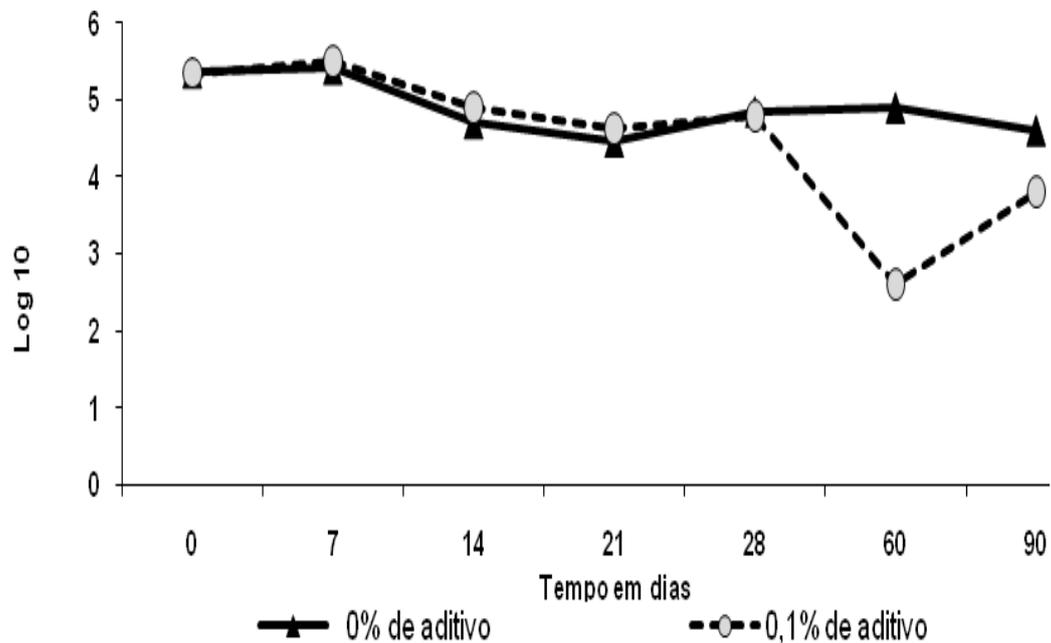


Figura 4.2 Monitoramento do crescimento microbiano na fase aquosa de mistura B10 em condição de armazenamento simulado, com e sem aditivo na condição de alta contaminação (10^7 UFC.L⁻¹). Cada ponto no gráfico representa a média de duas réplicas.

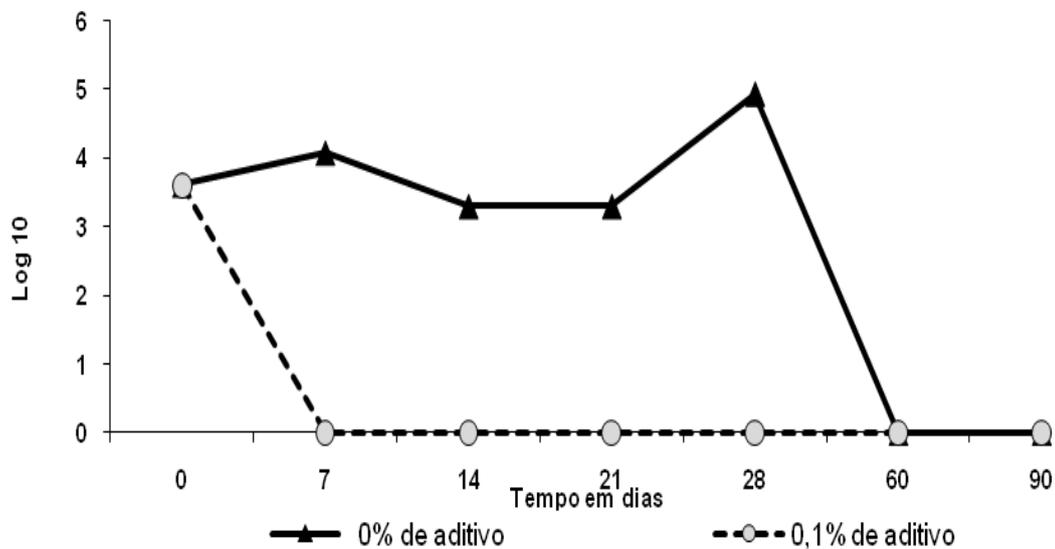


Figura 4.3 Monitoramento do crescimento microbiano na fase aquosa de mistura B10 em condição de armazenamento simulado, com e sem aditivo na condição de baixa contaminação (10^3 UFC.L⁻¹). Cada ponto no gráfico representa a média de duas réplicas.

4.3.2 Formação de biomassa

A estimativa do desenvolvimento microbiano através da biomassa formada na interface óleo/água ao final do experimento mostrou que os valores de peso seco da biomassa formada nos tanques tratados com o AMMBO50% foram em média 35% menores do que os observados nos tanques com combustível não tratado (Figura 4.4.).

Nos tanques com baixa contaminação (10^3 UFC.L⁻¹), os valores do peso seco foram em média, 33% menores nos tanques tratados com 0,1% do AMMBO50% em comparação com os tanques não tratados. Nos tanques com alta contaminação (10^7 UFC.mL⁻¹) a redução média da biomassa foi de 37% nos tanques que receberam combustível tratado com o aditivo AMMBO50%. Através do teste de Tukey foi constatada uma diferença significativa ($p > 0,05$) entre a média do peso seco da biomassa formada nos tanques que receberam combustível tratado com 0,1% AMMBO, comparados àqueles que receberam combustível não tratado, indicando que a adição do AMMBO50%, apresentou um efeito positivo na redução da biomassa formada independente do grau de contaminação.

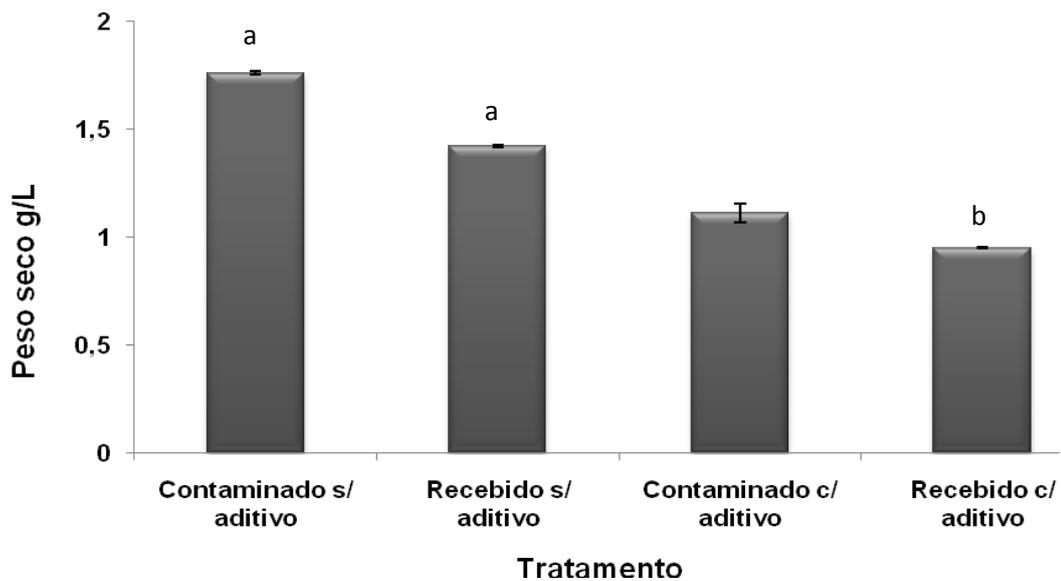


Figura 4.4. Valores de peso seco médio da biomassa (g/L) formada nos tanques com a mistura B10 após 90 dias de armazenamento simulado.

Os resultados obtidos com a contagem direta em placa e a estimativa do peso seco da biomassa para a condição de baixa contaminação corroboram com estudos anteriores realizados em laboratório (Zimmer et al., 2011; 2013). O AMMBO 50% adicionado ao combustível na concentração de 0,1% pode controlar o desenvolvimento microbiano em misturas B10 quando o sistema está com baixos níveis de contaminação.

Porém, para a condição de alta contaminação, os resultados obtidos pelas duas técnicas são antagônicos. Os resultados obtidos pela contagem padrão em placa sugerem que a adição de 0,1% AMMBO50% não apresentou qualquer efeito sobre a população microbiana (Figura 4.2, contagens de células viáveis). Enquanto os resultados obtidos pela avaliação do peso seco da biomassa após 90 dias, indicam que houve uma redução de 33% na biomassa formada na interface dos tanques tratados com AMMBO50% em comparação aos tanques que não tratados. Isto sugere que o AMMBO50% apresentou um efeito bioestático na condição de alta contaminação, uma vez que nos tanques tratados com o aditivo o desenvolvimento da biomassa não foi observado.

A fim de explicar melhor este resultado, foi realizada uma análise visual da biomassa formada ao final dos 90 dias do ensaio. Esta análise revelou diferenças marcantes na distribuição das células microbianas nos tanques tratados e não

tratados com o aditivo. A biomassa formada na interface óleo/água nos tanques que não receberam o aditivo se aderiu fortemente ao fundo, formando um filme denso (biofilme), contínuo com coloração escura no centro e esbranquiçada nas bordas (Figura 4.5 A e B), enquanto que a biomassa formada nos tanques que receberam o tratamento com o aditivo era líquida, pouco densa, sem pontos de aderência e de cor amarelada (Figura 4.5 C e D).

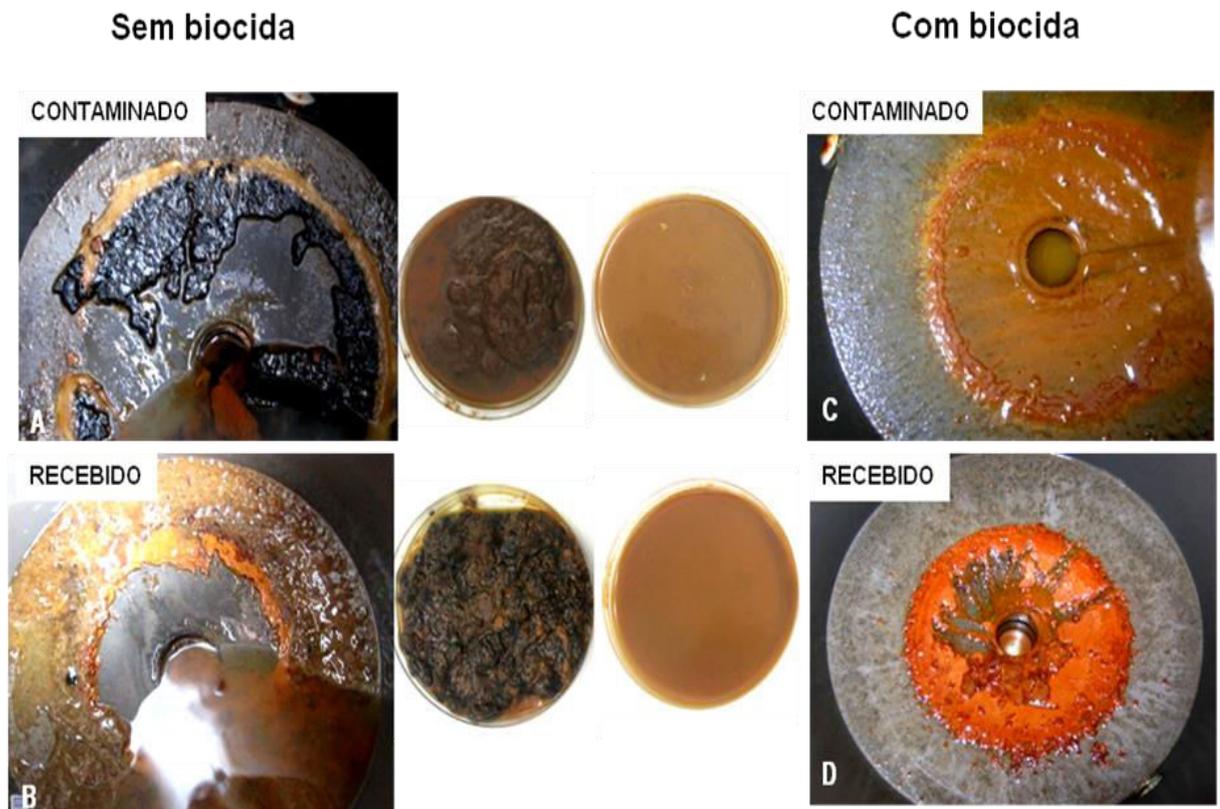


Figura 4.5: Aspecto da biomassa formada e aderida no fundo dos tanques após 90 dias (A: B10 contaminado sem aditivo; B: B10 recebido sem aditivo; C: B10 contaminado com aditivo; D: B10 recebido com aditivo)

Microrganismos crescendo em um biofilme se desenvolvem dentro de uma matriz polissacarídica e o aumento no número de células somente pode ser percebido como um aumento na espessura do biofilme, sendo difícil estimar o desenvolvimento real através da técnica de contagem padrão em placa com o tipo de amostragem realizada (fase aquosa). Nos tanques onde não foi detectada a formação de um biofilme (tanques com combustível tratado com 0,1% de AMMBO50%) as células estão distribuídas de forma planctônica, permitindo, uma

estimativa mais realista do desenvolvimento microbiano pelo método utilizado (contagem em placa). Desta forma, apesar dos resultados da contagem direta em placa do crescimento microbiano apresentar-se muito semelhante em ambos os tratamentos, é provável que o número total de microrganismos nos tanques não tratados (CONTROLE) seja muito superior àquele do sistema tratado, uma vez que as células crescendo no biofilme não são facilmente detectadas pela técnica utilizada. O emprego da técnica do peso seco permitiu que esta diferença fosse revelada e estimada. Assim, apesar de não ter sido constatado uma ação biocida (que causa a morte dos microrganismos), a biomassa formada ao final de 90 dias indicou que houve uma ação biostática (inibição do desenvolvimento) na população microbiana presente na condição de alta contaminação nos tanques tratados com AMMBO50% quando comparados com os não tratados.

Os estudos para avaliação de antimicrobianos para utilização em combustíveis são geralmente realizados em laboratório, utilizando meios minerais mínimos, para simular a fase aquosa e o combustível como fase oleosa. Poucos estudos foram realizados em escala maior (Passman, 2009) e menos ainda utilizam períodos de estocagem superior a 30 dias (Andrykovitch et al., 1987; Zimmer et al., 2013). A avaliação dos antimicrobianos em testes de laboratório é muito importante, pois permite uma avaliação preliminar da efetividade dos produtos, no entanto não são suficientes para garantir sua eficiência nas condições de uso (Schwingel & Eachus, 2009).

A efetividade de um antimicrobiano em sistemas óleo/água esta condicionada a vários fatores tais como: espectro de ação; concentração de indicada para uso; coeficiente de partição do produto; nível de contaminação microbiana, composição química do meio e composição e distribuição da população microbiana (Passman, 2013; Raikos, 2011; Zimmer et al, 2013). A maioria dos testes avalia somente a efetividade dos antimicrobianos sobre populações planctônicas (Geva, 1992; 2009; Siegert, 2009; Kenne & Browne, 2011; Browne, 2011; Passman, 2009) e utiliza técnicas para quantificar a população que não levam em conta a presença do biofilme, tais como a contagem direta em placa e estimativas indiretas por bioluminescência do ATP (Passman, 2009; Geva, 2009, Dodos et al., 2011 Dodos & Zannikos 2013). Desta forma, os

efeitos bioestáticos e a efetividade do antimicrobiano sobre os biofilmes são quase sempre desconsiderados. A penetração de qualquer antimicrobiano em biofilme é limitada e em nosso experimento foi observado que na condição de combustível não tratado, a biomassa se apresentou distinta visualmente da tratada, provavelmente devido às diferenças na composição microbiana. Porém, a inspeção visual sugere que o produto antimicrobiano avaliado inviabilizou ou, ao menos, reduziu muito a formação do biofilme. Este fato pode ser avaliado como um importante benefício decorrente da utilização do produto testado.

Neste estudo, foi possível avaliar o efeito do antimicrobiano sobre a população microbiana nativa (condição de recebido) e na adicionada (alta contaminação), pois os resultados obtidos com a recuperação da biomassa produzida na interface óleo/água e as observações visuais, indicaram que os tanques tratados com 0,1% do produto AMMBO 50%, controlaram o desenvolvimento microbiano.

4.3.3 Análise dos parâmetros químicos

Algumas variáveis ambientais tais como pH, temperatura e umidade contribuem para que os processos de degradação dos combustíveis estocados ocorram. Por isto e também por causa das características do produto avaliado, alguns parâmetros químicos e físicos foram acompanhados durante este estudo.

4.3.3.1 Temperatura, pH e umidade: O pH da água de drenagem foi verificado em cada tempo amostral, durante os 90 dias permanecendo na faixa de 4. A temperatura ambiente variou entre 11°C e 26°C e a interna (no interior dos tanques) entre 9°C e 20°C, acompanhando as variações da temperatura ambiente. No mesmo período a umidade relativa do ar variou entre 54% e 100%. Em nenhum dos tempos amostrais foi observada condensação de água nas paredes ou nas tampas dos tanques. Também não foi observada turbidez no combustível.

4.3.3.2 Estabilidade química: A estabilidade química do combustível armazenado foi avaliada no tempo 0 e após 90 dias (entre junho- setembro de 2011) através do monitoramento das alterações nas suas propriedades físico-

químicas. Dentre as avaliações de estabilidade oxidativa, o teor de água, a massa específica (densidade) e a viscosidade foram observadas maiores diferenças entre o combustível tratado e o combustível não tratado com 0,1% de AMMBO50%, apenas com a estabilidade oxidativa e teor de água (Figura 4.6). Nos tanques contendo combustível tratado com 0,1% de AMMBO50% (Figura 4.6, Tanques 5-8) tanto a estabilidade oxidativa quanto o teor de água não sofreram alterações mesmo depois de armazenados por 90 dias (Figura 4.6).

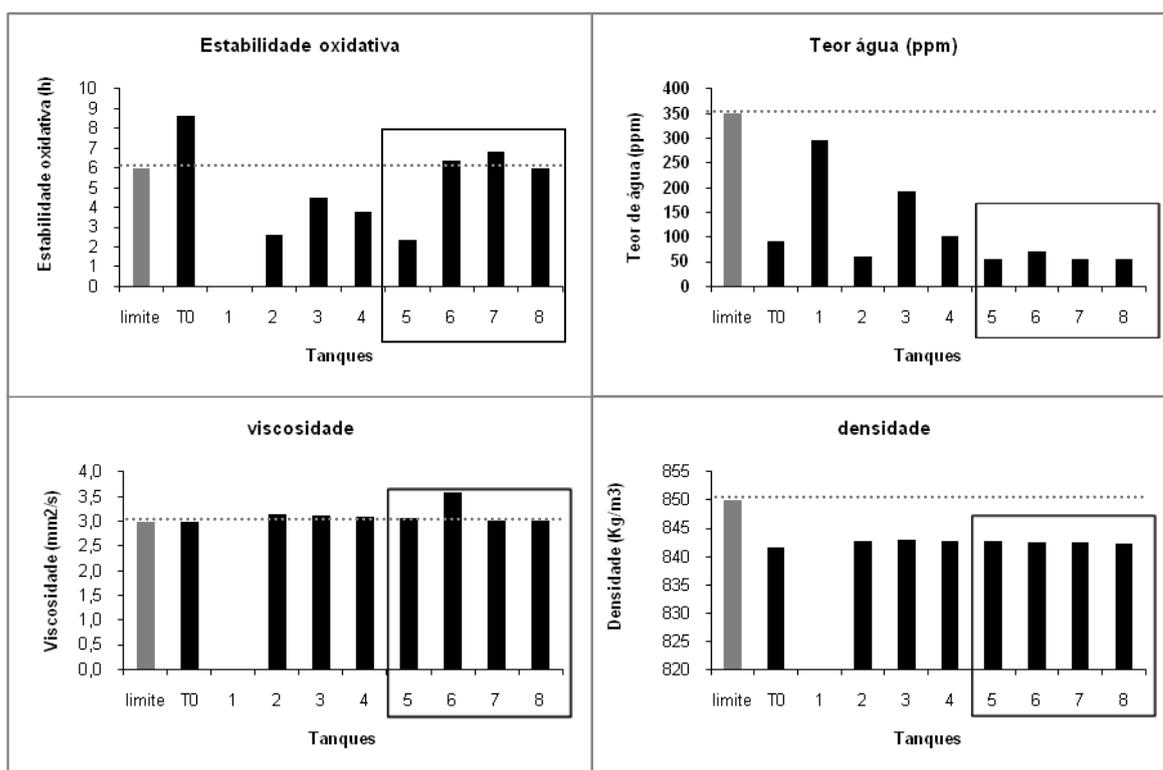


Figura 4.6 Parâmetros químicos monitorados no tempo (T0) e após 90 dias. Tanques 1 a 4 sem aditivo (1 e 2 contaminados); tanques 5 a 8 com aditivo (5 e 6 contaminado). O quadro destaca os tanques que receberam combustível tratado com aditivo. A linha pontilhada (...) informa o limite máximo do parâmetro analisado de acordo com a ANP.

Porém, nos tanques com combustível não tratado com 0,1% de AMMBO50%, após 90 dias de armazenamento em uma temperatura máxima de 20°C, observou-se um aumento no de até 3x no teor de água da mistura B10 (Figura 4.6). Este aumento pode ser explicado em parte pelo próprio desenvolvimento microbiano ocorrido no interior dos tanques não tratados, pois

microrganismos liberam água como resultado de seu metabolismo (Hill & Thomas, 1975), mesmo assim, variações maiores como as observadas nos tanques 1 e 3 por exemplo, sugerem que o combustível absorveu alguma água, sem no entanto, sair das suas especificações de qualidade.

A água no combustível pode estar presente de três formas, livre, dissolvida ou emulsionada. A forma como a água se apresenta durante o período de armazenamento do combustível depende principalmente da temperatura. Temperaturas mais baixas promovem o aparecimento de uma fase de água livre que se deposita no fundo dos tanques, favorecendo o desenvolvimento microbiano na interface óleo/água. Já uma temperatura mais alta faz com que o combustível incorpore água e fique turvo (água dissolvida) (Affens et al., 1981; Passman, 2013).

O biodiesel é bastante higroscópico e por isto as misturas BX (diesel/biodiesel) têm tendência a conter mais água que o óleo diesel. A capacidade das misturas diesel/biodiesel em absorver água, no entanto é dependente do teor de biodiesel na mistura (Fregolente et al., 2012). Fregolente et al. (2012) em um estudo com misturas de biodiesel de soja e diesel S50 (LSD), observaram que misturas com teor de biodiesel menor que 20% em temperaturas de 20°C e com umidade relativa do ar de 80% absorvem até 90% menos água que as misturas com maior percentual de biodiesel. Stromberg et al., 2013 avaliaram o teor de água em misturas com 7% de biodiesel de canola e diesel com ultra baixo teor de enxofre (10ppm) armazenados durante 14 dias e também não perceberam variações no teor de água destas misturas, enquanto que para o biodiesel puro foi observado um incremento constante no teor de água.

Um experimento realizado por Zimmer et al. (2012), onde foram avaliadas diferentes parâmetros de qualidade para misturas diesel/biodiesel B5 e B20 com e sem adição de antioxidante armazenadas durante 120 dias, também não foram observados aumentos nos teores de água.

