

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE TBHQ  
(Terc-butil-hidroquinona) E DE BIO-ÓLEO PARA USO EM  
BIODIESEL DE SOJA (B100) E ÓLEO DIESEL B (B10)**

**Sabrina Anderson Beker**

**Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia/UERGS**

**Porto Alegre, setembro de 2014**

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE TBHQ  
(Terc-butil-hidroquinona) E DE BIO-ÓLEO PARA USO EM  
BIODIESEL DE SOJA (B100) E ÓLEO DIESEL B (B10)**

**Sabrina Anderson Beker**

**Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia/UERGS**

Dissertação apresentada como um  
dos requisitos para a obtenção do  
Grau de Mestre em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente

**Porto Alegre, setembro de 2014**

***“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”***

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a todas as pessoas que me motivaram, apoiaram e colaboraram ao longo deste período especial;

Agradeço imensamente aos meus queridos pais pelo apoio, incentivo e amor incondicional e aos meus irmãos pelas conversas motivadoras e por toda ajuda sempre que precisei;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação de qualidade;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e aos professores pelos ensinamentos e troca de experiências essenciais para minha formação;

À minha querida orientadora Professora Fatima Menezes Bento pela oportunidade, confiança, orientação e atenção dedicada a mim durante a realização deste trabalho;

Aos Professores Renato Cataluña, Rosângela Silva e Elina Caramão, e suas alunas Maria Elisabete e Gabriela pelas preciosas colaborações no primeiro capítulo da dissertação;

À Professora Clarisse Piatnicki e Yara Patrícia pela orientação e colaboração valiosas para a realização do segundo capítulo da dissertação;

À Professora Maria do Carmo Peralba pela contribuição nas análises cromatográficas;

As colegas de Laboratório e de Mestrado que ao longo deste período tornaram-se grandes amigas: Aline, Francielle, Patricia, Juciana, Ana, Gabriela, Bruna e Vanessa, muito obrigada por toda força, pelo agradável convívio e por tornar esse período mais alegre;

As minhas amigas de longa data que estão sempre presente me apoiando em todos os momentos: Daniele, Sabrina e Sheila;

À CAPES pela bolsa concedida.

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE TBHQ (Terc-butil-hidroquinona) E DE BIO-ÓLEO PARA USO EM BODIESEL DE SOJA (B100) E ÓLEO DIESEL B (B10)<sup>1</sup>

## Resumo

Autor: Sabrina Anderson Beker  
Orientador: Fátima Menezes Bento

O biodiesel devido a sua natureza predominantemente composta por ésteres de ácidos graxos apresenta alta suscetibilidade à oxidação e à contaminação microbiana durante a estocagem. Algumas medidas de controle como a utilização de aditivos alternativos ou comerciais podem minimizar a ocorrência destes problemas. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de dois antioxidantes comerciais: butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e um bio-óleo experimental em meio de cultura. Em escala laboratorial, diferentes concentrações de TBHQ (0, 50, 100, 200, 300 e 600 ppm) foram adicionadas ao biodiesel de soja nas condições de como recebido, com e sem adição de inóculo (ASTM E1259-10) em meio mineral mínimo Bushnell-Haas a 30°C por 45 dias. Foram determinadas as concentrações inibitória e biocida mínimas do bio-óleo experimental adicionado à mistura B10 com três micro-organismos deteriogênicos (*Paecilomyces variotii*, *Candida silvicola* e *Bacillus pumilus*) e um inóculo não caracterizado conforme Norma ASTM E1259-10. Diferentes concentrações (0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10%) foram testadas por 10 dias sob 30°C. A caracterização dos compostos responsáveis pela inibição microbiana deste ensaio foi realizada por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada a Espectrometria de Massas por tempo de voo. Após o final dos ensaios, verificou-se que em ambas as condições as comunidades bacterianas e fúngicas desenvolvidas apresentaram perfis genotípicos diferentes que não puderam ser relacionados com a concentração de TBHQ utilizada, assim como os valores de biomassa. A estabilidade oxidativa foi mantida dentro do período mínimo durante o ensaio. Os valores de viscosidade cinemática, índice de acidez e teor de água da fase oleosa aumentaram ao longo de 45 dias, caracterizando o biodiesel como fora da especificação. Não foi observada degradação dos ésteres avaliados presentes na fase oleosa nas condições de ensaio. O BHT não apresentou atividade antimicrobiana. O bio-óleo apresentou atividade antimicrobiana na faixa de 0,25% a 4% e a análise cromatográfica dos compostos que conferiram a característica antimicrobiana ao bio-óleo apresentou um perfil majoritário de compostos fenólicos seguido de cetonas.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (149 p.), setembro, 2014.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1 Biocombustíveis .....	5
2.1.1 Bio-óleo .....	7
2.1.2 Biodiesel.....	8
2.2 Micro-organismos deteriogênicos de combustíveis e biocombustíveis .....	16
2.2.1 Estudos sobre diversidade microbiana em combustível.....	18
2.3 Condições e suscetibilidade ao desenvolvimento microbiano em biocombustíveis.....	20
2.4 Biodeterioração do biodiesel .....	23
2.4.1 Aplicação de cromatografia gasosa no estudo de biodiesel.....	26
2.5 Uso de antioxidantes em biodiesel.....	26
2.5.1 Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) .....	29
2.5 Medidas para prevenção, diagnóstico e tratamento da contaminação microbiana em combustíveis e biocombustíveis .....	30
3 Capítulos.....	37
3.1. Capítulo 1 .....	37
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE BIODIESEL DE SOJA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TBHQ DURANTE ARMAZENAMENTO SIMULADO.....	37
3.1.1 Introdução .....	39
3.1.2 Materiais.....	42
3.1.3 Metodologia.....	44
3.1.4 Resultados e Discussão .....	52
3.1.5 Conclusões.....	83
3.2 Capítulo 2.....	85
AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BIOCIDA MÍNIMA DE BIO-ÓLEO PARA USO EM ÓLEO DIESEL B10.....	85
3.2.1 Introdução .....	87
3.2.2 Materiais e Métodos .....	90
3.2.3 Resultados e Discussão .....	98
3.2.4 Conclusões.....	113
4 Considerações Gerais .....	115
5 Referências .....	116
6 Apêndices.....	132
7 Anexos .....	136
8 Vitta .....	137

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da oferta interna de Energia Elétrica por fonte no Brasil em 2013. Fonte: Ministério de Minas e Energia, 2014. ....	6
Figura 2 Reação de transesterificação para produção de biodiesel. R representa uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos. O álcool empregado é geralmente o metanol ( $R' = CH_3$ ). Fonte: Knothe et al., 2005....	10
Figura 3 Estruturas fenólicas de antioxidantes sintéticos (a) BHA, (b), BHT, (c), PG e (d) TBHQ (Ramalho & Jorge, 2006).....	28
Figura 4 Esquema do mecanismo de ação dos antioxidantes no processo oxidativo do biodiesel (Freire, 2012). ....	30
Figura 5 Diferentes formas que a água pode ser encontrada nos tanques de armazenamento de diesel A com adição de biodiesel (Fonte: Bento & Cavalcanti, 2012). ....	31
Figura 6 Mecanismos de ação dos biocidas. (Adaptado de Chapman, 2003). ....	34
Figura 7 Valores de biomassa de <i>Pseudallescheria boydii</i> com TBHQ após 10 dias de incubação. ....	55
Figura 8 Valores de biomassa de <i>Pseudallescheria boydii</i> com BHT após 10 dias de incubação ....	56
Figura 9 Valores de biomassa de <i>Paecilomyces variotii</i> com TBHQ após 10 dias de incubação. ....	56
Figura 10 Valores de biomassa de <i>Paecilomyces variotii</i> com BHT após 10 dias de incubação.....	57
Figura 11 Valores de biomassa total aos 42 dias sob a condição do biodiesel como recebido. *Controle 1: Biodiesel como recebido (0 ppm). **Controle 2: Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria. ....	58
Figura 12 Valores de biomassa total aos 42 dias sob a condição do biodiesel como recebido com adição de inóculo. *Controle 3: Biodiesel como recebido (0 ppm) mais adição de inóculo. **Controle 4: Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria mais adição de inóculo. ....	59

Figura 13 Valores comparativos de biomassa total aos 42 dias entre as duas formas de biodiesel e diferentes concentrações de TBHQ. Controle*: Biodiesel. Controle**: Biodiesel com antioxidante com a dosagem da planta industrial. ..	60
Figura 14 Aspecto do gel de poliacrilamida de 8% e do gradiente desnaturante de 15% a 55% (DGGE) de amostras da região V3 do gene 16S rRNA. CN1 (controle 1): Biodiesel puro. CN2 (controle 2): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria. CN3 (controle 3): Biodiesel puro + inóculo. CN4 (controle 4): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria + inóculo.....	62
Figura 15 Aspecto do gel de poliacrilamida de 6% e do gradiente desnaturante de 45% a 65% (DGGE) de amostras da região V3 do gene 18S rRNA. CN1 (controle 1): Biodiesel puro. CN2 (controle 2): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria. CN3 (controle 3): Biodiesel puro + inóculo. CN4 (controle 4): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria + inóculo.....	64
Figura 16. Valores de pH da fase aquosa do biodiesel como recebido. *Controle 1: Biodiesel como recebido. **Controle 2: Biodiesel como recebido mais adição de antioxidante da indústria.....	65
Figura 17 Valores de pH da fase aquosa do biodiesel como recebido mais adição de inóculo. *Controle 3: biodiesel como recebido mais adição de inóculo. **Controle 4: biodiesel com adição de antioxidante da indústria mais adição de inóculo.....	67
Figura 18 Viscosidade cinemática a 40°C – Biodiesel como recebido.....	74
Figura 19 Viscosidade cinemática a 40°C – Biodiesel como recebido mais adição de inóculo. ....	75
Figura 20 Valores de teor de água – Biodiesel como recebido. ....	77
Figura 21 Valores de teor de água – Biodiesel como recebido mais adição de inóculo.....	78
Figura 22 Aspecto do frasco contendo o bio-óleo na sua forma pura. ....	91
Figura 23 . Aspecto do frasco de vidro utilizado, contendo a mistura B10 (fase oleosa), meio de cultura (fase aquosa) e inóculo. (Fonte: Foto de Sabrina Beker).....	95
Figura 24 Esquema ilustrativo do procedimento de extração em fase sólida (SPE) (Maciel, 2011). ....	96

Figura 25 Aspecto dos frascos utilizados na avaliação com o crescimento do fungo filamentosso <i>Paecilomyces variotii</i> nas concentrações de 3% (A) e 4% (B), respectivamente, após 10 dias. (Fonte: Foto de Sabrina Beker).....	100
Figura 26 Frascos experimentais contendo inoculo do fungo leveduriforme <i>Candida silvicola</i> nas concentrações de 3% e 4%, respectivamente. (Fonte: Foto de Sabrina Beker) .....	101
Figura 27 Distribuição do total de picos por classe da SPE com água. ....	102
Figura 28 Distribuição das classes dos compostos presentes no extrato realizado por SPE com água ultrapura do bio-óleo. ....	103
Figura 29 Distribuição do total de picos por classe da SPE com NaOH 1M. .	104
Figura 30 Distribuição das classes dos compostos presentes no extrato realizado por SPE com a solução de NaOH 1M do bio-óleo. ....	105
Figura 31 Frascos experimentais contendo inóculo de <i>Bacillus pumilus</i> nas concentrações de 0,5% e 1%, respectivamente, e seu controle. (Fonte: Foto de Sabrina Beker) .....	110
Figura 32 Aspecto do frascos experimentais contendo inóculo não caracterizado nas concentrações de 0,1% e 0,25%, respectivamente, e seus controles. (Fonte: Foto de Sabrina Beker). ....	112
Figura 33 Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM) do bio-óleo frente aos micro-organismos deteriorogênicos de óleo diesel B10 e inóculo não caracterizado .....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Especificações para o biodiesel (B100) no Brasil, Estados Unidos e Europa.....	14
Tabela 2 Efetividade relativa de antioxidantes para diferentes biodieseis (Adaptado de Jakeria et al, 2014). .....	28
Tabela 3 Identificação das amostras do experimento. ....	46
Tabela 4 Concentração inibitória mínima (CIM) e biocida (CBM) de TBHQ após 10 dias de ensaio. ....	52
Tabela 5 Resultados de diversidade de espécie H' (Shannon-Wiener). ....	63
Tabela 6 Resultados de diversidade de espécie H' (Shannon-Wiener) .....	64
Tabela 7 Avaliação da presença/ausência do crescimento bacteriano da fase aquosa. ....	67
Tabela 8 Valores de índice de acidez em biodiesel como recebido. Controle 1: biodiesel puro. Controle 2: biodiesel com antioxidante da indústria. *Resultado não conclusivo: ponto de viragem não encontrado. ....	69
Tabela 9 Valores de índice de acidez do biodiesel com adição de inóculo. Controle 3: biodiesel puro com adição de inóculo. Controle 4: biodiesel com antioxidante da indústria e adição de inóculo. * Resultado não conclusivo: ponto de viragem não encontrado.....	70
Tabela 10 Estabilidade à oxidação do biodiesel como recebido. Controle 1: Biodiesel puro. Controle 2: biodiesel com antioxidante da indústria. *Ponto de inflexão não detectado. ....	71
Tabela 11 Estabilidade oxidativa do biodiesel com adição de inóculo. Controle 3: biodiesel como recebido mais adição de inóculo. Controle 4: biodiesel com antioxidante da indústria mais adição de inóculo. ....	73
Tabela 12 Porcentagem de ésteres de ácidos graxos avaliados presentes no biodiesel como recebido no tempo inicial e após 45 dias de incubação. Biodiesel*: Com adição de antioxidante na dosagem da planta industrial. ....	79

Tabela 13 Porcentagem de ésteres de ácidos graxos avaliados presentes no biodiesel como recebido com adição de inóculo no tempo inicial e após 45 dias de incubação. Biodiesel*: Com adição de antioxidante na dosagem da planta industrial.....	80
Tabela 14 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM) da mistura (bio-óleo+B10) para os inóculos testados.....	99
Tabela 15 Distribuição dos compostos majoritários, número de picos e suas áreas encontrados no extrato realizado com água ultrapura. ....	102
Tabela 16 Distribuição dos compostos majoritários, número de picos e suas áreas encontrados no extrato realizado com NaOH 1M.....	104
Tabela 17 Relação dos compostos fenólicos do extrato obtido com água ultrapura classificados com nome, fórmula e área. ....	107
Tabela 18 Relação dos compostos fenólicos do extrato obtido por NaOH classificados com nome, fórmula e área. ....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ANP - Agência Nacional do Petróleo  
ASTM - American Society for Testing and Materials  
ATM - Atmosfera  
ATP – Adenosina Trifosfato  
BDN - Bactérias denitrificantes  
BEN - Balanço Energético Nacional  
BH – Bushnell-Haas  
BHA - Butil-hidroxi-anisol  
BHT - Butil-hidroxi-tolueno  
BRS - Bactérias redutoras de sulfato  
°C - Grau Celsius  
CBM - Concentração Biocida Mínima  
CECOM – Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos  
CEN - Comitê Europeu de Normalização  
CG – Cromatografia gasosa  
CIM - Concentração Inibitória Mínima  
CNT – Confederação Nacional do Transporte  
DCM – Diclorometano  
DGGE - Gel com gradiente desnaturante  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EPE - Empresa de Pesquisa Energética  
EUA - Estados Unidos da América  
FID – Detector por ionização de chama  
LB – Luria Bertani  
MME - Ministério de Minas e Energia  
mg - Miligrama  
mL - Mililitro  
µg - Micrograma  
µL – Microlitro  
µm - Micrometro  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
NBR – Norma Brasileira Regulamentadora  
NO<sub>x</sub> - Óxido de nitrogênio  
PCA – Plate count agar  
PCR – Reação da polimerase em cadeia  
PG – Propil-galato  
Ppm – Partes por milhão  
rRNA – RNA Ribossomal  
SPE – Extração em fase sólida  
TBHQ – Terc-butil-hidroquinona  
UFC - Unidades Formadoras de Colônia  
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **1. Introdução**

A crescente demanda energética mundial, aliada às questões sociais, políticas, econômicas, e, principalmente ambientais, tem levado à desafiante busca por fontes alternativas aos derivados do petróleo (Balat et al., 2008). Os biocombustíveis entraram neste cenário como uma opção viável para a redução gradual do uso dos combustíveis fósseis, principalmente no setor do transporte, onde até o momento, o óleo diesel é o mais utilizado e o mais importante do ponto de vista econômico (Subramaniam et al., 2013).

A matéria-prima para a obtenção do combustível renovável ou biocombustível é a biomassa, a qual compreende todo material orgânico, não fóssil, seja de origem animal, vegetal ou de micro-organismos, suscetível de ser transformada em energia (Knothe et al., 2005). Entre os combustíveis alternativos propostos, o biodiesel tem recebido muita atenção para uso em motores diesel, uma vez que o mesmo encontra-se inserido na matriz energética nacional desde 2005 quando a Lei 11.097/2005 tornou obrigatória a adição de biodiesel a todo óleo diesel de petróleo no Brasil, sendo que no momento essa mistura corresponde a 6% (B6).

Paralelamente a este cenário, um dos produtos da conversão térmica da biomassa, o bio-óleo, vem sendo igualmente explorado com o intuito de ser adicionado ao óleo diesel (Cataluña et al., 2013). Diversas vantagens são oferecidas pelos biocombustíveis na esfera ambiental, tais como ausência de compostos aromáticos e enxofre. No entanto, a suscetibilidade à contaminação microbiana e à oxidação durante o armazenamento representam as principais fragilidades sofridas pelos combustíveis alternativos.

Com relação à contaminação microbiana, a mesma é favorecida e potencializada devido à presença de água no interior dos tanques de estocagem (Passmann, 2013). Como consequência do desenvolvimento microbiano no interior dos reservatórios, compostos com características ácidas são produzidos pelo metabolismo microbiano, possibilitando um aumento da corrosão e da instabilidade química do combustível, por exemplo. Portanto, o armazenamento é um dos pontos críticos da sustentabilidade da cadeia do biocombustível e deve ser monitorado e avaliado para garantia do produto.

Medidas físicas como drenagem da água e limpeza dos tanques podem ser tomadas a fim de reduzir a possibilidade de desenvolvimento de sedimentos de origem biológica durante a estocagem. Além disso, pode-se fazer uso de agentes químicos com atividade antimicrobiana (biocidas) para prevenir a presença de micro-organismos.

No entanto, no Brasil, o uso e a regulamentação para o uso de biocidas ainda está sob avaliação, pois existem aspectos relacionados ao uso e ao descarte no ambiente que precisam especial atenção e estudos. Desta forma, estudos com moléculas antimicrobianas (biocidas) que atendam a todas as exigências ambientais e econômicos na preservação dos diferentes tipos de combustíveis precisam ser conduzidos. Neste sentido, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de produtos como o bio-óleo adicionado ao óleo diesel B (mistura B10) e dois diferentes aditivos antioxidantes sintéticos comerciais para biodiesel. Para a apresentação dos resultados obtidos a dissertação foi dividida em dois capítulos:

O primeiro capítulo teve como objetivo geral investigar a influência de diferentes concentrações do antioxidante sintético terc-butil-hidroquinona

(TBHQ) sobre a população microbiana presente naturalmente no biodiesel de soja, na condição de como recebido e propositadamente contaminado. Os objetivos específicos deste estudo foram: determinar a concentração inibitória mínima e biocida (CIM/CBM) de TBHQ (Terc-butil-hidroquinona) e BHT (Butil-hidroxi-tolueno) frente a micro-organismos isolados (*Paecilomyces variotii*; *Pseudallescheria boydii*; *Candida silvicola* e *Bacillus pumillus*) e a um consórcio microbiano não caracterizado conforme Norma ASTM E1259-10 durante 10 dias; Acompanhar o desenvolvimento microbiano (biomassa) dos microcosmos sob os diferentes concentrações de TBHQ (0 ppm; 50 ppm; 100 ppm; 200 ppm; 300 ppm e 600 ppm) tanto em biodiesel como recebido quanto em biodiesel contaminado propositadamente através de medidas de peso seco por 42 dias; monitorar a variação do teor de água, viscosidade cinemática à 40°C, estabilidade à oxidação a 110°C e índice de acidez da fase oleosa ao longo de 45 dias a fim de relacionar os resultados com as especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP); estimar a biodegradação dos ésteres presentes na fase oleosa através da técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama conforme Norma Européia EN14103 e Identificar a diversidade microbiana presente nos microcosmos através da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante após 45 dias de estocagem simulada.

O segundo capítulo teve como objetivo geral avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de um bio-óleo experimental, sob a perspectiva de agente antimicrobiano, em mistura B10, sendo que os objetivos específicos foram: determinar a concentração inibitória (CIM) e biocida (CBM) mínima de diferentes concentrações de bio-óleo: 0% (controle); 0,05%; 0,1%;

0,25%; 0,5%; 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9% e 10%, em óleo diesel B (mistura B10), fazendo uso de quatro diferentes micro-organismos previamente isolados de tanques de combustíveis: *Bacillus pumilus*, *Paecilomyces variotii*, *Candida silvicola* e Inóculo não-caracterizado conforme norma ASTM E1059-10 durante 10 dias; Realizar a extração dos compostos solúveis em água presentes no bio-óleo, com o intuito de investigar quais compostos migraram para a fase aquosa e conferiram a ação antimicrobiana fazendo uso da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE) e, por fim, caracterizar qualitativamente através de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada a Espectrometria de Massas por tempo de voo (GC×GC/TOFMS) os extratos obtidos na Extração em Fase Sólida (SPE) do bio-óleo.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Biocombustíveis**

A crescente demanda energética mundial, aliada às questões ambientais, tem levado à desafiante busca por fontes alternativas aos derivados do petróleo. Sabe-se que a solução para estes desafios está no desenvolvimento e na maior utilização de fontes energéticas limpas e renováveis. Devido à isso, a sociedade científica vem conduzindo muitas pesquisas sobre combustíveis renováveis alternativos nas últimas décadas, principalmente no setor do transporte (Moura et al., 2010; Subramaniam et al., 2013).

Há mais de 100 anos, o inventor do motor a diesel, Rudolf Diesel, testou óleo de amendoim em seu motor. Na época, o engenheiro alemão disse que o uso de óleos vegetais como combustíveis podiam parecer insignificantes naquele momento, no entanto, ao longo do tempo, podiam tornar-se tão importantes quanto os produtos derivados de petróleo. A busca por fontes de energia ilimitada sofreu um maior impulso na década de 70, devido principalmente à crise energética global; altos preços do petróleo; incertezas acerca da disponibilidade deste recurso limitado e às crescentes preocupações ambientais (Wang et al., 2000; Demirbas et al., 2009; Balat et al., 2010).

A matéria prima para a obtenção do combustível renovável ou biocombustível é a biomassa, que segundo Omachi e colaboradores (2004), compreende todo material orgânico, não fóssil, que contém energia química em seu interior, como as vegetações aquáticas ou terrestres, árvores, biomassa virgem, lixo orgânico, resíduos de agricultura, esterco de animais entre outros restos industriais. Segundo Correio (2009), cita-se como exemplo de

combustíveis renováveis oriundos de biomassa: o bio-óleo, o etanol, o biogás e o biodiesel.

No Brasil, segundo dados do Balanço Energético Nacional (BEN), as fontes renováveis representam 79,3% da oferta interna de eletricidade no Brasil, que é a resultante da soma dos montantes referentes à produção nacional mais as importações, que são essencialmente de origem renovável (Figura 1), e dentro deste percentual a biomassa representa 7,6% demonstrando o satisfatório desenvolvimento do Brasil quanto à utilização de energias alternativas (BEN, 2014).

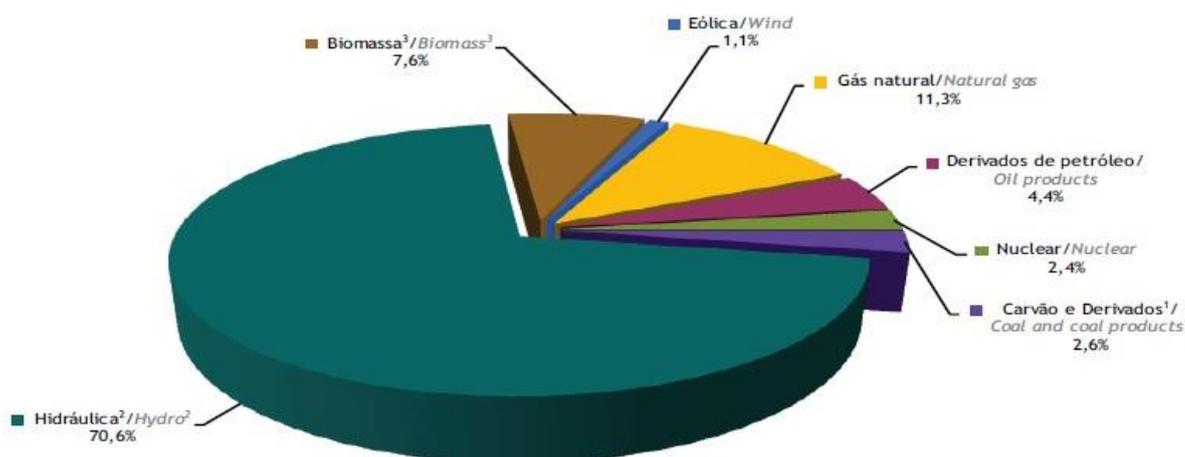


Figura 1 Estrutura da oferta interna de Energia Elétrica por fonte no Brasil em 2013. Fonte: Ministério de Minas e Energia, 2014.

Segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2011) do MME (Ministério de Minas e Energia) nos próximos dez anos, a demanda total de energia do país poderá crescer mais de 60%. Até 2020, 65% do consumo total serão ligados aos setores industrial e de transportes. Para tanto, os investimentos totais previstos pelo governo brasileiro, na área de biocombustíveis somam R\$ 97,2 bilhões até o final desta década.

A estabilidade ao armazenamento do biodiesel e suas misturas vem sendo avaliada em pesquisas com o intuito de investigar a qualidade final, avaliando-se entre outras a suscetibilidade à oxidação e à contaminação microbiana (Cavalcanti, 2009; Bücken et al., 2011; Passmann, 2013; Cazarolli et al., 2013, Zimmer et al., 2013; Fernandes et al., 2013).

### **2.1.1 Bio-óleo**

Atualmente, existe uma tendência no aproveitamento da biomassa residual conseqüente da produção agrícola no Brasil. Não somente por razões econômicas, mas também por questões ambientais, o reúso destes resíduos ricos em materiais lignocelulósicos desempenha um importante papel na matriz energética, uma vez que através do processo de conversão térmica (pirólise) podem ser transformados em bio-óleo (Cataluña et al, 2013).