Nenhum estudo ainda relacionou a presença de contaminação microbiana com elevação nos teores de água mesmo assim, os resultados obtidos aqui nos levam a considerar que em temperaturas amenas (até 20°C), com misturas de até 20% de biodiesel no diesel e boas condições de

armazenamento, grandes aumentos nos teores de água podem indicar a presença de contaminação microbiana. Ainda assim, cabe ressaltar que todos os experimentos citados acima foram realizados com pequenos volumes de combustível (entre 200mL e 1L) por este motivo, possíveis alterações nos teores de água podem ter sido mascaradas pela dificuldade de se trabalhar com valores muito baixos. Nosso estudo foi realizado com um volume maior (20L), o que pode ter permitido avaliar as alterações no teor de água de forma mais clara. Outra explicação possível para o fato seria que outro componente químico presente na fórmula do aditivo utilizado, como dispersantes, por exemplo, tenha prevenido a absorção de água pelo combustível.

O parâmetro Estabilidade Oxidativa informa sobre a capacidade do combustível de resistir às mudanças físicas e químicas provocadas pelas interações do combustível com o ambiente (Atabani et al., 2010; Berrios et al., 2012). As reações químicas que ocorrem no combustível, decorrentes da redução de sua estabilidade oxidativa também induzem a alterações negativas em outros parâmetros como a viscosidade e o índice de acidez da mistura, acentuando a deterioração do combustível (Cavalcanti, 2009). Em geral, a aplicação de aditivos pode estender a estabilidade oxidativa das misturas por um período entre 8 a 10 semanas, mas isto pode variar em função do teor de biodiesel presente na mistura (Karavakalis et al., 2011 Mariasiu, 2012). Misturas com percentuais de biodiesel inferiores a 20%, em geral sofrem menos alterações (Mazumdar et al., 2013). Na especificação Brasileira (Regulamento Técnico ANP N°04/2012, anexo 1) apenas o biodiesel puro tem um valor especificado, com um período de indução de 6h, para as misturas não há especificação, porém duas normas são sugeridas a EN 14112 e EN 15751, a primeira pode ser apenas aplicada para avaliar a estabilidade do biodiesel puro, a outra (EN 15751) é a norma utilizada para medir a estabilidade tanto de biodiesel puro quanto de misturas, mas a sua efetividade para o biodiesel puro ainda está sendo verificada (EN15751; Pimenta Jr, 2013). Esta norma especifica um período de indução de 20 h para B7. A especificação europeia (EN 14214 2012) sugere um período de indução de 8h e a especificação Americana (ASTM D6751) 3h para o biodiesel puro.

Neste estudo, observou-se que os tanques que receberam o combustível não tratado com 0,1% de AMMBO50% (tanques 1-4), sofreram significativa redução (de 9h no tempo zero para valores entre 3h a 5h após 90 dias) no parâmetro estabilidade oxidativa, após 90 dias de armazenamento simulado, enquanto os tanques com combustível que recebeu tratamento com aditivo permaneceram dentro das especificações.

Berrios et al. (2012), estudou uma mistura comercial com 5% de biodiesel em condições de armazenamento por 180 dias e não verificou alterações significativas em suas propriedades. Também McKormick & Westbrook (2010) não observaram variações na estabilidade oxidativa de misturas com 5% e 20% de biodiesel armazenadas por 12 semanas. Os autores concluíram que a estabilidade das misturas está relacionada a estabilidade do biodiesel puro que compõe a mistura. Quando o biodiesel puro apresenta um período de indução superior a 3h a estabilidade oxidativa da mistura com 5% de biodiesel pode se manter inalterada por até 1 ano e para misturas com 20% de biodiesel este período pode ser de até 4 meses (McKormick & Westbrook (2010)). No estudo conduzido por Zimmer et al., (2010) com diesel e biodiesel puro e as misturas B5 e B20 com e sem antioxidante, armazenadas por 120 dias, a estabilidade oxidativa do biodiesel puro saiu das especificações após 30 dias, porém as misturas, mesmo aquelas produzidas com biodiesel sem antioxidante, apresentaram períodos de indução médios de 8h após 120 dias.

Nenhum dos estudos citados acima, porém relacionou a participação da contaminação microbiana ou do teor de água na alteração da estabilidade oxidativa. No estudo realizado por Zimmer et al. (2010), por exemplo, a presença de água livre não foi detectada e a contaminação microbiana foi detectada na faixa de 10^3 CFU.mL⁻¹, considerada normal para amostras ambientais. Apenas Schleicher et al. (2009), que avaliaram a estabilidade oxidativa em B100, B20 e B5 armazenados, contaminados mas sem adição de água relacionaram a redução da estabilidade oxidativa à presença de contaminação microbiana. Os autores perceberam que apesar da baixa contaminação observada (máx $1,7 \cdot 10^3$ CFU.mL⁻¹), amostras contaminadas sofreram redução mais acentuada em sua estabilidade oxidativa em comparação com aquelas não contaminadas.

Microrganismos crescendo em combustível podem acelerar e intensificar os processos de degradação química tanto pela liberação de ácidos orgânicos e outros compostos resultantes de seu metabolismo no meio, quanto pela degradação dos aditivos que preservam a qualidade do mesmo (Gaylarde et al 1999; Rodriguez et al., 2009; Dodos et al 2011, Passman, 2013). Já a presença de água é considerada um dos fatores mais negativos para a manutenção da estabilidade oxidativa (Ambrozin et al., 2009).

A redução mais acentuada da estabilidade oxidativa observada neste estudo para o combustível não tratado com o aditivo pode ser explicada principalmente pela soma de três fatores, pela presença da contaminação microbiana, pela maior quantidade de água dissolvida no combustível e em menor proporção, por uma menor quantidade de aditivo na mistura (o produto é uma combinação de aditivos +biocida, o que aumenta a quantidade de aditivos nos tanques tratados).

Uma análise visual do fundo dos tanques drenados nos permite observar as características dos produtos formados durante o armazenamento e também os danos sofridos pela estrutura dos tanques de armazenamento após o término do experimento. Nos tanques que receberam o combustível não tratado além do biofilme aderido foi observado um lodo de aparência mucilaginoso (Figura 4.7B).

Os danos causados à estrutura dos tanques foram visualmente menores nos tanques que continham o combustível tratado com 0,1% de AMMBO50% comparado aos que receberam combustível não tratado. Isto provavelmente está relacionado à liberação de metabólitos ácidos pelo metabolismo microbiano e também à presença do biofilme aderido à superfície do tanque que favorece a ocorrência de corrosão (CIM).



Figura 4.7 Aspecto da superfície dos tanques e a presença de borra (biológica/química). **A:** Tanque no tempo zero antes da adição do combustível; **B:** Borra mucilaginosa formada ao final de 90 dias nos tanques não tratados; **C e D:** tanque que recebeu combustível não tratado com AMMBO50% após 90 dias com alta contaminação microbiana a seta indica área onde houve a instalação de biofilme; **E:** Aspecto da superfície do tanque após 90 dias após a adição do combustível não tratado; **F:** Aspecto da superfície do tanque após 90 dias após a adição do combustível tratado.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ingrediente ativo MBO é conhecido por ser um antimicrobiano de amplo espectro bastante eficaz no controle de microrganismos anaeróbios (como as BRS, maiores responsáveis pela corrosão influenciada por microrganismos) e também por sua capacidade de neutralizar os ácidos formados pelo metabolismo microbiano e a pela formação de produtos de degradação (Siegert, 2009; Shennan, 1983). Este antimicrobiano foi efetivo na concentração de 0,02% contra bactérias e fungos crescendo isoladamente em óleo diesel (Siegert, 2009). Porém, Zimmer et al. (2013), observaram que este antimicrobiano na composição do AMMBO50%, utilizado nas concentrações de 0,04% e 0,1% apresentou apenas ação biostática sobre a contaminação microbiana em mistura B10. É importante ressaltar que a concentração do antimicrobiano neste produto é de 50%, correspondendo de em um cálculo grosseiro a uma concentração de 0,02% e 0,05% do ativo antimicrobiano no sistema, respectivamente. Além disto, o mesmo estudo mostrou que o AMMBO50% é menos efetivo no controle da contaminação em misturas diesel/biodiesel do que em diesel ou biodiesel puros (Zimmer et al., 2013).

O uso de antimicrobianos associados a outros químicos para a proteção de combustível foi estudado por Geva (1992), que sugeriu que nestes casos a efetividade do antimicrobiano pode ser afetada pela interação com outros componentes do produto e/ou alterações no coeficiente de partição do antimicrobiano, que resultariam em uma menor disponibilidade do ingrediente ativo na fase aquosa (Raikos et al., 2012). A presença de lodo de origem química ou biológica é outro fato que pode contribuir para a redução da efetividade dos antimicrobianos (Andrykovitch et al., 1987; Wick et al., 2011; Kiuru, 2011; Zimmer et al., 2013). O produto avaliado neste estudo, apresenta outros compostos químicos com a função de garantir um tratamento mais amplo do combustível tais como inibidores de corrosão, antioxidantes, dispersantes, detergentes, etc... Estas características, provavelmente podem ter contribuído para que o combustível tratado com 0,1% de AMMBO50% sofresse menos alterações ao longo dos 90 dias de avaliação, comparado ao combustível não tratado. Nos tanques com

combustível tratado, por exemplo, não foi observada uma biomassa tão espessa quanto à formada na interface óleo/água dos tanques não tratados. A formação de películas biológicas é um problema grave que está associado aos problemas de corrosão e entupimento de tubulações e sistemas injetores sendo considerado o maior problema em sistemas de armazenamento de combustíveis com alta taxa de rotatividade do produto (Passman, 2013). Dispersantes e demulsificantes fazem parte da formulação do produto (conforme informação sobre a composição na bula do produto) e podem ter sido responsáveis, principalmente nos tanques contendo alta contaminação pela eliminação do biofilme. Outro fator que precisa ser levado em conta é que a presença do antimicrobiano na formulação do aditivo deve ter alterado a composição da população microbiana, eliminando diversas espécies, incluindo aquelas envolvidas na formação do biofilme ou, ao menos, impedindo o seu desenvolvimento.

O pacote multifuncional avaliado nas condições estabelecidas neste estudo atuou de forma **preventiva no controle microbiano**, devendo sua dosagem ser ajustada de acordo com as características de cada sistema. No caso de sistemas com contaminação já instalada recomenda-se uma prévia descontaminação e limpeza dos tanques para que após se implementem as medidas preventivas.

4.5 CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, o aditivo multifuncional adicionado na concentração de 0,1%, apresentou uma ação biocida após 7 dias para os tanques com baixa contaminação microbiana e uma ação bioestática para os tanques que receberam inóculo microbiano (alta contaminação). Foi observado que nos tanques tratados com o produto a formação de biomassa foi significativamente inibida e as características que garantem sua estabilidade química permaneceram dentro dos limites da especificação exigida pela ANP ainda após 90 dias.

O produto avaliado foi eficiente no controle do desenvolvimento microbiano e em manter propriedades relacionadas com a estabilidade química da mistura B10 durante o armazenamento simulado de 90 dias.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFENS, W. A.; HAZLETT, R. N.; DEGUZMAN, J. D. The solubility of water in current JP5 jet turbine fuels. **NRL Memorandum Report 4609**, Naval Research Lab Washington, 1981 Disponível em: <http://handle.dtic.mil/100.2/ADA103266>. Acesso em 12 jun. 2012.
- AMBROZIN, A.R. ; KURI,S. E. & MONTEIRO, M. R. Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. **Química Nova**, 32: 1910-1916, 2009.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM D445 Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity). **ASTM International**, 2012, West Conshohocken, PA. www.astm.org. doi: 10.1520/D0445-12
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM D6304-07 Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration. **ASTM International**, 2007, West Conshohocken, PA. www.astm.org. doi: 10.1520/D6304-07
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS - ASTM D6751-12 Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. **ASTM International**, 2012, West Conshohocken, PA. www.astm.org. doi: 10.1520/D6751-12
- 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, www.astm.org.doi:10.1520/E1259-10
- ANDRYKOVITCH, G. & NIEHOF, R. A. Fuel soluble biocides for control of *Cladosporium resinae* in hydrocarbons fuel. **Journal of Industrial Microbiology**, 2: 35-40, 1987.
- ATABANIA, A. E.; SILITONGA, A. S.; IRFAN ANJUM BADRUDDINA, I. A.; MAHLIAA, T. M. I.; MASJUKIA, H. H. & MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16: 2070– 2093, 2012.
- BERRIOS, M.; MARTÍN, M.A.; CHICA, A.F. & MARTÍN, A. Storage effect in the quality of different methyl esters and blends with diesel. **Fuel**, 91:119-125. 2012.
- BROWNE, A.B. Sustainable and effective preservation strategies for Ultra Low sulphur diesel biodiesel and unleaded gasoline. In **IASH, 2011**, The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Sarasota, Florida, USA, October 16-20, 2011.
- BUSHNELL, C.D. & HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, 41, 654-674, 1941.
- CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do Biodiesel e misturas – Abrangência, limitações dos métodos de avaliação e alternativas futuras. **Biodieselbr**, Curitiba, 71-73, 2009.
- DODOS, G.S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S & ZANNKOS, F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuel. **Proceedings of the 12th**
-

international Conference on environmental Science and Technology, Rhodes, Greece, 8-10 September, 2011.

DODOS, G. & ZANNIKOS, F. "Microbiological Growth Study of Biodiesel Fuel," **SAE International Journal of Fuels and Lubricants**, 6(2):419-429, 2013, doi: 10.4271/2013-01-1148.

EGUCHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, 22, 35-39, 2007. Disponível em: http://www.sbccc.com.br/sumario_22.htm. Acesso em Novembro 2011.

European Committee for Standardization - EN 14214:2012 Automotive Fuels - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines. **Requirements and Test Methods**, **European Committee for Standards** (CEN) Europe, 2012.

European Committee for Standardization – EN 14112 (2003) Fat and oil derivatives—fatty acid methyl esters (FAME)—determination of oxidation stability (accelerated oxidation test). **European Committee for Standardization** Press, Brussels, Method EN14112:2003.

European Committee for Standardization -EN 15751: Automotive fuels. Fatty acid methyl ester (FAME) fuel and blends with diesel fuel. Determination of oxidation stability by accelerated oxidation method. **European Committee for Standardization** (British Standard). 2009.

FREGOLENTE, P.B.L.; FREGOLENTE, L.V.; WOLF MACIEL; M.R. Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. **Journal of Chemical & Engineering** 57 (6): 1817-1821, 2013.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F. & KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, Rio de Janeiro, 30:01-10.1999.

GEVA, J. GEISSMANN, E. ITTAH, E.; NAKDIMON, I.; SAPIR, Y. & FASS, R. ATP analyses as a tool to determine the need to clean the fuel tanks of diesel motivated vehicles before refouling with biocides and stability improving additives. In: **IASH 2007- 10th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Tucson, Arizona, October, 7-11, 2007. (2009)

GEVA, J., PROPES, J., PAPIER, J., BUSANNI, M., ZEHAVI, E. & FASS, R., 1992. Effects of stabilizing additives on the susceptibility of diesel fuels to microbial attack. In: Giles, H. N. (Ed.) **Proceedings of the 4th International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Orlando, Florida, November 1992.

GROOT, A. C. M.D. FLYVHOLM, M. A. M. Formaldehyde and Formaldehyde-Releasers **Kanerva's Occupational Dermatology**, pp 397-413. 2012

GROOT, A., GEIER, J., FLYVHOLM, M.A., LENSEN, G. & COENRAADS, P.J. Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Metalworking fluids and remainder. Part 1. **Contact Dermatitis**, 63:117-128. 2010 DOI: 10.1111/j.1600-0536.2010.01714.x

-
- HILL, E.C. & HILL, G.C., Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels., In IASH, 2009, **The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, October, 2009.
- HILL, E. C. & THOMAS, A. R., Microbiological aspects of supersonic aircraft fuel. In: **Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium**. pp. 157–174. 1975
- KARAVALAKIS, G.;HILARI,D.; GIVALOU,L.; KARONIS, D. & STOURNAS,S. Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants. **Energy**, 36, 369-374, 2011.
- KEENE, P. & BROWNE, B.A. Effective preservation strategies for ultra low sulfur diesel, biodiesel and unleaded gasoline W.J. Bartz (Ed.), **Eighth International Fuels Colloquium**, Technische Akademie Esslingen, Ostfildern, Germany. 2011. on CD.
- KIURU, J.; TSITKO, I.; SIEVANEN, J. & WATHEN, R. Optimization of biocide strategies on fine paper machines. **BioResources**, 5(2):514–524, 2010.
- KIURU, J. Interactions of chemical variations and biocide performance at paper machines. Tese (**Doutorado**) Aalto University School of Chemical Technology, School of Chemical Technology, (Espoo, Finland) 2012, 124p.
- LIU, S., & SUFLITA, J. M., **Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*: Journal of Industrial Microbiology**, 13: 321-327, 1994.
- MARIASIU, F. The influence of ultrasonic irradiation process on Biodiesel blends oxidation stability. **Research Journal of Agricultural Science**, 44 (1): 275-280, 2012.
- MAZUMDAR, P.; BORUGADDA, V.B.; GOUD, V.V. & SAHOO, L. Effect of storage parameters on stability of Jatropha-derived biodiesel. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 4:13, 2013. doi:10.1186/2251-6832-4-13
- MCCORMICK, R.L & WESTBROOK S. R. Storage Stability of Biodiesel and Biodiesel Blends. **Energy Fuels**, 24:690–698, 2010. doi:10.1021/ef900878u
- PASSMAN, F.J., Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 81, 88-104, 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002>
- PIMENTA JR, V. A. Biodiesel: uso, limitações e implicações técnicas devido à degradabilidade oxidativa. Dissertação (**mestrado**), Escola de Economia de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas – EESP – FGV, 2013, 158p.
- RAIKOS, V.; VAMVAKAS, S. S.; SEVASTOS, D., KAPOLOS, J. ; KARAIKAKIS, G.;KOLIADIMA, A. Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, 93: 559 –566, 2012. doi:10.1016/j.fuel.2011.10.028 disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236111006466>.
-

-
- RAIKOS, V.; VAMVAKAS, S. S.; KAPOLOS, J. ; KOLIADIMA, A. & KARAIKAKIS, G.; Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**, 90: 695-700, 2011. doi:10.1016/j.fuel.2010.09.030.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E. & BLANCO, R. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica **Revista de Biología Tropical**, 57 (3): 489-504, 2009.
- SCHLEICHER, T., WERKMEISTER, R., RUSS, W. & MEYER PITTROFF, R. Microbiological stability of biodiesel - diesel mixtures. **Bioresource Technology**, 100 (2), 724-730, 2009.
- SCHWINGEL, W. R., EACHUS, A.C. Antimicrobial additives for metalworking lubricants. In: Rudnick LR (ed) **Lubricant additives: chemistry and applications**, 2nd ed. CRC, Boca Raton, 383–397, 2009.
- SHENNAN, J.L. Selection and evaluation of biocides for aqueous metal-working fluids. **Tribology International**, 16 (6): 317-330, 1983.
- SIEGERT, W. Microbial Contamination in Diesel Fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009- **11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, 18-22, 2009.
- STRÖMBERG, N.; SARAMAT, A. & ERIKSSON, H. Biodiesel degradation rate after refueling. **Fuel**, 105: 301–305, 2013.
- WICK, A.; MARINCAS, O.; MOLDOVAN, Z. & TERNES. T. A. Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge. **Water Research**, 45 (12):3638–3652 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.014>
- 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**, 112: 153-162, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.062>
- ZIMMER, A., BUCKER, F., BENTO, F.M., CAVALCANTI, E.H.S., GUILLERMO, H., PACHECO, J., RESENDE, V.L.D., TEIXEIRA, R.M. & VISCARDI, S.L.C. Vida de Prateleira e Avaliação dos Níveis de Contaminação de Diesel S500, Biodiesel Metílico de Soja e de Misturas B5 e B20 Armazenados em Recipientes de Aço por 120 dias na Região Sul In: **5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel**, 2012, Salvador. Anais LAVRAS: UFLA, 2012, 3: 1513-1514.
- ZIMMER, A.; GALVES, F.; CANAL, N.; CORÇÃO, G. & BENTO, F. M. Monitoramento da contaminação microbiana em tanque subterrâneo com diesel e biodiesel (B4) In: **4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 7º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel**, 2010, Belo Horizonte. Anais LAVRAS: UFLA, 2010, 3: 1505-1506.
-

CAPÍTULO V

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE USO DE UM
TESTE DE BIOLUMINESCÊNCIA DO ATP PARA
ESTIMATIVA DA CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA DE COMBUSTÍVEIS**

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE USO DE UM TESTE DE BIOLUMINESCÊNCIA DO ATP PARA ESTIMATIVA DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE COMBUSTÍVEIS

RESUMO

A contaminação microbiana em tanques de armazenamento de combustíveis pode afetar a qualidade do produto estocado. O emprego de técnicas de bioluminescência do ATP tem sido utilizado para detectar e estimar o grau de contaminação em tanques de armazenamento de combustíveis em tempo real. O objetivo deste estudo foi apresentar a viabilidade de um KIT comercial para a detecção de ATP por bioluminescência em diferentes fases aquosas durante a simulação de armazenamento de combustíveis, em laboratório. Nos experimentos a concentração de ATP presente em diluições sucessivas de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* ou de um inóculo não caracterizado em diferentes matrizes aquosas foi quantificado utilizando-se bioluminescência do ATP. Os valores obtidos foram comparados com o número de microrganismos determinados nas amostras pela técnica padrão de contagem em placa. A partir destes ensaios foi demonstrada uma correlação linear alta ($R^2 = 0,93$ e $R^2 = 0,96$) entre os valores de RLU e UFC/mL e um coeficiente de variação (CV) médio de 10% e 7%, para diluições de um inóculo de *Pseudomonas sp.* em solução salina e água ultra pura respectivamente. Para as diluições de um inóculo misto em água ultrapura a correlação entre RLU e UFC/mL foi menor ($R^2 = 0,76$) e o CV foi de 44%. Para as diluições de um inóculo não caracterizado em água drenada de um sistema óleo/água, o coeficiente de variação foi de 46%. Não foi possível obter leituras de RLU quando foi avaliado água de drenagem de tanques de combustíveis. Estes resultados demonstram que o kit utilizado nesta avaliação foi mais sensível para detecção de carga microbiana em meio aquoso comparado com a técnica padrão de contagem em placa. Porém, na avaliação de fase aquosa oriunda de tanques de armazenagem de diesel e biodiesel não foi adequado para a detecção da carga microbiana.

Palavras chave: Bioluminescência, ATP, mistura diesel/biodiesel, controle microbiano, Contaminação microbiana.

5.1 INTRODUÇÃO

O combustível armazenado sem os cuidados necessários pode oferecer condições propícias para o crescimento de microrganismos (Passman, 2013). Durante o crescimento de bactérias e fungos, são produzidos metabólitos e biomassa que podem provocar muitos problemas operacionais e comprometer a qualidade final dos combustíveis estocados. Dependendo das rotinas de manutenção do tanque, esta atividade microbiana quando não controlada pode prejudicar a qualidade final do produto, alterando suas propriedades e causando entupimentos, corrosão e formação de borras e sedimentos. Neste sentido, o monitoramento constitui-se em uma das principais ações de prevenção e controle de contaminação microbiana (Passman, 2009; Bento et al., 2010; Passman, 2013). O estabelecimento de rotinas de manutenção periódica dos tanques de armazenamento deve incluir a inspeção visual do combustível (Bento et al., 2010). Quando a contaminação microbiana é detectada a implementação de medidas corretivas deve ocorrer o mais breve possível. Estas medidas podem incluir a drenagem e limpeza dos tanques e/ou a aplicação de antimicrobianos.