O bio-óleo, também conhecido sob os nomes de óleo de pirólise ou líquido de pirólise, é geralmente um líquido orgânico de cor castanho escuro e cheiro de fumaça característico. Sua composição caracteriza-se por conter moléculas de diferentes tamanhos, derivadas das reações de despolimerização ou fragmentação dos três principais blocos de constituição da biomassa: celulose, hemicelulose e lignina (Ozçimen, 2010).

A pirólise, por sua vez, é um processo que provoca a decomposição de um material sólido na ausência de oxigênio, utilizando energia térmica para originar os produtos sólidos (carvão e cinzas), líquidos (bio-óleo) e gasosos (voláteis). Nessa conversão, o óleo obtido na pirólise é constituído por espécies moleculares menores e apresenta em sua composição, normalmente, mais de quatrocentos compostos orgânicos diferentes que apresentam um amplo

espectro de funcionalidade química, e água (Xu et al., 2008). Dentre estes compostos orgânicos encontram-se hidroxialdeídos, hidroxicetonas, açúcares, furanos, ácidos carboxílicos e fenóis (Pollard et al., 2012).

O bio-óleo, além de ser usado na produção de inúmeras substâncias na indústria química, destaca-se principalmente por ser um combustível líquido renovável, sendo esta a maior vantagem sobre derivados do petróleo. (Czernick et al., 2004). No entanto, a composição variável do bio-óleo provoca uma instabilidade química no produto além de uma alta viscosidade, por isso, o óleo de pirólise requer algumas modificações para o uso como combustível, ou então, ele pode ser adicionado ao etanol e óleo diesel. Pesquisas científicas nesta direção vêm sendo realizadas com sucesso (Cataluña et al., 2013).

Outra importante aplicação do bio-óleo que vem sendo investigada é com relação à sua atividade antimicrobiana (Mohan et al., 2008; Okutucu, 2011; Dong et al., 2011; Kim et al., 2012; Lingbeck et al., 2014). Em revisão publicada recentemente, Lingbeck e colaboradores (2014) trouxeram diversos estudos que comprovam a eficiência antimicrobiana do bio-óleo frente a um grande espectro de bactérias patogênicas. Os autores atribuíram o efeito preservante do líquido de pirólise devido à presença de compostos antimicrobianos e antioxidantes como os aldeídos, ácidos carboxílicos e fenóis.

### **2.1.2 Biodiesel**

Biodiesel é um nome comum dado ao combustível alternativo que pode ser produzido a partir de uma infinidade de matérias primas oleosas tais como óleos vegetais, gordura animal, óleos residuais urbanos ou industriais ou ainda, a partir de algas e micro-organismos (Knothe et al., 2005). A escolha da

matéria-prima a ser utilizada na produção de biodiesel é tanto um processo de decisão química quanto de decisão econômica (Basha, 2009).

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, dendê, girassol etc. (Ferrari et al., 2005; Shahid & Jamal, 2008). 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 plenamente 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 é quimicamente definido como uma mistura de mono alquil ésteres de ácidos graxos derivados da transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (Knothe et al., 2010). Transesterificação é uma reação química na qual metanol ou etanol reage com óleos vegetais ou animais na presença de um catalisador (ácido ou básico) para produzir ésteres de ácidos graxos e glicerol (figura 2) (Knothe et al., 2006; Subramanian et al., 2013).

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel foi criado em 2004, e com a aprovação da Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o governo brasileiro introduziu o biodiesel na matriz energética nacional. Todo o óleo diesel veicular comercializado ao consumidor final possui biodiesel. Desde maio de 2010 a mistura obrigatória passou a ser de 5% de biodiesel a o diesel de petróleo. Este percentual tende a aumentar nos próximos anos, podendo

chegar a 20% em 2018 para as áreas metropolitanas do país. Tramita no Congresso a Medida Provisória (MP) 647/14, que aumenta de 5% para 7% o percentual de adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final. O aumento será feito em duas etapas. Em 1º de julho do corrente ano aumentou para 6%, conforme definido pela Lei 11.097/05. Em 1º de novembro passará para 7%. (congressonacional.leg.br, 2014).

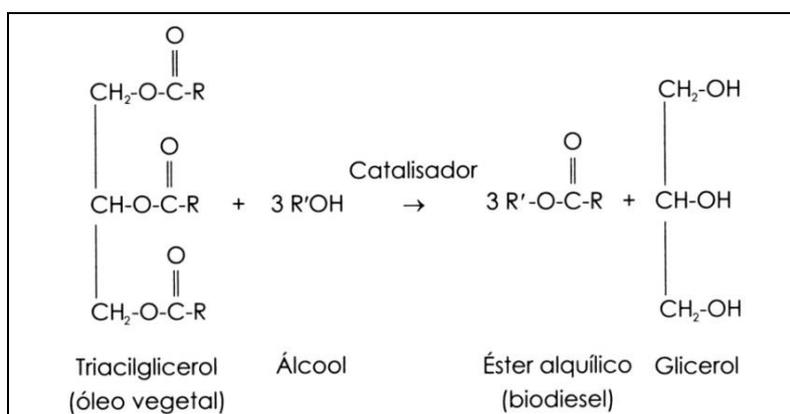


Figura 2 Reação de transesterificação para produção de biodiesel. R representa uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos. O álcool empregado é geralmente o metanol (R' = CH3). Fonte: Knothe et al., 2005.

Essa mistura é denominada óleo diesel B e, assim como o combustível de origem fóssil, requer determinados cuidados para que a qualidade do produto se mantenha ao longo de toda a cadeia de abastecimento, da produção até o consumidor final (ANP, 2010). Portanto, o armazenamento é um dos pontos críticos da sustentabilidade da cadeia do biodiesel e deve ser monitorado e avaliado para garantia do produto.

O principal critério para a qualidade do biodiesel é o atendimento a um padrão apropriado. Atualmente, o padrão de qualidade americano, elaborado pela American Society of Testing and Materials (ASTM), através da Norma

ASTM D6751, e o estabelecido na União Européia através da norma EN 14214 do Comitê Europeu de Normalização (CEN) figuram como os mais conhecidos e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões (Lobo et al., 2009).

O biodiesel, por ser uma fonte renovável de energia, apresenta várias vantagens na sua utilização em relação ao diesel. Destacam-se: o alto número de cetano; alto ponto de fulgor; baixas emissões de material particulado e de monóxido de carbono e dióxido de carbono; alta biodegradabilidade, e também não possuem em sua composição enxofre e compostos aromáticos (Passman et al, 2005; Lapuerta et al., 2012). 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, 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 (NO<sub>x</sub>), mas os percentuais de redução variam de acordo com a quantidade de biodiesel adicionada ao diesel.

A composição média de ésteres de ácidos graxos do biodiesel de soja pode variar, no entanto, majoritariamente, essa composição compreende C16:0 (Palmítico), C18:0 (Esteárico), C18:1 (Oléico), C18:2 (Linoleico) e C18:3 (Linolênico), sendo que há uma predominância de ésteres de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoléico com um teor de, aproximadamente, >50% (Ferrari et al., 2005; Pullen & Saeed, 2014). Os ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis que os saturados a reações de oxidação, as quais são

aceleradas pela exposição ao oxigênio e altas temperaturas, condições estas que interferem na qualidade do produto. Portanto, é necessário determinar a composição de ésteres de ácidos graxos no biodiesel para poder estudar sua estabilidade (Ferrari et al., 2005).

Devido a esta composição, o biodiesel é facilmente reconhecido como uma fonte de carbono prontamente assimilável pelos micro-organismos, o que pode produzir sob determinadas condições, além da suscetibilidade à oxidação, uma maior suscetibilidade à biodegradação (Gomes, 2008; Bücken et al., 2011; Passmann, 2013). A biodegradabilidade do biodiesel, embora freqüentemente reportada por ser uma vantagem (Lutz et al., 2006; Mariano et al., 2008; Bücken et al., 2011; Passmann, 2013), pode tornar-se uma desvantagem do ponto de vista dos padrões de qualidade do biocombustível.

A higroscopicidade intrínseca do biodiesel o torna mais rapidamente biodegradável do que combustíveis fósseis (Azam et al., 2005; He et al., 2007; Luque et al., 2008). E, de acordo com Sorensen e colaboradores (2011), a introdução em larga-escala na infra-estrutura já existente de armazenamento de combustíveis pode resultar em um aumento significativo na atividade microbiana devido à pré contaminação nos tanques.

Outro fator, não menos importante, que contribui para sua vulnerabilidade é a sua baixa estabilidade química (Passmann & Dobranick, 2005, Ferrari et al., 2005; Pullen & Saeed, 2014, Fattah et al., 2014). Devido à presença de uma quantidade significativa de ácidos graxos com ligações duplas, a baixa estabilidade oxidativa representa uma preocupação pois diminui significativamente a qualidade do produto quando o mesmo é estocado durante um longo tempo (Jain et al., 2010).

Sendo assim, em função deste cenário nacional, o Programa Brasileiro de Biodiesel através da Rede Brasileira de Estudos sobre Armazenamento, Estabilidade e Problemas Associados (ARMAZBIODI) vem realizando estudos de vida de prateleira dos principais biodieseis e misturas. Esta rede tem como um de seus objetivos a identificação e eliminação de gargalos tecnológicos no armazenamento de biodiesel e suas misturas, no tocante a processos de origem química e biológica. Portanto, a realização de pesquisas com o intuito de investigar a qualidade e as fragilidades, entre elas: suscetibilidade à oxidação e à contaminação microbiana dos biocombustíveis tem sido fundamental para a garantia da qualidade final dos combustíveis (Cavalcanti, 2009; Bücken et al., 2011; Dantas et al., 2011; Silva et al., 2012; Cazarolli et al., 2013, Zimmer et al., 2013).

#### **2.1.2.1 Especificações do biodiesel**

O biodiesel de qualidade deve ser produzido seguindo especificações industriais restritas, conforme norma ASTM D6751 de nível internacional (BiodieselBr, 2007). A lei que regulamenta o biodiesel no Brasil é a Lei nº 11.097, de janeiro de 2005. Nesta lei estão especificadas todas as regras para a produção e comercialização do biodiesel (Brasil, 2005).

No Brasil, as especificações do biodiesel puro (B100) são estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). A Tabela 1 relaciona as especificações para o índice de acidez, estabilidade à oxidação, viscosidade cinemática e teor de água incluindo os limites e métodos para o B100, estabelecidas no Brasil, Estados Unidos e Europa (Hoekman et al., 2012; Brasil, 2012).

Tabela 1 Especificações para o biodiesel (B100) no Brasil, Estados Unidos e Europa.

	Brasil		Estados Unidos		Europa	
	Limites	Método	Limites	Método	Limites	Método
VC <sup>1</sup> à 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	3,0 a 6,0	NBR 10441 ASTM D445 EN 3104	1,9 a 6,0	ASTM D445	3,5 a 5,0	EN 3104 EN 3105
IA <sup>2</sup> , máx. (mg KOH/g)	0,50	NBR 14448 ASTM D664 EN14104	0,50	ASTM D664	0,50	EN14104
EO <sup>3</sup> (h)	6,0	EN 14112	3,0	EN14112	6,0	EN 14112
TA <sup>4</sup> (mg/kg)	200	ASTM D6304	500	ASTM D6751	500	EN 14214

VC<sup>1</sup> - Viscosidade Cinemática IA<sup>2</sup> - Índice de Acidez EO<sup>3</sup> - Estabilidade à Oxidação TA<sup>4</sup> – Teor de Água

Os problemas no armazenamento podem ser causados pelas condições de estocagem como exposição ao ar e/ou à luz, temperatura, assim como a presença de metais com efeitos catalíticos na oxidação. Esta instabilidade do combustível pode aumentar a formação de sedimentos e goma e ainda, o escurecimento do biodiesel (Jain et al., 2010).

O uso de um biocombustível degradado em motor causa problemas operacionais como entupimento de filtros e bicos injetores, formação de depósito na câmara de combustão e em vários componentes do sistema, desse modo, afetando de maneira ruim o desempenho do motor (Gerpen et al., 1997; Kawasaki & Yamane, 2007). Por esta razão, alguns parâmetros físico-químicos devem ser monitorados, exercendo o papel de indicadores de que os processos de degradação abiótica estão ocorrendo no sistema.

#### 2.1.2.1.1 Índice de Acidez

O monitoramento da acidez no biodiesel é de grande importância durante a estocagem, uma vez que é utilizado para estimar o nível de ácidos

graxos livres ou produtos de degradação que podem estar presentes no biodiesel e, freqüentemente, o excesso de ácidos é associado a problemas de corrosão nos motores e degradação durante sua estocagem. A alteração dos valores neste período pode significar a presença de água (Lôbo et al., 2009). Quanto maior o índice de acidez, maior a formação de produtos ácidos pela oxidação (Dos Santos et al., 2011).

#### *2.1.2.1.2 Estabilidade à Oxidação a 110°C*

A estabilidade oxidativa do biodiesel está diretamente relacionada com o grau de insaturação dos alquilésteres presentes (Lôbo et al., 2009) como também, com a posição das duplas ligações na cadeia carbônica (Barreto et al., 2012). A concentração de alquilésteres com alto grau de insaturação varia de acordo com a matéria prima utilizada na produção do biodiesel. Quanto maior o número de insaturações, mais suscetível está a molécula à degradação tanto térmica quanto oxidativa, formando produtos insolúveis que ocasionam problemas de formação de depósitos e entupimento do sistema de injeção de combustível do motor.

A alta temperatura e a exposição ao ar são fatores importantes que afetam a estabilidade do biodiesel, contudo, esta é significativamente afetada quando estes dois fatores estão presentes ao mesmo tempo (Dorado et al., 2013). A baixa estabilidade frente à oxidação restringe o uso de biodiesel (Lobo et al, 2009; Almeida et al, 2011). Entretanto, é possível aumentar essa estabilidade com a adição de antioxidantes fenólicos sintéticos, comumente utilizados em alimentos (Takemoto et al., 2009; Tormin et al., 2011).

#### 2.1.2.1.3 Viscosidade Cinemática a 40°C

A viscosidade do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação (Borsato et al., 2012) e tem influência no processo de queima na câmara de combustão do motor. Alta viscosidade ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor.

Apesar de alguns tipos de motores e sistemas de injeção poderem utilizar óleos vegetais não transesterificados, a maior parte dos motores hoje disponíveis exige a utilização de combustíveis com viscosidade inferior às dos óleos vegetais (Knothe et al, 2006).

#### 2.1.2.1.4 Teor de água

A água, além de promover a hidrólise do biodiesel resultando em ácidos graxos livres, também está associada à proliferação de micro-organismos, corrosão em tanques de estocagem com deposição de sedimentos. Como o biodiesel apresenta certo grau de hidroscopicidade, o teor de água deverá ser monitorado durante o armazenamento (Lôbo et al., 2009).

## **2.2 Micro-organismos deteriogênicos de combustíveis e biocombustíveis**

A biodeterioração de combustíveis vem sendo reportada desde o século passado. Em 1895, foi documentado o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* em parafina por Miyoshi (Gaylarde et al 1999; Miyoshi 1895, *apud* Bento 2001).

Com relação às formas de acesso da população microbiana ao combustível no local de armazenagem, Yemashova e colaboradores (2007) sugerem que essa contaminação possa ocorrer através do sistema de ventilação ou de bombeamento dos sistemas de combustíveis, uma vez que são micro-organismos encontrados tanto no ar, como no solo e na água. A presença de oxigênio em tanques de armazenamento é comum, pois sua entrada no sistema ocorre durante a reposição do combustível, pela própria ventilação dos tanques, o que favorece a proliferação de muitas espécies de micro-organismos aeróbios (bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes).

Entre as bactérias aeróbias que já foram isoladas de tanques de armazenamento, podem-se citar os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* etc (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Passmann, 2003; Vieira et al., 2006; Chao et al 2010). O crescimento de bactérias anaeróbias, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias denitrificantes (BDN), também foi detectado em tanques de estocagem (Gaylarde et al., 1999).

Fungos filamentosos e leveduriformes dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Hormoconis*, *Penicillium*, *Alternaria* – entre outros- já foram isolados de tanques de armazenamento (Bento & Gaylarde, 2001; Passmann, 2003; Miranda et al., 2007; Yemashova et al., 2007; Restrepo-Rodríguez et al 2010). Bückler e colaboradores (2011) reportaram que *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp, *Rhodotorula* sp e *Candida silvicola* – todos previamente isolados de tanque de estocagem –

foram capazes de crescer as expensas de diesel, biodiesel e misturas B5, B10, B20.

White e colaboradores (2011) identificaram através de métodos de cultivo microbiano tradicionais, a predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* em diesel contaminado, enquanto que utilizando técnicas independentes de cultivo (piroseqüenciamento do gene 16 rRNA) indicaram que os gêneros *Marinobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia* e *Halomonas* foram os mais comuns encontrados. Bücken e colaboradores (2014) identificaram a presença de *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Dysgonomonas*, *Hylemonella*, *Klebsiella* e *Tolomonas* em biodiesel através de seqüenciamento por IlluminaHiSeq do gene 16S rRNA (método independente de cultivo). Archea (Euryarchaeota e Crenarchaeota) também foram detectadas pela autora e colaboradores confirmando as informações recentemente publicadas na revisão sobre contaminação microbiana de combustíveis por Passmann (2013).

### **2.2.1 Estudos sobre diversidade microbiana em combustível**

Segundo Passman (2013), a população microbiana dos sistemas de combustíveis é taxonomicamente diversa e inclui bactérias, fungos e arqueias. Os estudos da composição das comunidades microbianas tem contribuído para o conhecimento da susceptibilidade de combustíveis e biocombustíveis à deterioração e degradação microbiológica.

A indústria de combustíveis ainda se baseia em técnicas tradicionais e dependentes de cultivo e de identificação fenotípica microbianas (Norma ASTM D6974-09). A eficácia destas metodologias baseadas no cultivo de micro-

organismos, ou seja, que possuem a capacidade de crescer em meios de cultura, apresenta uma limitação no momento em que subestima a diversidade microbiana e possível identificação incorreta das espécies constituintes do combustível (White et al., 2011).

Atualmente, estão sendo explorados novos métodos moleculares para acessar as populações microbianas que não são cultiváveis. Estas técnicas, chamadas também de técnicas independentes de cultivo, são geralmente baseadas em seqüenciamento de última geração e permitem a identificação de espécie a partir da análise de DNA da amostra, seja ela de um micro-organismo isolado ou de uma determinada comunidade composta de vários micro-organismos. A partir da extração direta do DNA total da amostra identifica-se a diversidade e abundância de comunidades microbianas. Entre estes métodos moleculares, o DGGE - *denaturing gradient gel electrophoresis* vem sendo bastante utilizado (Lee et al., 2010; White et al., 2011; Sorensen et al., 2011; Colla et al., 2014; Meyer et al., 2014; Bücken et al., 2014), o qual constitui uma técnica rápida e de baixo custo em relação ao seqüenciamento de alto rendimento, e permite a visualização do perfil da comunidade de diferentes amostras (Muyzer et al., 1993).

O DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) tem como princípio diferentes padrões de migração de gene amplificado por PCR baseados na variação da composição de bases dentro do gene amplificado (Muyser et al., 1993). O produto amplificado tem o mesmo tamanho, ou seja, mesmo número de pares de bases (pb). Os oligonucleotídeos iniciadores, delineados para DGGE, amplificam regiões entre 200 e 500pb. Os procedimentos para a realização do DGGE envolvem a extração do DNA

genômico, amplificação, por PCR, do gene de interesse, e eletroforese do produto amplificado em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear (uréia e formamida) que promove a desnaturação do DNA. À extremidade 5' do forward primer é acoplado a um grampo de cerca de 30 a 50 bases G-C. A migração do produto amplificado, por eletroforese, do gradiente de menor grau de desnaturação para o gradiente de maior grau de desnaturação, causa a desnaturação do DNA em fitas simples. Assim, a completa desnaturação da dupla fita é necessária para a migração. Mas, a presença do grampo G-C, incorporado a uma das extremidades, impede a completa desnaturação do produto amplificado. A mobilidade eletroforética do produto amplificado depende da relativa proporção de G-C e A-T. Cada banda presente no gel corresponde a uma única espécie de micro-organismo.

### **2.3 Condições e suscetibilidade ao desenvolvimento microbiano em biocombustíveis**

A presença de água é a condição fundamental para que o crescimento microbiano ocorra em qualquer ambiente. Durante o armazenamento de combustíveis um dos principais fatores desencadeadores do desenvolvimento microbiano é a presença de água. Por esta razão, a remoção da água é uma medida de preservação dos combustíveis. A água nos sistemas de armazenamento (tanques e tubulações) pode ser encontrada em diferentes formas: livre, dissolvida e emulsificada.

O processo de remoção da água dos sistemas de estocagem durante as operações diárias é bastante difícil, especialmente quando o biodiesel é adicionado à mistura. A razão para isso é que o biodiesel, por natureza, é mais

higroscópico que os combustíveis de origem fóssil (He et al., 2007) podendo conter até aproximadamente 1500 ppm (0,15%) de água em solução, enquanto o diesel comum somente até 100 ppm (0,05%) (Gerpen et al., 1997).

Além da capacidade do biodiesel absorver umidade, a água presente em um tanque de estocagem pode estar relacionada ao transporte do combustível. É muito comum observar a penetração de água no sistema durante operações de carga e descarga, bem como através de sistema de ventilação imprópria. Vedação deficiente e mudanças de temperatura dentro do sistema são também fonte de condensação das gotículas de água do ar (Sorensen 2011; CNT, 2012). Estabelecida a presença de água no tanque, o biodiesel pode sofrer tanto a degradação química (reações de hidrólise), como a biológica, favorecendo dessa forma o crescimento de micro-organismos na interface óleo-água. Após iniciado o crescimento microbiano, o metabolismo celular também libera água.

A temperatura é um dos fatores mais importantes que afetam a degradação de muitas substâncias como alimentos e óleos que contêm compostos orgânicos. Leung e colaboradores (2006) realizaram um estudo investigando a degradação de biodiesel sob diferentes condições e obtiveram resultados que indicaram que altas temperaturas, concomitantemente à exposição ao ar, têm um importante papel na degradação do biodiesel, provavelmente devido à alta taxa de oxidação do biodiesel a altas temperaturas.

Dentro do tanque de estocagem de combustível, também pode-se encontrar condições que propiciam o crescimento microbiano, como os valores de pH da água na faixa de 4,0 a 9,0. A atividade metabólica de alguns micro-organismos podem contribuir na redução do pH da água livre, pela produção de

ácidos orgânicos (Bücker et al., 2011, Hill & Hill, 2008; Aktas et al., 2010; Passmann, 2013).

O estabelecimento de grupos microbianos aeróbios e anaeróbios (bactérias redutoras de sulfato, por exemplo) ocorre em função da difusão do oxigênio dentro do tanque, que pode variar em cada sistema. Muitos micronutrientes (compostos inorgânicos e orgânicos) podem ser disponibilizados aos micro-organismos pela entrada de ar, poeira, aditivos e principalmente pelo combustível que pode carrear outros contaminantes.

Sendo assim, diversos são os fatores que contribuem para o desenvolvimento microbiano e conseqüente formação de biomassa dentro de um sistema, oferecendo condições favoráveis à biodegradação do combustível. Por outro lado, o biodiesel dependendo de sua origem (vegetal ou gordura animal), por apresentar características distintas em termos de composição química, pode nuclear a geração de sedimentos de natureza química diversa (gomas, monoglicérides, esterol-glicosídeos, compostos inorgânicos, ácidos orgânicos e inorgânicos) (Jain et al., 2010).

As mudanças na natureza do combustível, como a tendência mundial da redução do teor de enxofre, presença de biodiesel e principalmente as condições durante o armazenamento poderão determinar uma maior ou menor formação de sedimentos seja de origem química e/ou biológica. O Brasil é um país com grande diversidade climática formado de regiões com diferentes temperaturas médias em diferentes estações do ano, além de diferentes valores de umidade relativa. Dependendo da região, os cuidados com o acúmulo de água no interior dos tanques de armazenagem de combustíveis devem ser redobrados. Nas regiões quentes e úmidas, por exemplo, é mais

provável que ocorra a formação de água no fundo dos tanques devido à condensação do ar interno. Essa água livre favorece a corrosão de materiais e o desenvolvimento microbiano (Gaylarde et al., 1999; Chesneau, 2000; Cavalcanti, 2009).

Além disso, devido às diferentes regiões do país basearem-se em diferentes tipos de economia, as matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel podem variar de acordo com o local. O Brasil dispõe de uma imensa variedade de espécies vegetais que podem ser empregadas na produção de biodiesel (Ferrari et al., 2005; Shahid & Jamal, 2008; Apolonário et al., 2012) e suas diferentes composições químicas podem afetar o modo como se dá a sua biodegradação.

Como conseqüências do crescimento microbiano em tanques de armazenamento, são detectados vários problemas que podem ser percebidos principalmente pelo armazenador e pelo consumidor final. Os principais problemas e conseqüências são: bloqueios de tubulações, válvulas e filtros; aumento do conteúdo de água; formação de lodo; produção de surfactante causando emulsificação do óleo; corrosão dos tanques de estocagem; produção de sólidos suspensos no combustível; degradação de hidrocarbonetos entre outros (Gaylarde et al., 1999).

#### **2.4 Biodeterioração do biodiesel**

Segundo Passmann (2013), a diferença entre biodeterioração e biorremediação (tipicamente reportada como biodegradação) é tipicamente comercial. Ambos são conseqüências da atividade microbiana. Quando a degradação do combustível é desejada (por exemplo, após um derramamento

ou vazamento de um tanque), o termo de operação utilizado é biorremediação. Quando o combustível perde valor comercial, então o fenômeno é identificado como biodeterioração. No entanto, de uma perspectiva ecológica microbiana, quase não há diferença entre biorremediação e biodeterioração.

Com relação à degradação, o biodiesel é o composto mais facilmente degradado em relação aos derivados de petróleo, que normalmente possuem em sua composição compostos recalcitrantes. A constituição do biodiesel é baseada em cadeias de hidrocarbonetos na forma de éster com dois átomos de oxigênio ligados a outros dois radicais orgânicos que o torna biologicamente ativo, ou seja, essas moléculas são facilmente reconhecidas e degradadas pelos micro-organismos (Lapuerta et al., 2009) .