A detecção e a quantificação da contaminação microbiana em combustíveis nem sempre são uma tarefa simples e inspeções visuais rápidas podem facilmente induzir a diagnósticos enganosos. A presença de água livre no fundo dos tanques, precipitados pretos, cheiro de ácido sulfídrico e biomassa (lodo) na interface óleo-água são considerados indicativos da presença de contaminação microbiana. No entanto, um combustível que se apresente límpido e brilhante ainda pode conter altos níveis de contaminação microbiana (Geva et al., 2007; Dodos et al., 2012; Passman, 2013).

Muitos desafios estão associados à enumeração de microrganismos em óleo e em sistemas óleo/água (Keasler et al., 2011). A metodologia tradicionalmente utilizada para detecção e quantificação da contaminação em combustíveis armazenados inclui a filtração do combustível em membrana 0,22µm e contagem em placa, os resultados podem demorar até 7 dias, reduzindo as chances de se implementar uma ação corretiva eficaz. Por esta razão, um dos

parâmetros essenciais para o estabelecimento de uma nova tecnologia de monitoramento de campo é a possibilidade de se obter o resultado em tempo real.

O uso de métodos de detecção de ATP tem sido proposto em alternativa ao de métodos microbiológicos para fazer o monitoramento da carga microbiana em diferentes setores industriais como alimentação, farmacêutica, hospitalar e também em combustíveis pela rapidez da resposta, habilidade e facilidade de utilização e por apresentar custos aceitáveis em relação a outros métodos. Esta técnica proporciona um diagnóstico rápido, do tipo passa/não passa, funcionando como uma primeira seleção em programas de controle de qualidade (Griffith et al., 1994, Bágur et al., 2002).

Os resultados são expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU), não existindo um valor de RLU fixo para determinar se uma amostra está contaminada ou não. Devido às particularidades do método e as suas variadas aplicações, sempre que se deseja aplicá-lo a um determinado sistema é necessário um estudo prévio do mesmo para que sejam estabelecidos os limites de detecção para a condição a ser avaliada e os intervalos de valores que caracterizam o grau de contaminação do sistema. Apesar disto, não se encontram, num só guia, metodologias para a avaliação de desempenho de testes comerciais que, permitam a sua validação. Existem guias de orientação para a validação de métodos internos de ensaio em análise química (Relacre, 2000) ou microbiológica (Microval, 1997). Os métodos para detecção de ATP comercializados, no entanto, não se enquadram em nenhuma das categorias anteriores.

Os limites de detecção do método geralmente são estabelecidos através de curvas de correlação entre o método de contagem em placa (UFC) e as leituras de RLU obtidas para uma diluição seriada de um inóculo contendo um ou mais organismos mais freqüentemente encontrados no sistema que se deseja analisar. Uma boa correlação indica que o método foi capaz de detectar a carga microbiana presente no meio (Geva et al, 2007; Turner et al., 2010). Este método também tem sido sugerido por muitos pesquisadores para avaliação da contaminação microbiana em combustíveis (Passman, 2007, 2009, 2013;

Passman & Eachus, 2007; English, 2007; Geva et al., 2007; Keasler et al., 2011; Dodos et al., 2012).

O teste padrão para avaliação da contaminação de combustíveis por bioluminescência do ATP está descrito na Norma **ASTM D7687-11 Standart test method for mesurement of cellular adenosine triphosphate in fuel, fuel/water mixtures and fuel – associate with sample concentration by filtration**, publicada em 2011. O método descrito utiliza tecnologia QGO-M® kits da empresa IlluminUltra® (produto importado) em que a quantificação do ATP ocorre em amostras de combustível ou em sistemas de água /combustível e necessita de um passo de extração prévia do ATP, o que dificulta a realização da avaliação em campo por pessoal não especializado.

No entanto, atualmente no Brasil encontram-se kits para quantificação de ATP por bioluminescência em diferentes formatos. Algumas empresas desenvolveram kits mais simplificados e compactos para a análise de superfícies e água que não incluem o passo prévio de extração do ATP e permitem que esta análise seja efetuada em campo por pessoal não especializado. Esta tecnologia vem sendo empregada na indústria alimentícia, hospitalar e farmacêutica como uma primeira seleção para testar a desinfecção de superfícies, alimentos, bebidas e até mesmo vacinas e também para análise de água. Na tentativa de se avaliar um kit com preços acessíveis á indústria do petróleo brasileira com possibilidades de se monitorar a contaminação microbiana, foi conduzido este estudo. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso de um Kit comercial de determinação de ATP por bioluminescência para a detecção e quantificação da contaminação microbiana em fase aquosa proveniente de tanques de armazenamento de combustíveis.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Teste de bioluminescência do ATP

Os valores limítrofes para que uma amostra seja considerada “limpa” são específicos para cada sistema e aplicação e devem ser estabelecidos através de ensaios prévios. Considera-se como limite para uma amostra ser considerada

como não contaminada (passa) o valor máximo do resultado que corresponde a uma amostra limpa. O limite para uma amostra ser considerada contaminada (não passa), é o valor mínimo do resultado que corresponde a uma contaminada. O limite de detecção é a menor quantidade do analito (ATP) que o método é capaz de detectar.

Este estudo foi dividido em três etapas, a primeira envolveu diluições sucessivas de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em água ultrapura e solução salina a fim de se conhecer os padrões de leitura para o Kit selecionado e avaliar a correlação com o método padrão de contagem em placa. Na segunda etapa utilizou-se diluições sucessivas de um inóculo misto em água ultra pura e água que entrou em contato com o combustível por 30 dias, para se estabelecer os padrões de leitura do kit para as populações mais frequentemente encontradas no combustível e para se avaliar as possíveis interferências da matriz (fase aquosa) nas leituras. Uma terceira etapa foi conduzida com diluições sucessivas de um inóculo misto água de drenagem de tanques de armazenamento estéril a fim de se avaliar a aplicabilidade do kit em uma situação mais próxima da real.

Para se avaliar a aplicabilidade do método em uma fase aquosa associada a combustíveis (etapas 2 e 3), seguiu-se metodologia sugerida por Passman (2007); Geva et al., (2007) e a norma **ASTM D7687-11** com algumas alterações para adequação as orientações do fabricante. Um ensaio de bioluminescência de ATP e a contagem padrão em placa foram realizados para cada inóculo estudado. Os valores obtidos nas leituras foram utilizados para determinação da correlação entre os métodos de bioluminescência do ATP e contagem padrão em placa (UFC X RLU) e para o estabelecimento do coeficiente de variação.

5.2.1.1 Kit comercial para avaliação do teste do ATP: Para a realização dos ensaios foi utilizado um kit comercial para quantificação de ATP total em amostras líquidas. O kit é composto de um Swab (amostrador), específico para análise de amostras aquosas e de um luminômetro. Este kit está disponível comercialmente e foi escolhido por apresentar um formato compacto, tornando a amostragem fácil e rápida e por permitir a obtenção dos resultados no

local. O swab está contido em um estojo estéril, semelhante a uma caneta. Dentro deste estojo há um compartimento lacrado que contém todos os reagentes necessários para a lise das células (liberação do ATP) e para a reação enzimática de bioluminescência. A metodologia consiste em se mergulhar o swab em um volume conhecido da amostra desejada, devolvendo-o em seguida para o estojo. O swab é então pressionado contra o lacre do compartimento dos reagentes rompendo-o. Isto promove a lise das células e a reação enzimática que resulta em bioluminescência. Após um período de 10 segundos, com leve agitação, o estojo com o swab é inserido no luminômetro que fornece a leitura da intensidade de luz produzida na reação em Unidades Relativas de Luz (RLU). A intensidade de luz produzida está correlacionada com a quantidade de ATP presente na amostra, isto permite estimar a carga microbiana na amostra avaliada.

5.2.1.2 Ensaio de bioluminescência: O ensaio de bioluminescência do ATP- baseado na reação luciferase- luciferina foi realizado com o Kit comercial descrito acima de acordo com o protocolo do fabricante (Figura 5.1). Para o ensaio, o swab estéril foi mergulhado no frasco contendo 30 mL da diluição do inóculo estudado. Para cada diluição foram utilizados 3 swabs e para cada swab foram realizadas 5 leituras no intervalo máximo de 1 minuto. A média dos valores de RLU obtidos em cada diluição foram anotados e convertidos em Log_{10} . Neste estudo os valores de RLU obtidos em cada ensaio foram correlacionados com a estimativa do número de células (UFC - unidades formadoras colônia) e os Valores de RLU foram utilizados para determinar o coeficiente de variação (CV). Este coeficiente é uma medida de variabilidade relativa dada pela fórmula (desvio padrão / média) que permite a comparação da variabilidade relativa de diferentes conjuntos de dados. Quanto menor o valor, menor é a variação encontrada o que garante a confiabilidade dos dados e indica uma boa reprodutibilidade da método (Pachello et al.,2010).

Na figura 5.1 pode ser observado um resumo das etapas de validação do teste do ATP.

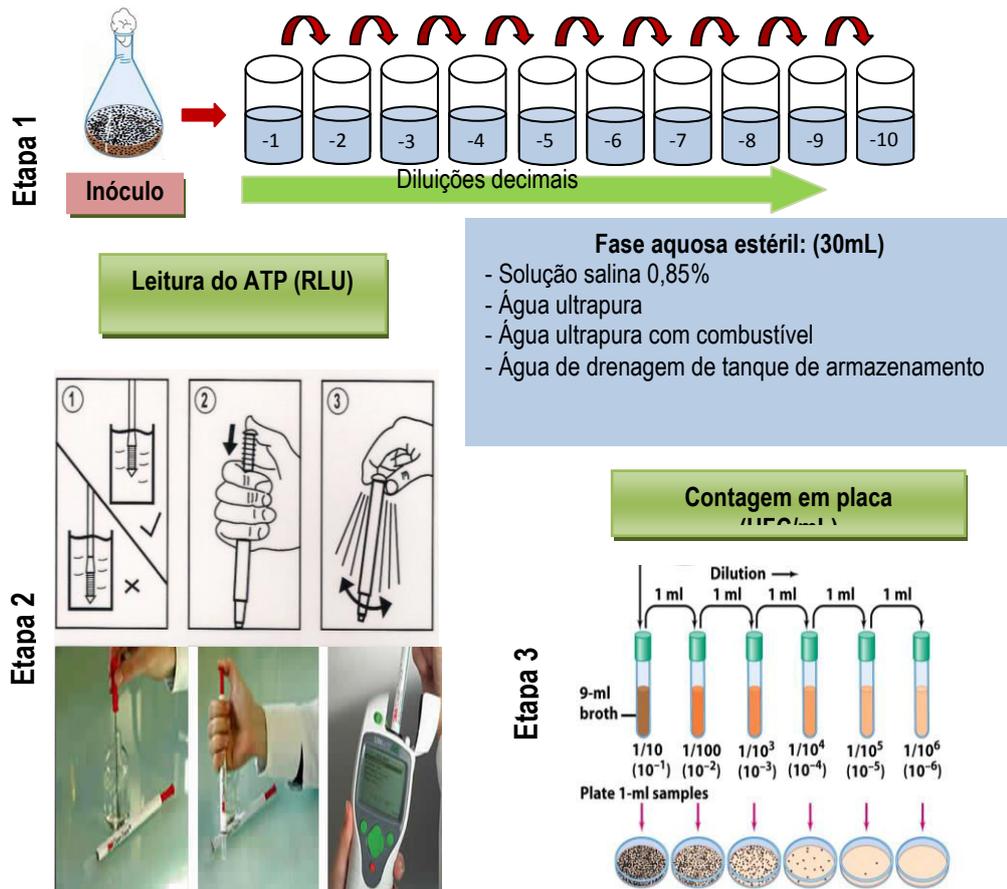


Figura 5.1. Etapas utilizadas no delineamento experimental.

5.2.1.3 Determinação de UFC/mL: Para contagem de UFC, após as leituras de bioluminescência de ATP, uma alíquota de 100 µL de cada amostra testada foi retirada e foram realizadas diluições seriadas. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi espalhada em placa com meio sólido e incubada (triplicata) por 48h a 28°C. Após as colônias foram contadas e os valores médios de UFC/mL obtidos foram anotados e convertidos em Log₁₀.

5.2.2 Validação do teste do ATP em cultura de *Pseudomonas sp.*

Em uma primeira etapa a atividade do Kit foi avaliado em diluições sucessivas de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em solução salina 0,85% e em água ultra pura. Em frascos estéreis com capacidade para 80 mL, contendo 30 mL de água foram realizadas diluições sucessivas de um inóculo de *Pseudomonas sp.* Para cada diluição foram realizadas três amostragens com swab específico. A seguir, alíquotas de 100 µL foram espalhadas em placa com

meio sólido LB (spread-plate) e incubadas a 28°C por até 24h para posterior contagem de UFC. A leitura do branco (controle) foi realizada na solução salina estéril e também na água ultra pura estéril. O gênero *Pseudomonas sp.* é considerado ubíquo, ou seja pode ser encontrada em vários locais, e é frequentemente isolada em sistemas de combustíveis contaminados (Bento e Gaylarde, 2001; Rodriguez-Rodriguez et al, 2009).

5.2.2.1 Pré inóculo: O pré-inóculo foi preparado a partir da retirada com a alça de uma colônia crescida em meio de cultura sólido de *Pseudomonas sp.* (cultura pura). As células foram inoculadas em 30 mL de meio LB e incubado overnight a 30 ° C sob agitação de 100rpm. O microrganismo selecionado foi isolado a partir de amostras de diesel B5 (95% diesel; 5% biodiesel) e pertence a coleção de culturas do LABIO (Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis) da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

5.2.2.2 Inóculo: O inóculo foi ajustado de acordo com métodos espectrofotométricos para uma turbidez McFarland 0,5 padrão (comprimento de onda de 600 nm) utilizando solução salina 0, 85% ou água ultra pura. De modo a obter, a concentração celular de aproximadamente, 10⁸ CFU/mL de bactérias. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas na matriz de teste (solução salina 85% ou água ultra pura).

5.2.3 Cultura mista em diferentes fases aquosas (matrizes)

Para esta etapa, para cada matriz aquosa, foram montados 10 frascos estéreis com capacidade para 80 mL, contendo 30 mL da fase aquosa estudada. Nestes frascos foram realizadas diluições sucessivas de um inóculo não caracterizado (ASTM1259-10). Para cada diluição foram realizadas três amostragens com swab específico. A seguir, alíquotas de 100 µL foram espalhadas em placa com o auxílio de uma alça de vidro (Drigalsky) em meio sólido PCA (técnica de espalhamento) e incubadas a 28°C por até 5 dias para posterior contagem de UFC. Para este teste foi utilizado um inóculo misto, não caracterizado que foi avaliado em diferentes fases aquosas: água ultra pura estéril (Kupsy, 2010); água ultrapura que esteve em contato com a mistura B10 por 30 dias e água de drenagem de tanques de combustíveis. A leitura do branco

(controle) foi realizada na fase aquosa (estéril) utilizada.

5.2.3.1 Inóculo não caracterizado: Um inóculo não caracterizado foi preparado conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10. Resumidamente, em um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo Bushnell-Haas (Bushnell & Hass, 1941) foi adicionado 2% da mistura diesel/biodiesel - B10 (previamente esterilizada por filtração) e foi inoculado com 5 mL de uma mistura de borra microbiana obtida a partir de diferentes combustíveis (biodiesel e diesel e misturas B5) e incubados a 28°C, 200 rpm durante 7 dias.

Para a realização dos experimentos o inóculo foi ajustado de acordo com métodos espectrofotométricos para uma turbidez McFarland 0,5 padrão (comprimento de onda de 600 nm) utilizando como diluente a água ultra pura. De modo a obter, a concentração celular de aproximadamente, 10^5 UFC/mL e 10^8 UFC/mL de bactérias. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas na matriz de teste (água ultra pura, água ultrapura com mistura B10 e água de drenagem de tanques de combustíveis).

5.2.3.2 Água ultra pura com a mistura B10: Em frascos com capacidade para 1L foram adicionados 700 mL da mistura B10 (90% diesel e 10% biodiesel) e 300 mL de água ultrapura. Estes frascos foram armazenados em temperatura ambiente ($28\pm 2^\circ\text{C}$) e abrigados da luz por 30 dias. Após este período a água foi separada do óleo, esterilizada em autoclave e o pH foi verificado para utilização no experimento.

5.2.3.3 Água de drenagem de tanques de armazenamento: A água para esta etapa foi obtida através da coleta no lastro de tanques de armazenamento da mistura B5 em postos de combustível e armazenada em frascos estéreis, conduzida até o Laboratório, onde foi filtrada em papel filtro para retirada de material sólido mais grosseiro. Esta água filtrada foi acondicionada em frascos para decantação do material sólido mais fino por 7 dias. Após este período o sobrenadante foi retirado e o resíduo de óleo foi separado da água em funil de separação. Esta água então foi autoclavada e o pH foi verificado para utilização no experimento. Neste tratamento o branco foi a água de drenagem estéril.

5.2.4 Análise estatística

Os coeficientes de correlação linear e os coeficientes de variação foram obtidos com o uso do programa Microsoft Office Excel 2007.

5.3. RESULTADOS

5.3.1 Detecção do ATP com cultura pura de *Pseudomonas sp.*

Nesta etapa do experimento, foi avaliado o limite de detecção do kit selecionado para diluições de um inóculo de *Pseudomonas sp.* em solução salina 0,85% e água ultra pura. Os testes com cultura pura e matriz simples tiveram como objetivo conhecer o desempenho do kit selecionado na determinação do ATP em amostras aquosas.

Os valores de “background” (leituras do branco) para estas matrizes, foram de 13 RLU com coeficiente de variação de 23% para solução salina 0,85% e 30 RLU com um coeficiente de variação de 25% para água ultra pura. Por este motivo, para leituras de RLU abaixo de 30 em matrizes compostas por água ultra pura ou solução salina foram considerados como não contaminadas. A Figura 5.2 resume os resultados de RLU e UFC/mL obtidos para as diluições de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em solução salina 0,85% e água ultra pura.

Este ensaio mostrou que o kit selecionado foi capaz de detectar a presença da bactéria *Pseudomonas sp.* em ambas as matrizes de forma semelhante. Também o método de bioluminescência do ATP demonstrou ser mais sensível para detecção da bactéria do que a técnica padrão de contagem em placa, detectando a presença da bactéria nas diluições -8, -9 e -10, nas matrizes estudadas que não foram detectadas pela técnica de contagem padrão em placa.

Os coeficientes de correlação linear entre os métodos avaliados para as diluições de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em solução salina 0,85% e água ultra pura foram $R^2 = 0,93$ e $R^2 = 0,96$, respectivamente, o que indica boa correlação para o método em ambas matrizes aquosas. Os coeficientes médios de variação para as leituras de RLU de cada matriz foram de 10% e 7% respectivamente. As maiores variações neste coeficiente para ambas as matrizes foram detectadas para leituras de RLU abaixo de 100.

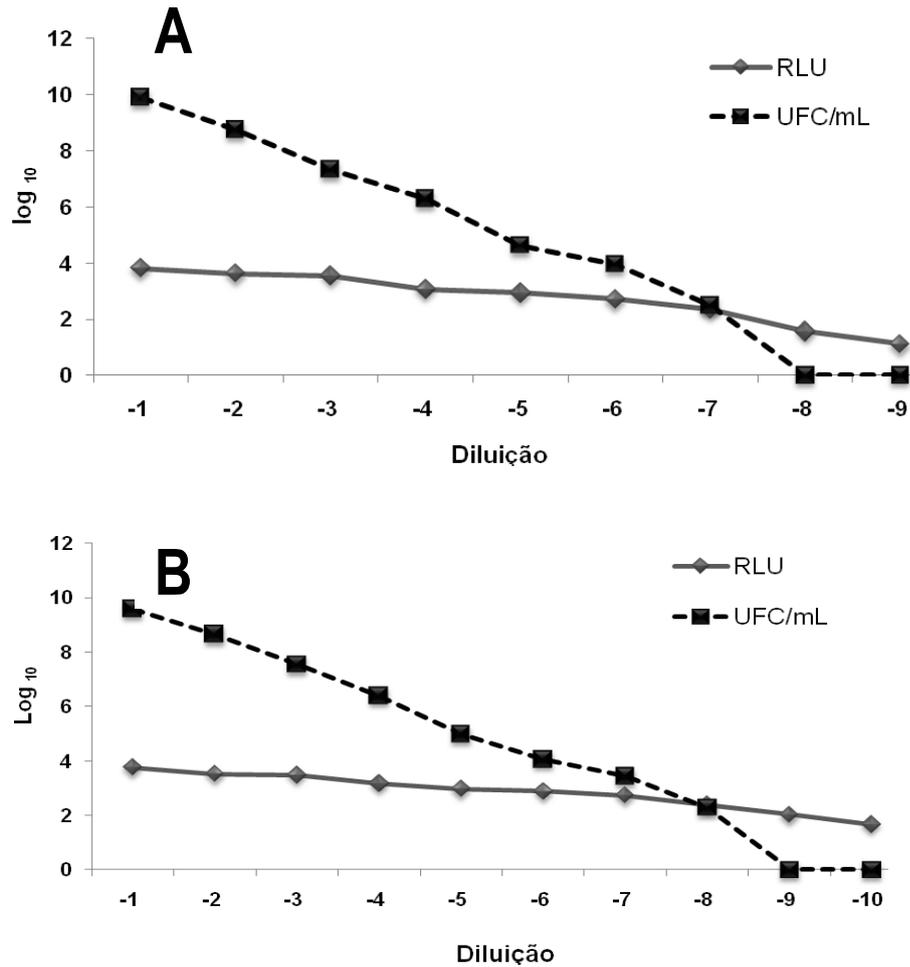


Figura 5.2. Valores de RLU e UFC/mL (Log₁₀) obtidos para as diluições de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em solução salina (**A**) e em água ultra pura (**B**)

As Figuras 5.3 e 5.4 mostram a correlação entre as leituras de ATP e contagens de UFC/mL obtidos para as diluições de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em solução salina e água ultra pura.

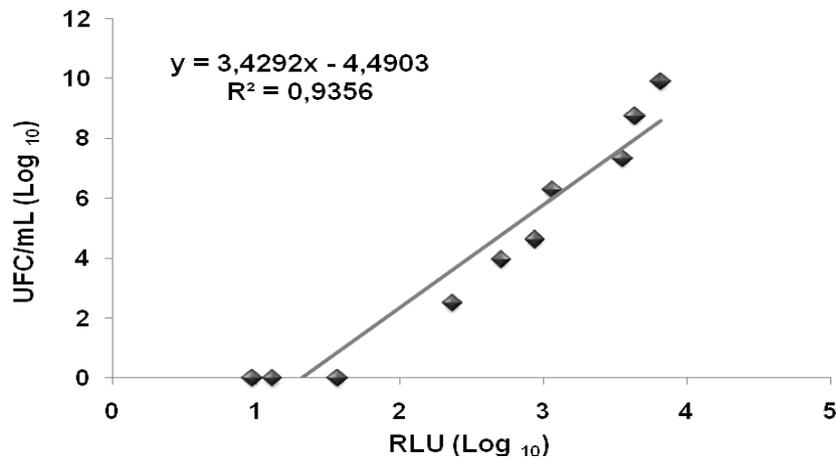


Figura 5.3: Distribuição dos valores de RLU em função do valores de UFC/mL obtidos através das leituras de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em solução salina.