Para que a deterioração dos combustíveis por micro-organismos ocorra, são necessárias algumas condições. A presença de uma comunidade microbiana com a capacidade de utilizar (tornar disponível e degradar) esse combustível como fonte de carbono é essencial, sendo que estas competências são traduzidas pela produção de biossurfactantes e enzimas. A disponibilidade do combustível ao ataque microbiano é uma das primeiras condições e pode ser garantida pela produção de biossurfactantes (Bento et al., 2008).

Os biossurfactantes são um grupo de metabólitos geralmente secundários com propriedades de reduzir a tensão superficial e interfacial e são sintetizados por uma ampla variedade de micro-organismos. Esses metabólitos são moléculas anfifílicas complexas em que as porções hidrofílicas e hidrofóbicas dependem da fonte de carbono e da espécie microbiana (Benincasa et al., 2004). A parte hidrofílica faz com que os surfactantes se

solubilizem em água, enquanto a parte hidrofóbica faz com que eles se concentrem na interface. Com a redução da tensão superficial, os biossurfactantes aumentam as áreas de superfície dos compostos insolúveis levando a um aumento da mobilidade e biodisponibilidade dos compostos apolares do combustível, ou seja, os biossurfactantes aumentam a biodegradação dos combustíveis (Perfumo et al., 2010).

Por sua vez, as enzimas presentes nos micro-organismos deteriogênicos também desempenham um papel significativo na biodegradação do biodiesel. Essas enzimas atuam primeiramente no catabolismo dos ésteres realizando a hidrólise do metil ou etil éster. Esta reação é catalisada por uma esterase (ou lipase) que resulta em um ácido graxo e um álcool. Após esta reação, os ácidos graxos são incorporados às células microbianas por processos de  $\beta$ -oxidação (Amouric et al., 2010).

As esterases são enzimas que agem em ésteres solúveis ou hidrolisam outros lipídeos em água e as lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface óleo/água catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídios, resultando na formação de mono e diacilglicerídios, ácidos graxos e glicerol, além disso, as lipases propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa. Ambas lipases e esterases são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água, como os triacilglicerídeos. Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al., 1999).

Com o aumento do teor do biodiesel ao diesel em território nacional, tornam-se imprescindíveis investigações acerca da suscetibilidade dessa

mistura à contaminação microbiana. Apesar de diversos estudos reportarem a biodegradação do biodiesel, ainda são necessárias pesquisas que envolvam o efeito da biodegradação nas propriedades e mecanismos relacionados aos combustíveis (Jakeria et al., 2014).

#### **2.4.1 Aplicação de cromatografia gasosa no estudo de biodiesel**

Diversas técnicas têm sido empregadas na determinação do teor de ésteres em biodiesel, tanto no sentido de estimar a pureza do produto final quanto para acompanhamento da reação de transesterificação (Marques et al., 2010). Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG/DIC), cromatografia gasosa com detector seletivo de massas (CG/DSM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida com detector seletivo de massas (CL/DSM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN-1H e 13C) e infravermelho próximo (IV) são alguns exemplos (Knothe et al., 2005).

A norma europeia EN14103 indica o emprego da cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG/DIC) com padronização interna e quantificação com calibração por um ponto. Heptadecanoato de metila é o padrão interno. O método quantifica ésteres graxos metílicos com cadeias de 14 a 24 carbonos, saturados ou insaturados.

#### **2.5 Uso de antioxidantes em biodiesel**

Apesar das inúmeras vantagens, o biodiesel é mais suscetível à auto-oxidação do que combustíveis fósseis (Kivevele et al., 2011; Dantas et al., 2011). A exposição ao calor, a luz, a umidade, ao oxigênio e aos

contaminantes metálicos podem acelerar o processo de oxidação o qual pode ter um papel importante na formação de compostos indesejáveis (Araujo et al., 2009; Kivevele et al., 2011).

A estabilidade do biodiesel na presença de aditivos tem sido estudada por diversos pesquisadores (Knothe 2007; McCormick et al., 2007; Xim et al., 2009). Normalmente, esses antioxidantes são compostos sintéticos que interrompem a reação em cadeia de radicais livres.

Por exemplo, um antioxidante (AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio) intercepta o radical peróxido (RCOO\*) para preveni-lo de criar outro radical pelo mecanismo de auto-oxidação. O mecanismo relacionado é mostrado abaixo (Pullen et al., 2012):

**Estágio de interceptação do radical:  $R - COO' + AH \leftrightarrow R - COOH + A'$**

**Estágio de término do radical:  $A' + A' \leftrightarrow A - A$  ou materiais sem radical**

Para aumentar a estabilidade á oxidação na estocagem de ésteres metílicos de ácido graxo de diferentes óleos, é comum o tratamento destes ésteres empregando-se diferentes tipos de antioxidantes sintéticos ou naturais, tais como, butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-buti-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (Du Plessis et al, 1985; Leung et al, 2005; Bondioli et al, 1995; Dunn, 2002) (Figura 3). Eles são caracterizados pela presença de grupos fenólicos, com hidrogênio dissociável, capazes de formar radicais livres estáveis. Desta forma, a oxidação do óleo (biodiesel) não se propaga.

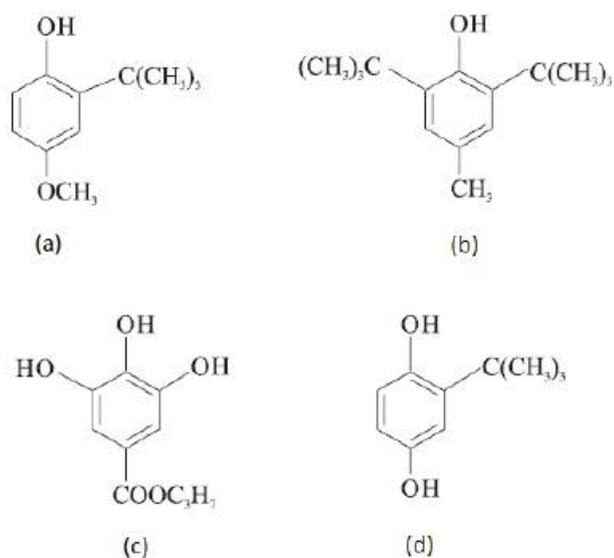


Figura 3 Estruturas fenólicas de antioxidantes sintéticos (a) BHA, (b), BHT, (c), PG e (d) TBHQ (Ramalho & Jorge, 2006).

A atividade dos antioxidantes fenólicos depende do número de grupos hidroxil/fenólicos anexados às suas posições orto e para no anel aromático. Geralmente, o grupo hidroxil ativo pode prover prótons que inibem a formação de radicais livres ou interrompem a propagação de radicais livres, o que pode retardar a taxa de oxidação do biodiesel (Karavalakis & Pereira, 2010).

Baseado na revisão de literatura, é evidente que diferentes antioxidantes têm diferentes influências na estabilização oxidativa de diferentes biodieseis, oriundos de diferentes substratos. A eficiência relativa de diferentes antioxidantes está relacionada na tabela 3.

Tabela 2 Efetividade relativa de antioxidantes para diferentes biodieseis (Adaptado de Jakeria et al, 2014).

Tipos de biodiesel	Efetividade relativa de antioxidantes
Soja	TBHQ
Jatropha	TBHQ>BHT>TBPOBPA>a-T
Palma	TBHQ>BHT>BHA>a-tocopherol
Óleo residual de fritura	PG>BHA>BHT>TBHQ>vitamina E
Óleo de mamona	BHA>PG>>DBPC>TBHQ
Girassol	Ácido caléfico>Ácido clorogênico
Óleo de côco	Ácido caléfico

### **2.5.1 Terc-butil-hidroquinona (TBHQ)**

O terc-butil-hidroquinona (TBHQ) é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos e gorduras e não se complexa com íons de cobre e ferro, como o galato. É considerado, em geral, o antioxidante difenólico mais eficaz em óleos vegetais do que o BHA ou BHT; em relação à gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o PG. (*Food ingredients* Brasil, 2009).

O biodiesel contendo TBHQ pode apresentar um tempo de estocagem, a 25 °C, três vezes maior que o tempo verificado para o B100 sem antioxidante (Borsato et al., 2012). O mecanismo de ação do antioxidante é proposto como resultante do deslocamento de elétrons não-pareados do anel fenólico do aditivo, formando assim, um híbrido estabilizado pela ressonância interna do anel (Figura 4) (Freire, 2012).

Além da já reconhecida atividade antioxidante do TBHQ, este composto também é conhecido devido às suas propriedades antimicrobianas (Davidson et al., 1983; Oliveira et al., 2007). A capacidade do TBHQ em inibir o desenvolvimento de micro-organismos no meio em que está inserido, pode ser explicada devido à presença de compostos fenólicos na sua constituição química, e de um modo geral, a atividade antimicrobiana destes compostos já está comprovada em alimentos (Rauha et al., 2000; Puupponen-Pimia et al., 2001; Zhu et al., 2004; Proestos et al., 2005; Pereira et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Entretanto, pouco ainda é reportado à respeito do potencial de uso de antioxidantes contendo estruturas fenólicas, como o caso do TBHQ, como agentes antimicrobianos. Tampouco sabe-se sobre o comportamento deste

antioxidante frente ao controle da contaminação microbiana em biodiesel. Diante deste contexto, o estudo sobre o caráter antimicrobiano de TBHQ adicionado ao biodiesel, faz-se necessário.

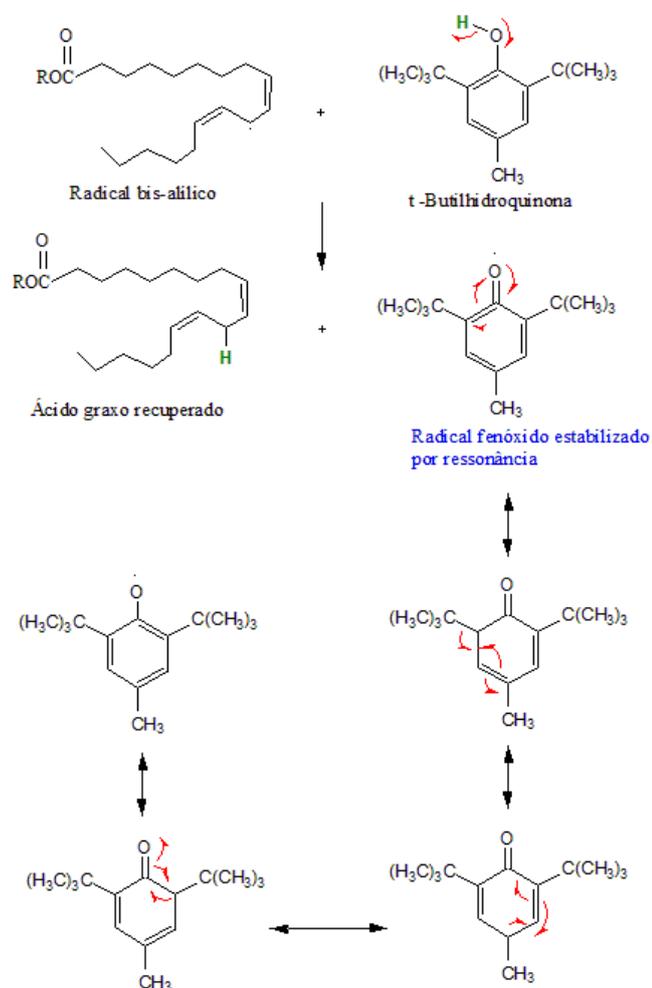


Figura 4 Esquema do mecanismo de ação dos antioxidantes no processo oxidativo do biodiesel (Freire, 2012).

## 2.5 Medidas para prevenção, diagnóstico e tratamento da contaminação microbiana em combustíveis e biocombustíveis

Para evitar o desenvolvimento de populações microbianas deteriorativas no combustível durante o armazenamento são indicados procedimentos físicos e químicos que são fundamentais para a qualidade final do produto. O diagnóstico de um tanque (aéreo ou subterrâneo) com

contaminação microbiana é dado a partir da inspeção e constatação da presença de fase livre de água no fundo do tanque. Os tanques contaminados normalmente apresentam três fases distintas, a fase aquosa, oleosa e a biomassa presente na interface óleo-água, que devem ser monitoradas separadamente (Figura 5).

O biodiesel apresenta uma maior tendência em absorver umidade do que o diesel devido, principalmente, ao conteúdo de  $O_2$  em sua molécula e à 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. Na Figura 5 estão apresentadas as formas em que a água pode ser encontrada durante a estocagem de misturas de diesel e biodiesel.

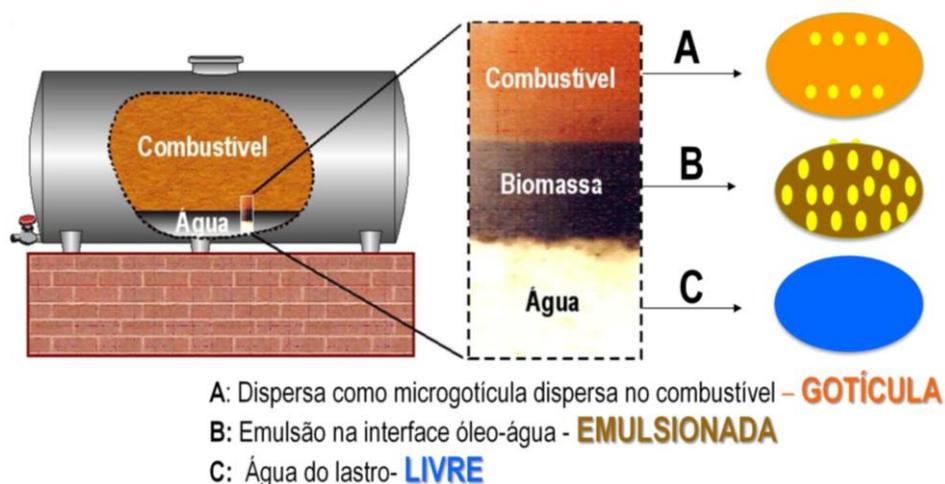


Figura 5 Diferentes formas que a água pode ser encontrada nos tanques de armazenamento de diesel A com adição de biodiesel (Fonte: Bento & Cavalcanti, 2012).

O conhecimento sobre a suscetibilidade à contaminação microbiana em óleo diesel estocado já é de domínio público. Reconhecidas Instituições ligadas ao mercado de combustível, tais como a International Air Transport Association

(IATA) do Instituto do Petróleo (IP) no Reino Unido e da ASTM nos EUA, estabeleceram metodologias e valores para se chegar ao diagnóstico de uma condição **ACEITÁVEL** e de **ALERTA** de contaminação microbiana em combustíveis. Apesar da interface óleo-água ser um indicativo de tanque contaminado, as fases aquosa e oleosa precisam ser monitoradas.

Os procedimentos de limpeza e drenagens regulares são medidas físicas que impedem o acúmulo da água formada nos lastros. Estes procedimentos constituem-se em uma forma estratégica no controle da infecção microbiana (Passman, 2005; Siegert, 2009; Klinkson, 2009; Bento & Cavalcanti, 2012; Passman, 2013) e compreendem uma medida simples e baixo custo (Norma ABNT 15512). Em alguns tipos de formato de tanque, torna-se impossível a drenagem em certos pontos. Deve-se também destacar que adicionalmente à infecção microbiana pode se difundir de um tanque para outro com a passagem de um combustível sem contaminação, através de mangueiras, ou filtros, que tenham sido utilizados ou expostos a um combustível contaminado.

A preservação do combustível também pode ocorrer através da aplicação de compostos químicos (biocidas) que impedem e controlam o desenvolvimento de populações microbianas deteriogênicas. Os biocidas ou antimicrobianos compreendem produtos com largo espectro de componentes de estruturas químicas diversas (compostos inorgânicos e orgânicos) (Bento et al., 2010; Zimmer et al., 2013). Alguns são mais efetivos em um grupo de micro-organismos 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).

## **2.6 Mecanismos de ação dos biocidas**

Os diferentes modos de ação dos biocidas pertencentes aos vários grupos químicos vêm sendo amplamente revisados e resumidos por McDonnell e Russell (2004) e Maillard (2007), entre outros autores. No geral, os mecanismos de ação dos biocidas, podem ser definidos de acordo com o alvo na célula. Três níveis de interação podem ser descritos: interação com componentes externos da célula; interação com a membrana citoplasmática e interação com os constituintes citoplasmáticos (Morente et al., 2013). No entanto, é possível que o biocida aja em um ou em todos os três níveis de interação com a célula para produzir sua atividade antimicrobiana (Morente et al., 2013).

O mecanismo de ação dos biocidas pode ser dividido em quatro categorias: os oxidantes; os eletrófilos; os líticos e os protonóforos (Figura 6) (Chapman, 2003). Os oxidantes incluem agentes de rápida ação como as clorinas e peróxidos que agem através de reações de oxidação com os constituintes orgânicos das células (Clapp et al., 1994; Dukan et al., 1999; Dukan e Touati, 1996). Os agentes eletrofílicos incluem os íons inorgânicos como a prata, o cobre, e o mercúrio, e biocidas orgânicos como os formaldeídos e as isotiazolonas. Estes biocidas reagem covalentemente com os nucleófilos celulares para inativar enzimas (Collier et al., 1990; Slawson et al., 1990) e há evidência que eles iniciam a formação de radicais livres intracelulares os quais contribuem para sua ação letal (Kimura, 1997; Thurman

e Gerba, 1989; Chapman e Diehl, 1995). Biocidas líticos que agem na membrana catiônica como clorexidina e compostos quaternários de amônio (Broxton et al., 1983; Chawner e Gilbert, 1989), e alcoóis como o fenoxietanol (Gilbert et al., 1977) desestabilizam as membranas levando à rápida lise celular. Os ácidos fracos como os ácidos sórbico e benzóico interferem na habilidade da membrana celular de manter o pH equilibrado, resultando em acidificação do interior da célula e ruptura generalizada do metabolismo (Eklund, 1985).

Os compostos fenólicos são hidrofóbicos e o seu sítio de ação é a membrana celular da célula. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica causando desarranjo na função e na estrutura da membrana e penetram a célula bacteriana, exercendo a atividade inibitória no citoplasma celular, provocando a lise e liberação do ATP intracelular (Walsch et al., 2003).

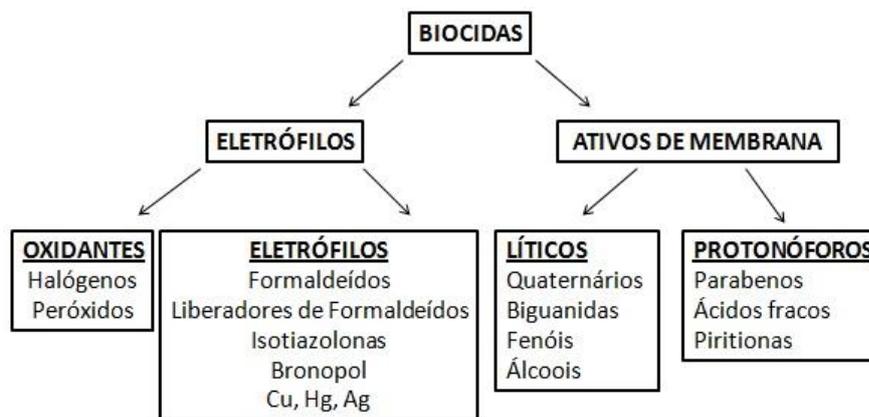


Figura 6 Mecanismos de ação dos biocidas. (Adaptado de Chapman, 2003).

Entretanto, a utilização de agentes químicos no controle da contaminação microbiana em tanques de estocagem de combustíveis ainda se constitui em uma alternativa pouco conhecida e com muitas dúvidas a serem

esclarecidas para o setor do petróleo (Bento et al., 2006; Bento et al., 2010). Dentre elas, qual o biocida indicado, quais as concentrações a serem utilizadas, qual a fase a se tratar (fase oleosa, interface ou a fase aquosa), qual o tempo de preservação do combustível pelo biocida, como realizar o descarte da fase aquosa dos tanques de óleo diesel com biodiesel tratado com biocida. Por se tratar de um produto biocida é preciso que esteja licenciado junto ao órgão ambiental competente pela indústria produtora.

Uma das maiores preocupações de quem armazena o combustível está em manter a qualidade final do produto. Se a adição de um preservante químico traz esta garantia, outra preocupação do setor tem sido como liberar um combustível tratado com biocida no ambiente de forma segura (Bento et al., 2010).

A utilização de biocidas sintetizados especialmente para o uso em combustíveis e biocombustíveis tem sido recomendada nos Estados Unidos e Europa (Passman, 2003; Siegert, 2009). Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas na seleção de um biocida mais efetivo na preservação dos diferentes tipos de combustíveis (Siegert, 2009; Bento et al., 2010; Passman; 2011; Kenne & Browne, 2011; Zimmer et al., 2010; Zimmer et al., 2013). Em informativo, liberado pela ANP (17-02-2012), é relatado que na audiência pública sobre a revisão da Resolução ANP nº 7/2008 (especificação do biodiesel) a adoção de biocidas, biodegradáveis e menos tóxicos, para combater a contaminação por micro-organismos, deverá ser objeto de consulta à Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), previamente a qualquer medida nessa direção. Desta forma, já está sendo considerada dentro do cenário brasileiro a **participação microbiana** como um dos contaminantes

potenciais de sistemas de armazenamento e a necessidade de estudo de controle (Bücker et al., 2011; Cazarolli et al., 2013; Zimmer et al., 2013)

### **3 Capítulos**

#### **3.1. Capítulo 1**

##### **AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE BIODIESEL DE SOJA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TBHQ DURANTE ARMAZENAMENTO SIMULADO**

Sabrina Anderson Beker<sup>a</sup>, Yara Patricia da Silva<sup>b</sup>, Francielle Bücken<sup>a</sup>, Juciana Cazarolli<sup>a</sup>, Maria do Carmo Ruaro Peralba<sup>b</sup>, Clarisse Piatnicki<sup>b</sup>, Fatima Menezes Bento<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Biodeterioração e Biodegradação de Combustíveis e Bio combustíveis (LAB-BIO), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

## RESUMO

Devido a sua natureza predominantemente composta por ésteres de ácidos graxos, o biodiesel apresenta alta suscetibilidade à oxidação e à contaminação microbiana durante a estocagem. Vários aditivos comerciais são utilizados para prevenir a oxidação, sendo que a atividade antimicrobiana é pouco conhecida. O presente trabalho investigou a atividade antimicrobiana de Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e Butil-hidroxi-tolueno (BHT) através da determinação da concentração inibitória e biocida mínima. Foi avaliado o biodiesel de soja sob duas condições: como recebido com e sem a adição de inóculo microbiano, ambos tratados com diferentes concentrações do antioxidante comercial TBHQ (0; 50; 100; 200; 300 e 600 ppm) utilizando-se microcosmos contendo 100 mL de biodiesel e 5 mL de meio mineral Bushnell-Haas por 45 dias a 30°C. A influência das diferentes concentrações de TBHQ quanto à formação de biomassa e as alterações das comunidades bacterianas e fúngicas pela análise do DNA total da biomassa formada foi avaliada. Foram monitoradas as alterações nos parâmetros químicos de qualidade: estabilidade oxidativa, índice de acidez, viscosidade cinemática, teor de água e degradação de ésteres. O BHT não apresentou atividade antimicrobiana. O TBHQ apresentou atividade antimicrobiana na faixa de 250 ppm a >1000 ppm em meio de cultura. As análises revelaram que a adição do antioxidante não apresentou relação linear com a formação de biomassa nas diferentes concentrações utilizadas em ambas as condições de biodiesel (como recebido com e sem adição de inóculo), bem como nas mudanças dos perfis das comunidades bacterianas e fúngicas. A estabilidade oxidativa foi mantida dentro do período mínimo de 6 h durante o ensaio. Os valores de viscosidade cinemática, índice de acidez e teor de água da fase oleosa aumentaram ao longo de 45 dias caracterizando o biodiesel como fora da especificação. Não foi observada degradação dos ésteres avaliados presentes na fase oleosa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodiesel. TBHQ. Degradação. Biomassa.

### 3.1.1 Introdução

Devido à grande demanda de energia e a escassez de recursos energéticos finitos, vem crescendo diariamente a exploração de fontes renováveis de energia de duração ilimitada e de menor impacto ambiental. O biodiesel é um biocombustível que apresenta grande potencial dentro deste cenário e atua como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis seja como substituto ou como aditivo ao combustível derivado de petróleo (Balat et al., 2008).

O biodiesel apresenta em sua composição ésteres (metílicos ou etílicos) de ácido graxos, de origem vegetal ou animal, produzidos através da reação química de um álcool na presença de um catalisador com óleos ou gorduras, cujo processo é mundialmente conhecido como transesterificação (Subramaniam et al., 2013). Dentre as matérias-primas mais utilizadas para sua produção, o grão de soja tem sido destaque, sendo o mais utilizado na produção do biodiesel nacional.

O biodiesel de soja apresenta muitas vantagens em comparação ao petrodiesel. Além de ser originado de fonte renovável de energia, ele conta com a presença de quantidades mínimas de enxofre e de compostos aromáticos em sua constituição, o que confere a este biocombustível uma menor toxicidade em comparação aos combustíveis fósseis. Devido às suas características intrínsecas, apresenta também excelente lubricidade (Subramaniam et al., 2013).

O biodiesel devido a sua natureza (ésteres de ácidos graxos) é mais facilmente reconhecido e metabolizado por micro-organismos no ambiente. Segundo Passmann e Dobranick (2005), do ponto de vista ambiental, após um

acidente envolvendo um derrame de biodiesel (solo ou água), a biodegradabilidade é uma vantagem. Porém, durante o armazenamento seja do biodiesel puro e/ou na mistura, esta característica pode indicar uma maior suscetibilidade à contaminação microbiana.

O ar presente no interior dos tanques de armazenamento de combustíveis pode condensar-se devido as diversas condições climáticas nacionais. Esta condensação, conseqüentemente, acumula-se no fundo dos tanques em forma de água livre. A presença de água e de micro-organismos torna-se o princípio da formação de uma massa biológica na interface combustível/água devido à presença de micro-organismos deteriorogênicos que possuem a capacidade de degradar as cadeias carbônicas do biodiesel (Jakeria et al., 2014).

Além da suscetibilidade à contaminação microbiana, outra preocupação que envolve a qualidade do biodiesel é referente à sua estabilidade química, ou seja, vulnerabilidade à oxidação e absorção de água. Devido à ação do ar, da luz, temperatura e umidade, sua constituição química pode alterar-se com o tempo (Fattah et al., 2014). Ao contrário dos combustíveis fósseis, que são relativamente inertes e mantêm as suas características essenciais pouco alteradas ao longo da estocagem, o biodiesel degrada mais rapidamente devido aos fatores bióticos e abióticos.

Portanto, hoje existe uma grande preocupação concernente à qualidade deste produto uma vez que o mesmo encontra-se inserido na matriz energética nacional desde janeiro de 2005 mediante a Lei N° 11.097, a qual permitiu a adição de biodiesel ao diesel. Desde julho do corrente ano a proporção estabelecida por medida provisória é de 6% (B6).

Para controlar o crescimento microbiano algumas práticas preventivas podem ser adotadas, sendo que a principal é a drenagem diária dos tanques. Também podem ser administrados produtos com características antimicrobianas como compostos químicos sintéticos, os quais devem ser adicionados aos combustíveis, contribuindo para a prevenção e controle da contaminação (Passmann, 2013). No entanto, esta prática ainda não é legalizada no Brasil, o que dificulta a utilização desta medida de controle.

Quanto aos processos oxidativos do biodiesel, estes podem ser minimizados pela adição de antioxidantes, os quais desempenham papel fundamental na prevenção da iniciação e propagação da oxidação deste produto. Entre os antioxidantes mais utilizados em biodiesel de soja, encontra-se o Terc-butil-hidroquinona (TBHQ), o qual é considerado o mais eficaz em óleos vegetais da indústria alimentícia. Sua estrutura química permite que o biodiesel se mantenha estável durante seu armazenamento (Jain et al., 2010).

Pesquisas envolvendo a relação da molécula de TBHQ com a microbiota do biodiesel são raras. Portanto, investigações acerca do comportamento da microbiota fúngica e bacteriana do biodiesel na presença de diferentes antioxidantes fazem-se necessárias.

Diante deste contexto envolvendo o monitoramento da qualidade do biodiesel, o presente estudo optou por investigar a influência de diferentes concentrações do antioxidante sintético terc-butil-hidroquinona (TBHQ) sobre a microbiota fúngica e bacteriana do biodiesel de soja como recebido e propositadamente contaminado e aprofundar o conhecimento do comportamento do biodiesel diante das diferentes concentrações quanto à sua estabilidade à oxidação.

Os objetivos específicos deste estudo foram: Avaliar a Concentração inibitória mínima e biocida (CIM/CBM) de BHT (Butil-hidroxitolueno) e TBHQ (Terc-butil-hidroquinona) frente a micro-organismos isolados (*Paecilomyces variotii*; *Pseudallescheria boydii*; *Candida silvicola* e *Bacillus pumillus*) e a um consórcio microbiano não caracterizado conforme Norma ASTM E1259-10 durante 10 dias; Acompanhar o desenvolvimento microbiano (biomassa) em escala laboratorial de microcosmos sob diferentes concentrações de TBHQ (0 ppm; 50 ppm; 100 ppm; 200 ppm; 300 ppm e 600 ppm) em biodiesel como recebido com e sem adição de inóculo não-caracterizado por meio de medidas de peso seco, por 42 dias; Monitorar a variação da viscosidade cinemática à 40°C, estabilidade à oxidação a 110°C, índice de acidez e teor de água da fase oleosa ao longo de 45 dias; Estimar a biodegradação dos ésteres presentes na fase oleosa através da técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama conforme Norma Européia EN14103 e; Identificar a diversidade microbiana fúngica e bacteriana presente nos microcosmos através da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) após 45 dias de estocagem simulada.

### **3.1.2 Materiais**

#### **3.1.2.1 Combustível**

O biodiesel utilizado neste estudo foi obtido a partir de óleo de soja e cedido por uma empresa de Passo Fundo (RS/ Brasil). Foram utilizados dois tipos de amostras: (i) biodiesel sem a adição de antioxidante (Apêndice C) e (ii) biodiesel com antioxidante adicionado na indústria fornecedora do biodiesel (em concentração desconhecida) (Apêndice D).

### **3.1.2.2 Antioxidantes**

Os antioxidantes sintéticos comerciais empregados nos experimentos foram: Butil-hidroxi-tolueno, BHT, (Fluka  $\geq 99\%$ ) e Terc-butil-hidroquinona, TBHQ, (Fluka  $\geq 98\%$ ).

### **3.1.2.3 Meio mineral mínimo**

Foi confeccionado o meio mínimo mineral Bushnell & Haas (1941) com pH 7,2 para servir de suporte de nutrientes minerais para o crescimento microbiano (Anexo 5).

### **3.1.2.4 Micro-organismos**

Neste estudo foram utilizados micro-organismos isolados de tanques de armazenamento de óleo diesel A e biodiesel em trabalhos anteriores do grupo do Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (UFRGS) executados no Brasil (Bento & Gaylarde, 1996; 2001; Bento et al., 2006; Bückner et al., 2011). Foram utilizados os fungos filamentosos *Paecilomyces variotii* (Bückner et al., 2011) e *Pseudallescheria boydii* (Schultz, 2010), e a levedura *Candida silvicola* (Bento & Gaylarde, 2001).

A bactéria *Bacillus pumillus* previamente isolada de sedimento formado pela centrifugação de biodiesel também foi testada. Estas espécies são classificadas como deteriogênicas de combustível estocado no Brasil e fazem parte da bacterioteca e micoteca do Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis da UFRGS.

### **3.1.2.5 Inóculo não-caracterizado**

A confecção do inóculo não-caracterizado foi realizada conforme Norma ASTM E1259-10. Resumidamente, em um frasco erlenmeyer contendo 100 mL de meio mineral Bushnell-Haas, foi adicionado 2% da mistura B10 (previamente esterilizada por filtração) onde então foi inoculado 5 mL de uma borra microbiológica prospectada de um tanque contaminado e incubado a 28 °C, 200 rpm durante 7 dias. A concentração utilizada foi de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

### **3.1.3 Metodologia**

#### **3.1.3.1 Estudo preliminar: Avaliação da Concentração Inibitória e Biocida Mínima (CIM/CBM) de BHT e TBHQ**

A determinação da CIM foi realizada pelo método de diluição em caldo e observada pela ausência de turbidez dos meios nos frascos. Uma solução estoque do antioxidante na concentração de 2000 ppm foi preparada sendo diluída em água ultrapura estéril. Em frascos estéreis, com capacidade para 15 mL, adicionou-se 4 mL de caldo malte e 4 mL da solução estoque do antioxidante de 2000 ppm. A partir do primeiro frasco que apresentou a concentração de 1000 ppm, foram realizadas diluições sucessivas em cada frasco, obtendo-se as concentrações de 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62 ppm; 31 ppm; 15 ppm; 7 ppm; 3 ppm e 1 ppm. Em cada frasco foi adicionado o inóculo de *Paecilomyces variotii* na concentração final de  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. O mesmo procedimento foi realizado para os demais fungos. Para a bactéria, foi adicionado o caldo Luria Bertani e para o inóculo não caracterizado foi adicionado o meio mineral Bushnell Haas. Sendo que um

frasco, contendo apenas o meio de cultura representou o controle dos testes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após determinar a concentração inibitória mínima de cada concentração das misturas sobre os micro-organismos, também foi avaliada a concentração biocida das mesmas. A partir do frasco em que houve a inibição do crescimento dos micro-organismos avaliados (CIM), retirou-se uma alíquota de 10 µL, que foi inoculada em placas petri contendo ágar malte (para os fungos), ágar Luria Bertani (para a bactéria) e ágar para contagem – PCA (para o inóculo não-caracterizado). As placas foram incubadas a 28°C e 30°C ± 1°C durante 3 dias. A concentração mínima biocida (CBM) foi determinada através da ausência absoluta de crescimento dos micro-organismos nas diferentes concentrações testadas.

### **3.1.3.2 Estudo em escala laboratorial simulando estocagem de biodiesel com diferentes concentrações de TBHQ**

Após o estudo preliminar sobre a CIM/CBM de dois antioxidantes, o TBHQ foi escolhido para ser utilizado na escala laboratorial. Portanto, foram definidas cinco concentrações de TBHQ em biodiesel a serem estudadas: 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm e 600 ppm. O controle utilizado foi de 0 ppm, sendo que um controle com o teor de antioxidante (dosagem da planta industrial) utilizado na indústria também foi avaliado.

Os microcosmos utilizados foram frascos de vidro esterilizados com capacidade para 200 mL, utilizando-se uma fase oleosa e uma fase aquosa. A fase aquosa (meio mineral Bushnell-Haas) foi confeccionada conforme descrito

no anexo 5. Após a adição de 5mL de fase aquosa estéril nos frascos, foi adicionado 100 mL de biodiesel.

Nesta etapa, o experimento foi dividido em dois tratamentos onde dois níveis de contaminação foram avaliados: biodiesel como recebido da indústria e o mesmo biodiesel com adição de um consórcio de micro-organismos (inóculo não-caracterizado) preparado conforme a Norma ASTM E1259, descritos como tratamento 1 e 2:

O tratamento 1 constitui-se da utilização de biodiesel como recebido, ou seja, não estéril. O tratamento 2 constitui-se da utilização do biodiesel como recebido com a adição do inóculo não-caracterizado preparado conforme Norma ASTM E 1259 (ASTM 2010) na concentração de  $10^5$  esporos/células.mL<sup>-1</sup>. O segundo tratamento teve por objetivo verificar o comportamento das diferentes concentrações de TBHQ frente a uma alta contaminação em biodiesel. A descrição dos tratamentos utilizados pode ser visualizada na tabela 3.

Tabela 3 Identificação das amostras do experimento.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	TRATAMENTO 1 (Biodiesel como recebido)	TRATAMENTO 2 (Biodiesel como recebido + inóculo)
Controle	CN1 - Biodiesel 0 ppm + BH	CN3 - Biodiesel 0 ppm + BH + inóculo
Controle	CN2 - Biodiesel com antioxidante* + BH	CN4 - Biodiesel com antioxidante*+BH + inóculo
50 ppm	Biodiesel 50 ppm TBHQ + BH	Biodiesel 50 ppm TBHQ + BH + inóculo
100 ppm	Biodiesel 100 ppm TBHQ + BH	Biodiesel 100 ppm TBHQ + BH + inóculo
200 ppm	Biodiesel 200 ppm TBHQ + BH	Biodiesel 200 ppm TBHQ + BH + inóculo
300 ppm	Biodiesel 300 ppm TBHQ + BH	Biodiesel 300 ppm TBHQ + BH + inóculo
600 ppm	Biodiesel 600 ppm TBHQ + BH	Biodiesel 600 ppm TBHQ + BH + inóculo

Biodiesel com antioxidante\*: o antioxidante foi adicionado na indústria em concentração desconhecida.

Após serem adicionadas a fase oleosa, aquosa e a adição do inóculo não-caracterizado no tratamento correspondente, os frascos foram envoltos

com papel alumínio para proteger da luz e acondicionados em incubadora na temperatura de 30°C±2°C por 45 dias. O ensaio foi realizado em triplicata.

### **3.1.3.2.1 Análises realizadas na interface fase aquosa/fase oleosa**

#### **3.1.3.2.1.1 Avaliação de Peso Seco (formação de biomassa)**

A biomassa formada na interface fase aquosa/fase oleosa resultante do crescimento microbiano foi quantificada através da técnica do peso seco. A mesma foi retida através de filtração em um sistema a vácuo por discos de papel filtro (porosidade 14 µm). Com auxílio de pipeta Pasteur foi adicionado, aproximadamente, 3 mL de hexano para retirar o excesso de óleo, e então os discos de papel filtro contendo a biomassa foram incubados em estufa a 30°C por 3 dias com o intuito de retirar a umidade. Após esse período os discos de papel foram pesados em balança de precisão. O cálculo para obtenção dos resultados finais de biomassa foi:

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

#### **3.1.3.2.2.1 Estudo da comunidade bacteriana e fúngica por PCR-DGGE**

##### *Extração de DNA*

A biomassa formada na interface óleo-água aos 45 dias de experimento foi removida dos frascos por filtração à vácuo em *kitassato* da fase aquosa e oleosa e retida em papel de filtro (Whatman 110mm). A biomassa retida no papel filtro e a fase aquosa do experimento foram utilizadas para a extração de DNA utilizando-se PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories,

USA), de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações, conforme protocolo descrito por Silva e colaboradores (2013).

### *Bactérias*

A amplificação da região V3 do gene 16S rRNA por PCR foi realizada utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores universais BA 338F -GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') e UN518R(5'- ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Ovreas et al., 1997). A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada em solução tampão contendo 1U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTP; 5pmol de cada iniciador, em um volume final de 25µL. As condições da amplificação da PCR foram 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os amplicons obtidos foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante como descrito por Ovreas e colaboradores (1997). A concentração do gel foi de 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1), e apresentou um gradiente desnaturante de 15% a 55% de formamida e uréia (Ovreas et al., 1997)

### *Fungos*

A amplificação da região V3 do gene 18S rRNA por PCR foi realizada utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores universais FR1(N)-GC (5'- AIC CAT TCA ATC GGT AIT D D -3') e FF390 (5'- CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3') (Vainio; Hantula, 2000). A amplificação do gene 18S rRNA foi realizada em solução tampão com 1 U Taq DNA Polimerase

Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 5pmol de cada iniciador, em um volume final de 25µL. As condições da amplificação da PCR foram de 5 minutos a 94°C , 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 47°C e 3 minutos de 72°C , e extensão final a 72°C por 10 minutos (Oros-Sichler et al., 2006). Os amplicons obtidos foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante como descrito por Vainio & Hantula (2000). Os géis apresentaram 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1 m:m), e um gradiente desnaturante de 45% a 65% de formamida e uréia (Vainio & Hantula, 2000).

A amplificação para ambos pares de oligonucleotídeos foi conduzida em um termociclador TX96 Plus (AMPLITHERM). A qualidade dos produtos gerados foi analisada em gel de agarose 1,5%, corados com Sybr Safe (Invitrogen, São Paulo, Brasil) para posterior migração por DGGE. O DGGE foi realizado a 200V, durante 3 horas e 30 minutos no DCode TM System (Bio-RadInc., Hercules, USA) em tampão de corrida 1X TAE. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A aquisição das imagens foi feita por fotodocumentador. Os perfis de bandas gerados por DGGE foram comparados utilizando-se o software Gel Pro-Analizer 3.1 seguida pela análise visual dos perfis gerados. O índice de diversidade de espécies de Shannon-Wiener foi obtido de acordo com Rodrigues (2014).

### **3.1.3.2.3 Análises realizadas na fase aquosa**

#### **3.1.3.2.3.1 Medidas de pH**

A medida do pH foi realizada utilizando-se fitas de pH universal, pois devido a presença de óleo residual na amostra aquosa, não é recomendado o uso de eletrodo de pH.

#### **3.1.3.2.3.2 Avaliação da atividade bactericida**

Da fase aquosa de cada frasco retirou-se uma alíquota de 10 µL que foi depositada sobre o meio ágar das placas (técnica *Drop-plate*) contendo meio ágar Luria Bertani e incubadas a 28°C, durante 5 dias. Após este tempo, identificou-se a presença ou ausência de crescimento microbiano. Este teste foi realizado a cada tempo amostral (7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) com todas as réplicas de cada tratamento do experimento.

#### **3.1.3.2.4 Análises realizadas na fase oleosa**

**3.1.3.2.4.1 Análises referentes aos parâmetros indicativos da qualidade do biodiesel realizadas pelo CECOM (Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos do Instituto de Química da UFRGS)**

##### **3.1.3.2.4.1.1 Índice de acidez**

O índice de acidez é utilizado para estimar o nível de ácidos graxos livres ou produtos de degradação que podem estar presentes no biodiesel e, freqüentemente, o excesso de ácidos é associado a problemas de corrosão nos motores e degradação durante sua estocagem. O ensaio foi realizado no tempo zero, aos 15, 30 e 45 dias de acordo com a norma ABNT NBR 14448.

##### **3.1.3.2.4.1.2 Estabilidade à oxidação a 110°C**

A medida da estabilidade à oxidação a 110°C é realizada pelo equipamento Rancimat conforme Norma EN 14112. Basicamente, é o período, determinado em horas, que indica o período de indução, isto é, o tempo em

que a condutividade aumenta rapidamente em razão de processos de oxidação acelerados. O período de indução (PI) é calculado pelo software do equipamento e é usado como indicador da estabilidade oxidativa da amostra. O ensaio foi realizado no tempo zero, aos 15, 30 e 45 dias.

#### **3.1.3.2.4.1.3 Viscosidade cinemática a 40°C**

O ensaio foi realizado de acordo com a norma ABNT NBR 10441 no tempo zero, aos 15, 30 e 45 dias.

#### **3.1.3.2.4.1.4 Teor de água**

A norma ASTM D 6304 foi utilizada para determinar o teor de água nas amostras de biodiesel no tempo zero, aos 15, 30 e 45 dias. A determinação do teor de umidade através da técnica de Karl Fischer Coulométrico consiste na reação do reagente de Karl Fischer com água com seu ponto final detectado potenciométricamente.

#### **3.1.3.2.4.2 Análise de avaliação de degradação de ésteres através de cromatografia gasosa**

A avaliação referente à degradação dos ésteres constituintes das amostras da fase oleosa foi realizada no tempo zero e aos 45 dias. Foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa (CG), realizada no Laboratório de Química Analítica da UFRGS, segundo o método EN 14103:2011.

O cromatógrafo utilizado para as análises foi um Shimadzu 2010 com injetor tipo Split (1:100) com detector de ionização de chama (FID), equipado com uma coluna para altas temperaturas DBEN (30  $\mu\text{m}$   $\times$  0,32  $\mu\text{m}$   $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ).

A determinação do teor total de ésteres do biodiesel foi feita seguindo a Norma ABNT NBR 15764. As condições de análise foram: Temperatura do injetor e detector a 250°C, forno com temperatura inicial de 60°C por 2 minutos, seguido de aquecimento de 10°C/min até 200°C, seguido das taxas de 5°C/min até 240°C, mantendo por 7 minutos. O padrão interno utilizado foi o heptadecanoato de metila (grau de pureza de 99,8%, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL.

### 3.1.4 Resultados e Discussão

#### 3.1.4.1 Estudo preliminar: Avaliação da Concentração Inibitória e Biocida Mínima (CIM/CBM) de BHT e TBHQ

Pode-se observar na tabela 4 o resultado da ação antimicrobiana de TBHQ frente aos isolados analisados e ao inóculo não-caracterizado. Observa-se que o micro-organismo mais suscetível ao TBHQ foi o *Bacillus pumillus* que apresentou CIM de 250ppm e CBM de 500 ppm.

Tabela 4 Concentração inibitória mínima (CIM) e biocida (CBM) de TBHQ após 10 dias de ensaio.

Micro-organismo	CIM	CBM
<i>Candida silvicola</i>	1000 ppm	1000 ppm
<i>Paecilomyces variotii</i>	1000 ppm	>1000 ppm
<i>Pseudallescheria boydii</i>	500 ppm	500 ppm
<i>Bacillus pumilus</i>	250 ppm	500 ppm
<i>Inóculo não-caracterizado</i>	>1000 ppm	>1000 ppm

Segundo Gutiérrez-Larraínzar e colaboradores (2013), o TBHQ é um derivado da hidroquinona, com um grupo terc-butil no anel fenólico, o qual dá à molécula um caráter mais hidrofóbico, facilitando a penetração nas bactérias

Gram-positivas devido à constituição de seu envoltório celular, propriedade também confirmada por López e colaboradores (2005). Esta propriedade poderia justificar o baixo valor de CIM encontrado com *B. pumillus* no presente experimento com relação aos demais isolados avaliados.

Os fungos filamentosos *Paecilomyces variotii* e *Pseudallescheria boydii* apresentaram CIM de 1000 ppm e 500 ppm, respectivamente, demonstrando a maior sensibilidade da *P. boydii* ao TBHQ dentre os fungos filamentosos, sendo que sua CBM também foi de 500 ppm. A CBM de *P. variotii* não foi possível determinar, pois este micro-organismo apresentou crescimento até a concentração de 1000 ppm.

Bücker e colaboradores (2011) estudaram o crescimento de *Paecilomyces* sp. em diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e misturas B5, B10, e B20. Após 60 dias, o isolado desenvolveu-se mais nas amostras contendo biodiesel do que em diesel puro, mostrando assim sua capacidade deteriorogênica de biocombustíveis.

Mais recentemente, Cazarolli e colaboradores (2013) avaliaram o crescimento de *P. boydii* em biodiesel proveniente de biodiesel de linhaça, oliva e soja. Os resultados indicaram um maior crescimento (produção de biomassa) em biodiesel de linhaça, seguido do biodiesel de soja, demonstrando a capacidade deteriorogênica deste micro-organismo. Por essa razão *P. boydii* foi avaliado neste estudo.

Quanto ao fungo leveduriforme *Candida silvicola*, a ação fungistática e fungicida de TBHQ foi observada na concentração de 1000 ppm. Esta levedura também foi prospectada de um tanque de óleo diesel contaminado, e,

posteriormente estudado por Bento e Gaylarde (2001), onde demonstraram o crescimento do isolado em óleo diesel.

Quanto ao inóculo não-caracterizado, não foi possível determinar sua CIM e CBM, pois em todas as concentrações de TBHQ utilizadas no ensaio houve desenvolvimento microbiano. O inóculo é composto por um grupo de diferentes micro-organismos que apresentaram diferentes suscetibilidades ao TBHQ. Portanto, devido à diversidade microbiana presente no inóculo é sugerido que a maioria apresentou resistência à ação da molécula de TBHQ.

Os resultados obtidos com o ensaio conduzido com BHT não foram mostrados, pois em todas as concentrações testadas houve desenvolvimento dos micro-organismos utilizados. Desta forma, não puderam ser determinadas as CIM e CBM para o BHT, pois houve crescimento até com 1000 ppm.

Além dos resultados obtidos com a CIM e CBM de TBHQ, foi possível também, ao final do experimento avaliar a formação de biomassa através da medida de peso seco (mg). As análises de peso seco foram conduzidas somente com os fungos filamentosos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* com os antioxidantes TBHQ e BHT.

Através da figura 7 é possível observar os valores de biomassa de *P. boydii* após 10 dias de ensaio com o TBHQ. Observa-se que na concentração de 1000 ppm e 500 ppm não houve formação de biomassa, pois em comparação ao controle negativo (0,01 mg), o qual não continha o micro-organismo, o peso não foi alterado, portanto corroborou com os resultados obtidos pela CIM e CBM. A partir de 250 ppm a formação de biomassa ficou evidente e manteve-se em valores de 0,04 mg até 0,05 mg.

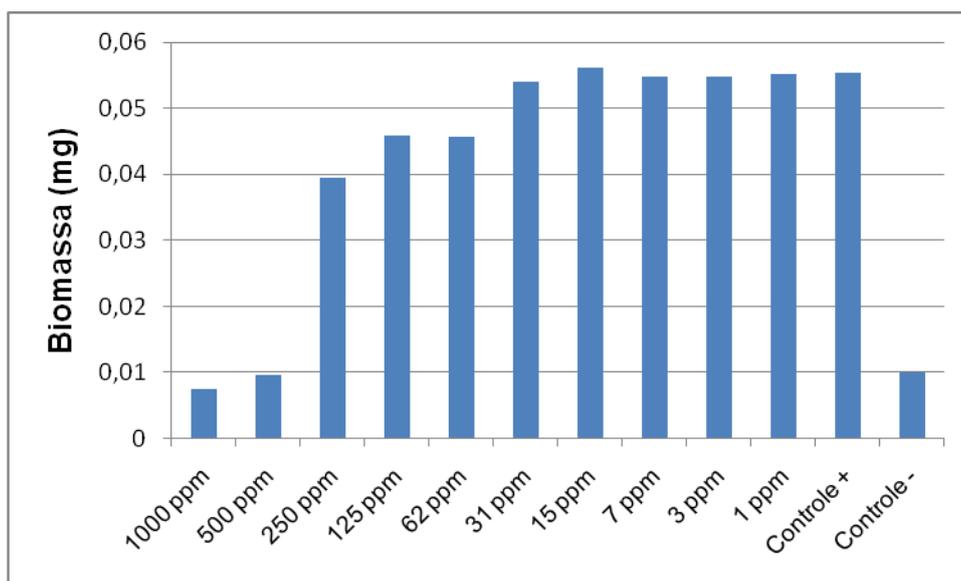


Figura 7 Valores de biomassa de *Pseudallescheria boydii* com TBHQ após 10 dias de incubação.

Já os resultados obtidos com o antioxidante BHT (figura 8), mostraram que mesmo na mais alta concentração, de 1000 ppm houve formação de biomassa de *P. boydii* (0,02 mg). Este resultado corrobora com os resultados encontrados para CIM e CBM, comprovando que o BHT não teve efeito inibitório sobre este micro-organismo.

Com relação ao fungo *P. variotii* quando em contato com TBHQ nas concentrações de 1000 ppm e 500 ppm mostrou ausência de formação de biomassa (figura 9). A partir de 250 ppm (0,01 mg) o fungo desenvolveu-se bem, com 0,02 mg (125 ppm) até 0,03 mg (1 ppm).

Observa-se que no gráfico representado pela figura 10, *P. variotii* no ensaio conduzido com BHT houve pouca formação de biomassa na concentração de 1000 ppm (0,01 mg) quando comparado ao controle (-) (0,01 mg).