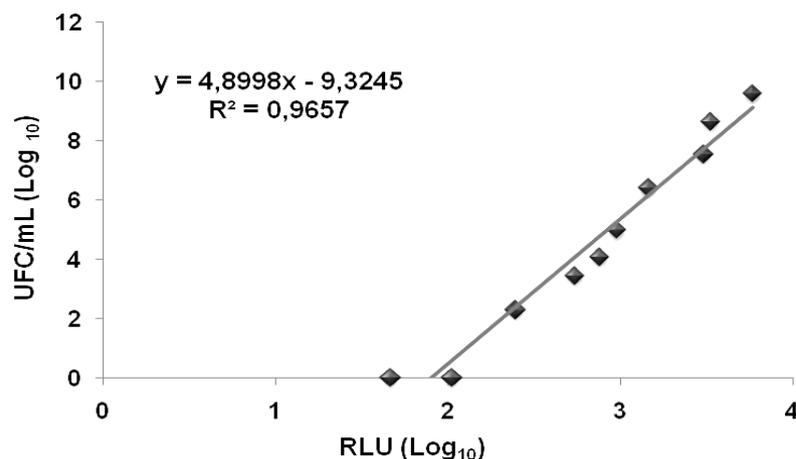


Figura 5.4: Distribuição dos valores de RLU em função do valores de UFC/mL obtidos através das leituras de uma cultura pura de *Pseudomonas sp.* em água ultra pura .

5.3.2. Diluições de um inóculo não caracterizado em água ultrapura

Uma vez que no estudo anterior a água ultrapura mostrou-se uma matriz adequada, permitindo uma melhor correlação entre as duas técnicas empregadas, nesta segunda etapa foi realizada uma avaliação da detecção do inóculo não caracterizado nesta matriz a fim de se estabelecer os padrões de leitura para inóculos mistos.

Nas figuras abaixo são mostrados os valores de RLU (\log_{10}) obtidos para diluições sucessivas de um inóculo não caracterizado (figuras 5.5) em água ultra pura e a correlação entre valores obtidos para as mesmas diluições pelo

método padrão de contagem em placa (UFC/mL) e pelo método de bioluminescência do ATP (figura 5.6).

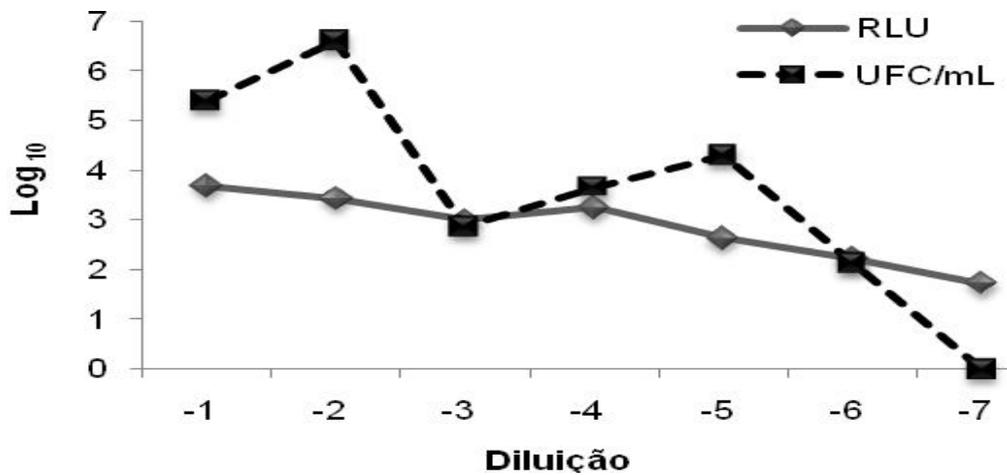


Figura 5.5. Valores de RLU e UFC (log₁₀) obtidos para as diluições em água ultra pura com inóculo não caracterizado.

Para a detecção da contaminação em diluições de um inóculo não caracterizado em água ultra pura a técnica de bioluminescência do ATP também demonstrou maior sensibilidade que o método de contagem padrão em placa, sendo capaz de detectar a contaminação em diluições maiores. Porém, foi observada uma baixa correlação entre os dois métodos nesta etapa ($R^2 = 0,76$). O CV médio para as leituras de RLU nesta condição foi de 44%.

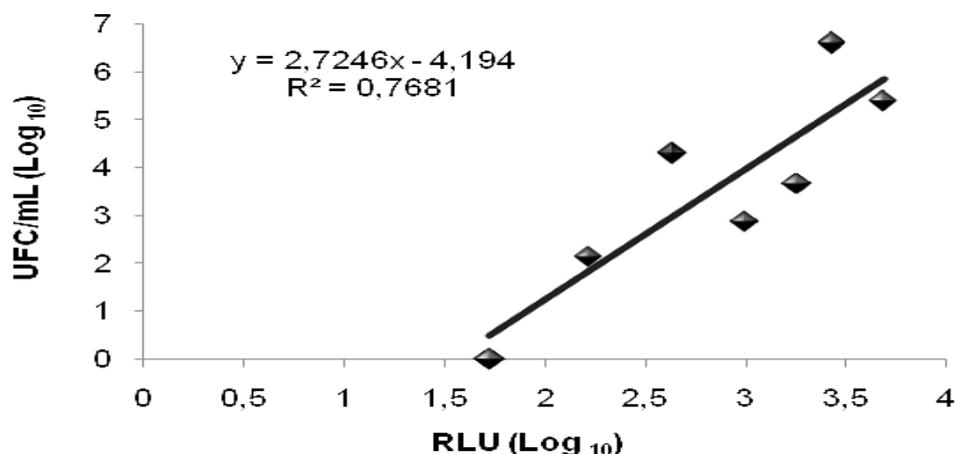


Figura 5.6. Distribuição dos valores de RLU em função do valores de UFC/mL obtidos através das leituras de diluições de um inóculo não caracterizado.

5.3.3 Diluições de um inóculo não caracterizado em água ultra pura em contato com combustível por 30 dias.

Ao entrar em contato com a água, algumas frações do combustível podem migrar para esta fase alterando sua composição. A presença de substâncias químicas orgânicas dispersas ou dissolvidas na fase aquosa pode interferir com a reação de emissão de luz da qual o teste de ATP é dependente (Passman, 2009; Keasler et al, 2011). Por isto, a fim de verificar se a composição da água que entrou em contato com o combustível interfere com as leituras, nesta etapa utilizou-se como matriz uma água que ficou em contato com a mistura B10 durante 30 dias (ver Item 5.2.2).

Nesta condição foi possível observar a redução das leituras de RLU à medida que as diluições aumentavam (Figura 5.7) e o coeficiente de variação médio para as leituras de RLU foi de 46%. Não foi possível correlacionar este resultado com as contagens de UFC, pois a recuperação de microrganismos em placa ficou abaixo do limite de detecção. Muitas vezes, a enumeração de bactérias em meio de cultura quando a matriz contém hidrocarbonetos é mais lenta (2-4 semanas para um resultado) e pouco consistente, pois o óleo cria áreas anaeróbias no meio de cultura sólido. No caso de enumeração de bactérias anaeróbias em meio postgate B, por exemplo, as emulsões podem alterar o meio, tornando-o preto e, portanto fornecendo resultados falso positivos (Dokens & Hughes, 2011; Keasler et al., 2011).

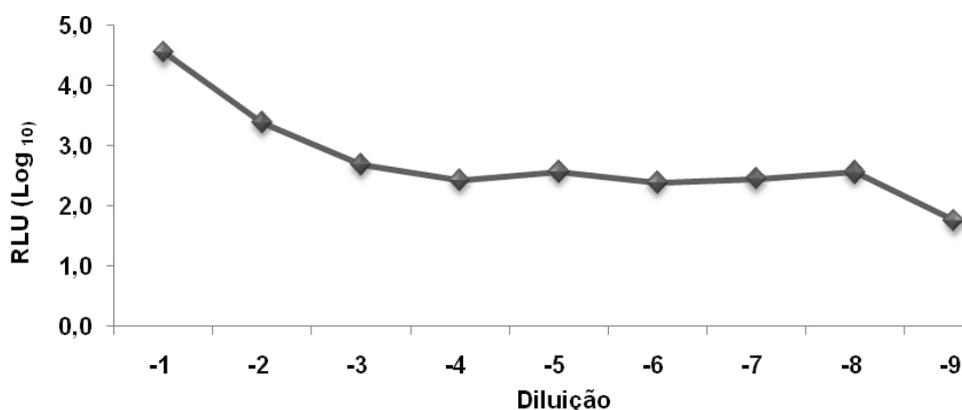


Figura 5.7. Valores de RLU (\log^{10}) obtidos para as leituras de diluições em água ultra pura que esteve em contato com combustível com inóculo não caracterizado em contato com combustível por 30 dias.

No tratamento onde a matriz aquosa utilizada foi a água de drenagem de tanques de armazenamento de combustível não foi possível realizar os ensaios, pois a cor intensa desta fase aquosa interferiu com a reação de emissão de luz. De acordo com English, (2009), quando se trata de amostras líquidas a composição da matriz é um fator importante e por este motivo em alguns casos utiliza-se o passo de extração do ATP. A enumeração de bactérias pela técnica de bioluminescência do ATP para análise de combustíveis ou líquidos contendo hidrocarbonetos é problemática devido às interferências de hidrocarbonetos, sólidos suspensos e pela presença de outros químicos que podem interferir com a reação enzimática. Neste caso é necessário um passo prévio de extração e lavagem das células, eliminando-se os efeitos da matriz para que se obtenha leituras confiáveis (Keasler et al., 2011).

A tabela 5.1 resume os principais resultados para os testes realizados.

Tabela 5.1. Valores dos coeficientes de correlação e variação obtidos nos ensaios

Matriz	Inóculo	Coefficiente de correlação R^2	Coefficiente de variação (CV%)
Solução salina	<i>Pseudomonas sp</i>	0,9356	10%
Água ultra pura	.	0,9662	7%
Água ultra pura	Inóculo não caracterizado	0,7681	44%
Água ultra pura que esteve em contato com o combustível		-	46%

5.3.4 Correlação entre ATP/UFC

Em nosso estudo, nos ensaios realizados com cultura pura (diluições de *Pseudomonas sp.*) foi encontrada uma boa correlação entre os valores de UFC/mL e as leituras de RLU, mesmo em diferentes matrizes aquosas (0,93 e 0,96) (Tabela 5.1). Resultado semelhante foi obtido por Geva et al (2007), que no intuito de aplicar a técnica para monitoramento de combustíveis armazenados, testaram dois diferentes kits para determinação de luminescência do ATP utilizando diluições sucessivas de um inóculo padrão de *Cladosporium resinae*

(cultura pura) em diesel. Em seu estudo os autores encontraram coeficientes de correlação de 0,99 e 0,96 entre os valores de RLU e as contagens de UFC, o que consideraram uma boa correlação. Em outros estudos conduzidos com diluições de culturas puras (Yan et al., 2011; Burgos et al., 2002) também foram encontradas boas correlações entre os dois métodos.

No mesmo estudo, mas em situação de campo, utilizando um dos kits avaliados, Geva et al., (2007) encontraram uma correlação muito baixa entre os valores de RLU e os valores de UFC aferidos. Os autores explicaram que em situação real (campo) podem ser encontrados diferentes tipos e espécies de microrganismos compondo a comunidade e os mesmos encontram-se em estágios fisiológicos bastante distintos. Isto pode provocar muitas variações nas leituras de ATP, tornando as curvas de calibração pouco confiáveis e gerando problemas de interpretação.

Passman et al., (2007) e Dodos et al., (2012), Dodos & Zannikos (2013), trabalhando com inóculos mistos, também encontraram dificuldades para correlacionar os dois métodos. Neste caso, os autores alertaram para o fato que o teste de ATP é muito sensível para detecção de microrganismos, sendo possível detectar até mesmo aqueles que não podem ser recuperados em placa. Em nosso estudo a correlação encontrada entre as leituras de ATP e a contagem de UFC, para as leituras de um inóculo misto foi muito baixa (0,76).

Alguns trabalhos estabelecem facilmente uma correlação entre o número de microrganismos recuperados em placa e os valores de RLU. Mas é preciso se levar em conta que os valores de RLU obtidos nas leituras estão mais relacionados à concentração de ATP nas células do que ao número de células presentes na amostra. A concentração de ATP presente numa amostra depende fortemente das características do sistema, da composição da população microbiana e do estado metabólico das células e não propriamente do número de células presentes numa amostra (Nilsson et al., 2002; Ukutu et al., 2005). De acordo com Eydal & Petersen (2007) o volume da célula também podem afetar diretamente a quantidade de ATP, e por isto, células maiores como algumas leveduras, por exemplo, podem conter mais ATP do que algumas bactérias. Em

suma, os valores de RLU obtidos refletem a concentração de ATP presente no meio, isto vai variar em função do tipo, tamanho e estado fisiológico de cada célula microbiana. A presença de outras substâncias orgânicas no meio como proteínas, por exemplo, também pode alterar este resultado (Nilsson et al., 2002; Ukutu et al., 2005; Passman, 2009).

A maioria dos trabalhos que consegue boas correlações (Burgos et al., 2002; Ukutu et al., 2005; Yan et al., 2011) utiliza inóculos bacterianos, culturas puras e condições de crescimento que otimizam sua recuperação em placa, favorecendo a observação da correlação.

Cabe ainda ressaltar que quando se trabalha com inóculos mistos, a quantidade de células cultiváveis pode variar de 1% a mais de 50% do total de células viáveis, dependendo do sistema e das técnicas empregadas para sua recuperação (Desjardins & Beaulieu, 2003; Lahtinen et al., 2006; Oquist et al., 2008). Por isto, é esperado que o número de células viáveis seja maior que o número de células cultiváveis. Nestes casos, quando se encontra uma correlação entre as duas técnicas isto pode significar que o número de bactérias cultiváveis representa a maior parte da população. Ainda neste contexto é preciso ressaltar que a concentração do ATP, não é um bom indicador para estimar a presença de esporos desde que estes tem apenas traços de ATP (Laduc et al., 2007).

5.3.5 Coeficientes de Variação (CV):

O Coeficiente de Variação (CV) é uma medida que informa sobre a reprodutibilidade do método, traduzindo a variação encontrada entre as leituras de uma mesma amostra (Pachello, 2011). Geva et al. (2007) recomendam para ensaios de ATP bioluminescência, um CV de até 32% para garantir a confiabilidade do método. Neste estudo os CV observados entre as leituras de ATP, para as diluições de *Pseudomonas sp.* (cultura pura) (7% e 10%) estiveram dentro dos limites sugeridos por Geva et al. (2007) e Pachello (2011), indicando uma boa reprodutibilidade para o Kit testado nesta condição. O mesmo, no entanto não ocorreu para as leituras das diluições de um inóculo não caracterizado, onde a variabilidade entre as leituras de uma mesma amostra

foram bastante altas (44% e 46%), o que significa que os resultados obtidos para esta condição são discutíveis.

A razão para esta variabilidade pode ser explicada principalmente pela complexidade da comunidade microbiana que compõe o inóculo (bactérias, fungos e leveduras) e também pela provável presença de organismos cultiváveis, não cultiváveis e esporos. Segundo estudo desenvolvido por Yan et al. (2011), onde utilizaram a técnica de bioluminescência do ATP para detectar carga microbiana em molho de soja, os resultados obtidos foram satisfatórios apenas após a aplicação de uma etapa de pré tratamento. Esta etapa, que consistiu na extração prévia do ATP total da matriz, eliminação do ATP extracelular por tratamento enzimático com apirase e uma fase prévia de cultivo a fim de quebrar a dormência dos esporos, reduziu a variabilidade dos resultados e permitiu a obtenção de uma correlação entre o método padrão de contagem em placa e as leituras de RLU de R^2 0,90.

Outro fator que precisa ser levado em conta é a amostragem. As amostras foram preparadas em um volume de 30 mL para cada diluição, mas em função do desenho do amostrador, o volume efetivamente coletado e testado de cada amostra foi de 0,145mL. Este volume tão pequeno, aliado a heterogeneidade da amostra pode ter contribuído para a grande variação observada entre as leituras. Para combustíveis, Passman (2013) ressalta que a distribuição dos microrganismos na amostra pode ser muito heterogênea e sugere que sejam recolhidas amostras de até 1L de combustível para que se possam conseguir estimativas confiáveis a partir dos métodos tradicionais. A norma ASTM D7687-11(método para medida do ATP) sugere que seja utilizado um volume de 1 a 5mL de amostra de combustível para se obter esta estimativa.

A técnica de quantificação do ATP por bioluminescência vem sendo amplamente utilizada para estimar a carga biológica em superfícies e utensílios hospitalares, superfícies de preparo de alimentos, alimentos crus ou industrializados, bebidas e águas residuais de efluentes industriais e hospitalares entre outros, fornecendo resultados em menos de 5 min. (Chen e Godwin, 2006; Fukuda et al, 2005;. Samkutty et al, 2001;. Bell et al, 1996.; Siragusa et al., 1995;

Stanley, 1982; Vanstaen, 1980; Vilder, 1989; Van Crombrugge et al., 1989; Murphy et al., 1998; Vilar et al., 2008, Aycicek et al., 2006; Tebbutt et al., 2007; Caputo et al, 2011; Lehto et al., 2011; Ogden, 1993). Porém, quando a quantificação envolve matrizes ricas em substâncias orgânicas como gorduras, carboidratos, proteínas, que podem conter ATP ou incluem a presença de corantes ou outras substâncias químicas como biocidas, por exemplo, protocolos que incluem um passo de extração prévia podem proporcionar resultados mais confiáveis como demonstrado por Ribeiro et al. (2000) nas análises de leite, Burgos et al. (2002) em análises de sucos de frutas e Yan et al. (2011) nas análises de contaminação em molho de soja.

5.4 CONCLUSÕES

O Kit de determinação de bioluminescência do ATP avaliado neste estudo mostrou maior sensibilidade para a detecção da contaminação microbiana tanto nos ensaios com cultura pura (*Pseudomonas sp.*), quanto para os ensaios com cultura mista (inóculo não caracterizado), sendo capaz de detectar a contaminação microbiana nas diluições mais altas, onde a técnica padrão (contagem em placa) não detectou.

Os coeficientes de variação médios obtidos para os valores de RLU dos ensaios com cultura pura foram de 7% e 10%, indicando uma boa reprodutibilidade, o que confere confiabilidade ao método utilizado.

Para as avaliações realizadas com diluições de uma cultura mista (inóculo não caracterizado) a reprodutibilidade não foi boa, os coeficientes foram de 44% e 46%. Estes valores indicam uma grande variação entre as leituras conferindo pouca confiabilidade aos dados aferidos.

As leituras em água de drenagem de tanques de combustíveis não foram possíveis, principalmente em função da cor da matriz (castanho). Para este tipo de amostra, com matriz mais complexa e presença de cultura mista, seria necessária a extração prévia do ATP, para que se possa eliminar os efeitos desta matriz. A possibilidade de avaliação de um volume maior de amostra a fim de reduzir o erro também é necessária.

O kit para determinação do ATP por bioluminescência testado neste estudo, na forma como está projetado, não é adequado para estimar o grau de contaminação microbiana da fase aquosa proveniente de tanques de combustíveis. Em virtude das características peculiares desta matriz (água de drenagem) é necessário um kit de ATP que permita a extração prévia das células da matriz.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, www.astm.org_doi:10.1520/E1259-10
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS ASTM D7687 - 11 Standard Test Method for Measurement of Cellular Adenosine Triphosphate in Fuel, Fuel/Water Mixtures, and Fuel-Associated Water with Sample Concentration by Filtration. **ASTM International**, 2010, West Conshohocken, PA, www.astm.org_doi:10.1520/D7687 - 11
- AYCICEK, H.; OGUZ, U. & KARCI, K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 209 (2): 203–206, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.09.007>
- BELL, C.; BOWLES, C.D.; TOSZEGHY, M.J.K. & NEAVES, P., Development of a hygiene standard for raw milk based on the lumac ATP-bioluminescence method. **International Dairy Journal**, 6 (7): 709–713, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)00007-6](http://dx.doi.org/10.1016/0958-6946(96)00007-6)
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, 47(2), 107-112, 2001.
- BENTO, F.M.; BUCKER, F.; SANTESTEVAN, N.; CAVALCANTI, E.H.S.; ZIMMER, A. GAYLARDE, C.; CAMARGO, F. Impacto da adição do biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: Um enfoque microbiológico e controle. **Revista Biodiesel**, 47; Caderno técnico, 2010.
- BURGOS, C., MURILLO, L., GUTIÉRREZ, I. & ARIAS, J. Comparación de los métodos de bioluminiscencia y recuento en placa como control de calidad en producto terminado de bebida de malta y refrescos pasteurizados en una empresa de Bogotá D.C. **Revista de La Facultad de Farmacia**, 43: 25-28, 2002.
- BUSHNELL, C. D. & HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, 41, 654-674, 1941.
- CAPUTO, P.; FERRI, E. N.; GIROTTI, S.; GOZZI, S.; & SARACINO, P. Application of luminescent ATP rapid checks at ready-to-eat foods producing plant. **Czech Journal of Food Sciences**, 29(4): 382-390, 2011.
- CHEN, F.C. & GODWIN, S.L. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. **Journal of Food Protection**, 69: 2534-2538, 2006.
- DESJARDINS, E., & BEAULIEU, C. Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, 30: 141-145, 2003.
- DOCKENS, K. & HUGHES, B. Bacteria in Sales Oil Transmission Lines; Can we know for sure? Disponível em <http://www.luminultra.com/images/Docs/bacteria-in-sales-oil-transmission-lines-can-we-know-for-sure-final-dec-2011.pdf>
-

-
- DODOS, G. AND ZANNIKOS, F., "Microbiological Growth Study of Biodiesel Fuel," *SAE Int. J. Fuels Lubr.* 6(2):419-429, 2013, doi:10.4271/2013-01-1148.
- DODOS, G.S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S. & ZANNIKOS F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Global NEST Journal**, 14(2), 175-182. 2012. Disponível on line em http://www.gnest.org/journal/Vol_14_no_2/175-182856NRG10_Dodos_14-2.pdf.
- ENGLISH, E & LINDHARDT, C. Important technical considerations when evaluating bioluminescence as a field test for the determination of microbial contamination of petroleum fuels and other matrices in the field. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the 11th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; Prague, Czech Republic, October, 2009. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD
- ENGLISH, E & LINDHARDT, C. Important technical considerations when contemplating bioluminescence an analytical tool for the determination of microbial contamination of petroleum fuels and other matrices. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the 11th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels**; Prague, Czech Republic, October, 2009. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD
- ENGLISH, E & LINDHARDT, C. & PASSMAN, F.J. Preliminary assessment of the repeatability and reproducibility of adenosine triphosphate test results from fuel and bottom water samples. In: **IASH 2007- 10th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Tucson, Arizona, October, 7-11, 2007.
- EYDAL, H.S.C. PETERSEN, K. Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 3–1000 m. **Journal of Biological Methods**, 70:363-373. 2007.
- FUKUDA, S., TATSUMI, H., IGIMI, S., YAMAMOTO, S. Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken meat samples. **Letters in Applied Microbiology**, 41: 379-384, 2005.
- GEVA, J. GEISSMANN, E. ITTAH, E.; NAKDIMON, I.; SAPIR, Y. & FASS, R. ATP analyses as a tool to determine the need to clean the fuel tanks of diesel motivated vehicles before refouling with biocides and stability improving additives. In: **IASH 2007- 10th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Tucson, Arizona, October, 7-11, 2007.
- GEVA, Y. GEISSMANN, E. SAPIR, Y. & FASS, R. The use of an ATP kit to determine fuel tank's contamination level. In: **IASH 2007- 10th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Tucson, Arizona, October, 7-11, 2007.
- KEASLER, V.; BENNETT, B.; BROMAGE, B.; LINDEMUTH, P.; WHALEN, P. A. (2009). Utilization of an ATP Assay for Enumeration of Bacteria in Oil. **ISMOS-2 Conference 2009**.
- KEASLER, V; BENNETT, B; KELLER, C; WHALEN, P; CAIRNS, J (2011). Expanding the microbial monitoring toolkit: Evaluation of traditional and molecular monitoring methods. **ISMOS-3 Conference**, 2011.
-