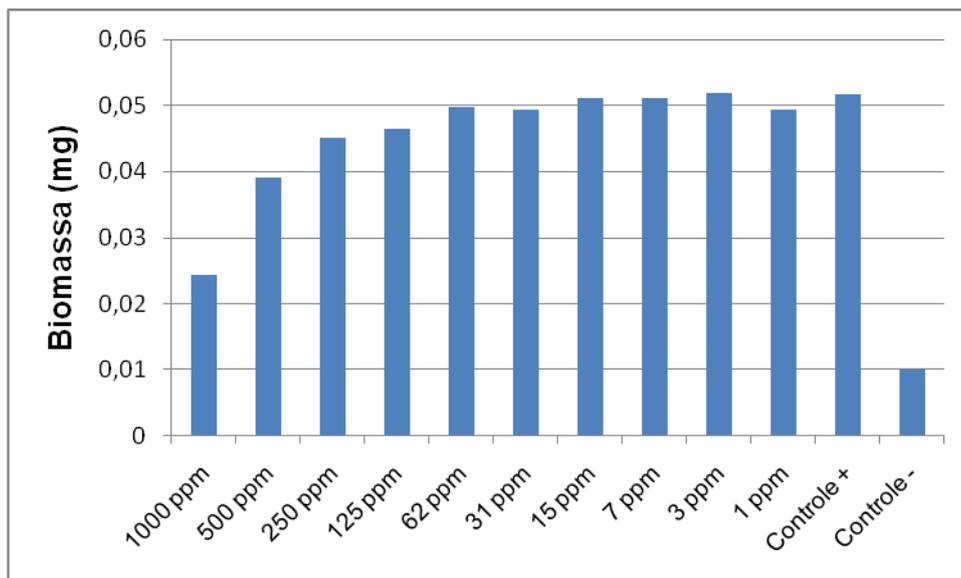


Figura 8 Valores de biomassa de *Pseudallescheria boydii* com BHT após 10 dias de incubação

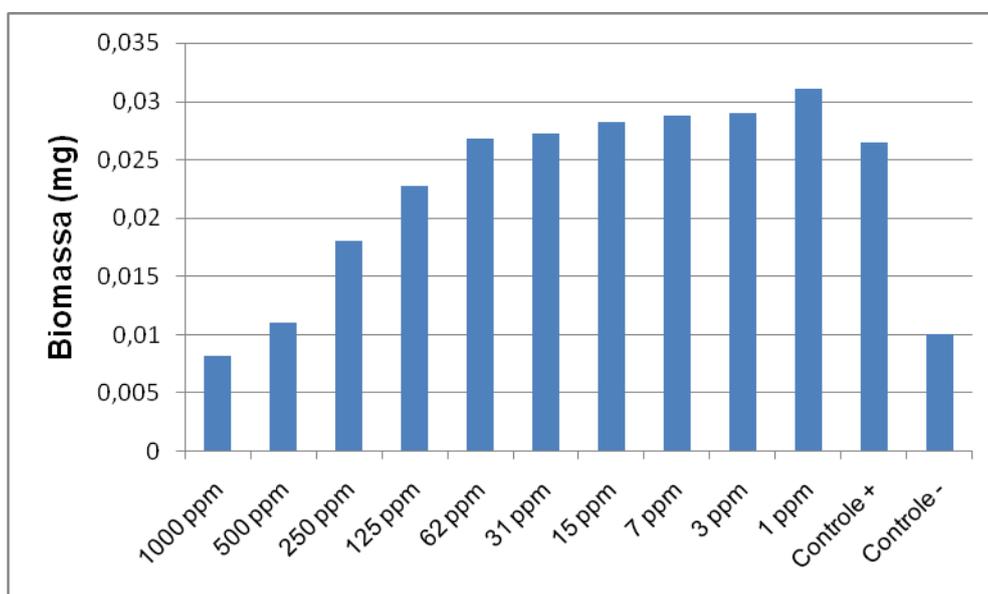


Figura 9 Valores de biomassa de *Paecilomyces variotii* com TBHQ após 10 dias de incubação.

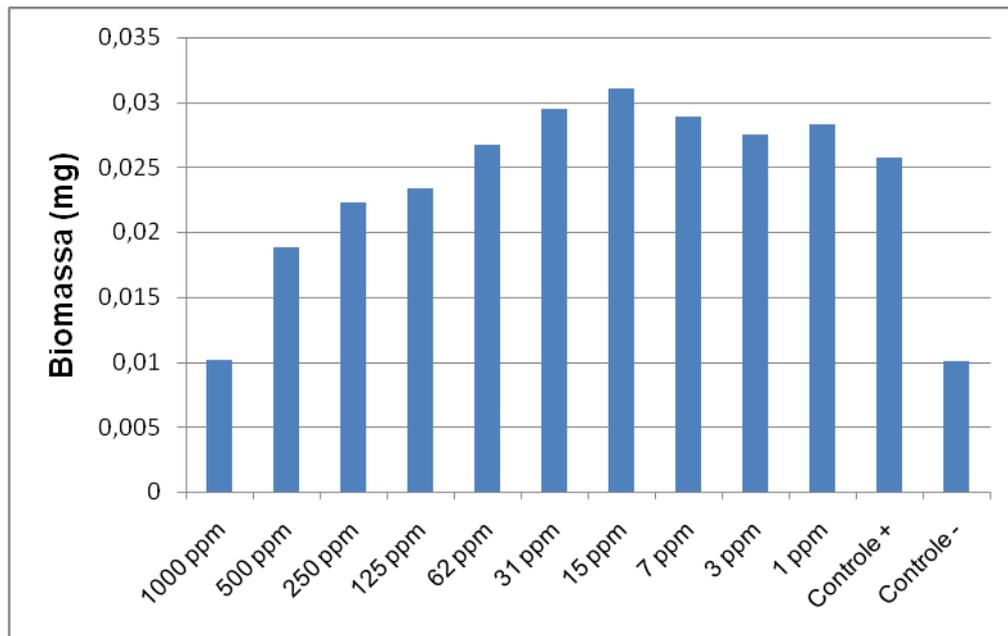


Figura 10 Valores de biomassa de Paecilomyces variotii com BHT após 10 dias de incubação.

### 3.1.4.2 Estudo em escala laboratorial simulando estocagem de biodiesel com diferentes concentrações de TBHQ

#### 3.1.4.2.1 Análise da interface fase oleosa-fase aquosa

##### 3.1.4.2.1.1 Medidas de Biomassa através da Análise do Peso Seco

As medidas de peso seco foram realizadas com o intuito de avaliar a formação de biomassa na interface óleo-água, onde em sua maioria há a presença de fungos filamentosos. Na figura 11, pode ser visualizado o gráfico correspondente a produção de biomassa ao longo de 42 dias da condição do biodiesel como recebido, onde é possível fazer um comparativo entre as diferentes concentrações de antioxidante quanto à formação de biomassa total final.

Foi possível observar que houve formação de biomassa ao longo de 42 dias. Os valores apresentados no gráfico representam a produção cumulativa de biomassa ao final do experimento. O menor valor obtido aos 42 dias, foi com

a concentração de 50 ppm, registrando-se com 266,33 mg. O maior valor foi observado com a concentração de 300 ppm que apresentou 540 mg, o dobro do menor valor encontrado com a concentração de 50 ppm. O controle 1, que corresponde ao biodiesel como recebido sem adição de TBHQ (0 ppm), apresentou valor de biomassa de 447,66 mg.

O controle 2 (biodiesel com a adição de antioxidante adicionado em concentração desconhecida na indústria) apresentou valor de biomassa de 385,66 mg. Este dado comprova que a prática realizada comercialmente demonstrou menor formação de biomassa em comparação ao controle 1, que não contém TBHQ. O valor do controle 2 ficou bem próximo ao valor encontrado na concentração de 600 ppm (385,16 mg).

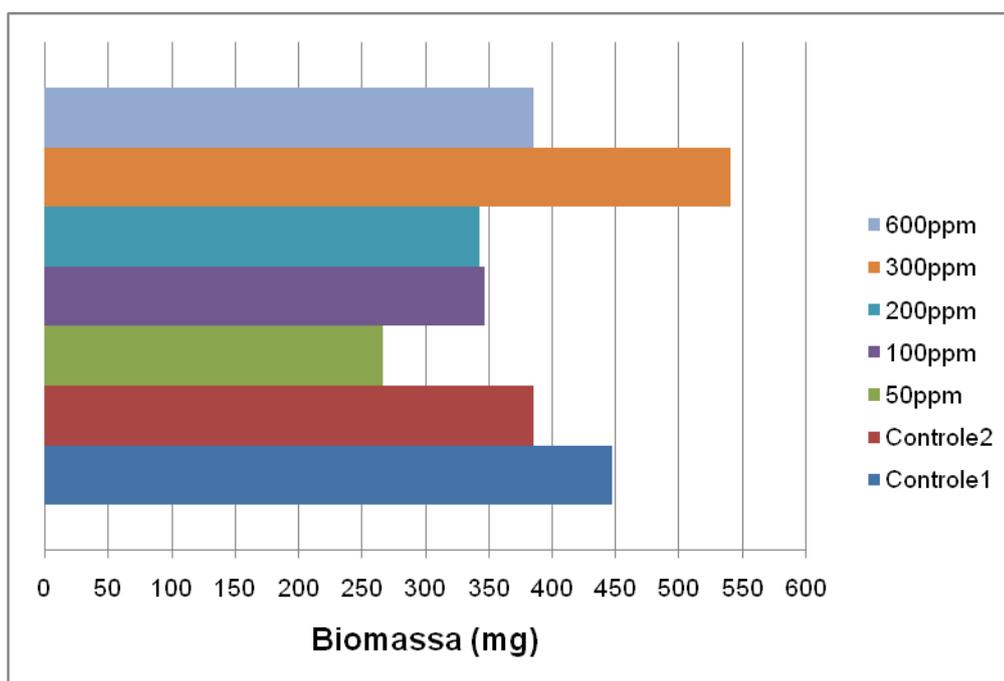


Figura 11 Valores de biomassa total aos 42 dias sob a condição do biodiesel como recebido. \*Controle 1: Biodiesel como recebido (0 ppm). \*\*Controle 2: Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria.

Observando-se a figura 11 fica claro que não é possível determinar uma *relação linear* entre os valores de biomassa com as concentrações de TBHQ utilizados no biodiesel como recebido. Da mesma forma, o biodiesel como recebido com a adição do inóculo também não apresentou *relação linear* entre estes dados (figura 12).

O gráfico representado pela figura 12 apresenta os valores de biomassa da condição do biodiesel como recebido mais adição do inóculo. O menor valor foi observado na concentração de 100 ppm, com 269,66 mg. O maior valor foi observado no controle 4, ou seja, biodiesel com antioxidante adicionado na indústria, foi de 398,50 mg. No entanto, pouca diferença quando comparado ao tratamento utilizando 200 ppm, o qual gerou uma biomassa final de 396,83 mg (figura 12).

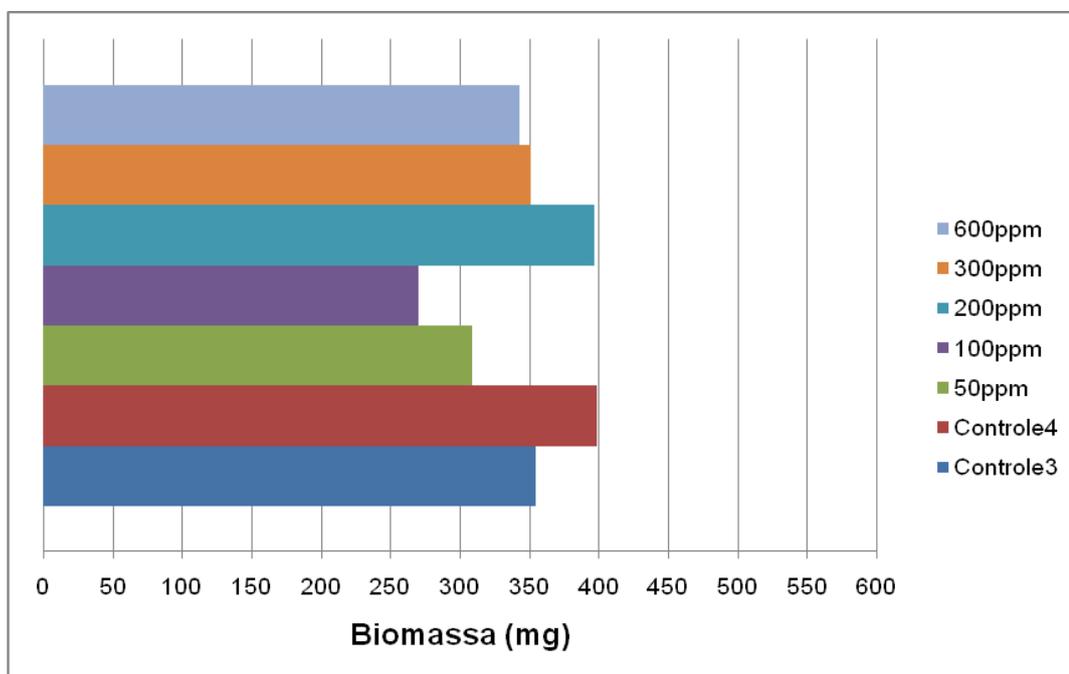


Figura 12 Valores de biomassa total aos 42 dias sob a condição do biodiesel como recebido com adição de inóculo. \*Controle 3: Biodiesel como recebido (0 ppm) mais adição de inóculo. \*\*Controle 4: Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria mais adição de inóculo.

Comparando-se os valores de biomassa total, temos os resultados apresentados no gráfico representado pela figura 13. Pode-se observar que de uma maneira geral, a microbiota residente do biodiesel adaptou-se as condições impostas pelo experimento. Pois o ensaio conduzido com o biodiesel como recebido, mostrou valores relativamente altos de biomassa quando comparados ao biodiesel com adição de inóculo. Mesmo com a adição do inóculo foi possível observar que a população existente no biodiesel não aumentou, sendo que em poucas concentrações de TBHQ foram observados valores maiores de biomassa.

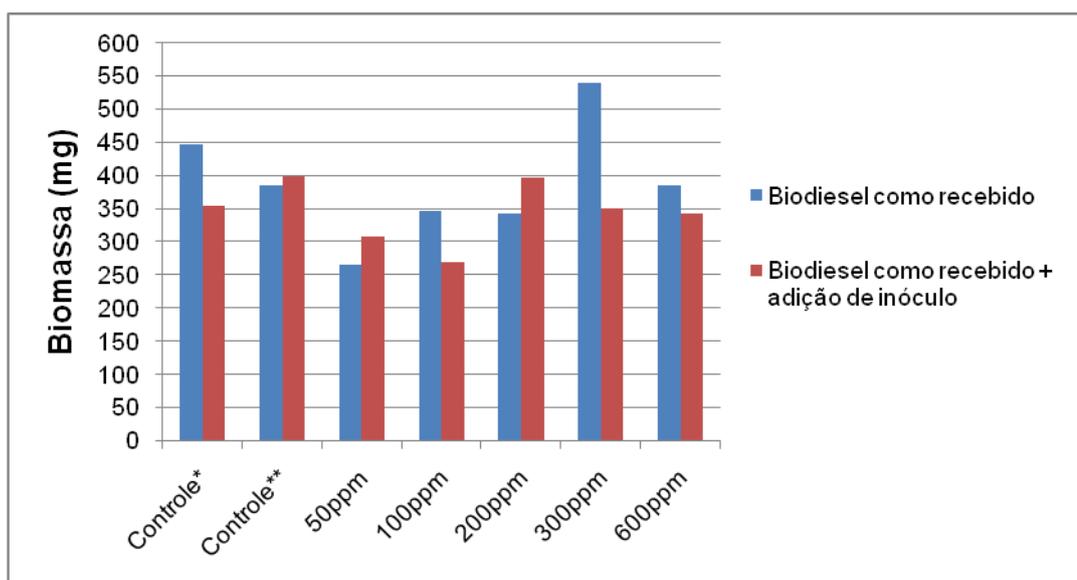


Figura 13 Valores comparativos de biomassa total aos 42 dias entre as duas formas de biodiesel e diferentes concentrações de TBHQ. Controle\*: Biodiesel. Controle\*\*: Biodiesel com antioxidante com a dosagem da planta industrial.

#### **3.1.4.2.1.2 Análise da diversidade bacteriana e fúngica de biodiesel através da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)**

Para entender como as diferentes concentrações de TBHQ adicionadas ao biodiesel influenciaram a diversidade das comunidades bacteriana e fúngica, do biofilme formado na interface óleo água, após 45 dias de incubação, foram realizadas análises por PCR-DGGE. A técnica (PCR-DGGE) vem sendo amplamente utilizada com o intuito de verificar as mudanças da microbiota de combustíveis sob diferentes condições, como por exemplo, em experimentos sobre as alterações na diversidade da comunidade microbiana em diferentes misturas de biodiesel e diesel, em simulações de estocagem destes combustíveis (Sorensen et al., 2011; Lee et al., 2010; White et al., 2011); e, em avaliação da estrutura e diversidade da comunidade microbiana durante o processo de biorremediação de solos contaminados com diesel e biodiesel (Silva et al., 2012; Meyer et al., 2014; Colla et al., 2014).

Na figura 14 estão apresentados os perfis das comunidades bacterianas do biodiesel como recebido (em azul) e do biodiesel como recebido com a adição de inóculo (vermelho) após 45 de incubação, obtidos pela migração dos amplicons da região V3 do gene 16S rRNA, por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Verifica-se que as comunidades microbianas que se desenvolveram em ambos os tratamentos apresentaram perfis diferentes, os quais não puderam ser relacionados com a concentração de TBHQ utilizada, ou seja, a estrutura da comunidade bacteriana foi diferente nos diferentes tratamentos, no entanto não houve correlação entre elas e a concentração de TBHQ. Dos tratamentos avaliados, o tratamento de 300 ppm com o biodiesel como recebido não pôde ser analisado, pois não apresentou amplificação por PCR do DNA extraído.

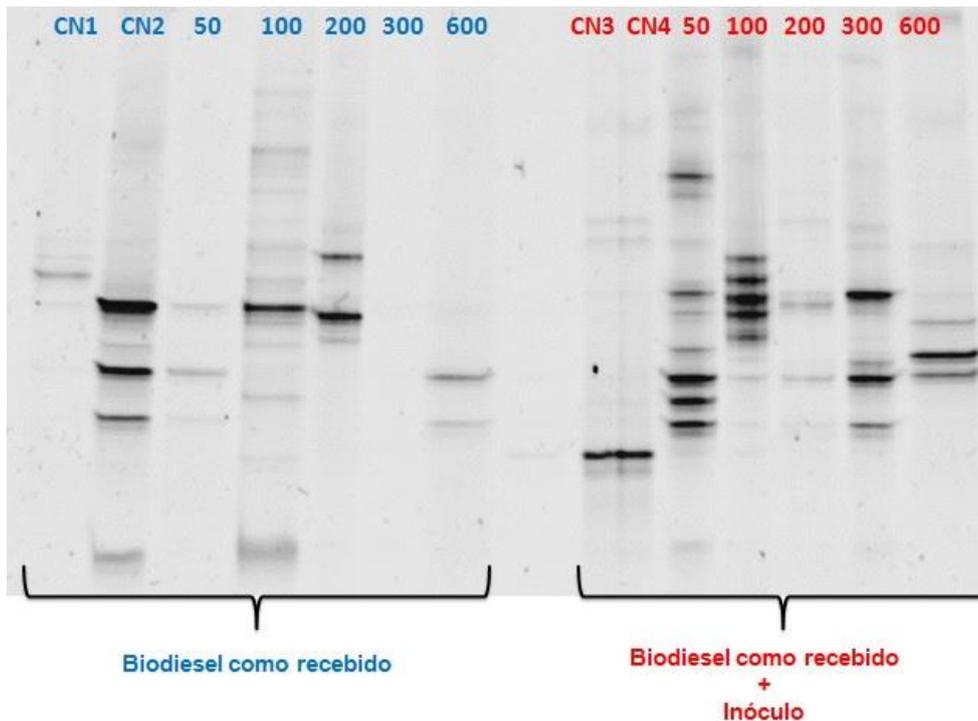


Figura 14 Aspecto do gel de poliacrilamida de 8% e do gradiente desnaturante de 15% a 55% (DGGE) de amostras da região V3 do gene 16S rRNA. CN1 (controle 1): Biodiesel puro. CN2 (controle 2): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria. CN3 (controle 3): Biodiesel puro + inóculo. CN4 (controle 4): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria + inóculo.

Para avaliar a diversidade da comunidade microbiana, procedeu-se a análise pelo índice de diversidade de Shannon-Wiener (Tabela 5). Este índice indicou maior diversidade bacteriana na condição do biodiesel com adição de inóculo, principalmente nos tratamentos de 50 ppm e 100 ppm, ou seja, os valores de diversidade ( $H'$ ) nos tratamentos com adição do inóculo são maiores do que os valores ( $H'$ ) dos tratamentos com biodiesel como recebido. Provavelmente, os micro-organismos do inóculo, que foram previamente expostos ao biodiesel e ao meio mineral BH (ASTM E1259-10), adaptaram-se às condições impostas. Desta forma, os micro-organismos do inóculo, já em condições experimentais, juntamente com a população nativa, conferiram ao

biofilme formado na interface óleo água uma comunidade bacteriana mais diversificada, quando comparada aos tratamentos sem inóculo.

Tabela 5 Resultados de diversidade de espécie H' (Shannon-Wiener).

Amostra	Diversidade de Espécie H' (Shannon-Wiener)	
	Biodiesel como recebido	Biodiesel + Inóculo
CN1	0,6	(CN3) 0,9
CN2	1	(CN4) 0,9
50ppm	0,6	1,2
100ppm	1,15	1,0
200ppm	0,8	0,8
300ppm	ND	0,95
600ppm	0,6	0,9

ND: Não detectado

Na figura 15, podem ser observados os perfis da comunidade fúngica dos seguintes tratamentos: condição do biodiesel como recebido (azul); e, do biodiesel como recebido, mais adição de inóculo (vermelho), após 45 dias de incubação. Nesta análise, pode ser verificada uma estrutura mais similar das comunidades fúngicas nas amostras do biodiesel como recebido, e pode-se observar que uma UTO (unidade taxonômica operacional) foi predominante em todas as amostras desta condição. Entretanto, na análise do biodiesel com adição de inóculo não é possível observar o mesmo, pois a distribuição de bandas (UTOs) não apresentou um padrão. A amostra Controle 4 (CN4) que corresponde ao biodiesel com antioxidante adicionado na indústria e adição de inóculo não pôde ser analisada pois não apresentou amplificação por PCR do DNA extraído.

Através do índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') (tabela 6), verifica-se um aumento nos valores de H' na condição do biodiesel com adição de inóculo quando comparado ao biodiesel recebido, ou seja, indicou uma maior diversidade fúngica nesta condição. Assim como os resultados obtidos

pela análise de diversidade bacteriana, aqui também sugere-se que a microbiota fúngica adaptou-se às condições do ensaio e desenvolveu-se durante os 45 dias de incubação.

O inóculo utilizado nesta análise representa o mesmo adicionado no tempo inicial do experimento. Percebe-se que o perfil obtido com o inóculo foi o mesmo observado nas amostras 50 a 600 ppm da condição do biodiesel como recebido mais a adição do inóculo.

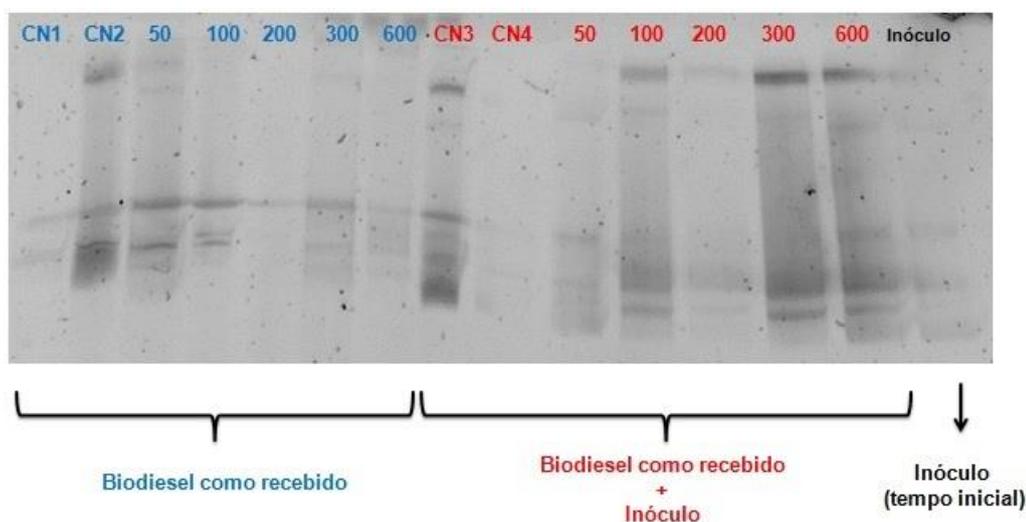


Figura 15 Aspecto do gel de poliacrilamida de 6% e do gradiente desnaturante de 45% a 65% (DGGE) de amostras da região V3 do gene 18S rRNA. CN1 (controle 1): Biodiesel puro. CN2 (controle 2): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria. CN3 (controle 3): Biodiesel puro + inóculo. CN4 (controle 4): Biodiesel com antioxidante adicionado na indústria + inóculo

Tabela 6 Resultados de diversidade de espécie H' (Shannon-Wiener)

Amostra	Diversidade de Espécie H' (Shannon-Wiener)	
	Biodiesel como recebido	Biodiesel + Inóculo
CN1	0,30	(CN3) 0,60
CN2	0,48	(CN4) 0,30
50ppm	0,48	0,70
100ppm	0,48	0,78
200ppm	0,0	0,78
300ppm	0,0	0,60
600ppm	0,0	0,60
Inóculo	-	0,48

### 3.1.4.2.2 Análises realizadas na fase aquosa

#### 3.1.4.2.2.1 Detecção da produção de metabólitos por meio de medidas de pH

A figura 16 traz o gráfico referente aos valores de pH observados nas diferentes concentrações de TBHQ e controles na condição de biodiesel como recebido. Pode ser observado que todas as concentrações tiveram seu pH reduzido. O pH inicial em todas as amostras era 7,2. Após 42 dias, foi verificado que o menor valor de pH foi obtido com a concentração de 50 ppm: 5,3, seguido da concentração de 300 ppm, no valor de 5,8. O controle 1 teve seu pH reduzido para o valor de 6,1, mostrando que apenas com a adição do biodiesel, sem a intervenção do antioxidante, o valor do pH já é modificado.

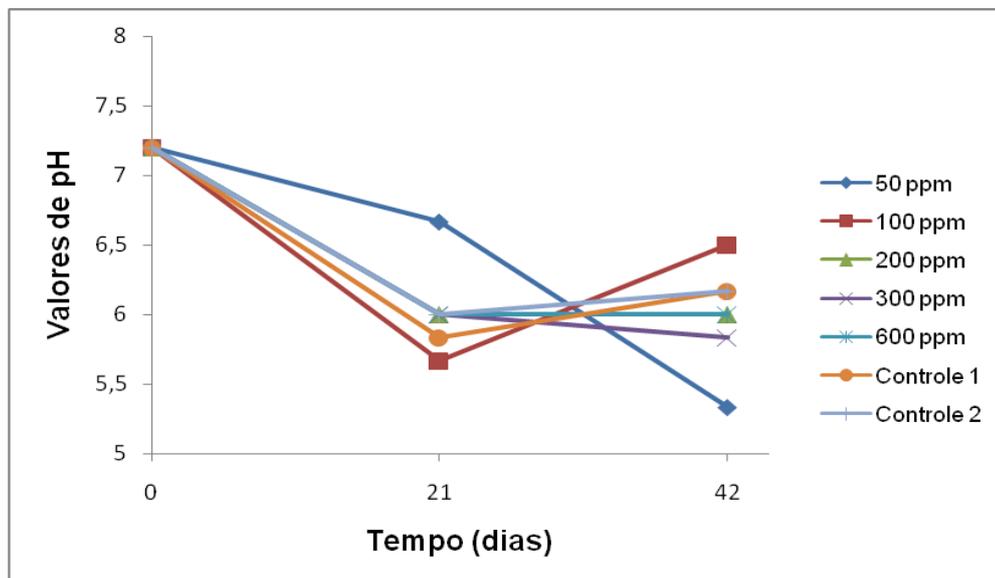


Figura 16. Valores de pH da fase aquosa do biodiesel como recebido. \*Controle 1: Biodiesel como recebido. \*\*Controle 2: Biodiesel como recebido mais adição de antioxidante da indústria.

De acordo com Bucker e colaboradores (2011), além dos metabólitos produzidos durante a biodegradação do biodiesel, a redução do pH do meio aquoso também pode ser causada tanto pela lise celular quanto pela produção

de ácidos orgânicos gerados durante a degradação abiótica do diesel e/ou biodiesel. Bento e colaboradores (2005) ao estudarem a degradação de hidrocarbonetos verificaram que a formação de ácidos orgânicos pode reduzir os valores de pH da fase aquosa. Os autores reportaram uma redução de 7 para 4,8 em 60 dias para experimento conduzido com o fungo *Aspergillus fumigatus* em microcosmos contendo óleo diesel, sendo que o controle sem o micro-organismo reduziu para 6,9.

A condição como recebido mais a adição do inóculo por sua vez também apresentou decréscimo nos valores de pH em todas as concentrações de TBHQ e controles (Figura 17). Similarmente a condição do biodiesel como recebido, a concentração de 50ppm também demonstrou o menor valor de pH: 5,5. Seguido da mesma maneira de 300ppm, com valor de 5,6.

A redução de pH observada demonstra a presença de ácidos oriundos do metabolismo dos micro-organismos presentes no sistema, além de produtos da degradação abiótica. A presença destes ácidos pode facilitar a corrosão de tanques de armazenagem de combustíveis (Bento et al., 2004; Aktas et al., 2010).

#### **3.1.4.2.2.2 Avaliação da presença de atividade bactericida**

Neste ensaio, a atividade bactericida foi avaliada com o intuito de informar sobre a presença de algum composto com ação biocida presente na fase aquosa que tenha inibido o crescimento microbiano. Este ensaio foi realizado através da técnica de *Drop-plate*. Na tabela 7, são evidenciados em vermelho os resultados referentes ao tratamento 1 (biodiesel como recebido) e em azul, ao tratamento 2 (biodiesel como recebido mais a adição do inóculo).

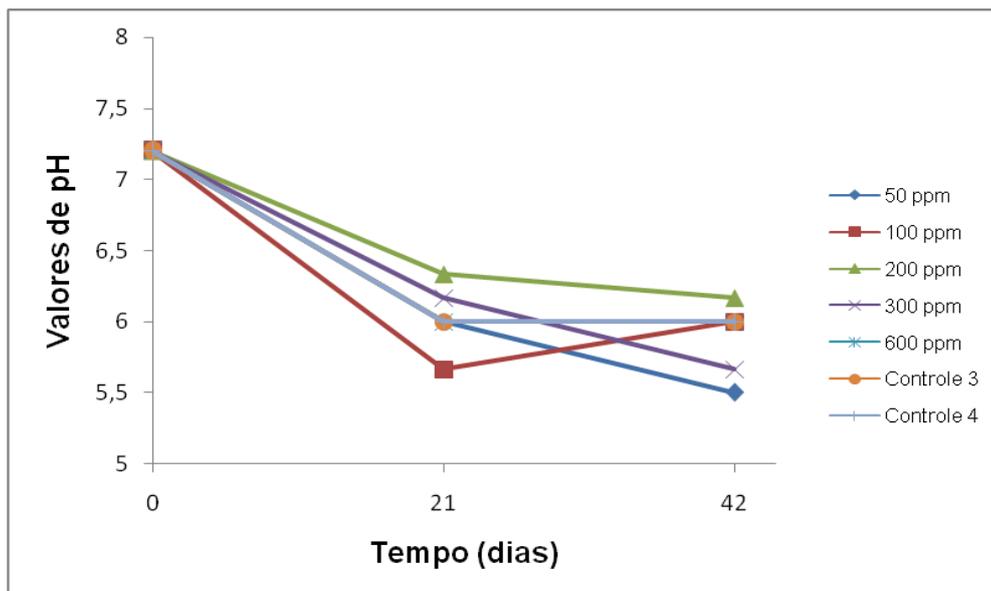


Figura 17 Valores de pH da fase aquosa do biodiesel como recebido mais adição de inóculo. \*Controle 3: biodiesel como recebido mais adição de inóculo. \*\*Controle 4: biodiesel com adição de antioxidante da indústria mais adição de inóculo.

Tabela 7 Avaliação da presença/ausência do crescimento bacteriano da fase aquosa.

Tempo (dias)	Teor de TBHQ (ppm)													
	CN*		CN**		50		100		200		300		600	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
42	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+

(+) : presença de crescimento

(-) : ausência de crescimento

(\*) : biodiesel puro

(\*\*) : biodiesel com a adição do antioxidante adicionado na indústria

Pode-se observar que a condição do biodiesel como recebido e do biodiesel com adição de inóculo apresentaram presença de crescimento no 7° dia em todas as concentrações e controles. Ao 42° dia, podemos observar que as concentrações de 100 ppm, 300 ppm e 600 ppm, não apresentaram crescimento no biodiesel como recebido, ou seja, sugere-se a esse fato a

presença de algum composto antimicrobiano na fase aquosa que tenha inibido o crescimento de bactérias. Para este fato, pode ser sugerido que o TBHQ, composto pouco solúvel em água de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, somente tenha se solubilizado na fase aquosa quando em altas concentrações no biodiesel, apresentando efeito antibacteriano e promovendo a morte das bactérias.

Por outro lado, a condição do biodiesel onde houve a adição do inóculo aos microcosmos, apresentou crescimento de bactérias em todas as concentrações testadas e em todos os tempos analisados. Por conter uma maior quantidade de micro-organismos devido a adição do inóculo, o TBHQ solubilizado na fase aquosa neste tratamento não foi suficiente para inibir o desenvolvimento bacteriano.

### **3.1.4.2.3 Análises realizadas na fase oleosa**

#### **3.1.4.2.3.1 Monitoramento dos valores de índice de acidez**

Os valores monitorados ao longo de 45 dias através das análises de índice de acidez no biodiesel como recebido estão demonstrados na tabela 8. Pôde-se observar que todos os valores aumentaram gradativamente conforme o tempo. De acordo com a Norma ABNT NBR 14448 o limite máximo é de 0,5 mg KOH/g. Este valor foi observado apenas no tempo zero em todas as amostras.

O controle 1, que corresponde ao biodiesel como recebido sem adição de antioxidante, apresentou valor de índice de acidez de 0,49 mg KOH/g no tempo zero, porém, no 30<sup>o</sup> dia passou a apresentar 2,52 mg KOH/g. Em alguns

tempos amostrais não foi possível obter os resultados pois o ponto de viragem das amostras não foi encontrado.

O maior valor obtido foi no controle 2 (biodiesel com adição de antioxidante na indústria), que após 45 dias apresentou 7,34 mg KOH/g. Segundo Berrios e colaboradores (2012), a razão pela qual os valores de índice de acidez aumentam pode ser explicada devido à ocorrência da hidrólise dos metil-ésteres de ácidos graxos presentes na constituição do biodiesel, os quais, após sofrerem esta reação, liberam ácidos graxos e conseqüente aumento no índice de acidez. Além disso, há a formação de ácidos como produto final da oxidação.

Tabela 8 Valores de índice de acidez em biodiesel como recebido. Controle 1: biodiesel puro. Controle 2: biodiesel com antioxidante da indústria. \*Resultado não conclusivo: ponto de viragem não encontrado.

Amostra	Índice de acidez ( mg KOH/g)			
	0 dia	15º dia	30º dia	45º dia
<b>Controle 1</b>	0,49	1,47	2,52	*
<b>Controle 2</b>	0,47	3,48	*	7,34
<b>50 ppm</b>	0,48	1,18	1,40	*
<b>100 ppm</b>	0,48	3,32	*	5,81
<b>200 ppm</b>	0,46	1,65	1,88	2,17
<b>300 ppm</b>	0,46	1,73	3,40	4,15
<b>600 ppm</b>	0,44	3,44	3,98	*

Os valores de índice de acidez também aumentaram ao longo do tempo no experimento conduzido com o biodiesel com adição de inóculo (Tabela 9). Todas as amostras demonstraram valores dentro das especificações exigidas pela norma brasileira no tempo zero, no entanto, ao longo dos 45 dias os valores aumentaram e no tempo final os valores apresentaram entre 1,62 mg KOH/g (50 ppm) e 2,36 mg KOH/g (controle 4). De maneira geral, todos os valores do índice de acidez ficaram acima do valor máximo permitido pela

legislação que é de 0,5 mg KOH/g, informando que o biodiesel está fora da especificação para a comercialização.

Diversos estudos demonstraram que após a oxidação do biodiesel, o valor do índice de acidez assim como outros parâmetros (densidade e viscosidade) aumentam (McCormick et al., 2007; Bouaid et al., 2007; Lin et al., 2009). Fatores como temperatura, exposição ao ar e à luz, o material do tanque ou a presença de traços de metal e antioxidantes podem influenciar nas alterações dos parâmetros de qualidade do biodiesel (Almeida et al., 2011), assim como a contaminação microbiana, fator este já verificado por vários estudos (Passmann & Dobranic, 2005; Bücken et al., 2011; Zimmer et al., 2013; Passmann, 2013).

Tabela 9 Valores de índice de acidez do biodiesel com adição de inóculo. Controle 3: biodiesel puro com adição de inóculo. Controle 4: biodiesel com antioxidante da indústria e adição de inóculo. \* Resultado não conclusivo: ponto de viragem não encontrado.

Tratamento	Índice de acidez ( mg KOH/g)			
	0 dia	15º dia	30º dia	45º dia
<b>Controle 3</b>	0,49	1,45	1,94	1,92
<b>Controle 4</b>	0,47	1,38	1,92	2,36
<b>50 ppm</b>	0,48	1,54	1,41	1,62
<b>100 ppm</b>	0,48	3,38	1,58	2,16
<b>200 ppm</b>	0,46	4,62	*	1,8
<b>300 ppm</b>	0,46	1,38	1,48	1,89
<b>600 ppm</b>	0,44	1,34	1,63	1,84

Ao compararmos os valores de índice de acidez da condição do biodiesel como recebido e biodiesel com adição de inóculo, observa-se neste último que a presença simultânea do inóculo e do antioxidante confere aos valores de índice de acidez uma maior tendência de linearidade.

### 3.1.4.2.3.2 Monitoramento da estabilidade à oxidação

A estabilidade à oxidação a 110°C foi monitorada por 45 dias. De acordo com a Norma EN14112 utilizada pelo CECOM nos ensaios conduzidos, o tempo mínimo para este ensaio é de 6 h. Conforme pode ser visualizado na tabela 10, no tempo inicial (T0) as amostras do biodiesel como recebido apresentaram valores dentro das especificações, exceto o controle 1 que apresentou 3,6 h e o controle 2 que apresentou 5,4 h, biodiesel sem adição de antioxidante e com a adição de antioxidante adicionado na indústria, respectivamente. Ao 45º dia, a amostra com 50 ppm de TBHQ apresentou 5 h de período de indução, ficando então 1 h abaixo do valor mínimo exigido. As demais amostras de 100 ppm até 600 ppm apresentaram de 11 h a 12 h de período de indução.

Tabela 10 Estabilidade à oxidação do biodiesel como recebido. Controle 1: Biodiesel puro. Controle 2: biodiesel com antioxidante da indústria. \*Ponto de inflexão não detectado.

Tratamento	Estabilidade à oxidação (h)			
	0 dia	15º dia	30º dia	45º dia
<b>Controle 1</b>	3,6	7,1	5,8	4,3
<b>Controle 2</b>	5,4	4,4	2,8	5,9
<b>50 ppm</b>	12	5,1	4,7	5
<b>100 ppm</b>	7	10,6	5,4	11,8
<b>200 ppm</b>	9,6	13,75	6,8	*
<b>300 ppm</b>	17	10,6	*	11,9
<b>600 ppm</b>	17,6	13,7	20,1	12,2

Domingos e colaboradores (2007) estudaram o efeito da adição de BHT, BHA e TBHQ em etil-ésteres de óleo de soja. Os autores utilizaram concentrações de 200 a 8000 ppm. O melhor resultado quanto à estabilidade à oxidação foi obtido com a utilização de 8000 ppm de TBHQ, ou seja, com a maior concentração dentre as testadas, mostrando então grande potencial

quando utilizado em altas concentrações. No entanto, este antioxidante, segundo os autores, é ideal para ésteres com baixa estabilidade.

A eficiência de TBHQ também foi verificada por Dunn e colaboradores (2005), que investigaram a eficiência de diferentes antioxidantes (BHA, BHT, TBHQ e propil-galato). Foi observado que o TBHQ demonstrou boa compatibilidade física quando utilizado em concentrações maiores que 3000 ppm, e afirmaram ser o antioxidante mais efetivo dentre os testados.

No presente estudo, valores acima de 100 ppm, dentro das condições utilizadas, foram suficientes para manter a estabilidade à oxidação das amostras dentro das especificações exigidas pela Norma. Os valores de 300 ppm e 600 ppm apresentaram os maiores tempos, 11,9 h e 12,2 h, respectivamente.

A condição como recebido com adição de inóculo mostrou ao longo dos 45 dias, que manteve valores mais altos que o mínimo exigido pelas especificações da ANP (Tabela 11). A amostra contendo 600 ppm de TBHQ demonstrou o maior valor de estabilidade oxidativa: 16,95 h no tempo final. Os menores valores foram 6,2 h e 7 h, obtidos respectivamente pelas amostras referente ao controle 3 (biodiesel como recebido mais a adição do inóculo) e controle 4 (biodiesel com o antioxidante aplicado na indústria mais a adição do inóculo). As demais amostras contendo entre 50 ppm e 600 ppm apresentaram valores de estabilidade à oxidação entre 11,8h a 16,95h.

Tabela 11 Estabilidade oxidativa do biodiesel com adição de inóculo. Controle 3: biodiesel como recebido mais adição de inóculo. Controle 4: biodiesel com antioxidante da indústria mais adição de inóculo.

Tratamento	Estabilidade à oxidação (h)			
	0 dia	15º dia	30º dia	45º dia
<b>Controle 3</b>	3,6	6,6	3,1	6,2
<b>Controle 4</b>	5,4	3,9	3,5	7
<b>50 ppm</b>	12	5,2	8,9	11,8
<b>100 ppm</b>	7	13	5,1	12,8
<b>200 ppm</b>	9,6	8,9	2,6	11,8
<b>300 ppm</b>	17	10,1	13,75	15,8
<b>600 ppm</b>	17,6	13,9	24,1	16,95

Em estudo conduzido por Borsato e colaboradores (2012) foi verificado que a oxidação do biodiesel puro (B100) foi menor do que das amostras que continham antioxidantes. Ou seja, o antioxidante contribui para o aumento da estabilidade oxidativa das amostras. O mesmo foi observado no presente estudo, onde as amostras que continham maiores quantidades de TBHQ apresentaram mais horas de período de indução.

A estabilidade oxidativa na condição em que o biodiesel recebeu o inóculo, não teve seu período de indução reduzido, exceto pela variação dos valores de estabilidade oxidativa principalmente em 15 e 30 dias. No entanto, de modo geral, o teor de antioxidante conseguiu conferir uma maior estabilidade oxidativa aos 45 dias.

A estabilidade à oxidação de misturas de biodiesel é um processo muito complexo que é afetado por uma variedade de fatores, incluindo composição do biodiesel, presença de antioxidantes e aditivos, além do estágio da oxidação (Karavalakis et al., 2010). Portanto, outras variáveis devem ser levadas em conta no momento de atribuir o resultado à um único parâmetro.

### 3.1.4.2.3.3 Monitoramentos dos valores de viscosidade cinemática

Os valores referentes à viscosidade cinemática a 40°C na condição do biodiesel como recebido e com adição do inóculo mantiveram-se dentro dos valores exigidos nas especificações da ANP, que compreendem valores entre 3 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> e 6 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (Figuras 18 e 19, respectivamente).

De uma maneira geral, todos os valores aumentaram, no entanto, de forma moderada. Durante a estocagem, devido a formação de ácidos e compostos poliméricos oxidados, os valores de viscosidade tendem a aumentar. Devido à influência da temperatura, presença de metais ou presença de luz, através da quebra das ligações duplas, os ácidos graxos insaturados do biodiesel reagem para formar dímeros (uma molécula composta de duas subunidades idênticas ou monômeros ligados) e polímeros, aumentando assim a viscosidade.

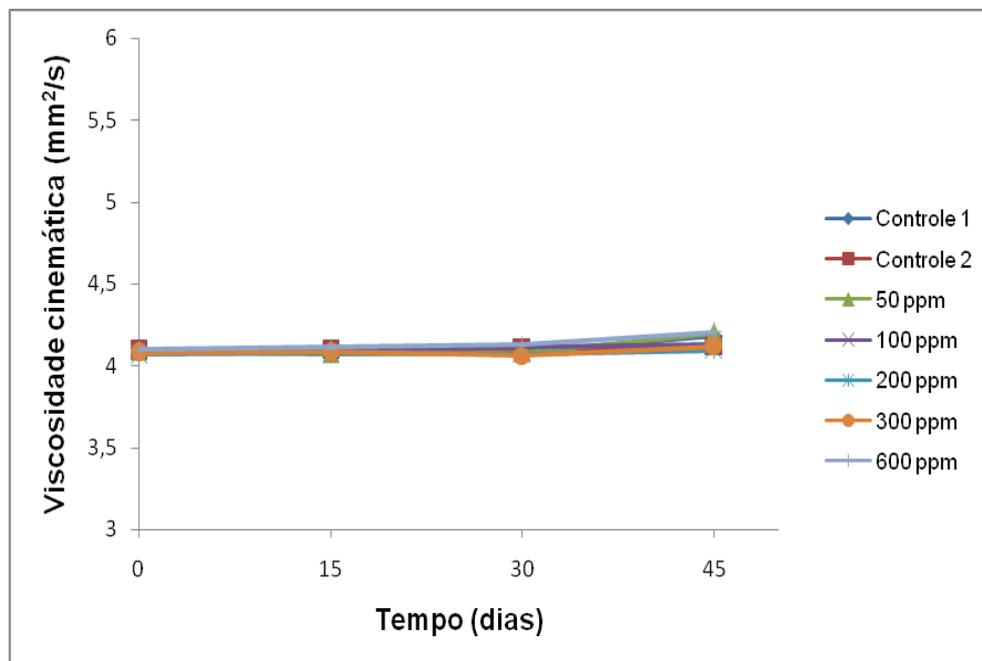


Figura 18 Viscosidade cinemática a 40°C – Biodiesel como recebido.

Segundo Knothe e colaboradores (2005), a oxidação do biodiesel é geralmente acompanhada pelo aumento no valor do índice de acidez e viscosidade do combustível, ambas observações foram verificadas no presente trabalho. Além disso, os autores ressaltam que o odor e a cor do biodiesel alteram-se devido à oxidação.

Em estudo conduzido por Corseuil e colaboradores (2011), os autores verificaram que a viscosidade exerce influência sobre a biodegradabilidade do biodiesel. Em comparação ao biodiesel de óleo de mamona, o qual é mais viscoso, o biodiesel de soja apresentou maior biodegradabilidade em meio aquoso. Os autores inferiram a este resultado que uma maior viscosidade resulta em um decréscimo na biodisponibilidade e uma desaceleração na biodegradação, devido a uma menor interação e um menor tempo de contato com o substrato utilizado. Esta relação também foi previamente estabelecida para a biodegradação de óleos parafínicos (Haus et al., 2000), óleo cru (Sugiura et al., 1996), e ésteres oleoquímicos (Andreas, 1999).

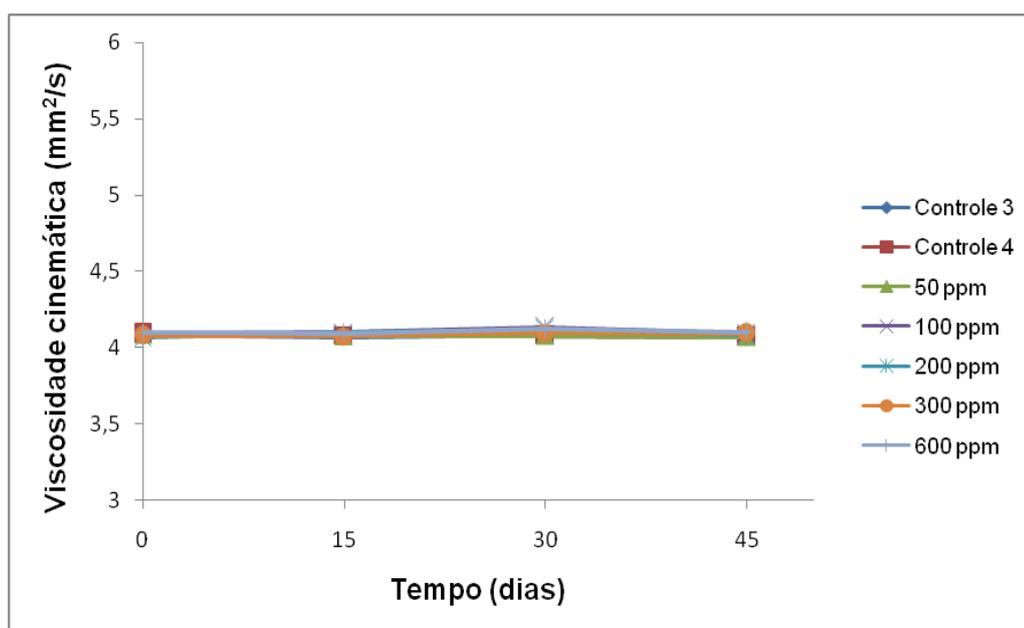


Figura 19 Viscosidade cinemática a 40°C – Biodiesel como recebido mais adição de inóculo.

Neste trabalho, os resultados referente à viscosidade das amostras com a presença do inóculo microbiano apresentaram uma variação e valores ainda menores que os das amostras que não contêm o inóculo. Mais uma vez, é observado que o inóculo não afetou a qualidade do biodiesel com relação a este parâmetro.

#### **3.1.4.2.3.4 Monitoramento dos valores de teor de água**

Os valores de teor de água também foram monitorados durante os 45 dias seguindo a Norma ASTM D6304. Em todas as amostras foi observado aumento no teor de água. Este dado é muito importante uma vez que informa sobre a quantidade de água que é incorporada ao biodiesel.

A água, além de promover a hidrólise do biodiesel resultando em ácidos graxos livres, também pode acelerar a proliferação de micro-organismos, corrosão em tanques de estocagem com deposição de sedimentos. Como o biodiesel apresenta certo grau de higroscopicidade, o teor de água deve ser monitorado durante o armazenamento (Lôbo et al., 2009).

O valor máximo aceitável segundo as especificações exigidas no monitoramento dos parâmetros de qualidade do produto desde janeiro de 2014 é de 200 mg/kg. No entanto, ao final do ensaio todas as amostras mostraram valores acima do limite aceito, na maioria das amostras foi observado até oito vezes mais.

Na condição do biodiesel como recebido, conforme pode ser visualizado na figura 20, o controle 1 apresentou o valor de 1628 mg/kg de teor de água no final do monitoramento (45° dia). O valor mais alto observado ao 45° dia, foi na amostra de 600 ppm, com 1703 mg/kg.

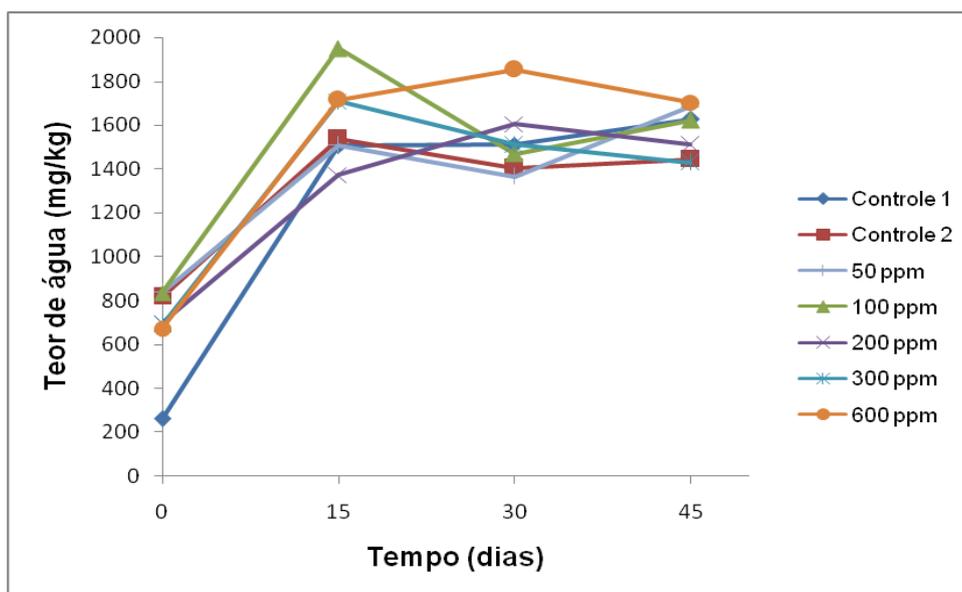


Figura 20 Valores de teor de água – Biodiesel como recebido.

Nas amostras da condição do biodiesel com adição de inóculo, os valores obtidos nas análises de teor de água estão demonstrados no gráfico (figura 21). O controle 3 (biodiesel como recebido mais adição de inóculo) foi o que apresentou menor valor de teor de água (1464 mg/kg) no 45º dia, no entanto, ainda continua maior que o mínimo estabelecidos pela especificação pela ANP. As demais amostras apresentaram valores superiores a 1500 mg/kg, sendo que o maior foi observado pela concentração de 50 ppm, com 1671 mg/kg.