-
- KUPSI, B.; CEYLAN, E. & STEWART, C. Performance Evaluation of Various ATP Detecting Units. report done by Silliker Inc. **Food Science Center Report RPN 13922**, 2010. Disponível em <http://pmr.mx/files/ReporteSillikerDocumento.pdf>
- LA DUC, M. T., DEKAS, A., OSMAN, S., MOPISS, C., NEWCOMBE, D., & VENKATESWARAN, K. (2007). Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments, **Appl. Environ. Microb.** 73(8): 2600-2611.
- LAHTINEN, T., KOSONEN, M., TIIROLA, M., VUENTO, M., AND OKER-BLOM, C. (2006). Diversity of bacteria contaminating paper machines, **J. Ind. Microbiol Biot.** 33(9), 734-740.
- LEHTO, M.; KUISMA, R.; MÄÄTTÄ, J.; KYMÄLÄINEN, H. R. & MÄKI, M. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. **Food Control**, 22, 469-475, 2011.
- MURPHY, S. C. ; KOZLOWSKI, S. M. ; BLANDER, D. K. ; BANDLER, D.K. & BOOR, K. J. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for troubleshooting fluid milk shelf-life problems. **Journal Food Science**, 81(3): 817-820, 1998.
- MURRAY, H.D.; SCHNEIDER, D.A. & GOURSE, R.L. Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and non-redundant. **Mol. Cell**, 12: 125-134, 2003.
- NILSSON, H. O., BLOM, J., AL-SOUD, W. A., LJUNGH, A., ANDERSEN, L. P., AND WADSTROM, T. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*, **Appl. Environ. Microb.** 68(1), 11-19, 2002.
- OGDEN, K. Practical experiences of hygiene control using ATP-bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**, 99: 389-393, 1993.
- OQVIST, C. C., KUROLA, J., PAKARINEN, J., EKMAN, J., IKAVALKO, S., SIMELL, J. & SALKINOJA-SALONEN, M. Prokaryotic microbiota of recycled paper mills with low or zero effluent, **J. Ind. Microbiol Biot.** 35, 1165- 1173, 2008.
- PACHELLO C. Adenosine Triphosphate (ATP) Rapid Testing for Water and Rinse Water Hygiene, **Chair**. Pages 278-280, 2011.
- PASSMAN, F. J. & EACHUS, A. C. (2007), "Adenosine Triphosphate as a Rapid Measure of Microbial Contamination in Fuel Systems," In: Bartz, W.J. (Ed.), "**Fuels 2007—6th International Colloquium**." Technische Akademie Esslingen, Ostfildern, Germany, pp 689-695.
- PASSMAN, F. J. Using Adenosine Triphosphate to Quantify Bioburdens in Various Liquid Fuels *In: Morris, R.E. (Ed.), Proceedings of the 11th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels*; Sarasota, Florida, USA, October, 2009. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD.
- PASSMAN, F.J., ENGLISH, E., LINDHARDT, C., 2007. Using adenosine triphosphate as a measure of fuel treatment microbicide performance. In: Morris, R.E. (Ed.), **Proceedings of the 10th International Conference on the Stability and Handling**
-

-
- of Liquid Fuels**; Tucson, Arizona, USA, October 7e11, 2007. The international Society for Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Washington. on CD
- PASSMAN, F.J., Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 81, 88-104, 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002>
- RIBEIRO, N. J; CERQUEIRA J; SANTOS, P.& LOUZÃ A. Validação interna de um método de ensaio baseado em ATP para a monitorização da higiene de superfícies de aço inox na indústria dos laticínios. **RPCV** 97(542): 71-80, 2002.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E. & BLANCO, R. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, 57 (3): 489-504, 2009.
- SAMKUTTY, P.J.; GOUGH, R.H.; ADKINSON, R.W.; MCGREW, P. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence. **Journal of Food Protection**, 64: 208-212, 2001.
- SIRAGUSA, G.R. & CUTTER, C.N. Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. **Journal of Food Protection**; 58:764-769, 1995.
- STANLEY, P. A. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, 4 (1): 375–380, 1989.
- TEBBUTT, G.; BELL, V. & AISLABIE, J. Verification of cleaning efficiency and its possible role in programmed hygiene inspections of food businesses undertaken by local authority officers. **Journal of Applied Microbiology**, 102: 1010-1017, 2007.
- TURNER, D.E., DAUGHERITY, E.K., ALTIER, C., MAURER, K.J., Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.** 49, 190–195, 2010.
- UKUKU, D.O., SAPERS, G.M., FETT, W.F. ATP bioluminescence assay for estimation of microbial populations of fresh-cut melon. **J. Food Prot.** 68, 2427–2432, 2005.
- VAN CROMBRUGGE J, WAES G, REYBROEK W. The ATP-F test for estimation of the bacteriological quality of raw milk. **Neth. Milk Dairy J.** 1989; 43:347
- VANSTAEN, H. Applicability of bioluminescence for rapid detection of viable microorganisms. **Laboratory Practice**, 29, 12. 1980.
- VILAR, M. J.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L.; DIÉGUEZ, F. J.; SANJUÁN, M. L. & YUS, E. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. **International Journal of Food Microbiology**, 125: 357-361, 2008.
- YAN, S.-L., MIAO, S.-N., DENG, S.-Y., ZOU, M.-J., ZHONG, F.-S., HUANG, W.-B., PAN, S.-Y. AND WANG, Q.-Z. ATP bioluminescence rapid detection of total viable count in soy sauce. **Luminescence**, 27: 34–38 2011. doi: 10.1002/bio.1321
-

CAPÍTULO VI

Toxicidade de uma fase aquosa de armazenamento simulado com a mistura B10, tratada com um antimicrobiano (MBO 50%).

Toxicidade de uma fase aquosa de armazenamento simulado com a mistura B10, tratada com um antimicrobiano (MBO 50%).

RESUMO

Este trabalho apresenta a avaliação da toxicidade em dois níveis tróficos de uma fase aquosa durante o armazenamento simulado da mistura B10 tratada com um biocida (MBO 50%). Para a realização do teste foi simulado o armazenamento da mistura B10 (fase oleosa) tratada com as seguintes concentrações 0% (**Controle**), 0,05% e 0,1% de biocida e com 5% de fase aquosa, durante 1, 10, 20 e 30 dias. Após tempo determinado (24h, 10, 20 ou 30 dias) a água foi coletada e utilizada nos experimentos como substância teste sem qualquer diluição para análise da toxicidade. As espécies *Lactuca sativa* L. (alface) e *Artemia salina* Leach (micro-crustáceo) foram usadas como organismos-teste nos bioensaios. Foram determinados o efeito da substância teste sobre a sobrevivência (imobilidade) do micro-crustáceo *A. salina* e sobre a germinação das sementes e crescimento das raízes de *L. sativa*. Os resultados mostram que tanto a água que esteve em contato com o combustível não tratado, quanto aquela que esteve em contato com o combustível tratado apresentaram toxicidade para os organismos estudados. Porém, a água que esteve em contato com o combustível tratado com o biocida mostrou alta toxicidade aguda para ambos os organismos-teste utilizados.

Palavras-chave: Misturas diesel/biodiesel, água residual, toxicidade, biocida.

6.1 INTRODUÇÃO

Durante o armazenamento de combustíveis é comum o aparecimento de uma fase de água livre no fundo dos tanques. Esta água se forma, principalmente por condensação da umidade do ar nas paredes, vazamentos ou ainda pode acompanhar o combustível. A presença de água nos tanques favorece a proliferação de microrganismos que degradam o combustível. Como consequência ocorre a perda de qualidade do produto e outros problemas de ordem operacional tais como entupimento de filtros e corrosão dos tanques e tubulações. Após a adição do biodiesel ao diesel (mistura denominada Diesel B), estes problemas se intensificaram, principalmente devido à natureza higroscópica do biodiesel que absorve mais água e também a baixa complexidade desta molécula que pode ser mais facilmente degradada por microrganismos (Sorensen et al., 2011).

Uma das alternativas para controlar o desenvolvimento microbiano nos tanques de armazenamento de combustíveis é a drenagem periódica dos mesmos e/ou o uso de antimicrobianos. Um antimicrobiano indicado para uso em combustíveis é o 3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine) também denominado MBO. Nos EUA e Europa estes compostos vêm sendo utilizados principalmente no controle da contaminação de combustíveis de aviação (Passman, 2013). No Brasil o uso destes antimicrobianos para proteção de combustíveis ainda não é uma prática, principalmente em função da falta de informações sobre seu impacto no ambiente. Atualmente existe uma grande preocupação dos órgãos legisladores e também das empresas distribuidoras de combustíveis com problemas ambientais decorrentes de derrames acidentais ou vazamentos de combustível. Esta preocupação se justifica porque muitos antimicrobianos recomendados para uso em combustíveis apresentam solubilidade tanto na fase combustível quanto na fase aquosa. As frações do antimicrobiano que permanecem na fase combustível podem desaparecer sem maiores danos ambientais, durante a queima deste no motor (Siegert, 2009). Para se obter a aprovação do uso de um produto biocida além de vários outros testes é necessária a avaliação das emissões, pois é preciso comprovar que sua adição ao combustível não gera mais poluentes. Porém, as frações que migram para a fase aquosa também

necessitam de uma atenção especial, uma vez que esta fase pode ter um destino irresponsável, sendo liberada diretamente em diferentes compartimentos ambientais.

Na maioria dos postos de combustível, por exemplo, os resíduos líquidos passam apenas por caixas separadoras com a finalidade de retirar o material grosseiro e separar água e óleo. O efluente líquido resultante não recebe qualquer tipo de tratamento, sendo despejado diretamente no esgoto pluvial ou em corpos hídricos próximos (Eras et al. 2011). Mesmo quando ocorre o monitoramento do efluente, a verificação destas amostras se dá através das análises físico-químicas indiretas e inespecíficas de carbono orgânico, presença de sedimentos, temperatura e pH (Martins, 2007; Vasconcelos, 2009). Estas análises, no entanto, não distinguem entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente, sendo insuficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (Ronco et al., 2004). Baseados na Resolução Nº 357 de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) – que “dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências”, os órgãos ambientais estaduais já estão exigindo, por meio de Portarias e Resoluções estaduais, que as empresas atendam aos limites de toxicidade estabelecidos para efluentes. Ainda, a recentemente lançada Resolução Nº 430 de 2011 do CONAMA, reforça a competência dos órgãos estaduais para definirem as atividades e realizarem o controle dos critérios estabelecidos para efluentes com potencial tóxico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade aguda de uma fase aquosa durante o armazenamento simulado da mistura B10 tratada com um biocida que apresenta um antimicrobiano em sua composição, utilizando técnicas de bioensaio com as espécies *Lactuca sativa* L. (alface) e *Artemia salina* Leach (microcrustáceo) como organismos-teste.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A ecotoxicidade da fase aquosa durante o armazenamento simulado da mistura B10 tratada com biocida foi estimada usando o teste de mobilidade de *A.*

salina e o teste de germinação de sementes de 5 dias.

Microcosmos: Para simular a estocagem da mistura B10 tratada com o biocida, foram montados frascos de vidro, com capacidade para 5,0 L contendo 4,95 L da mistura B10 (90% diesel S50 e 10% biodiesel - soja e sebo 25:75) não estéril e 50 mL de água ultrapura. Desta forma simulou-se um armazenamento com 5% de água (v/v).

Antimicrobiano: Foi utilizado um aditivo multifuncional com o antimicrobiano que tem como ingrediente ativo 3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine) conhecido pela sigla MBO, na concentração de 50%.

Tratamentos: Para cada tempo amostral, um conjunto de 3 frascos recebeu 4.950 mL combustível tratado com 0%, 0,05 ou 0,1% do aditivo contendo o biocida MBO e 50 mL de água ultrapura. Os tratamentos foram denominados **A** (água ultrapura com combustível B10 **sem biocida** - 0%); **B** (água ultrapura com combustível B10 tratado com 0,05% de biocida) e **C** (água ultrapura com combustível B10 tratado com 0,1% de biocida). Os tempos amostrais foram 1, 10, 20 e 30 dias. Todos os frascos foram mantidos abrigados da luz e em temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Ao final de cada tempo amostral toda a fase aquosa (50 mL) foi retirada dos frascos com auxílio de uma pipeta de vidro e utilizada como **substância teste** nos ensaios de toxicidade sem qualquer tipo de diluição.

6.2.1 Análises de ecotoxicidade

As análises ecotoxicológicas foram realizadas a partir de bioensaios agudos utilizando como organismo-teste o micro crustáceo *Artemia salina* Leach e a planta *Lactuca sativa* L. (Alface).

6.2.1.1 Bioensaio de imobilidade da *A. salina*: O micro-crustáceo de água salgada *A. salina*, destaca-se por compor um bioensaio de toxicidade de baixo custo, rapidez na obtenção dos resultados e por não exigir técnicas assépticas. Apesar da sensibilidade do gênero *Artemia* ser bastante variável quando submetida a diferentes tipos de águas residuais (Guerra, 2001; Campos et al., 2002; Aggelis et al., 2003; Svensson et al., 2005; Souza et al., 2007; Santana & Machado, 2008; Pimentel et al., 2009), esse organismo ainda é muito

utilizado e recomendado em testes de toxicidade. Costa et al.(2008) chamam atenção para facilidades conquistadas quando se elege *Artemia* sp. como organismo-teste, uma vez que os cistos são facilmente adquiridos em qualquer loja de suprimentos para aquários.

Controle da sensibilidade dos organismos-teste: O controle do nível de sensibilidade dos organismos é necessário para assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados conforme a ISO 6341 (1996). Para isso, foram realizados ensaios de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) da marca Sigma Aldrich[®]. Foram considerados aptos para utilização nos testes de toxicidade lotes com neonatos que apresentassem uma CE_{50} , 24h (concentração efetiva média em 24h), entre 0,6 e 1,7 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ (ISO, 1996).

Metodologia: A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *A. salina* foi baseada em Meyer et al.(1982), Nascimento et al. (1999) e Normas da CETESB-SP (1991).

Eclosão dos cistos de *A. salina*: Cistos de *A. salina* de alta eclosão da marca MARAMAR PET[®], vendidos sob o nome “Ovos de Alta Eclosão” foram adquirido em loja de suprimentos para aquário. A eclosão dos cistos *A. salina* foi realizada em um funil de separação contendo 250 mL de uma solução de sal marinho a 3,5%, onde foram adicionados 0,1g de cistos. O funil foi mantido sob iluminação e aeração constantes, durante 48 horas. Após esse tempo, os nauplios eclodidos foram separados com pipetas *Pasteur* e transferidos para placas de petri, contendo 500 μ L da solução de sal marinho onde foram eclodidos e 500 μ L da solução a ser testada, na quantidade de 10 exemplares por placa (Garcia-Rodriguez et al., 2004; Rodriguez et al., 2009).

Delineamento experimental: Um frasco contendo 15 mL da amostra a ser testada recebeu 0,525g de sal marinho a fim de manter os condições de salinidade ideais para o cultivo de *A salina*. Após, 5 mL da amostra salinizada foi transferida para frascos de polipropileno com capacidade para 15mL. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, 10 nauplius recém eclodidos foram transferidos para cada frasco. Os frascos foram cobertos com papel alumínio e mantidos sob iluminação, a contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 48h sob estéreomicroscópio (OPTECH BEL EB 40). Foram determinados como mortos

aqueles animais que não apresentavam movimento num intervalo mínimo de 10 segundos. A sobrevivência em cada réplica foi calculada pela fórmula:

$$M (\%) = \frac{\text{Número de organismos vivos}}{\text{Número total de organismos no tubo}} \times 100$$

O percentual final de sobrevivência em cada tratamento foi calculado pela média das três réplicas. A toxicidade da substância teste foi classificada como não tóxica (mortalidade $\leq 10\%$), baixa toxicidade (mortalidade $> 10\%$ e $\leq 50\%$), moderada toxicidade (mortalidade $> 51\%$ e $\leq 80\%$) e alta toxicidade (mortalidade $> 80\%$). Os critérios que definiram esta classificação seguem o seguinte raciocínio, uma vez que é definida uma sobrevivência mínima de 90% para que os testes de toxicidade sejam válidos (EPA, 2002; Khan et al., 2007) uma mortalidade $\leq 10\%$ caracteriza uma substância não tóxica para os organismos. Da mesma forma, como os resultados dos ensaios de toxicidade são em sua grande maioria apresentados como CL_{50} (concentração letal capaz de matar/ imobilizar 50% da população), considerou-se que uma mortalidade $> 10\%$ e $\leq 50\%$ caracteriza uma baixa toxicidade para uma substância não diluída. O controle do teste foi constituído pela mesma solução salina utilizada para a eclosão dos nauplios.

6.2.1.2 Bioensaio de germinação de Sementes: Os bioensaios de germinação de sementes e crescimento da raiz têm sido utilizados como uma técnica simples rápida e reprodutível para avaliar o dano causado por compostos tóxicos presentes no ambiente (Wang & Keturi 1990; Gopalan, 1999). Muitas espécies, incluindo *L. sativa* têm sido recomendadas para testes de fitotoxicidade (USEPA, 1982; FDA 1987). Esta espécie é considerada um padrão para uso em testes fitotoxicológicos devido à sua moderada sensibilidade e alta frequência (ATSM 2003; Wang 1992). O *National Water Research Institute*, no Canadá (Dutka, 1989), recomenda o emprego de sementes de alface em testes de toxicidade de efluentes, solos ou sedimentos, devido ao crescimento rápido e a pouca reserva de energia necessária para sua germinação. Nestes testes, comumente avalia-se a inibição do processo germinativo e o alongamento das

raízes, que ocorre na presença de pequenas concentrações do composto tóxico, tornando este organismo um indicador mais sensível aos efeitos biológicos.

Os testes de fitotoxicidade foram conduzidos segundo a metodologia descrita em Sobrero & Ronco (2004). Foram utilizadas sementes de alface (*L. sativa*) da marca ISLA. O produto é vendido em supermercados sob o nome de Alface Itapuã 401. As sementes de teste foram selecionadas para um tamanho uniforme após triagem visual.

Delineamento experimental: O teste de germinação de sementes foi preparado colocando-se 10 sementes em placas de petri de vidro (93x 50 mm) forradas com papel filtro e contendo 4 pequenos pedaços de algodão que serviram para manter a umidade dentro de cada placa. Após, 10 mL da substância teste foi homogeneamente distribuída na placa de modo a encharcar o papel e os algodões. Cada placa foi então vedada com filme plástico e mantida em temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), no escuro por 5 dias. Três repetições foram preparadas para cada amostra. No quinto dia as sementes germinadas foram contadas e o comprimento das raízes de cada um dos exemplares foi medido com régua. Os valores finais para cada um dos parâmetros avaliados foram obtidos pela média das três réplicas dos tratamentos. A porcentagem de germinação das sementes e alongamento radicular de *L. sativa* em água ultrapura também foram medidos e utilizados como controle (Tiquia et al, 1996; Tiquia & Tam, 1998; Bágur-Gonzales et al., 2010). Para efeitos deste teste, a germinação foi considerada bem sucedida se o comprimento da raiz principal foi igual ou maior que 3 mm (Bowers et al, 1997). Os dados foram utilizados para estabelecer três índices de toxicidade, índice de germinação de sementes (IS) e índice de alongamento da raiz (AR), conforme estabelecido por (Bágur –Gonzales et al., 2010) e o índice de germinação (IG) (Zucconi et al 1981).

$$\text{IS} = \frac{\text{Germ}_{(\text{amostra})} - \text{Germ}_{(\text{controle})}}{\text{Germ}_{(\text{controle})}}$$

Onde, $\text{Germ}_{(\text{amostra})}$ é a média do número de sementes germinadas nos tratamentos (%) e $\text{Germ}_{(\text{controle})}$ a média do número de sementes germinadas no controle (%).

$$AR = \frac{\text{Along}_{(amostra)} - \text{Along}_{(controle)}}{\text{Along}_{(controle)}}$$

Onde, $\text{Along}_{(amostra)}$ é a média do comprimento das raízes nos tratamentos (cm) e $\text{Along}_{(controle)}$ a média do comprimento das raízes no controle (cm).

Estes índices podem variar entre -1 (fitotoxicidade máxima) a > 0 . Sendo o potencial de toxicidade aguda classificado como baixa (0 a -0,25); moderada (-0,25 a -0,5), elevada (-0,5 a -0,75) e muito elevada (-0,75 a -1). Caso haja uma redução de 50% na variável estudada (IS ou AR) em relação ao controle (branco) (IS_{50} ou AR_{50}), considera-se como uma medida do potencial de "Toxicidade crônica" devido à influência de longo prazo destes poluentes sobre o meio ambiente. Os valores de $AR > 0$ indicam estimulação do crescimento da semente (Bágor –Gonzales et al., 2010).

Também foi utilizado o índice de germinação (IG) que é obtido através da equação abaixo. Este índice combina o percentual de germinação da semente (GS) com o percentual de crescimento da raiz (CR) e tem se mostrado o parâmetro mais sensível, capaz de detectar níveis baixos de toxicidade que afetam o crescimento das raízes, bem como níveis elevados de toxicidade, que afetam a germinação (Tiquia & Tam, 1998).

$$GS = \frac{\text{Número de sementes}_{(amostra)}}{\text{Número de sementes}_{(controle)}} \times 100$$

$$CR = \frac{\text{Comprimento da raiz}_{(amostra)}}{\text{Comprimento da raiz}_{(controle)}} \times 100$$

$$IG = \frac{GS \times CR}{100}$$

De acordo com este cálculo um índice de germinação (IG) de 20% indica alta toxicidade, um índice de germinação entre 70% e 80% indica baixa toxicidade e Índices $\geq 80\%$ indicam ausência de toxicidade (Zucconi et al., 1981; Tiquia & Tam, 1998).

6.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando o teste de Tukey a um nível de significância de 95%, utilizando o programa Statistica 7.1.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Teste de toxicidade frente a *A. salina*

Os percentuais de mortalidade de *A. salina* observados para as diferentes concentrações de uso do aditivo com ação biocida podem ser observados na Figura 6.1.

Os resultados dos testes de ecotoxicidade são geralmente expressos como, CL_{50} (concentração letal inicial mediana) ou FT (fator de toxicidade). Atualmente, no Rio Grande do Sul, a resolução 129/2006 do CONSEMA, prevê padrões de toxicidade de efluentes líquidos de fontes poluidoras estabelecidos como Fator de toxicidade (FT) (CONSEMA, 2006). O FT representa o menor valor de diluição da amostra na qual não se observa imobilidade maior que 10% nos organismos expostos (Rodrigues & Pawlowski, 2007). Este índice (FT) é representado por um número inteiro, que corresponde a menor diluição da amostra que não cause efeito tóxico aos organismos (ABNT 12713). No caso dos testes realizados neste experimento o objetivo foi avaliar o efeito das concentrações de uso do biocida sobre toxicidade da água que se forma no fundo dos tanques de armazenamento e que deve ser drenada em intervalos regulares. Por esta razão, optou-se por não diluir as amostras e apresentar os resultados obtidos nos testes com *A. salina* em percentual de mortalidade.