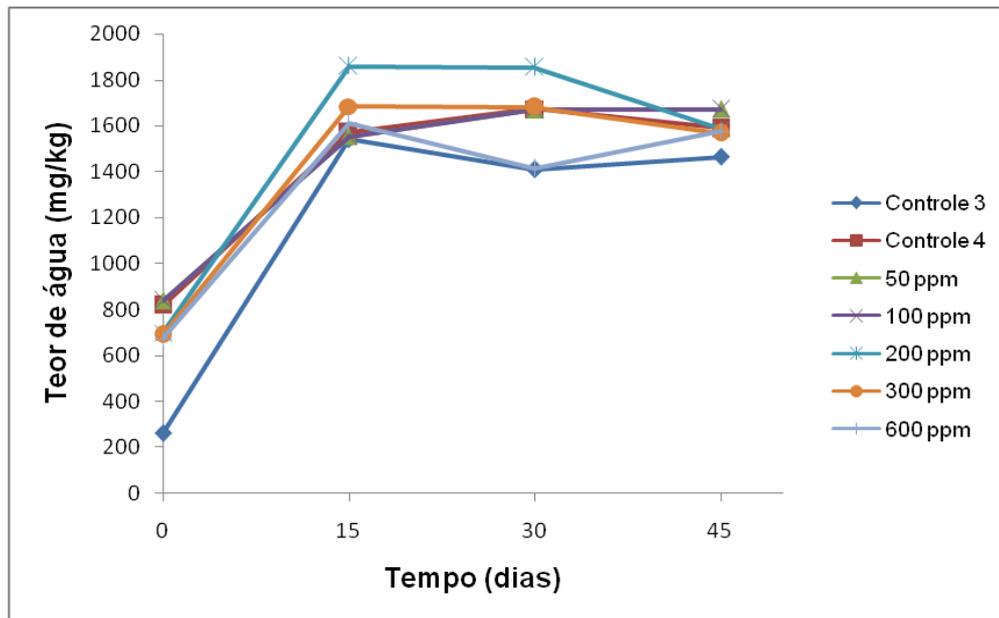


Figura 21 Valores de teor de água – Biodiesel como recebido mais adição de inóculo.

De acordo com Passmann (2013), em termos práticos, isso significa que em um tanque de combustível com 10.000 m<sup>3</sup> pode, dentro das especificações exigidas pelas normas, conter 2 m<sup>3</sup> de água livre, por exemplo. De uma perspectiva de tanque de operação este volume é insignificante. No entanto, esta condição gera um habitat propício para a proliferação microbiana, 2 m<sup>3</sup> é um volume substancial. Independente das melhores práticas para remoção mecânica da água, tanques de combustíveis estão propensos a acumular água suficiente para suportar o crescimento microbiano.

Com relação ao teor de água, de modo geral, observa-se que para os dois tratamentos, ou seja, com e sem inóculo, os valores do teor de água aumentam até 15º dia, e partir daí até o final do monitoramento a concentração de água não apresenta variação significativa para todas as amostras. Observa-se ainda, que as amostras controle 1 e controle 3 que não contêm antioxidante,

mesmo tendo contato com a fase aquosa mantiveram-se praticamente dentro das especificações (em torno de 250 ppm de água).

### 3.1.4.2.3.5 Análise da biodegradação de ésteres por meio de cromatografia gasosa

As análises da biodegradabilidade dos ésteres de ácidos graxos majoritários presentes no biodiesel de soja dos ensaios conduzidos com o biodiesel como recebido e com adição de inóculo podem ser verificadas nas tabelas 12 e 13, respectivamente. Percebe-se que de uma maneira geral, todas as amostras apresentaram a mesma proporção de ésteres de ácidos graxos no tempo inicial e final, sendo que a ordem de valores percentuais foi: C18:2>C18:1>C16>C18>C18:3, dados como os encontrados por Berrios e colaboradores (2012).

Por meio da análise cromatográfica realizada no presente estudo não foi detectada degradação de ésteres em nenhuma das amostras ao final dos 45 dias nas condições estabelecidas no delineamento experimental. Desta forma, é possível afirmar que o antioxidante TBHQ e os micro-organismos presentes não tiveram influência na taxa de biodegradação do biodiesel avaliado.

Tabela 12 Porcentagem de ésteres de ácidos graxos avaliados presentes no biodiesel como recebido no tempo inicial e após 45 dias de incubação. Biodiesel\*: Com adição de antioxidante na dosagem da planta industrial.

Ésteres (%)	Biodiesel como recebido								
	T inicial				T final				
	Biodiesel	Biodiesel*	Biodiesel	Biodiesel*	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	600 ppm
<b>C16</b>	10,94±0,02	10,86±0,06	10,80±0,05	11,03±0,02	11±0,03	10,99±0,02	11,08±0,01	11,03±0,01	10,7±0,16
<b>C18</b>	4,51±0,01	4,43±0,04	4,54±0,10	4,59±0,05	4,60±0,01	4,60±0,02	4,58±0,0	4,57±0,01	4,69±0,05
<b>C18:1</b>	25,46±0,01	25,37±0,05	25,39±0,16	25,78±0,47	25,50±0,03	25,53±0,04	25,42±0,06	25,44±0,09	25,85±0,15
<b>C18:2</b>	58,94±0,03	59,20±0,15	59,10±0,03	58,43±0,71	58,66±0,16	58,75±0,05	58,78±0,04	58,82±0,07	58,61±0,06
<b>C18:3</b>	0,14±0,00	0,13±0,00	0,15±0,03	0,16±0,04	0,24±0,18	0,12±0,01	0,13±0,00	0,14±0,00	0,14±0,01
<b>Total de ésteres</b>	99,99±0,00	99,99±0,00	99,98±0,00	99,99±0,00	100±0,00	99,99±0,00	99,99±0,00	100±0,00	99,99±0,00

Tabela 13 Porcentagem de ésteres de ácidos graxos avaliados presentes no biodiesel como recebido com adição de inóculo no tempo inicial e após 45 dias de incubação. Biodiesel\*: Com adição de antioxidante na dosagem da planta industrial.

Ésteres (%)	Biodiesel como recebido com adição de inóculo								
	T inicial		T final						
	Biodiesel	Biodiesel*	Biodiesel	Biodiesel*	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	600 ppm
<b>C16</b>	10,94±0,02	10,86±0,06	11,01±0,03	11,04±0,03	11,10±0,02	10,98±0,13	10,88±0,03	10,86±0,01	11,03±0,12
<b>C18</b>	4,51±0,01	4,43±0,04	4,55±0,00	4,58±0,00	4,57±0,02	4,49±0,04	4,45±0,00	4,46±0,02	4,55±0,06
<b>C18:1</b>	25,46±0,01	25,37±0,05	25,51±0,01	25,48±0,02	25,40±0,04	25,43±0,05	25,39±0,07	25,40±0,01	25,45±0,07
<b>C18:2</b>	58,94±0,03	59,20±0,15	58,77±0,03	58,73±0,01	58,77±0,08	58,94±0,23	59,12±0,05	59,12±0,04	58,82±0,26
<b>C18:3</b>	0,14±0,00	0,13±0,00	0,14±0,00	0,15±0,00	0,13±0,00	0,14±0,01	0,14±0,00	0,14±0,01	0,14±0,00
<b>Total de ésteres</b>	99,99±0,00	99,99±0,00	99,98±0,00	99,98±0,00	99,97±0,00	99,98±0,00	99,98±0,00	99,98±0,00	99,99±0,00

A degradação do biodiesel, segundo Dunn (2008), pode acontecer pelos seguintes mecanismos: (i) oxidação ou auto-oxidação a partir do contato com oxigênio presente no ar do ambiente; (ii) decomposição térmica ou termo-oxidativa do excesso de calor; (iii) hidrólise do contato com água ou mistura em tanques de armazenagem; (iv) contaminação microbiana da migração de partículas de sujeira ou de gotas de água contendo bactérias ou fungos no combustível. Na mesma linha, Khoury e colaboradores (2011) constataram que a taxa de degradação dos metil-ésteres de ácidos graxos do biodiesel depende da estrutura do éster de ácido graxo, do seu nível de insaturação, da configuração de duplas ligações, da presença (ou ausência) de conjugação, bem como da posição da dupla ligação.

Apesar do biodiesel avaliado no presente trabalho ter presenciado praticamente todas as condições favoráveis a sua degradação, os níveis de contato experimentados pelo biodiesel nestas condições podem não ter sido suficientes para degradá-lo. Em estudos prévios do grupo, foram constatadas baixas porcentagens de degradação dos ésteres do biodiesel por fungos em condições similares ao presente experimento (Bücker et al., 2011, Schultz, 2011; Cazarolli et al., 2013).

Nossos resultados contrastam com diversos trabalhos que confirmam a alta taxa de biodegradabilidade do biodiesel em simulações laboratoriais (Zhang et al, 1998; Mariano et al., 2009; Coreseuil et al., 2011; Bücken et al., 2011; Silva et al., 2012). Entretanto, alguns estudos também verificaram taxa de degradação não significativa em biodiesel sob diferentes condições experimentais (Leung et al., 2006; Yang, et al., 2013).

Leung e colaboradores (2006) investigaram o efeito da temperatura de estocagem e exposição ao ar e/ou água na pureza do biodiesel e, após 52 semanas, a análise de cromatografia gasosa do conteúdo total de metil-ésteres de ácidos graxos foi reportada. Os resultados demonstraram que o biodiesel degradou menos que 10% em 52 semanas para aquelas amostras estocadas a 4 e 20°C com ou sem exposição ao ar, enquanto 40% e 7% de degradação foram encontradas nas amostras estocadas a 40°C com e sem exposição ao ar, respectivamente. Elevadas temperaturas ou exposição ao ar testadas isoladamente tiveram pouco efeito na degradação do biodiesel. Os autores sugeriram que a alta temperatura juntamente com a exposição ao ar aumenta a taxa de degradação do biodiesel.

Yang e colaboradores (2013) conduziram estudo similar, com microcosmos contendo biodiesel na temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e exposição ao ar por 27 semanas. Não observaram decréscimo significativo de nenhum metil-éster de ácido graxo.

Embora estes estudos corroborem os resultados verificados no presente trabalho, outras hipóteses podem ser lançadas ao fato do biodiesel avaliado não ter degradado. O microcosmo utilizado constituía-se de 100 mL de fase oleosa e 5 mL de fase aquosa em um frasco hermeticamente fechado com

capacidade para 200 mL acondicionado a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  protegido da luz. Este sistema resulta em uma condição de microaerofilia, onde as baixíssimas concentrações de oxigênio e a superfície de contato devem ser levadas em consideração. A proporção de fase aquosa (5%) é muito menor do que aquelas utilizadas em outros trabalhos onde houve maior taxa de biodegradação. Por exemplo, Bückner e colaboradores (2011) utilizaram um sistema onde a proporção estudada era de 1:1 e obtiveram até 100% de degradação pela levedura *Candida silvicola*.

Outro ponto que deve ser ressaltado é com relação ao desenvolvimento microbiano nos microcosmos. Apesar de haver formação de biomassa em todas as amostras conforme reportado na seção 3.1.4.2.1.1 os resultados de cromatografia gasosa não apresentaram consumo de nenhum metil-éster de ácido graxo pelos micro-organismos. Sugere-se que a microbiota do biodiesel tenha consumido compostos da fase aquosa, ou seja, é provável que os micro-organismos tenham se desenvolvido às expensas dos compostos solubilizados do biodiesel.

Cazarolli e colaboradores (2013) avaliaram em escala laboratorial a migração de ésteres da fase oleosa (biodiesel de soja) para a fase aquosa (meio mineral). A comunidade microbiana presente no sistema contendo biodiesel pode utilizar os ésteres disponíveis na fase aquosa para seu crescimento. Foi detectado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (GC-MS) que após 7 dias de contato entre a fase oleosa/aquosa, houve a migração de ésteres de cadeia carbônica palmitato de etila (C16), estearato de metila (C18), oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:2), e linolenato de metila (C18:3) para a fase aquosa

do experimento. Provavelmente, a formação de biomassa observada no presente trabalho, pode ter sido formada a partir do consumo de frações que migraram para a fase aquosa, ou então de outros componentes do biodiesel, como a glicerina, ou mesmo os compostos mono, di ou triacilglicerídeos e, assim, ter contribuído para o aumento da suscetibilidade do biodiesel à contaminação microbiana (Bücker et al., 2010, Schultz, 2011; Cazarolli et al., 2013).

### **3.1.5 Conclusões**

Foi possível determinar a concentração inibitória e biocida mínima de TBHQ (Terc-butil-hidroquinona) com os micro-organismos isolados (*Paecilomyces variotii*; *Pseudallescheria boydii*; *Candida silvicola* e *Bacillus pumillus*) e a um consórcio microbiano não caracterizado;

O desenvolvimento microbiano (biomassa) sob diferentes concentrações de TBHQ em biodiesel como recebido e em biodiesel como recebido com adição de inóculo não-caracterizado foi acompanhado por 42 dias, no entanto, não foi observada relação linear entre a concentração de TBHQ e a quantidade de biomassa formada;

Não foi observada influência da adição de TBHQ nas alterações das comunidades bacterianas e fúngicas do biodiesel em ambos tratamentos (biodiesel como recebido com e sem inóculo). Entretanto, observou-se aumento na diversidade microbiana com a adição do inóculo em ambas comunidades.

Os valores de viscosidade cinemática, índice de acidez e teor de água da fase oleosa aumentaram ao longo de 45 dias caracterizando o biodiesel como fora da especificação;

Foi possível observar que os valores relativos à estabilidade à oxidação a 110°C mantiveram-se estáveis, ou seja, o antioxidante empregado foi efetivo na sua ação, exceto para o biodiesel como recebido a 0 ppm e 50 ppm de TBHQ, além do biodiesel com adição de antioxidante de acordo com a dosagem da planta industrial.

Não foi observada degradação dos ésteres palmitato de etila (C16), estearato de metila (C18), oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:2), e linolenato de metila (C18:3) presentes na fase oleosa por meio da técnica de Cromatografia Gasosa.

## 3.2 Capítulo 2

### **AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BIOCIDA MÍNIMA DE BIO-ÓLEO PARA USO EM ÓLEO DIESEL B10**

Sabrina Anderson Beker<sup>a</sup>, Maria Elisabete Machado<sup>b</sup>, Gabriela Maciel<sup>b</sup>, Rosângela da Silva<sup>c</sup>, Renato Cataluña<sup>b</sup>, Elina Caramão<sup>b</sup>, Fatima Menezes Bento<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Biodeterioração e Biodegradação de Combustíveis e Biocombustíveis (LAB-BIO), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, Brasil.

## RESUMO

A atividade antimicrobiana de bio-óleo obtido a partir da pirólise de biomassa adicionado ao óleo diesel B foi avaliada no presente estudo. Além de apresentar potencial como fração para uso na formulação de óleo diesel, o bio-óleo apresenta em sua constituição compostos promissores no controle da contaminação microbiológica durante o armazenamento da mistura diesel/biodiesel B10. O trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do bio-óleo adicionado ao óleo diesel B (mistura B10) através da determinação da concentração inibitória e biocida mínima sob diferentes concentrações (0 à 10%) utilizando três micro-organismos deteriorogênicos (*Paecylomyces variotii*, *Candida silvicola* e *Bacillus pumilus*) e o inóculo não caracterizado conforme Norma ASTM E1259-10 por 10 dias a 30°C. Além disso, foram detectados os compostos do bio-óleo que migraram para a fase aquosa e conferiram a atividade antimicrobiana por meio de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada a Espectrometria de Massas por tempo de voo. Ao final de 10 dias de ensaio foram obtidos os valores de concentração inibitória e biocida mínima de bio-óleo em mistura B10 com três micro-organismos deteriorogênicos (dois fungos e uma bactéria) e o inóculo não caracterizado. A análise cromatográfica dos extratos avaliados permitiu a identificação de compostos oxigenados como ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis, furanonas, hidrocarbonetos, mistos, nitrogenados e piranonas, sendo que os analitos apresentaram um perfil majoritário de compostos fenólicos seguido de cetonas. Por fim, uma grande diversidade de compostos foi verificada no extrato obtido com água, totalizando 278 compostos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bio-óleo. Antimicrobiano. Compostos fenólicos.

### 3.2.1 Introdução

Hoje, o petróleo e o carvão são responsáveis pela maior parte de geração de energia no mundo. Entretanto, devido à limitação dessas fontes de energia fóssil, e aos problemas ambientais envolvidos, a busca por novas fontes de energia renovável torna-se cada vez maior. Por essa razão, existe um grande interesse na exploração da energia proveniente da biomassa, uma vez que a mesma pode produzir combustíveis líquidos para o setor de transportes (Santos et al., 2012).

A biomassa consiste em um recurso natural que compreende toda matéria orgânica suscetível de ser transformada em energia. Uma das formas utilizadas para essa transformação é através do processo de pirólise, uma complexa reação físico-química que decompõe a biomassa gerando produtos sólidos, gasosos e líquidos, como o bio-óleo, o qual vem sendo amplamente explorado. Este produto destaca-se por ser considerado um biocombustível, podendo ser utilizado como fração na formulação do óleo diesel (Minkova et al., 2000; Chum et al., 2001).

Outra forma de energia derivada de biomassa, no entanto produzida através da reação de transesterificação, é o biodiesel, sendo que desde 2005 no Brasil, a Lei 11.097 tornou obrigatória a adição de biodiesel ao óleo diesel, ou seja, desde então o biocombustível encontra-se efetivamente inserido na matriz energética nacional. Essa mistura é chamada de óleo diesel B, e, atualmente, essa proporção é de 6% de biodiesel adicionado ao óleo diesel (B6).

O biodiesel é um biocombustível rico em ésteres de ácidos graxos. Devido a sua constituição, o biodiesel apresenta diversas vantagens aos

combustíveis fósseis sob o ponto de vista ambiental, entre elas a biodegradabilidade (Zhang et al., 1998; DeMello et al., 2007; Mariano et al., 2008).

A biodegradação do biodiesel deve-se principalmente em razão da presença de compostos facilmente reconhecidos pelos micro-organismos, os quais degradam as cadeias carbônicas deste biocombustível (Amouric et al., 2010). A ação microbiana apesar de ambientalmente vantajosa representa também uma desvantagem do ponto de vista comercial, uma vez que durante a estocagem desse produto tal aspecto compromete a sua qualidade final.

Durante o armazenamento, podem ocorrer condições propícias para o desenvolvimento microbiano, como, por exemplo, a presença de água livre nos recipientes de estocagem. Esta condição pode ser proveniente da condensação do ar ou então da vedação ineficiente do sistema. Após o acúmulo de água dentro do tanque, inicia-se o processo de proliferação microbiana resultando na formação de uma massa biológica na interface combustível-água. Como conseqüências diretas há a deterioração do produto; o entupimento dos equipamentos do sistema; e a corrosão das paredes dos tanques e tubulações, sendo que esta última deve-se à liberação de substâncias ácidas oriundas do metabolismo destes micro-organismos (Bento et al., 2005; Passmann, 2013).

Medidas preventivas podem ser tomadas a fim de evitar estes problemas, tais como a drenagem da água e limpeza periódica dos tanques. Embora essas medidas físicas controlem a contaminação, medidas químicas são mais eficientes na erradicação dos micro-organismos. Em alguns casos, é indicado o uso de produtos antimicrobianos (biocidas), que são compostos

químicos, orgânicos ou inorgânicos que, quando adicionados aos combustíveis, auxiliam controlando e eliminando a contaminação microbiológica (Passmann, 2013). Entretanto, no Brasil, essa prática ainda não é legalizada, uma vez que existem muitas dúvidas no Setor do Petróleo quanto à sua utilização em combustíveis.

É um grande desafio para a pesquisa e indústria encontrar um composto que possua capacidade de inibir o crescimento microbiano e que não interfira na qualidade e características do combustível. Baseado nesta ideia, o bio-óleo surge como forte candidato a suprir essas dificuldades, uma vez que já tem sido testado com sucesso em motores do ciclo diesel e, além disso, há estudos que indicam presença de atividade antimicrobiana devido à sua composição rica em compostos oxigenados, representando desta forma, um preservante alternativo (Cataluña et al., 2013; Bedmutha et al., 2011; Meier et al., 2001; Mourant et al., 2005; Mohan et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a existência de atividade antimicrobiana do bio-óleo quando adicionado ao óleo diesel B. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e biocida (CIB) de diferentes concentrações de bio-óleo: 0% (controle); 0,05%; 0,1%; 0,25%; 0,5%; 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9% e 10%, em óleo diesel B (mistura B10), avaliando-se três diferentes micro-organismos previamente isolados de tanques de combustíveis: *Bacillus pumilus*, *Paecilomyces variotii*, *Candida silvicola* e Inóculo não-caracterizado conforme norma ASTM E1059-10 durante 10 dias.

- Realizar a extração dos compostos solúveis em água presentes no bio-óleo, utilizando dois procedimentos de preparo amostral, sendo um com água ultrapura e o outro com NaOH 1 M, com o intuito de investigar quais compostos migram para a fase aquosa e conferem a ação antimicrobiana fazendo uso da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE);

- Caracterizar qualitativamente através de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada a Espectrometria de Massas por tempo de voo (GC×GC/TOFMS) os extratos obtidos na Extração em Fase Sólida (SPE) do bio-óleo.

### **3.2.2 Materiais e Métodos**

#### **3.2.2.1 Bio-óleo**

O bio-óleo utilizado foi produzido no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob coordenação do Professor Dr. Renato Cataluña Veses (Cataluña et al., 2013). O óleo de pirólise foi produzido em um reator com leito fixo imobilizado a partir da mistura 1:1:1 de óleo de soja, borra de café e serragem de eucalipto, utilizando como aglutinante hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e hidróxido de sódio (NaOH) em atmosfera inerte de argônio com uma rampa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  da temperatura ambiente até  $700^\circ\text{C}$  e patamar de 15 minutos (Figura 22).

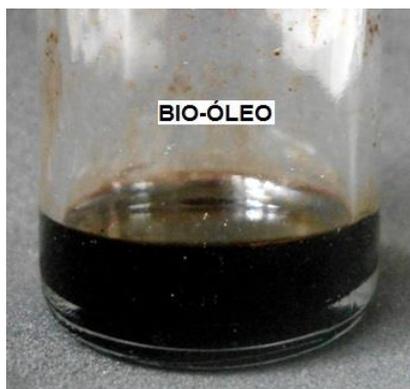


Figura 22 Aspecto do frasco contendo o bio-óleo na sua forma pura.

### **3.2.2.2 Combustíveis**

Foram utilizadas amostras de óleo diesel metropolitano (S50, ou seja, 50 ppm de enxofre em sua formulação) e biodiesel de soja (80%) e sebo bovino (20%), fornecidas pelas empresas Ipiranga Distribuidora de Petróleo e Granol Indústria Comércio e Exportação S/A, respectivamente (Apêndices A e B). Em laboratório, foi realizada a mistura de óleo diesel e biodiesel na proporção de 10% de biodiesel adicionado a 90% de óleo diesel, sendo então chamada de mistura B10. A esterilização da mistura foi realizada por filtração a vácuo por meio de membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (marca Milipore), utilizando-se um frasco *kitassato* previamente esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C e 1 atm. Após esse procedimento, os combustíveis foram armazenados em frascos esterilizados da mesma forma, e após, hermeticamente fechados. Para evitar a foto-oxidação, os frascos foram protegidos da luz com papel-alumínio e armazenados à temperatura ambiente.

### **3.2.2.3 Micro-organismos**

Neste estudo foram utilizados micro-organismos isolados de tanques de armazenamento de óleo diesel A e biodiesel em trabalhos anteriores do grupo

do Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (UFRGS) executados no Brasil (Bento & Gaylarde, 1996; Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2006; Bücken et al., 2011) . Para cada diferente concentração de mistura de óleo testada foram avaliados dois fungos, uma bactéria e um inóculo não-caracterizado.

O fungo filamentoso *Paecilomyces variotii*, que faz parte do Filo Ascomycota classificado na Família *Trichocomaceae*, foi isolado de borra biológica, presente nos tanques de armazenamento de combustíveis (Bücken et al., 2011). O fungo leveduriforme *Candida silvicola*, faz parte do Filo Ascomycota classificado na Família *Saccharomycetidae*, foi isolado de tanque de óleo diesel (Bento & Gaylarde, 2001).

A bactéria *Bacillus pumilus* previamente isolada de sedimento formado pela centrifugação de biodiesel também foi testada. Estas espécies são classificadas como deteriogênicas de combustível estocado no Brasil e fazem parte da bacterioteca e micoteca do Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis da UFRGS.

#### **3.2.2.3.1 Preparo dos inóculos dos micro-organismos isolados**

O inóculo do fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* foi preparado a partir de culturas com 7 dias de cultivo em ágar malte (Anexo 1) em tubos inclinados em incubadora a 30°C, mediante a adição de 2 mL de solução salina (0,85%) estéril e 2 mL de surfactante, solução líquida de Tween 80, preparado na concentração de 0,01%. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, e a suspensão utilizada em cada frasco contou com uma concentração final de  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. O inóculo para o fungo leveduriforme

*Candida silvicola* foi obtido a partir do crescimento das leveduras, cultivadas em tubos inclinados com ágar malte, adicionando-se 2 mL de solução salina (0,85%) estéril. A concentração final utilizada nos microcosmos foi de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup>.

O inóculo da bactéria *Bacillus pumilus* foi preparado a partir de cultura em placa petri contendo meio ágar Luria Bertani (Anexo 2) após 24 h de cultivo em incubadora a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ . A concentração final utilizada nos microcosmos foi de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.2.4 Inóculo não-caracterizado**

A confecção do inóculo não caracterizado foi realizada conforme Norma ASTM E1259-10. Resumidamente, em um frasco erlenmeyer contendo 100 mL de meio mineral Bushnell-Haas, foi adicionado 2% da mistura B10 (previamente esterilizada por filtração) onde então foi inoculado 5 mL de uma borra microbiológica prospectada de um tanque contaminado e incubado a  $28^\circ\text{C}$ , 200 rpm durante 7 dias. A concentração utilizada foi de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.2.5 Delineamento experimental para determinação da concentração inibitória e biocida mínima de bio-óleo adicionado ao óleo diesel B**

Após o procedimento de esterilização da mistura B10, foram preparadas as diferentes misturas de diferentes concentrações de bio-óleo à mistura B10, as quais posteriormente foram utilizadas para a avaliação da concentração inibitória e biocida mínima. Foram preparadas concentrações que variaram de 0% (controle) a 10%, sendo elas: 0%; 0,05%; 0,1%; 0,25%; 0,5%; 1%; 2%; 3%;

4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9% e 10%. Todas as misturas foram acondicionadas em frascos estéreis protegidos da luz e sob refrigeração (8°C a 10°C).