A mortalidade de *A. salina* no tratamento CONTROLE (água ultrapura salinizada (35g.L^{-1}), **sem** contato com combustível ou biocida) foi de 10%, o que confirma a validade do teste. A mortalidade no tratamento **A** (água ultrapura e mistura B10) foi 20%, após 24h e 40% após 30 dias, indicando que o efluente gerado apresenta baixa toxicidade para *A. salina* e que esta toxicidade tende a ser maior conforme o tempo de contato entre a água e a mistura B10 aumenta. Nos tratamentos **B** e **C** a mortalidade após 24h foi de 90% e 100% respectivamente.

Após 10 dias a mortalidade observada em ambos os tratamentos foi de 100%, caracterizando a substância teste como altamente tóxica para *A. salina*. A comparação das médias por um teste Tukey mostra uma diferença significativa ($p < 0,05$) na mortalidade observada para *A. salina* entre a amostra que ficou em contato com o combustível não tratado (A) e as amostras que entraram em contato com o combustível tratado com o biocida (B e C).

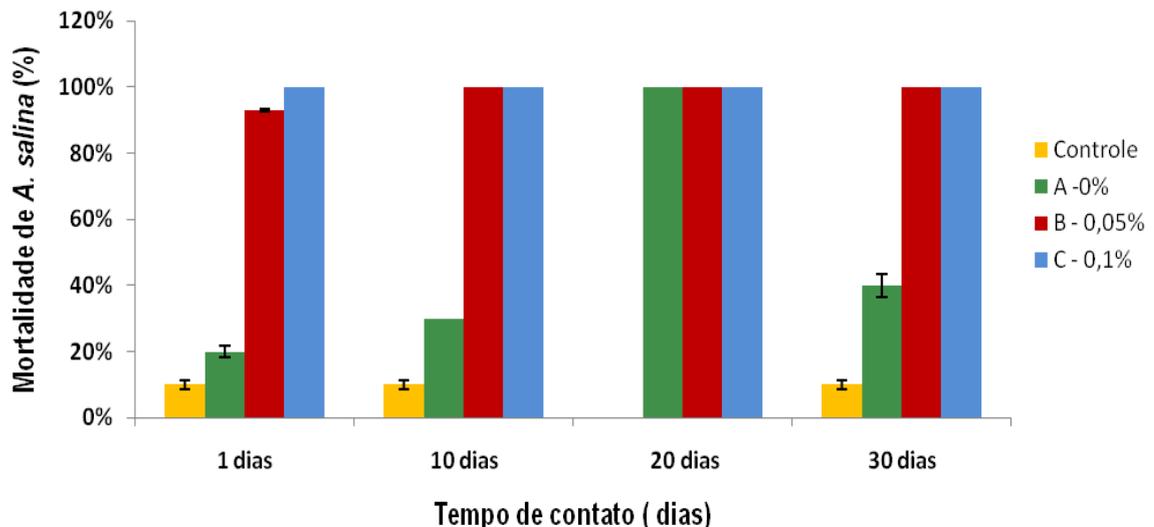


Figura 6.1: Mortalidade de *A. salina* exposta a uma fase aquosa em contato com combustível tratado com o aditivo com biocida. **Controle:** água ultrapura salinizada (35g.L^{-1}) sem contato combustível ou biocida); **A** - água ultrapura e combustível não tratado; **B** - água ultrapura e combustível tratado com 0,05% de aditivo; **C** - água ultrapura e combustível tratado com 0,1% de biocida.

6.3.2 Bioensaio de germinação Sementes com *L. sativa*

Para o teste de germinação de sementes, três diferentes índices foram utilizados como parâmetro para estimar a fitotoxicidade da água que entrou em contato com o combustível tratado com o biocida, o índice de germinação de sementes (SG), o índice de alongamento da raiz (RE) (Báгур –Gonzales et al., 2010) e o índice de germinação (GI). Os três índices mostraram boa concordância para a estimativa da toxicidade da substância testada. A precisão analítica e a variabilidade da sensibilidade dos organismos foram avaliadas através do coeficiente de variação que é calculado como $CV(\%) = ((\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100)$ (Perina, 2009).

Os resultados dos testes de germinação das sementes estão resumidos na tabela 6.1.

Tabela 6.1. Parâmetros medidos e os índices de toxicidade para bioensaio com *L. sativa* L.

<i>Lactuca sativa</i> L.								
AMOSTRA	Germinação (%)	Comprimento (cm)	CV (%)	GI%	IS	AR	Toxicidade	
CONTROLE	1 dia	90	3,22 ± 0,27	8,68	-	-	-	-
	10 dias	90	3,22 ± 0,27	8,68	-	-	-	-
	20 dias	83	3,37 ± 0,36	10,68	-	-	-	-
	30 dias	90	3,22 ± 0,27	8,68	-	-	-	-
BIOCIDA 0% (A)	1 dia	80	2,61 ± 0,53	22,94	72,27	-0,186	-0,111	Baixa
	10 dias	40	1,89 ± 0,42	22,22	26,08	-0,413	-0,555	Moderada/ alta
	20 dias	40	1,64 ± 0,34	2,07	23,36	-0,513	-0,519	alta
	30 dias	30	1,12 ± 0,17	15,17	11,59	-0,652	-0,666	alta
BIOCIDA 0,05% (B)	1 dia	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
	10 dias	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
	20 dias	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
	30 dias	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
BIOCIDA 0,1% (C)	1 dia	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
	10 dias	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
	20 dias	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta
	30 dias	0	0	0	0	-1	-1	Muito alta

^a Valores médios; ^b desvio padrão

A toxicidade da água que entrou em contato como combustível não tratado (A) foi considerada baixa nas primeiras 24h, moderada até 10 dias de contato e alta entre 20 e 30 dias de contato. Nos tratamentos B e C (0,05 e 0,1% de biocida), ambos os índices informam uma alta toxicidade da substância teste sobre *L. sativa*.

Os coeficientes de variação calculados foram satisfatórios uma vez que os estudos ecotoxicológicos são considerados com uma boa reprodutibilidade

quando a variação dos resultados, expressa pelo coeficiente de variação (CV) é menor que 30 % (Environment Canadá, 2007).

6.4 DISCUSSÃO

Nas condições deste estudo, a fase aquosa que esteve em contato com a mistura B10 não tratada com o aditivo contendo biocida mostrou-se tóxica para os organismos teste utilizados, *A. salina* e *L. sativa*, sendo observado que a toxicidade aumentou ao longo do tempo de contato com a mistura. De fato, dados da literatura mostram que algumas frações do diesel, solúveis em água, podem ser bastante tóxicas para os organismos aquáticos (Peterson & Muller, 2006; Khan et. al., 2007; DeMello et. al., 2007; Silva et. al., 2007; Hollebhone et. al., 2008, Muller et al, 2011). O petrodiesel é composto por hidrocarbonetos e frações de alguns compostos monoaromáticos como BTEX, alguns policíclicos aromáticos HPAs (naftaleno e fenantreno, por exemplo), fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre além de alguns metais como cobre e níquel que podem se solubilizar na água (Saeed & Al-Mutairi, 1999; Silveira et al.2006; Rodrigues et al 2010). Portanto a água que entra em contato com este combustível pode apresentar um perfil tóxico para organismos aquáticos como demonstrado nos estudos de Rayburn et al. (1996) com embriões de camarão, Silva et al. (2007) com o peixe *Danio rerio*, Muller et al. (2011) com o microcrustáceo *Daphnia magna* e Khan et al. (2007) com o microcrustáceo *D. magna* e o peixe *Oncorhynchus mykiss*.

Estudos recentes têm sugerido que a adição do biodiesel ao diesel de petróleo pode reduzir a toxicidade aquática do combustível, sendo esta redução melhor observada com misturas acima de 20% de biodiesel no diesel (Leme et al. 2011). Khan et al. (2007) utilizaram o microcrustáceo *D. magna* e o *O. mykiss* (truta arco-iris) para investigar a toxicidade aquática de frações solúveis em água (FSA) de diferentes misturas de diesel e biodiesel, assim como diesel e biodiesel puros. Eles demonstraram que a toxicidade da água para estes organismos foi reduzida à medida que a proporção de biodiesel na mistura aumentava. Outros estudos (DeMello et al. 2007, Silva et al. 2007 e Hollebhone et al. 2008) também relatam a redução dos efeitos tóxicos agudos para FSA de misturas de diesel e

biodiesel maiores que B5. De acordo com Leme et al. (2011) esta redução da toxicidade em ambiente aquático ocorre porque há uma redução da solubilidade dos HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) com o aumento da proporção do biodiesel ao diesel. Segundo Hollebone et al. (2008), a solubilidade do diesel e do biodiesel puros em água são muito semelhantes. Com o auxílio de análises cromatográficas, os autores detectaram a presença de componentes dos dois combustíveis (diesel e biodiesel) na água que esteve em contato com a mistura (B5 ou B20) em proporções semelhantes ao volume de cada combustível na mistura. Ainda de acordo com Hollebone et al. (2008), a toxicidade do biodiesel puro é de 5 a 10 vezes menor que a do diesel puro, mas esta redução está associada aos componentes de cada combustível que se solubilizam em água.

No caso do biodiesel, apenas alguns ácidos graxos se solubilizam em água e uma vez que a composição de ácidos graxos dos biodieseis está associada ao tipo de óleo empregado na sua produção, biodieseis produzidos a partir de diferentes fontes apresentam diferentes perfis tóxicos. Pereira et al. (2012) e Leite et al. (2011), também observaram a presença de metanol na matriz aquosa que esteve em contato com as misturas de diesel e biodiesel, encontrando uma correlação positiva entre a quantidade de metanol observada e a quantidade de biodiesel na mistura. Segundo os autores, o metanol aparece na matriz aquosa como produto da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos que compõem o biodiesel. Apesar de ser considerado tóxico para a biota (Leite et al., 2011), a presença do metanol não interfere na toxicidade do biodiesel (Pereira et al., 2012).

Em nossos resultados, a mortalidade observada para *A. salina* em água que esteve em contato com o combustível não tratado por 30 dias foi menor que 50%, indicando uma baixa toxicidade da substância teste sobre este organismo. Para *L. sativa*, na mesma condição, a toxicidade foi considerada alta. As diferenças observadas na classificação da toxicidade para a substância teste sobre os organismos estudados é considerada normal, uma vez que nem todas as formas de vida apresentam a mesma susceptibilidade a uma mesma substância tóxica (Fernandez-Alba et al. 2001).

Com a adição de 0,5 e 0,1% do biocida a mistura B10, os resultados evidenciaram um aumento significativo na toxicidade aguda da água que esteve

em contato com o combustível tratado. Nestas condições não foi observada, sobrevivência para *A. salina* nem germinação de *L. sativa* em todos os tempos amostrais. Resultado semelhante também foi observado por Rangel (2012), que realizou experimentos semelhantes ao deste estudo utilizando o mesmo antimicrobiano.

O aumento na toxicidade observada nos tratamentos com adição de 0,5 e 0,1% do biocida a mistura B10 pode estar diretamente relacionado à migração de compostos químicos presentes no biocida para a fase aquosa. O biocida utilizado no estudo é composto por diversas substâncias químicas, responsáveis pela garantia de diferentes propriedades do combustível, tais como, estabilidade oxidativa, inibidores de corrosão, anti - congelantes entre outros. Siegert, (2009), trabalhando com um sistema de óleo água (10:1), onde foi adicionado 0,02% de MBO (ingrediente ativo puro) ao combustível, observou que após 8 horas de contato, foi possível identificar uma concentração de 0,15% de MBO na água. Conforme este estudo pode-se supor que ao menos o antimicrobiano presente no biocida é capaz de se difundir rapidamente para a fase aquosa, o que é desejável sob o ponto de vista de proteção do combustível do ataque microbiano, mas que pode representar um risco do ponto de vista ambiental. Geralmente as fichas de segurança que acompanham os produtos trazem informações sobre a toxicidade de substâncias puras, não levando em consideração as possíveis interações desta substância com outras que poderiam estar presentes no meio. Os efeitos tóxicos combinados de vários produtos químicos têm recebido grande atenção em ecotoxicologia, pois misturas de produtos químicos podem ter um impacto negativo maior do que os constituintes individuais da mistura. Quando o modo de ação das diferentes substâncias tóxicas são semelhantes ou se uma das substâncias for considerada como um diluente para outras deve-se considerar um efeito biocida que leva a um aumento da toxicidade geral (Backhaus et al., 2002; Fernández-Alba et al., 2002).

6.5 CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, a fase aquosa que esteve em contato com a mistura B10 não tratada com o biocida é tóxica para *A. salina* e *L. sativa* e a toxicidade aumenta com o tempo de contato com a mistura. Para a fase aquosa

que esteve em contato com a mistura B10 tratada com as concentrações indicadas para uso (0,05 e 0,1%) do biocida, a toxicidade aguda frente à *A. salina* e *L. sativa*, é classificada como altamente tóxica, mantendo seu efeito tóxico mesmo após 30 dias. No caso desta fase aquosa atingir o ecossistema aquático ou mesmo o solo, sem prévio tratamento existe a possibilidade de danos ao ecossistema. Os ensaios utilizados neste estudo têm baixo custo, são rápidos e demonstram boa sensibilidade para utilização como uma avaliação rápida da toxicidade para organismos aquáticos onde há risco de dano ambiental proveniente do descarte deste resíduo sem tratamento adequado.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGELIS, G., ICONOMOU, D., CHRISTOU, M., BOKAS, D., KOTZAILIAS, S., CHRISTOU, Z., TSAGOU, V. & PAPANIKOLAOU, S., Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in a bioreactor cultures and biological evaluation of the process. **Water Research**, 37, 3897-3904, 2003. doi: 10.1016/S0043-1354(03)00313-0.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING, MATERIALS- ASTM Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity tests. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, pp 1534–1554, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 12713: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *daphnia spp* (*Cladocera*, *Crustácea*). Rio de Janeiro: p. 17. 2004e.
- BACKHAUS, T., ALTENBURGER, R., BOEDEKER, W., FAUST, M., SCHOLZE, M. & GRIMME, L.H. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19, 2348–2356, 2000.
- BAGUR-GONZÁLEZ, M.G., ESTEPA-MOLINA, C., MARTÍN-PEINADO, F. & MORALES-RUANO, S. J. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **Journal of Soils and Sediments**, 11, 281-289, 2011. DOI 10.1007/s11368-010-0285-4.
- BOWERS, N., PRATT, J. R., BEESON, D. & LEWIS M. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates **Environmental Toxicology and Chemistry**, 16 (2) , 207–213, 1997.
- CAMPOS, J. C., BORGES, R. M. H., OLIVEIRA FILHO, A. M., NÓBREGA, R. & SANT'ANNA Jr., G. L., Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. **Water Research**, 36, 95-10, 2002. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00203-2.
- CETESB. Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com *Artemia*. Norma Técnica L5.021, São Paulo. 1991.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução** nº. 129, de 24 de novembro de 2006. http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/smam/ usu_doc/ resolucao_consema_n129_06.pdf>. Acesso em ago. 2011.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução** 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: www.mma.sp.gov.br/conama/35705 – acesso em out 2012.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução** 430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: www.mma.sp.gov.br/conama/43011 – acesso em out 2012.
- COSTA, C. R., OLIVI, P., BOTTA, C. M. & ESPINDOLA, E. J. G. A. toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, 31(7),1820-1830, 2008.

- DeMELLO, J.A., CARMICHAEL, C. A., PEACOCK, E. E., NELSON, R. K., AREY, J. S. & REDDY, C. M. "Biodegradation and Environmental Behavior of Biodiesel Mixtures in the Sea: An Initial Study". **Marine Pollution Bulletin**, 54, 894 – 904, 2007.
- DUTKA, B. J. Methods microbiological for toxicological analysis of water, wastewater and sediments. **National Water Research Institute**, Burlington, Ontario, Canada, p.127, 1989.
- ENVIRONMENT CANADA. Biological test method: test for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil. Method Development and Applications Section, **Environmental Technology Centre**, Ottawa, ON, Canada, 2007, 1–131.
- ÉRAS, A. C. S.; SOUSA, C. A. & ANDRADE, C. S. Condições ambientais dos postos de combustíveis da cidade de Dourados-MS. In: Anais do II **Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**, Londrina IBEAS, 2011. Disponível em: <http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2011/XI-010.pdf> acesso em mai. 2012.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., HERNANDO, D., AGÜERA, A., CÁCERES, J. & MALATO S. Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. **Water Research**, 36, (17), 4255–4262. 2002 [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00165-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00165-3)
- FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., HERNANDO, M.D., PIEDRA, L. & CHISTI Y. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays **Analytica Chimica Acta**, 456, 289–301, 2001.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Seed germination and root elongation. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.06, the Center for Food Safety and Applied Nutrition and the Center for Veterinary Medicine, **U.S. Department of Health and Human Services**, Washington, D.C. 1987.
- GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutation Research**, 426, 99–102, 1999.
- GUERRA, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**, 44, 1737-1747. 2001.
- HOLLEBONE, B. P., FIELDHOUSE, B. & LANDRIAULT, M. (2008). "Aqueous Solubility, Dispersibility and Toxicity of Biodiesels". In Anais da **20th International Oil Spill Conference**, Savannah, Georgia, USA, 2008, 929 – 35.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6341: Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Stratus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test**. USA: ISO. 1996.
- KHAN, N., WARITH, M. & LUK, G. "A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms". **Journal of the Air and Waste Management Association**, 57(3), 286-96, 2007.
- LEITE, M. B. N. L., ARAUJO, M. M. S., NASCIMENTO, I. A., CRUZ, A. C. S., PEREIRA, S.A. & NASCIMENTO, N.C. Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 30, 893–897, 2011.

- LEME, D.M., GRUMMT, T., OLIVEIRA, D.P., SEHR, A., RENZ, S., REINEL, S., FERRAZ, E. R. A., MARCHI M. R. R., MACHADO, M. C., ZOCCOLO, G. J. & MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow_ kit (Litron) assay. **Chemosphere**, 86, 512–520, 2012.
- MARTINS, C.R.O. Avaliação da estrutura dos postos de revenda de combustíveis do distrito federal quanto à geração de resíduos aliada à análise de sua citotoxicidade e genotoxicidade. Tese (**Doutorado**) em biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasil, 2007.
- MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS D.E. & MCLAUGHLIN J.L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, 45, p.31-34, 1982.
- MULLER, J.B., MELEGARI, S.P. & MATIAS, W.G. Avaliação da toxicidade aquática da fração solúvel em água do diesel, biodiesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5). Em Anais do **XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**. Maceió Brasil, 2011. Disponível em: http://www.abrh.org.br/sgcv3/UserFiles/Sumarios/f1b2da5c1f4f78cf0b6c2b9ac5afcb42_e4a8b566c234a2886772207f9d981113.pdf acesso em dez. 2012.
- NASCIMENTO I. A. & ARAÚJO M.M.S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, 2(1), 41-47, 1999.
- PASSMAN, F.J., Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review, **International Biodeterioration & Biodegradation**. 81, 88–104, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002> .
- PEREIRA, S. A., ARAÚJO, V.Q., REBOUCAS, M.V., SEABRA, F. V. V., ALMEIDA M.V.A., CHINALIA, F.A. & NASCIMENTO, I. A. Toxicity of biodiesel, diesel and biodiesel/diesel blends: comparative sub-lethal effects of water-soluble fractions to microalgae species. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 88, 234–238, 2012.
- PERINA, F. C. Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas antincrustantes. Dissertação (**Mestrado**). Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.
- PETERSON, C. & MÖLLER, G., “Biodegradability, BOD5, COD and Toxicity of biodiesel fuels”. **Biodiesel Fuel Education**. University of Idaho. Department of Biological and Agricultural Engineering and Department of Food Science and Toxicology. 2004. <http://www.uidaho.edu/bioenergy/.BiodieselEd/publication/04.pdf>- acessado em 18/04/2012. Acesso em jul. 2012.
- PIMENTEL, M. F. P.; LIMA, D. P.; MARTINS, L. B.; BEATRIZ, A.; SANTAELLA, S. T. & COSTA-LOTUFO, L. V. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol. **PANAMJAS**, 4, 363-368, 2009.
- RANGEL, T. C. Avaliação ecotoxicológica do biocida grotan®ox mediante bioensaios de ecotoxicidade aguda utilizando *artemia salina* e *lactuca sativa* como bioindicadores. **Monografia**. Química Industrial, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, 2012.

-
- RAYBURN, J. R., GLAS, P. S., FOSS, S. S. & FISHER, W. S. "Characterization of Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*) Embryo Toxicity Tests using the Water Soluble Fraction of Number 2 Fuel Oil". **Marine Pollution Bulletin** 32 (12), 860 – 866, 1996.
- RODRIGUES R. V., K. C. MIRANDA-FILHO, E. P. GUSMÃO, C. B. MOREIRA, L. A. ROMANO & L. A. SAMPAIO. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of the Total Environment**, 408, 2054-2059, 2010.
- RODRIGUES, N. L. V. B. & PAWLOWSKY, U. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos Classe II A – Não inertes e Classe II B – Inertes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 12,8-16, 2007. doi: 10.1590/S1413-41522007000100002.
- RODRIGUEZ, A.G., TEIXEIRA, O.M., SALLES, F.G., VITAL, J.P. & PEIXOTO, D.S. Toxicidade por *Microcystis* em Goiás: Estudo dos efeitos tóxicos em camundongos e *Artemias salinas*. **Estudos**, 31(9), 1595-1606, 2004.
- RONCO, A., BÁEZ, M. C. D. & GRANADOS, Y. P. *In: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas* – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo**: Ottawa, cap. 1, 2004.
- SAEED T. & AL-MUTAIRI, T. Chemical composition of the water-soluble fraction of leaded gasolines in sea water. **Environment International**, 25,117-29, 1999.
- SANTANA, V. S. & MACHADO, N. R. C. F. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. **Catalysis Today**, 133, 606-610, 2008. doi:10.1016/j.cattod.2007.12.131
- SIEGERT, N. Microbial Contamination in Diesel Fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009- 11th **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czeth Republic, 18-22, October, 2009.
- SILVA, E. P.; TAVARES, M. G. O., BRAGA, A. C., SOUZA, H. R., ATAÍDE J. F., CUNHA, I. N., CORREIA, K. M., FREITAS, R. A., CAVASIN, G. M. & ANTONIOSI FILHO, N. R. "Avaliação Ecotoxicológica e Histológica de Combustíveis Fósseis e Biocombustíveis Produzidos por Craqueamento Termo-Catalítico e Transesterificação do Óleo de Soja". In Anais do **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, Nov. 2007, 01 – 06.
- SILVEIRA, E. L. C., CALAND, L. B., MOURA, C. V. R. & MOURA, E. M. Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes. **Química Nova**, 29, 1193-1197, 2006.
- SOBRERO, M. S. & RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga. *In: Ensayos Toxicologicos y Métodos de Evaluacion de calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Facultad de Ciencias Físicas e Matemáticas Ed. Chile, cap. 4, 2004.
- SORENSEN ,G.; PEDERSEN, D.V.; NORGAARD,A.K.; SORENSEN, K.B. & NYGAARD,S.D. Microbial growth in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, 102, 5259-5264.2011.
-

-
- SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E. & SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials** 147, 1073-1078, 2007. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.003.
- SVENSSON, B. M., MATHIASSEN, L., MARTENSSON, L. & BERGSTROM, S. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachatewater from landfills. **Environmental Monitoring and Assessment**, 102, 309-321.2005. doi: 10.1007/s10661-005-6029-z.
- TIQUIA, S. M. & TAM, N. F. Y. Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. **Bioresource Technology**, 65, 43-49.1998.
- TIQUIA, SM., TAM, N.F.Y. & HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter **Environmental Pollution**. 93, 249-256. 1996.
- U.S. Environmental Protection Agency – USEPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 5th ed.; **Research Triangle Park**, NC, 2002.
- U.S. Environmental Protection Agency. Seed germination/root elongation toxicity test. EG-12, Office of Toxic Substances, Washington. D.C. ed. germination/root elongation toxicity test. EG-12, **Office of Toxic Substances**, Washington. D.C. 1982
- VASCONCELOS, D. & GOMES, A. Tratamento de efluentes de postos de combustíveis para o reuso usando processos oxidativos avançados. **Cadernos UniFOA**. 11:35-45. Disponível em <http://www.foa.org.br/cadernos/edicao/11/35.pdf> acesso em junho de 2012
- WANG W. Use of plants for the assessment of environmental contaminants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** 126:87–127, 1992.
- WANG, W E KETURI, P. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. **Water, Air, and Soil Pollution**, 52 (3-4), 369-376, 1990.
- ZUCCONI. F., FORTE, M., MONACO, A. & DE BERTOLDI, M. Biological evaluation of compost maturity. **BioCycle**, 22, 27-29, 1981.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 CONCLUSÕES

Foram avaliadas 18 formulações de antimicrobianos indicadas para utilização em combustíveis, quanto ao seu espectro de ação contra diferentes grupos microbianos e as dosagens necessárias para erradicação ou controle destes organismos em caldo de cultura.

As formulações a base de isotiazolonas apresentaram efeito contra todos os grupos avaliados isoladamente e na forma de consórcio (bactéria, fungo, levedura e um consórcio microbiano) em dosagens menores, comparadas aquelas formulações classificadas como liberadores de formol (morfolinas e oxazolidinas). As oxazolidinas foram menos efetivas contra fungos e, em alguns casos, apresentaram apenas efeitos bioestáticos, sem erradicar o desenvolvimento da população microbiana.

Foi observado que das 8 formulações de antimicrobianos consideradas com potencial para as próximas avaliações em sistemas óleo/água, apresentaram incompatibilidades com a composição química do combustível provocando alterações visuais indesejáveis, tais como turbidez e formação de sólidos. Algumas formulações apresentaram desempenho diferente, dependendo do tipo de combustível avaliado. O tempo de preservação e a dosagem necessária para a preservação variou em função do tipo de combustível para algumas formulações baseadas em misturas de isotiazolonas e oxazolidinas. Foi observado que para o biodiesel puro (B100) foi necessária uma concentração maior das formulações para controlar a contaminação. Não foi possível verificar se este comportamento está relacionado à composição química do combustível ou a diferenças na composição e resistência intrínseca da comunidade microbiana que se desenvolveu nos diferentes microcosmos.

Foi verificado um comportamento diferencial do aditivo multifuncional com propriedades antimicrobianas (MBO) com relação ao tipo de combustível empregado. Este produto mostrou atividade biocida para os combustíveis puros (B0 e B100), mas não para as misturas (B7 e B10).

Também foi possível observar que a composição química da água de drenagem influenciou a atividade de ambos os antimicrobianos, alterando seu tempo de ação e a duração da preservação do combustível.

Foi observado que o aditivo multifuncional na concentração de 0,1% (de ativo com propriedades antimicrobianas) em condição de armazenamento simulado da mistura B10 (90% diesel e 10% biodiesel), por um período de 90 dias pode constituir uma boa estratégia para tratamento preventivo da contaminação microbiana em baixa contaminação. Para tratamentos de combustíveis com contaminação já instalada ou com grau de contaminação alto, apesar de ter sido verificado um efeito bioestático para o produto avaliado é sugerido um tratamento de choque com formulações baseadas em misturas de isotiazolonas ou morfolinás. Constatou-se após 90 dias que nos tanques que continham combustível tratado com o aditivo multifuncional não houve formação de biomassa visível na interface óleo-água e que o combustível manteve-se em conformidade com as exigências da ANP.

A metodologia de monitoramento e detecção da contaminação microbiana em fase aquosa baseada na técnica de bioluminescência do ATP avaliada mostrou maior sensibilidade para a detecção da contaminação microbiana tanto nos ensaios com cultura pura (*Pseudomonas sp.*), quanto para os ensaios com cultura mista (inóculo não caracterizado), sendo capaz de detectar a contaminação microbiana nas diluições mais altas, onde a técnica padrão não detectou. O kit para determinação do ATP por bioluminescência testado neste estudo, na forma como está projetado, não é adequado para estimar o grau de contaminação microbiana da fase aquosa proveniente de tanques de combustíveis. Em virtude das características peculiares desta matriz (água de drenagem) é necessário um kit de ATP que permita a extração prévia das células da matriz.

Para as condições estabelecidas neste estudo, a toxicidade aguda da fase aquosa em condições de armazenamento simulado de mistura B10 não tratada com o aditivo com produto antimicrobiano mostrou-se tóxica para *A. salina* e *L. sativa* e a toxicidade aumentou com o tempo de contato. No entanto, para a fase aquosa que esteve em contato com a mistura B10 tratada com as concentrações indicadas para uso (0,05 e 0,1%) do aditivo (com o biocida), a toxicidade aguda frente à *A. salina* e *L. sativa*, foi classificada como altamente tóxica, mantendo seu efeito tóxico mesmo após 30 dias.

7.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas de armazenamento de combustível podem apresentar grande complexidade tanto por sua estrutura física quanto pela composição do produto estocado. As recentes alterações na composição química dos combustíveis armazenados tem exigido o uso de uma grande variedade de aditivos químicos capazes de melhorar e garantir a sua integridade em situações de armazenamento por longos períodos. Neste sentido, as estratégias para o controle da contaminação microbiana, envolvendo apenas as boas práticas não são mais suficientes, havendo a necessidade do uso de antimicrobianos. A utilização de antimicrobianos é um dos métodos mais comumente empregados para o gerenciamento da contaminação microbiana nos mais diferentes setores da indústria. Estes produtos são capazes de reduzir ou manter a contaminação em níveis aceitáveis de forma a não comprometer a qualidade do produto final. Existem muitos princípios ativos em diferentes formulações disponíveis no mercado, mas nem todos têm seu uso autorizado para utilização em combustíveis. No Brasil, esta autorização deve ser concedida pela ANP, porém até o momento nenhum produto antimicrobiano foi autorizado para uso no País.

A primeira etapa do trabalho consistiu em avaliar a susceptibilidade de microrganismos deteriorogênicos de diesel e biodiesel em condições ótimas (caldo de cultura) em laboratório com 18 diferentes formulações de antimicrobianos. Alguns dos produtos avaliados estão formalmente registrados para utilização em combustíveis enquanto outros ainda são formulações experimentais. Este primeiro estudo teve um caráter exploratório e permitiu conhecer o espectro de ação para cada formulação testada além de estabelecer as faixas de concentração para uso dos produtos. A partir disto, foram selecionadas aquelas formulações que apresentaram as concentrações mais baixas no controle do desenvolvimento microbiano em caldo de cultura para avaliação em sistemas óleo-água. Nesta avaliação destacaram-se as formulações baseadas em isotiazolonas seguidas pelas morfolinas e oxazolidinas. Esta última apresentando efeitos biocida apenas em concentrações superiores a 0,1%.

Em uma segunda fase foram avaliadas 13 formulações em condições de armazenamento simulado em sistemas óleo/água. Algumas destas

formulações mostraram-se incompatíveis com o sistema, interagindo com o combustível e por este motivo foram eliminadas. Outras formulações apresentaram efetividade diferencial em função do tipo de combustível utilizado.

Nos sistemas água/óleo quase todas as formulações avaliadas apresentaram apenas efeito inibitório. As formulações à base de oxazolidina foram inibitórias na concentração de 0,1% e apenas em condição de baixa contaminação, enquanto as formulações contendo isotiazolonas foram inibitórias em alta e baixa contaminação em concentrações entre 0,03% e 0,05%.

Algumas formulações contendo isotiazolonas com diferentes graus de solubilidade em sistemas óleo/água também foram avaliadas nesta etapa revelando que as formulações com baixa ou nenhuma solubilidade em água não são efetivas na preservação do combustível.

A partir deste estudo inicial foi selecionado um aditivo multifuncional com o ativo antimicrobiano oxazolidina na concentração de 50% em sua composição e uma mistura de isotiazolonas para a próxima etapa.

A segunda etapa do estudo consistiu em avaliar estas duas formulações em condições de armazenamento simulado; com quatro tipos de combustíveis e três níveis de contaminação microbiana. A fase aquosa também variou, consistindo de um meio sintético com nutrientes para dar suporte mínimo ao crescimento microbiano ou água de drenagem de tanques de armazenamento (condição próxima a real). Neste experimento a mistura de isotiazolona foi efetiva no controle da contaminação microbiana em 0,04% em todos os tratamentos enquanto o aditivo multifuncional foi efetivo em concentrações de 0,1%, apenas na condição de baixa contaminação. Este mesmo produto foi menos efetivo na preservação de misturas de diesel/biodiesel do que nos combustíveis puros, diesel e biodiesel. Na presença de água de drenagem de tanques de armazenamento ambos os produtos avaliados tiveram sua eficácia reduzida evidenciando que as condições gerais do sistema podem afetar o desempenho dos antimicrobianos.

A efetividade dos antimicrobianos em sistemas de armazenamento de combustíveis foi avaliada em condições mais próximas da real, em tanques de aço carbono com capacidade para 20 litros contendo 1% de água de drenagem de tanques de armazenamento. O produto selecionado para este estudo foi o aditivo multifuncional com 50% de oxazolidina em sua formulação, utilizado

concentração de 0,1%. Neste estudo foram avaliadas as alterações nas características físico-químicas do combustível e o desenvolvimento microbiano ao longo de 90 dias de armazenamento. Os resultados obtidos mostraram que o combustível tratado, após 90 dias de armazenamento, manteve suas características físico-químicas em valores próximos aos iniciais e incorporou menos água. A biomassa formada ao final dos 90 dias foi 35% menor comparada ao combustível não tratado. Também, não foi percebida a formação de um biofilme na interface óleo/água nos combustíveis tratados com o aditivo, como ocorreu no combustível não tratado.

O acompanhamento do desenvolvimento microbiano a cada tempo amostral durante os 90 dias apontou poucas diferenças na condição de alta contaminação entre os tanques tratados com 0,1% de aditivo e os tanques não tratados, porém a diferença entre o peso seco da biomassa entre estes dois tratamentos foi de cerca de 35%. Este fato chama a atenção, pois evidencia outro problema relacionado ao gerenciamento da contaminação em combustíveis, a dificuldade em se estimar corretamente a população em desenvolvimento no sistema.

Em uma análise comparativa entre os experimentos realizados no laboratório e no campo pode-se perceber a grande importância que a mudança de escala proporcionou para a compreensão deste estudo. No quadro abaixo é dado um resumo sobre as condições experimentais e os principais resultados obtidos em ambos os estudos (Quadro 7.1). As diferenças observadas entre as duas escalas (laboratório e campo) demonstram a importância da realização de testes em diferentes escalas antes da implementação de qualquer estratégia e nos alertam sobre a possibilidade de sub ou superestimativa de uso na tomada de decisões baseadas apenas em estudos de bancada. Nesta comparação foram observadas diferenças importantes quanto a formação de biomassa e da degradação dos ésteres do biodiesel.

7.2.1 Quadro comparativo entre os experimentos de laboratório e campo

		Laboratório ¹ (Cap. III)	Campo (Cap. IV)
	Combustível	B0, B7, B10, B100 Diesel: S500 (500ppm de enxofre) Biodiesel Soja (60%) e sebo (40%)	B10 Diesel: S50 (50ppm de enxofre) Biodiesel Soja (75%) e sebo (25%)
	Fase aquosa	Meio mineral (BH) ou Água de drenagem	Água de drenagem
	Volume de combustível	60mL	19,6L
	Volume de água	20 mL (33%)	400mL (2%)
	Inóculo (microorganismos e concentração)	Consórcio microbiano não caracterizado composto por fungos, bactérias e leveduras nas concentrações de 10 ³ CFU/mL, 10 ⁵ CFU/mL e 10 ⁸ CFU/mL	Consórcio microbiano não caracterizado composto por fungos, bactérias e leveduras na concentração de 10 ⁸ CFU/mL
	Microcosmos	Frascos de vidro (180mL)	Tanques de aço carbono jateados com granalha de ferro (20L)
	Concentração do biocida	400ppm (0,04%) e 1000ppm (0,1%)	1000ppm (0,1%)
RESULTADOS	Tempo de morte	Não houve ação biocida	Não houve ação biocida
	Ação do antimicrobiano	Efeito bioestático verificado após 14 dias que perdurou por 28 dias.	Bioestática
	Volume de biomassa formada	Não foi possível avaliar pelo método utilizado uma vez que a biomassa confundiu-se com os componentes da água de drenagem.	0,61g/L
	Aparência da biomassa ao final do tempo experimental		Líquido amarelo ocre sem grumos
	Degradação da mistura B10 por FT-IR	30%	Não detectada
	Estabilidade oxidativa	Não avaliado	Nos tanques tratados com aditivo o combustível manteve-se dentro dos valores especificados para o diesel comercializado ² . Nos tanques não tratados ocorreu a perda de aderência a norma.
	Teor de água	Não avaliado	
	Viscosidade	Não avaliado	
	Massa específica	Não avaliado	Não alterou

¹ Para fins de comparação entre os experimentos (laboratório x campo) foram utilizados os dados obtidos para a mistura B10 na condição de alta contaminação e água de lastro com adição de 1000ppm do aditivo multifuncional com 50% de antimicrobiano (MBO) na formulação.

² Resolução ANP N° 50, de 23.12.2013 / Relatório técnico ANP N° 4/2013 (anexo I).

Com relação a efetividade do biocida, não foi possível avaliar a formação de biomassa nos microcosmos de vidro (escala laboratorial) devido à presença de produtos de corrosão. A comparação dos resultados obtidos neste estudo entre os microcosmos contendo meio mineral e água de drenagem sugeriram que na presença de água de drenagem o produto testado seria ineficaz para a proteção das misturas B10. Na escala de campo, porém, o efeito do antimicrobiano ficou evidente no controle da formação de biomassa. Nesta escala pode-se observar que apesar do efeito bioestático (que impede o desenvolvimento, mas não mata os microrganismos), o desenvolvimento microbiano foi controlado na presença de água de drenagem e com um benefício a mais, não houve a formação de biofilme, o que é um fator relevante, pois impede a formação dos grumos e películas que se aderem aos tanques e são a principal causa de problemas de entupimentos e corrosão.

Na comparação sobre os valores obtidos para a degradação (FT-IR) observada para os ésteres do biodiesel, ficamos limitados ao fato de não ter sido utilizado a mesma metodologia de avaliação. Nos microcosmos avaliados em laboratório foi observado 30 % de degradação do biodiesel ao final de 60 dias, já na condição de campo a degradação do biodiesel não foi observada. Com este resultado é possível apresentar algumas hipóteses, por exemplo, que a maior quantidade de água no experimento de laboratório (30%, limitação imposta pelo tamanho dos microcosmos) pode ter intensificado a degradação dos ésteres (degradação hidrolítica) já que o mesmo não ocorreu no experimento de campo que apresentava apenas 2% de água (condição próxima a real).

Outra possibilidade é que diferenças na composição e diversidade da população microbiana nos diferentes experimentos tenham se refletido na degradação diferencial dos ésteres. Embora a competência (capacidade de produção de enzimas) para degradar os ésteres que compõe o biodiesel seja bastante comum à microbiota ambiental, diferenças na composição do inóculo utilizado e também diferenças na composição do combustível empregado nos dois experimentos podem explicar a presença de populações de microrganismos distintas em cada situação, apresentando por este motivo taxas de degradação diferenciadas.

O ponto de coleta dentro do microcosmo e o volume amostrado (1mL para os experimentos de laboratório e 50 mL para os de campo) para a análise

da degradação dos ésteres pode ter influenciado os resultados. Na escala laboratorial a camada de combustível no frasco amostral apresentava aproximadamente 3 cm. Desta camada, próxima a interface foi coletado com auxílio de uma micropipeta, o volume de 1 mL da fase combustível e assim, conseguimos amostrar a região da interface dos microcosmos com mais facilidade. Além disto, a superfície de contato entre o combustível e a água compreendeu todo o diâmetro do frasco experimental. Nos tanques de 20L, a camada de óleo continha cerca de 60 cm de altura e o combustível foi amostrado em duas alturas com auxílio de pipeta de vidro estéril, a primeira junto a interface e outra 10 cm abaixo da superfície, totalizando uma amostra composta de 100 mL, o que pode ter diluído a amostra, dificultando a detecção da degradação do biodiesel.

A eficácia de um programa de controle da contaminação não depende apenas da utilização do biocida adequado, mas das dosagens e da frequência de tratamento adequadas. Para se estabelecer estes valores é necessário conhecer com o máximo de exatidão possível os níveis de contaminação presentes no tanque e a forma como esta contaminação está estabelecida. Microrganismos crescendo na condição planctônica, em geral são susceptíveis a antimicrobianos em concentrações menores do que microrganismos crescendo em biofilmes, por exemplo. Atualmente nenhuma das técnicas de monitoramento e quantificação da biomassa são satisfatórias para uma determinação precisa da contaminação. A técnica que utiliza a bioluminescência do ATP, uma das mais amplamente utilizadas atualmente, apesar de permitir um monitoramento rápido, permite apenas a quantificação da população microbiana planctônica na fase aquosa ou oleosa, e não leva em conta a presença do biofilme. Estas estimativas podem induzir ao erro, provocando falhas no gerenciamento da contaminação ao indicar a utilização de produto ou das dosagens inadequadas para o tratamento do sistema.

A questão da dosagem correta além dos problemas relacionados ao controle da contaminação no sistema também pode provocar sérios problemas ambientais.

Os agentes antimicrobianos são de uma maneira geral produtos químicos de elevada toxicidade. O uso de biocidas de caráter químico persistente é do ponto de vista ambiental, inaceitável com relação aos potenciais riscos

ambientais que poderão surgir nos sistemas de tratamento de águas residuais ou nos sistemas naturais de água (rios, lagos, mares, etc.), considerando o descarte irresponsável no ambiente sem o tratamento prévio (desativação química e ou diluição).

Um biocida ideal deve apresentar propriedades não persistentes e não bio-acumulativas e deve ser rápida e facilmente decomposto em espécies químicas com níveis baixos de toxicidade para todas as formas de vida. Eles devem ser utilizados nas menores dosagens e com a menor frequência possíveis para a boa manutenção do sistema a fim de se evitar uma elevação dos custos financeiros e ambientais. Porém, a redução dos riscos químicos provenientes da utilização de antimicrobianos não pode ser aceitável se resultar em menor eficácia contra os organismos indesejados. Neste sentido, a quinta etapa deste estudo, avaliou a toxicidade do aditivo multifuncional com propriedades antimicrobianas através de testes ecotoxicológicos, utilizando como organismos teste o crustáceo *Artemia salina* e sementes da planta *Lactuca sativa* (alface). Neste teste avaliou-se a toxicidade da água que esteve em contato com o combustível tratado com 0,1% do produto antimicrobiano após 1, 10, 20 e 30 dias. Os resultados mostraram que este efluente, em sua forma bruta apresenta alto potencial tóxico, porém a água que esteve em contato com o combustível não tratado também se revelou tóxica. Estes resultados tornam claro que na opção por implementar estratégias de combate a contaminação microbiana através do uso de agentes antimicrobianos, além da eficiência dos agentes químicos, a sua biodegradabilidade e impacto ambiental terão também que ser considerados quando das tomadas de decisão. Mesmo assim, o efluente residual associado a um sistema de armazenamento de combustíveis precisa ser tratado independente da utilização ou não de antimicrobianos no tratamento de combustíveis e, portanto este tratamento não constitui um custo associado apenas à utilização de antimicrobianos.

Para o gerenciamento adequado da contaminação microbiana de combustíveis armazenados devem-se escolher ao menos dois produtos antimicrobianos diferentes, adequados ao sistema específico que se deseja tratar, um para ser utilizado como tratamento preventivo e outro mais adequado para tratamentos de choque. Deve-se ainda promover a adoção de práticas de manutenção e monitoramento em intervalos regulares que devem incluir a

previsão dos custos e das estratégias para tratamento dos efluentes gerados a fim de se evitar danos ambientais.

Dentre os produtos estudados, o aditivo multifuncional com características antimicrobianas apresentou resultados que o caracterizam como efetivo para um tratamento preventivo da contaminação microbiana. As formulações baseadas em isotiazolonas ou morfolinás poderiam constituir uma boa opção para tratamentos corretivos, quando já existe uma contaminação instalada.

Apesar do mercado e órgãos legisladores ainda resistirem a utilização de antimicrobianos para controle da contaminação microbiana em combustíveis, cabe ressaltar que a redução do risco ambiental pela não utilização do controle químico está ligada ao aumento do risco de deterioração do produto armazenado, o que claramente constitui um risco financeiro para a indústria.

7.3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros propõem-se:

- Avaliar a interação entre contaminação microbiana e degradação química das misturas diesel/ biodiesel

- Avaliar a interferência da composição do combustível na ação do biocida;

- Avaliar o período de preservação de um tanque tratado com biocida em condições reais de uso;

- Determinar a diversidade microbiana utilizando técnicas modernas de sequenciamento das comunidades microbianas deteriorogênicas que se estabelecem nas diferentes misturas diesel biodiesel;

- Estudo da resistência de microrganismos à biocidas para uso em combustíveis;

- Estudo sobre o coeficiente de partição dos biocidas em condições de uso e concomitante avaliação microbiana;

- Desenvolvimento de métodos rápidos de monitoramento (a campo e por pessoal não especializado) com detecção da contaminação microbiana em combustíveis armazenados.

- Estudo das emissões do combustível tratado com biocida.

ANEXO I

RESOLUÇÃO ANP Nº 50, DE 23.12.2013 - DOU 24.12.2013

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 4/2013

Tabela I - Especificações do óleo diesel de uso rodoviário.

CARACTERÍSTICA (1)	UNIDADE	LIMITE		MÉTODO	
		TIPO A e B		ABNT NBR	ASTM/EN
		S10	S500		
Aspecto (2)	-	Límpido e isento de impurezas		14954	D4176
Cor	-	(3)	Vermelho (4)		
Cor ASTM, máx. (5)	-	3,0		14483	D1500 D6045
Teor de biodiesel (6)	% volume	(7)		15568	EN 14078
Enxofre total, máx.	mg/kg	10,0 (8)	-	-	D2622 D5453 D7039 D7212 (9) D7220
		-	500	14533	D2622 D4294 D5453 D7039 D7220
Destilação					
10% vol., recuperados, mín.	°C	180,0	Anotar	9619	D86
50% vol., recuperados		245,0 a 295,0	245,0 a 310,0		
85% vol., recuperados, máx.		-	360,0		
90% vol., recuperados		-	Anotar		
95% vol., recuperados, máx		370,0	-		
Massa específica a 20°C	kg/m³	815,0 a 850,0 (10)	815,0 a 865,0	7148 14065	D1298 D4052
Ponto de fulgor, mín.	°C	38,0		7974	D56

				14598	D93 D3828
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	2,0 a 4,5	2,0 a 5,0	10441	D445
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(11)		14747	D6371
Número de cetano, mín. ou Número de cetano derivado (NCD), mín.	-	48	42 (12)	-	D613 D6890 D7170
Resíduo de carbono Ramsbot-tom no resíduo dos 10% finais da destilação, máx.	% massa	0,25		14318	D524
Cinzas, máx.	% massa	0,010		9842	D482
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx	-	1		14359	D130
Teor de Água (13), máx.	mg/kg	200	500	-	D6304 EN ISO 12937
Contaminação total (14), máx.	mg/kg	24	-	-	EN 12662
Água e sedimentos, máx. (14)	% volume	0,05		-	D2709
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (15), máx.	% massa	11	-	-	D5186 D6591 (16)
Estabilidade à oxidação (15), máx.	mg/100mL	2,5	-	-	D2274 (17) D5304 (17)
Índice de neutralização	mg KOH/g	Anotar	-	14248	D974
Lubricidade, máx.	µm	(18)			ISO 12156 D6079
Condutividade elétrica, mín. (19)	pS/m	25	25 (20)	-	D2624 D4308

Disponível em: http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml

ANEXO II

RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.05.2012 - DOU 18.05.2012

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 4/2012

Tabela 1: Especificação do Biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	(2)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662 NBR 15995
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono, máx. (4)	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(7)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	EN 14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (8) 15771 -	6584 (8) -	EN 14105 (8) EN 14106 (8)
Glicerol total, máx. (9)	% massa	0,25	15344 15908	6584 (8) -	EN 14105 (8)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,80	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	EN 14105 (8)

Diacilglicerol, max.	% massa	0,20	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	EN 14105 (8)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	EN 14105 (8)
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110 (8)
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (8)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (10)	h	6	-	-	EN 14112 EN 15751 (8)

Nota:

- (1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio.
- (2) Será admitido o limite de 380 mg/kg 60 dias após a publicação da Resolução. A partir de 1º de janeiro de 2013 até 31 de dezembro de 2013 será admitido o limite máximo de 350 mg/kg e a partir de 1º de janeiro de 2014, o limite máximo será de 200 mg/kg.
- (3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130º C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.
- (4) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.
- (5) 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.
- (6) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano.
- (7) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.

(8) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica.

(9) 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.

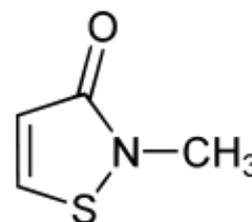
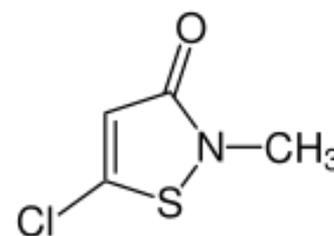
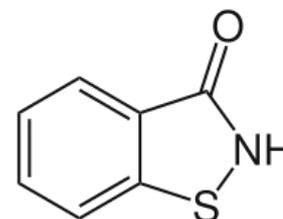
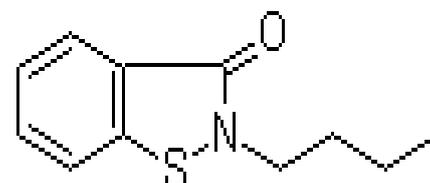
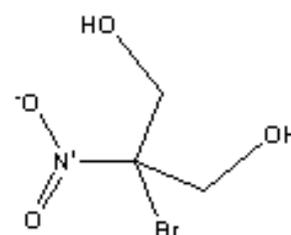
(10) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível.

Tabela II - Ponto de Entupimento de Filtro a Frio

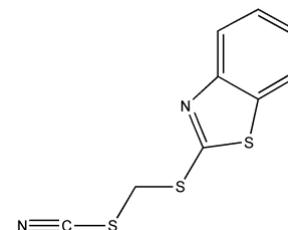
UNIDADES DA FEDERAÇÃO	LIMITE MÁXIMO, °C											
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
SP - MG - MS	14	14	14	12	8	8	8	8	8	12	14	14
GO/DF - MT - ES - RJ	14	14	14	14	10	10	10	10	10	14	14	14
PR - SC - RS	14	14	14	10	5	5	5	5	5	10	14	14

ANEXO III

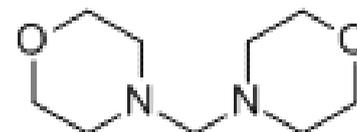
ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS BIOCIDAS

METILISOTIAZOLINONA**Nome IUPAC** 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one**Abreviatura:** MIT**Número Cas** 2682-20-4**Formula molecular:** C₄H₅NOS**Peso molecular:** 115.15**METILCLOROISOTIAZOLINONA****Nome IUPAC** 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one**Abreviatura:** CMI; CMIT; MCI; MCIT**Número Cas** 26172-55-4**Formula molecular:** C₄H₄ClNOS**Peso molecular:** 149.59866**BENZISOTIAZOLINONA****Nome IUPAC:** 2-Benzisothiazolin-3-one**Abreviatura:** BIT**Número Cas:** 2634-33-5**Formula molecular:** C₇H₅NOS**Peso molecular:** 151.19**BUTILBENZISOTIAZOLINONA****Nome IUPAC:** 2-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one**Abreviatura:** BBIT**Número Cas:** 4299-07-4**Formula molecular:** C₁₁H₁₃NOS**Peso molecular:** 207.29**BRONOPOL****Nome IUPAC:** 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol**Abreviatura:** BNP**Número Cas:** 52-51-7**Formula molecular:** C₃H₆BrNO₄**Peso molecular:** 199.99**Nome IUPAC:** 2-(thiocyanatomethylthio)benzothiazole

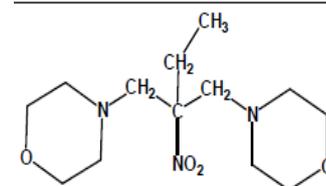
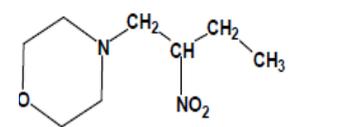
Abreviatura: TCMTB
Número Cas: 21564-17-0
Molecular Formula: C₉H₆N₂S₃
Peso molecular: 238.35



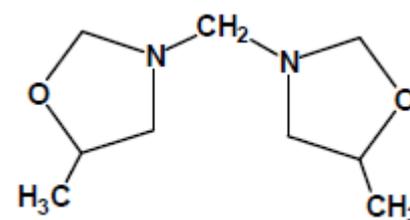
MORFOLINA
Nome IUPAC: N,N'- metilenebismorpholine
Abreviatura: MBM
Número Cas: 5625-90-1
Formula molecular: C₉H₁₈N₂O₂
Peso molecular: 186.25



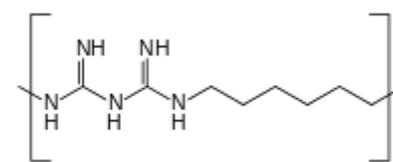
MORFOLINA
Nome IUPAC: 4-(2-nitrobutyl)morpholyne (1)
 4,4'-(2ethyl-2-nitrotrimethylene)-dimorpholine (2)
Abreviatura: NMEND
Número Cas: 2224-44-4/ 1854-23-5
Formula molecular: C₈H₁₆N₂O₃ / C₁₃-H₂₅-N₃-O₄
Peso molecular: 188.22 / 475.59



OXAZOLIDINA
Nome IUPAC: 3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine)
Abreviatura: MBO
Número Cas: 66204-44-2
Formula molecular: C₉H₁₈N₂O₂
Peso molecular: 186.25142



Nome IUPAC: hexamethylene biguanide
Abreviatura: PHMB
Número Cas: 28757-48-4
Formula molecular: (C₈H₁₇N₅)_n
Peso molecular: 213.333



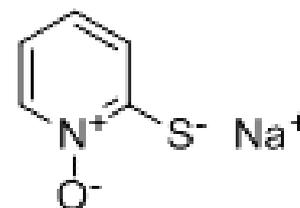
Nome IUPAC: 2-pyridinethiol-1-oxide, sodium salt

Abreviatura:

Número Cas: 3811-73-2

Formula molecular: C₅H₄NNaOS

Peso molecular: 149.13999



IODOPROPYNYL BUTYLCARBAMATE

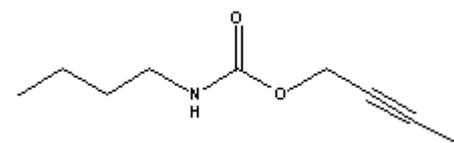
Nome IUPAC: 3-iodine-2-propenyl-butylcarbamate)

Abreviatura: IPBC:

Número Cas: 55406-53-6

Formula molecular: C₈H₁₂O₂NI

Peso molecular: 281.09



ANEXO IV
MEIOS DE CULTURA
1.1 Meio mineral (Bushnell e Haas, 1941)

Reagentes	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NH ₄ NO ₃	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeCl ₃	0,05
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
pH 7,0	

1.2 Meio Ágar nutriente

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar Bacteriológico	15,0
pH 7,2	

1.3 Caldo nutriente

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0
pH 7,2	

1.4 Meio Ágar Malte

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Malte	30,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar Bacteriológico	15,0

pH 5,6

1.5 Caldo Malte

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Malte	30,0
Peptona Bacteriológica	5,0

Ph 5,4

1.6 Meio Padrão para Contagem- PCA

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Malte	30,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar Bacteriológico	15,0

Ph 5,4

1.7 Meio Ágar Sabouraud

Reagentes	g L ⁻¹
Glicose	40,0
Peptona Bacteriológica	10,0
Ágar Bacteriológico	15,0

Ph 5,4

ANEXO V



FACULDADE DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SOLOS

LABORATÓRIO DE ANÁLISES

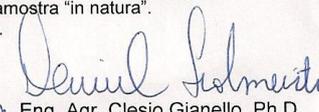
LAUDO DE ANÁLISES

NOME: Profa. Fátima Bento**MUN.:** Porto Alegre**Data de entrada:** 08/12/10**EST.:** RS**Data de expedição:** 20/01/11**Nº DE REG.:** R-389/2010**MATERIAL:** Água retirada do lastro do tanque de estocagem

Determinações	Amostra 01	Metodologia aplicada / Limite de detecção
N-NH ₄ ⁺ - mg/L	192	destilação, MgO / Titulometria/ 0,1 mg/L
N-NO ₃ - mg/L	< 0,1	destilação, Liga de Varda / Titulometria/ 0,1 mg/L
Fósforo total - mg/L	< 0,01	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,01 mg/L
Potássio total - mg/L	59	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,07 mg/L
Cálcio total - mg/L	67	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,04 mg/L
Magnésio total - mg/L	10	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,02 mg/L
Enxofre total - mg/L	34	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 1,0 mg/L
Cobre total - mg/L	0,86	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,004 mg/L
Zinco total - mg/L	483	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,02 mg/L
Ferro total - mg/L	1454	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,04 mg/L
Manganês total - mg/L	126	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,01 mg/L
Sódio total - mg/L	229	digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,1 mg/L
Boro total - mg/L	0,2	digestão seca/ ICP-OES/ 0,1 mg/L

Obs. 1: Resultados expressos na amostra "in natura".

Obs. 2: Média de 2 determinações.


 Eng. Agr. Clesio Gianello, Ph.D.
 CREA 8a. Reg. 25.642
 Responsável pelo Laboratório de Análises

ANEXO VI

OLEOPLAN S.A.

OLEOPLAN S/A – ÓLEOS VEGETAIS PLANALTO

CERTIFICADO DE QUALIDADE

PRODUTO: BIODIESEL - B100

FABRICAÇÃO: 23/5/2011

LOTE:353

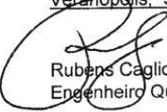
CERTIFICADO Nº: 353

MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS: ÓLEO DE SOJA (75%), GORDURA ANIMAL (25%) E METANOL

DATA DE ENSAIO: 24/05/2011

Característica	Unidade	Resultado	Especificações	Métodos
Aspecto/Temperatura lida em °C	-	Límpido e Isento de Impurezas/20	Límpido e Isento de Impurezas	Visual
Massa Específica a 20 °C	Kg/m ³	879,1	850-900	ASTM D 1298
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	4,299	3,0-6,0	ASTM D 445
Teor de água	mg/kg	326	500 (máx.)	ASTMD 6304
Contaminação Total	mg/kg	19,8	24 (máx.)	EN 12662
Ponto de Fulgor Vaso fechado Pensky – Martens	°C	132	100,00 (mín.)	ASTM D 93
Teor de éster	% massa	98,4	96,5 (mín.)	EN 14103
Resíduo de Carbono	% massa	0,02	0,05 (máx.)	ASTM D 4530
Cinzas Sulfatadas	% massa	0,007	0,020 (máx.)	ASTM D 874
Enxofre total	mg/kg	2,9	50 (máx.)	ASTM D 5453
Sódio + Potássio	mg/kg	3,3	5 (máx.)	NBR 15553
Cálcio + Magnésio	mg/kg	2,6	5 (máx.)	NBR 15553
Fósforo	mg/kg	1,7	10 (máx.)	NBR 15553
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C	-	1	1 (máx.)	ASTM D 130
Ponto de entupimento de filtro a frio	°C	6	19 (máx.)	ASTMD 6371
Índice de acidez	mgKOH/g	0,4	0,50(máx.)	ASTMD 664
Glicerina Livre	% massa	0,013	0,02 (máx.)	ASTMD 6584
Glicerina total	% massa	0,185	0,25 (máx.)	ASTM D 6584
Monoglicérol	% massa	0,469	ANOTAR	ASTM D 6584
Diglicérol	% massa	0,217	ANOTAR	ASTM D 6584
Triglicérol	% massa	0,172	ANOTAR	ASTM D 6584
Metanol	% massa	0,06	0,20 (máx.)	EN 14112
Estabilidade à oxidação a 110°C	h	7,9	6 (mín.)	EN 14112

Veranópolis, 30 de Maio de 2011.


 Rubens Cagliani
 Engenheiro Químico – CRQ 05302824

RST 470 – KM 109 – Nº. 3482 – CEP: 95330 – 000 – VERANÓPOLIS – RS
 FONE: (54) 3441 3300 – FAX: (54) 3441 3300
 E-mail: laboratorio_biodiesel@oleoplanver.com.br, atendimento@oleoplanver.com.br
 Site: www.oleoplanver.com.br

31 MAI 2011

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

15:00:00

ANEXO VII

ASTM D4176 - 04(2009) Standard Test Method for Free Water and Particulate Contamination in Distillate Fuels (Visual Inspection Procedures)

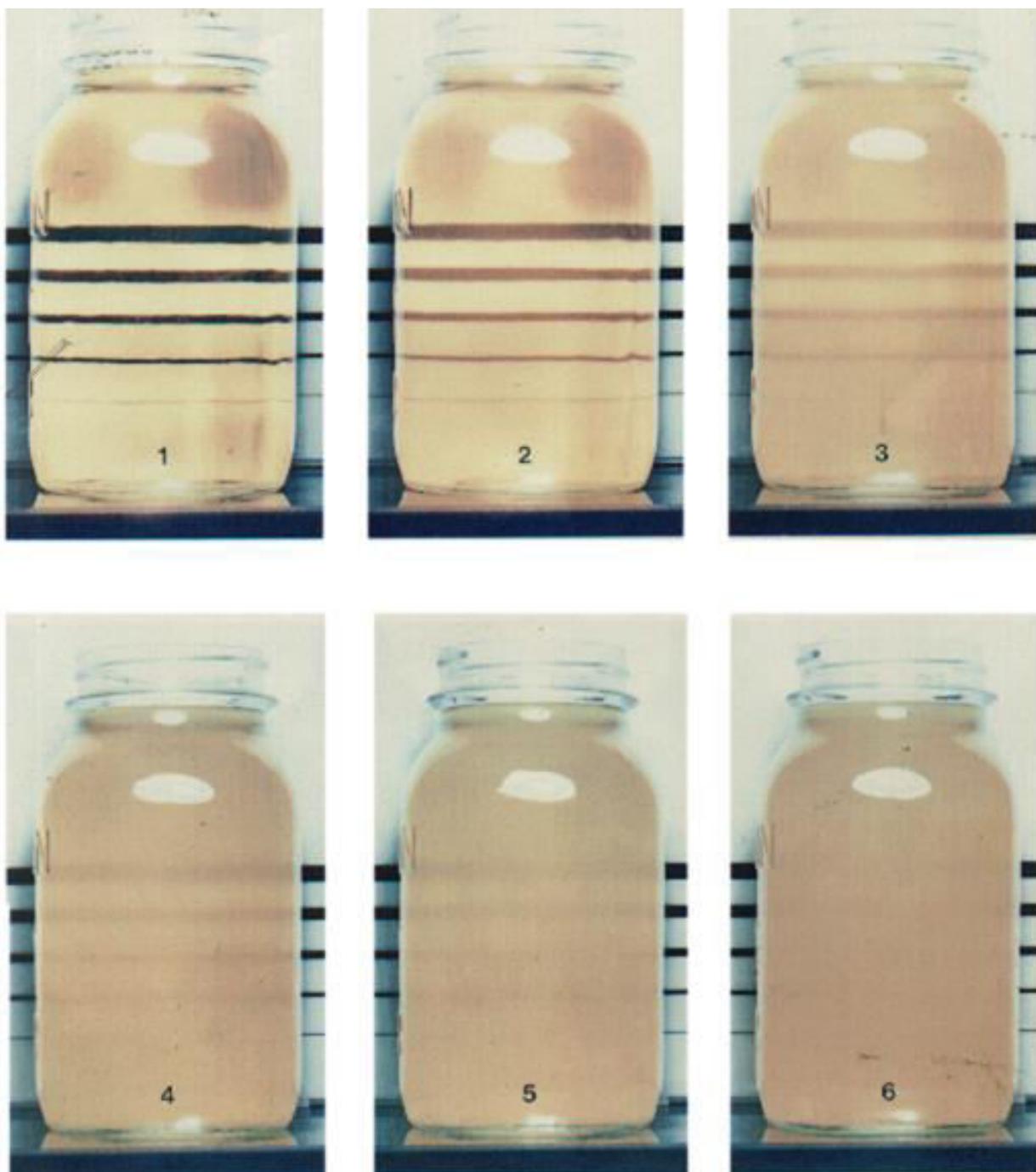
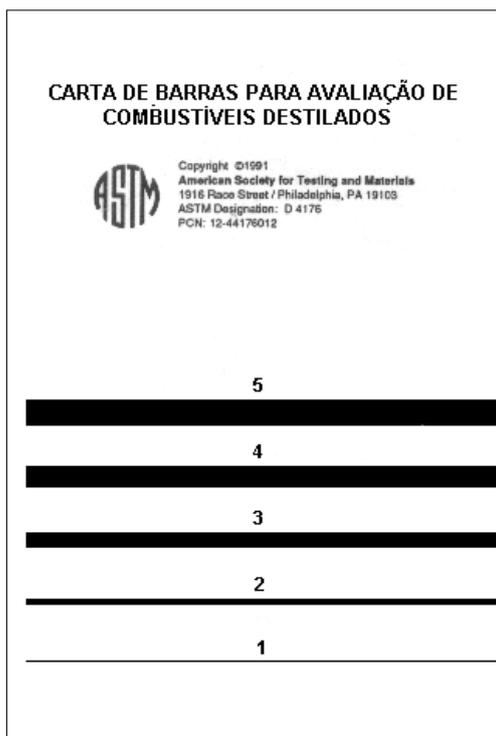
Escala Haze

Figura 1: Carta para avaliação da turbidez de combustíveis (Haze chart).



Na figura acima (Figura 1) as imagens numeradas de 1 a 6 representam diferentes níveis de turvação, sendo 1 o mais límpido e 6 o mais turvo. Um cartão com diferentes espessuras de linhas (Figura 2) é colocado atrás da amostra e visualizado. Trata-se de uma ferramenta que permite (através de uma escala visual) classificar o nível de turbidez do combustível.

Figura 2 Padrão de barras ASTM 4176.

Significado e uso

Nas especificações do combustível há a exigência de que o combustível seja claro e brilhante e livre de partículas visíveis (ver Nota 1). No entanto, não há nenhum método padrão para fazer essa determinação e as práticas têm divergido. Este método fornece procedimentos padrão para o teste.

Nota 1- Limpo e brilhante às vezes é usado no lugar de claro e brilhante. O significado é idêntico.

Procedimento 1 fornece um método de passa / não passa rápido para contaminação em combustível destilado.

Procedimento 2 fornece uma classificação numérica bruta de turbidez, principalmente como uma ferramenta de comunicação.

Vita

Dados Pessoais

Nome Adriane Ramos Zimmer
E-mail: adrianezimmer@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010 - 2014** **Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.**
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Orientador: Fátima Menezes Bento
 Bolsista: Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2007** **Mestrado em Biologia Animal.**
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: Ultraestrutura cuticular de duas espécies simpátricas de *Hyalella Smith 1874* (Crustacea, Amphipoda Dogielinotidae), Ano de obtenção: 2007
 Orientador: Georgina Bond Buckup
 Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2000 - 2005** **Graduação em Biologia.**
 Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

- 2011 - Atual** Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia
 Desenvolvimento de soluções biotecnológicas eficientes e ambientalmente corretas visando redução de custo da produção de biodiesel e melhorias da qualidade no armazenamento
- 2011 - Atual** Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Departamento de microbiologia
 Controle Químico da Contaminação Microbiana durante a Estocagem de Biodiesel metílico de soja e sebo bovino (B0,B5,B20 e B100) e a avaliação da biodegradabilidade no solo em caso de derrames.
- 2008 - 2010** Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia
 Produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *Pseudozyma hubeiensis* como biocatalisador e avaliação da qualidade do biocombustível durante o armazenamento
- 03/2005- 04/2007** **Projetos de pesquisa**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Biologia e ecologia de Hyalellidae (Crustacea, Peracarida, Amphipoda)
- 01/2004- 02/2005** Serviço Técnico Especializado, Instituto de Bociências, Departamento de Zoologia: Curadora da coleção de crustáceos com bolsa de Apoio Técnico CNPq

2. Universidade Luterana do Brasil - ULBRA

- 2001 - 2003** Monitoria da disciplina de Biologia Celular
- 2002- 2002** Pesquisa e Desenvolvimento: *Dinâmica Populacional de Aegla spinipalma*

04/2001- 02/2004 *Estágio: curadoria da coleção de invertebrados do Museu de Ciências Naturais da ULBRA e preparação de aulas práticas - 680 hs*

Prêmios e títulos

2012 Premio ciência, Tecnologia e Inovação em Biodiesel (CTIBiodiesel), 5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas.

Trabalhos técnicos

2008 Palestra ministrada na Universidade Luterana do Brasil Biodiesel: desafios e oportunidades,

2008 Palestra ministrada na Universidade Luterana do Brasil Bioecologia de Crustacea

2007 Curso ministrado na Semana acadêmica da Universidade Luterana do Brasil Identificação de crustáceos,

2006 Relatório tecnico PROBIO -Crustacea.

Participação em banca de trabalhos de conclusão

2009 Banca de Vinícius Siqueira de Souza. **Morfologia dos apêndices bucais de *Ocypode quadrata* (Fabricius,1787) (Crustacea,Decapoda, Ocypode)**, Universidade Luterana do Brasil - Graduação