### **3.2.2.6 Condições de cultivo**

O experimento foi conduzido em frascos de vidro com capacidade para 15 mL, previamente esterilizados, utilizando-se uma fase aquosa e uma fase oleosa conforme pode ser visualizado na figura 23. A fase aquosa utilizada variou de composição de acordo com o micro-organismo utilizado. Para o experimento conduzido com a bactéria, foi utilizado o meio Luria-Bertani, e para os fungos, utilizou-se o Caldo Malte (Anexos 3 e 4). Para os experimentos conduzidos com o inóculo não caracterizado utilizou-se o meio mineral Bushnell-Hass (Anexo 5) cuja composição contém nutrientes minerais. Todos os meios de cultivo utilizados no trabalho foram previamente esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos. Após este processo, adicionou-se a cada frasco de vidro a quantia de 2 mL de meio aquoso e 2 mL das diferentes concentrações das misturas de óleo, sendo que cada frasco apresentou a proporção de 1:1 (2 mL de fase aquosa e 2 mL de fase oleosa). O experimento foi realizado em quadruplicata. Por último, adicionou-se o inóculo na concentração de  $10^5$  esporos/células.mL<sup>-1</sup> preparado conforme descrito anteriormente e os frascos foram fechados com algodão estéril. Os microcosmos foram acondicionados em incubadora na temperatura de 29 ±1 °C pelo período de 10 dias.

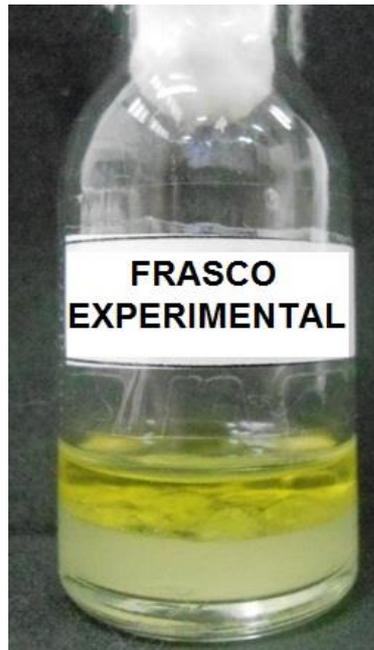


Figura 23 . Aspecto do frasco de vidro utilizado, contendo a mistura B10 (fase oleosa), meio de cultura (fase aquosa) e inóculo. (Fonte: Foto de Sabrina Beker)

### **3.2.2.7 Análises conduzidas**

#### **3.2.2.7.1 Avaliação da concentração inibitória e biocida mínima (CIM/CBM)**

A determinação da CIM foi feita pelo método de diluição em caldo e observada pela ausência de turbidez dos meios nos frascos. Após determinar a concentração mínima inibitória de cada concentração das misturas sobre os inóculos, também foi avaliada a concentração biocida das mesmas. A partir do frasco em que houve a inibição do crescimento dos micro-organismos avaliados (CIM), retirou-se uma alíquota de 10 $\mu$ L, que foi inoculada em placas petri contendo ágar malte para os fungos, ágar Luria Bertani para a bactéria e *Plate Count Agar* para o inóculo não caracterizado. As placas foram incubadas a 29°C  $\pm$  1°C durante 3 dias. A concentração biocida mínima (CBM) foi determinada através da ausência absoluta de crescimento dos micro-organismos nas placas.

### 3.2.2.7.2 Extração em Fase Sólida (SPE) do bio-óleo

Com o intuito de obter a caracterização dos compostos migratórios do bio-óleo para a fase aquosa, os quais possivelmente contribuíram para a sua atividade antimicrobiana, foi realizado primeiramente o processo de Extração em Fase Sólida (SPE). A SPE é uma técnica de separação que se baseia nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica, pois emprega uma pequena coluna aberta (cartucho de extração), que contém a fase sólida através da qual as amostras são percoladas. O princípio da técnica está na partição dos compostos em duas fases (uma sólida e outra líquida). Os analitos são retidos por adsorção na fase sólida, há uma maior afinidade pela fase sólida do que pela matriz da amostra, e posteriormente são dessorvidos com a utilização do solvente: dessorção química. Na figura 24, pode ser visualizado um esquema deste procedimento.

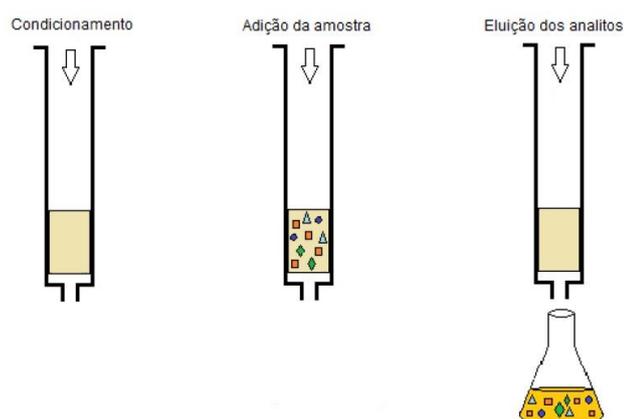


Figura 24 Esquema ilustrativo do procedimento de extração em fase sólida (SPE) (Maciel, 2011).

Foram realizados dois procedimentos para o preparo de amostra. Primeiramente em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL do bio-óleo. Após foi adicionado 5 mL de água ultrapura sendo 1 mL por vez com auxílio de uma pipeta Pasteur. Após este procedimento, houve uma separação de fases, onde a fase aquosa foi submetida a passagem pelo cartucho de extração comercial de sílica modificada com grupos octadecil ( $C_{18}$ ) da marca Agilent (500 mg/3 mL).

Em outro tubo de ensaio, também foi adicionado 0,5 mL de bio-óleo. No entanto, foi adicionado 5 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, sendo 1 mL por vez com auxílio de uma pipeta Pasteur. O intuito da adição de NaOH 1 M foi verificar uma maior extração dos compostos fenólicos por esta solução básica em comparação com a água ultrapura. Após, a fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo de ensaio, de onde então, foi submetida à passagem pelo cartucho.

O cartucho de extração foi primeiramente condicionado antes da adição das amostras. Para o condicionamento do cartucho foi adicionado 4 mL de metanol sob vácuo em frasco kitassato e após lavado com 20 mL de água ultrapura. Após o condicionamento do cartucho, as amostras foram percoladas em frações seqüenciais de 1 mL por vez, e após secar o cartucho, os analitos foram eluídos com 5 mL de diclorometano (DCM) e posteriormente com 5 mL de clorofórmio. O extrato obtido foi transferido para um béquer com auxílio de DCM para solubilização. Após a evaporação dos solventes a amostra foi submetida à análise cromatográfica. O procedimento de extração e a análise cromatográfica dos extratos foram realizados em duplicata.

### 3.2.2.7.3 Análise Cromatográfica dos Extratos

A caracterização dos compostos dos extratos foi realizada empregando a Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente conforme descrito por Cataluña e colaboradores (2013). As análises foram realizadas em um sistema GC×GC/TOFMS, usando um sistema Pegasus-IV (LECO, St. Joseph, USA) equipado com modulador criogênico com quatro jatos (*quadjet*), resfriado por nitrogênio e amostrador automático CTC-Combi Pal. As colunas empregadas na primeira e segunda dimensão foram, respectivamente: coluna DB5 (5% fenil; 95% dimetilpolisiloxano) com 60 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno (ID) e 0,25 µm de espessura de filme, e uma coluna DB-17 ms (50% fenil – 50% dimetilpolisiloxano) com 2,15 m, de comprimento, com 180 µm de DI, e 0,18 µm de espessura de filme (Agilent Technologies, J&W Scientific, Agilent, Folsom, CA, USA). A fase móvel foi o gás Hélio sob fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup> e o volume de injeção da amostra foi de 1 µL. A temperatura do injetor foi de 300°C, e as amostras foram injetadas no modo splitless. A programação de temperatura da primeira coluna iniciou em 40°C por 1 min até alcançar a temperatura final de 300°C, com taxa de aquecimento de 3°C min<sup>-1</sup>. Após a análise cromatográfica, os dados foram processados usando o software ChromaTOF versão 3.32, (LECO Corporation).

### 3.2.3 Resultados e Discussão

As diferentes concentrações de bio-óleo foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana e os resultados de concentração inibitória e biocida mínima (CIM/CBM) encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM) da mistura (bio-óleo+B10) para os inóculos testados.

	1 dia		2 dias		5 dias		7 dias		10 dias	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Paecilomyces variotii</i>	2%	>10%	2%	5%	3%	4%	4%	4%	4%	4%
<i>Candida silvicola</i>	2%	6%	2%	5%	2%	4%	4%	4%	4%	4%
<i>Bacillus pumilus</i>	1%	>10%	1%	>10%	1%	3,3%	1%	3,3%	1%	3,3%
Inóculo não-caracterizado	0,25%	0,5%	0,25%	0,5%	0,25%	0,5%	0,25%	0,5%	0,25%	0,5%

Observa-se que após 10 dias de experimento com o fungo filamentososo *Paecilomyces variotii*, a concentração inibitória mínima passou de 2% para 4%, a qual foi visivelmente inibitória também para o fungo leveduriforme *Candida silvicola* (Figura 25 e 26). Sendo que a concentração biocida mínima no 10º dia foi de 4% para ambos.

Na figura 25 pode-se observar que há a formação de biomassa na interface fase oleosa-fase aquosa, característico do desenvolvimento de fungo filamentosos, devido ao conjunto de hifas (estruturas vegetativas do fungo). Bucker e colaboradores (2011) avaliaram o crescimento de *Paecilomyces* sp. que apresentaram crescimento utilizando as misturas de óleo diesel B (B5,B10 e B20) e o biodiesel na sua forma pura (B100). Cazarolli e colaboradores (2013) também avaliaram a capacidade deteriorogênica deste micro-organismo na presença de biodiesel de soja.

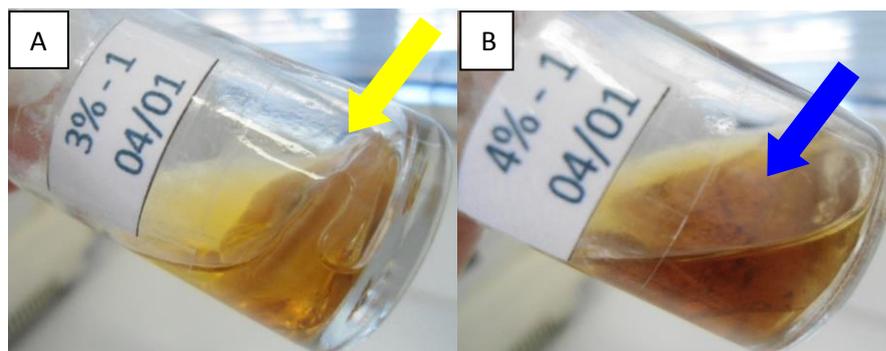


Figura 25 Aspecto dos frascos utilizados na avaliação com o crescimento do fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* nas concentrações de 3% (A) e 4% (B), respectivamente, após 10 dias. (Fonte: Foto de Sabrina Beker)

No frasco A (Figura 25), que corresponde à concentração de 3% de bio-óleo adicionado ao B10, há a formação de biomassa evidente (indicado pela seta amarela) na interface fase oleosa-fase aquosa, o que não foi observado no frasco B, correspondente à concentração de 4% (indicado pela seta azul). Tal fato indica que no meio contendo a mistura na concentração de 3%, o fungo tolerou a presença dos compostos do meio, desenvolvendo-se. A partir da concentração de 4%, seu crescimento foi inibido e também erradicado, conforme pôde ser verificado através da ausência de crescimento em placa contendo ágar malte, portanto, é possível indicar que para *P. variotii* a concentração inibitória e biocida mínima foram de 4% após 10 dias de ensaio.

*Candida* sp. tem sido freqüentemente citada a respeito de sua capacidade em degradar produtos derivados de óleo diesel, querosene, óleo lubrificante e biodiesel (Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2004; Miranda et al., 2007; Bucker et al., 2011), por essa razão a espécie *C. silvicola* foi testada neste experimento. A concentração inibitória mínima foi verificada através da turbidez do meio aquoso conforme pode ser visualizada na figura 26. Assim como para *P. variotii*, a CIM e CBM de *C. silvicola* foi de 4%.

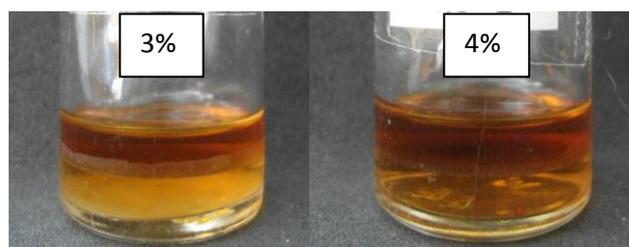


Figura 26 Frascos experimentais contendo inoculo do fungo leveduriforme *Candida silvicola* nas concentrações de 3% e 4%, respectivamente. (Fonte: Foto de Sabrina Beker)

O bio-óleo utilizado no presente estudo foi obtido por reação de pirólise a partir de biomassa: óleo de soja, serragem de eucalipto e borra de café (Cataluña et al., 2013). Através de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente, os autores identificaram a presença de diversos grupos químicos, tais como: cetonas, alcoóis, éteres, fenóis, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e compostos nitrogenados, sendo que os compostos majoritários são as cetonas e os compostos nitrogenados. A condução da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE) da fase aquosa em contato com o bio-óleo, teve o intuito de investigar quais compostos presentes no mesmo solubilizam-se na água e podem apresentar a característica antimicrobiana ao produto. O crescimento microbiano visível ocorre na interface da fase oleosa-fase aquosa. Neste sentido, é importante investigar qual o composto químico que pode estar presente na fase aquosa, devido à solubilização e que apresente características de inibição do crescimento dos micro-organismos. Pode-se observar, através da análise da tabela 15 que o extrato obtido pela SPE feita com água ultrapura, apresentou em sua composição uma mistura complexa de compostos, entre eles ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis, furanonas, hidrocarbonetos, mistos, nitrogenados e piranonas. No total foram

278 picos (Figura 27) tentativamente identificados com base na biblioteca de espectros de massas do equipamento. Com relação à quantidade de picos, as cetonas apresentaram 56 picos, seguido de nitrocompostos com 48 picos.

Tabela 15 Distribuição dos compostos majoritários, número de picos e suas áreas encontrados no extrato realizado com água ultrapura.

Classes	Picos	%	Área	%
ACIDO	10	3,5971	6620848,00	1,34
ALCOOL	13	4,6763	12827520,00	2,61
ALDEIDO	2	0,7194	4474939,00	0,91
CETONA	<b>56</b>	<b>20,144</b>	63344928,00	12,87
ESTER	3	1,0791	1799802,00	0,37
FENOL	30	10,791	<b>193043004,00</b>	<b>39,21</b>
FURANONA	26	9,3525	39703371,00	8,06
HIDROCARBONETO	37	13,309	59732528,00	12,13
MISTOS	5	1,7986	1565172,00	0,32
NITRO	48	17,266	33908024,00	6,89
NITROGENADO	38	13,669	62826025,00	12,76
PIRANONA	10	3,5971	12508467,00	2,54
<b>TOTAL</b>	<b>278</b>	<b>100</b>	<b>492354628,00</b>	<b>100,00</b>

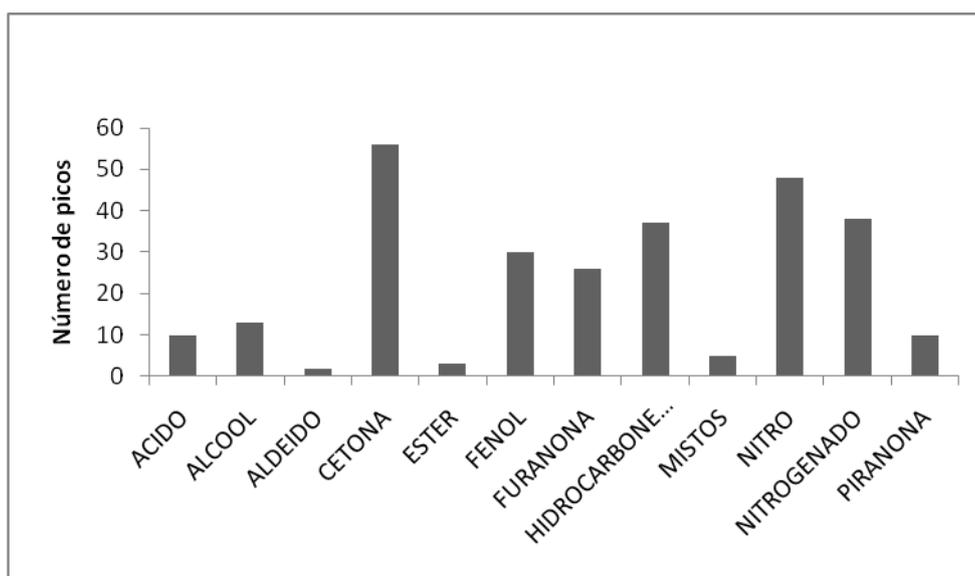


Figura 27 Distribuição do total de picos por classe da SPE com água.

Usando-se o percentual de área dos picos encontrados como uma medida semi-quantitativa da composição química da amostra, pôde-se traçar o gráfico da figura 28 com a soma das áreas relativas de cada classe de compostos identificadas no extrato. A classe de compostos majoritários foi a de fenóis com 39,21%, seguida de cetonas com 12,87%.

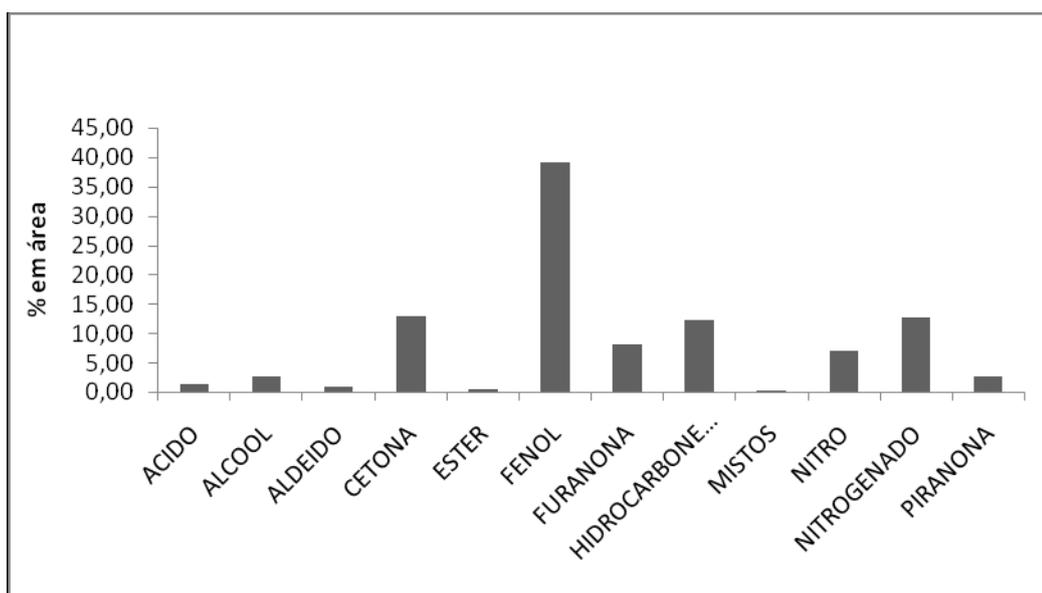


Figura 28 Distribuição das classes dos compostos presentes no extrato realizado por SPE com água ultrapura do bio-óleo.

Além da água ultrapura, foi utilizada também uma solução de o NaOH 1 M na Extração por Fase Sólida. Os resultados quanto ao número de compostos e as medidas semi-quantitativas da composição da amostra são mostrados na tabela 16.

É possível observar através destes resultados que o número total de compostos tentativamente identificados foi de 178 (Figura 29), ou seja, 100 compostos a menos do que a extração realizada por água ultrapura. Comparando-se estes resultados, verificou-se que o emprego da água

ultrapura foi mais eficiente do que a solução de NaOH no que se refere à maior quantidade de compostos extraídos para todas as classes.

Tabela 16 Distribuição dos compostos majoritários, número de picos e suas áreas encontrados no extrato realizado com NaOH 1M.

Classes	Picos	%	Área	%
ACIDO	5	2,81	1633764	0,92
ALCOOL	2	1,12	1880171	1,06
ALDEIDO	2	1,12	652666	0,37
CETONA	33	18,54	14457536	8,15
ESTER	1	0,56	105788	0,06
FENOL	<b>72</b>	<b>40,45</b>	<b>139462067</b>	<b>78,63</b>
FURANONA	6	3,37	3713376,5	2,09
HIDROCARBONETO	24	13,48	3743613	2,11
MISTO	4	2,25	674889	0,38
NITRO	8	4,49	3026459	1,71
NITROGENADO	10	5,62	5856522	3,30
PIRANONA	11	6,18	2149587,3	1,21
<b>TOTAL</b>	<b>178</b>	<b>100,00</b>	<b>177356438,8</b>	<b>100,00</b>

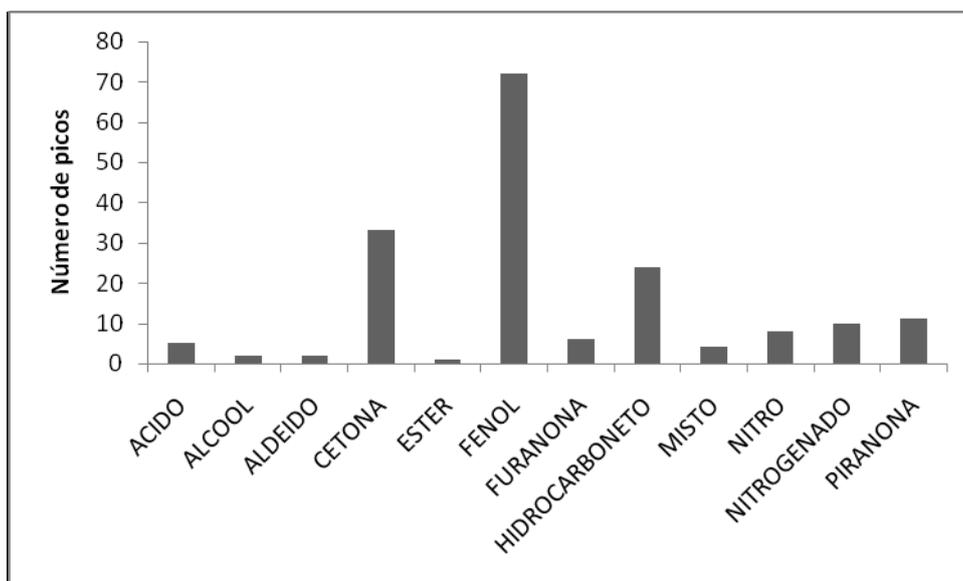


Figura 29 Distribuição do total de picos por classe da SPE com NaOH 1M.

No entanto, com relação à porcentagem de compostos fenólicos extraídos, a técnica de SPE realizada com NaOH mostrou uma maior eficiência na extração. Na figura 30 é possível observar que a na amostra havia 78,63% de compostos fenólicos, sendo que na SPE com água, este valor ficou em 39,21%, aproximadamente menos que o dobro de eficiência de extração.

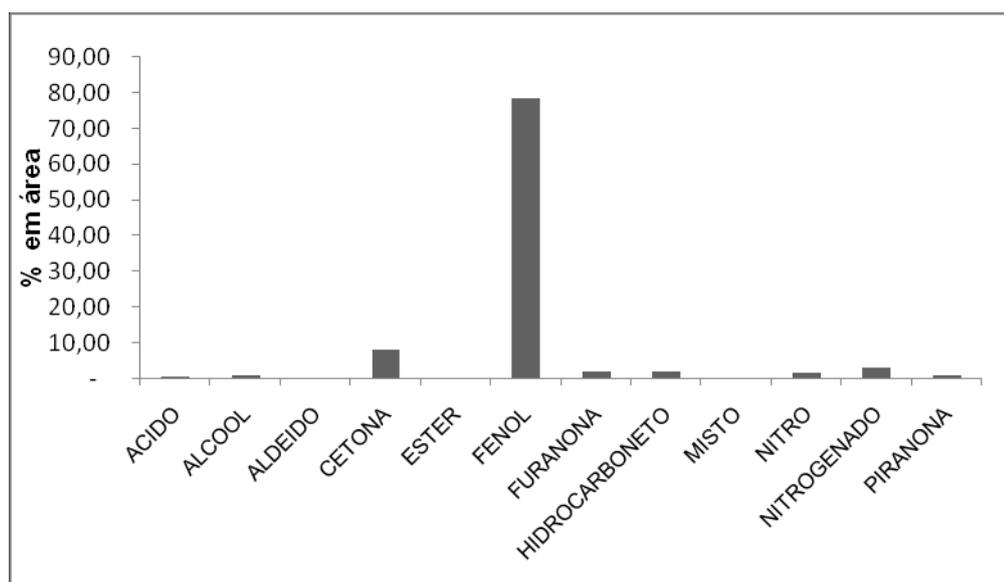


Figura 30 Distribuição das classes dos compostos presentes no extrato realizado por SPE com a solução de NaOH 1M do bio-óleo.

Portanto, os dados apresentados sugerem que a presença do fenol pode estar relacionada com a inibição do crescimento fúngico, uma vez que os compostos oxigenados, entre eles os compostos fenólicos, concentram-se na fase aquosa por afinidade, uma vez que são solúveis em água. Mohan e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade fungicida tanto de bio-óleo obtido por pirólise de serragem, bem como de suas frações ricas em lignina obtidas por extração com solvente acetato de etila, e observaram que o extrato, por conter mais compostos fenólicos em sua composição, teve um maior efeito fungicida sobre os fungos testados em comparação ao bio-óleo puro.

Diversos estudos apontam a eficiência de compostos fenólicos derivados da lignina como agentes antimicrobianos (Mourant et al., 2005; Mazela, 2006; Kim et al., 2012). Em várias investigações o bio-óleo tem sido testado como preservante alternativo de madeira (Suzuki et al., 1997; Meier et al., 2001; Mourant et al., 2007), uma vez que tem sido observada sua capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos deteriorogênicos.

Os grupos hidroxila (-OH) dos compostos fenólicos são descritos por causarem ação inibitória (Lai & Roy, 2004) uma vez que esses grupos podem interagir com a membrana celular e romper as estruturas da mesma causando o extravasamento de componentes intracelulares (Xu et al., 2013). Grupos ativos como os grupos hidroxila (-OH) promovem o deslocamento de elétrons na membrana agindo como trocadores de elétrons fazendo com que o gradiente de elétrons através da membrana fique reduzido. Este processo irá causar o colapso da força próton-motriz e a diminuição de ATP e acabará levando a célula à morte (Ultee et al., 2002). Similarmente, Farag e colaboradores(1989) haviam reportado que estes grupos hidroxila podem facilmente ligar-se ao sítio ativo de enzimas alterando o metabolismo celular dos micro-organismos. Os modos de ação citados ilustram a importância dos compostos fenólicos e seus grupos hidroxila (-OH) na atividade antimicrobiana. Na tabela 17 estão demonstrados os compostos fenólicos tentativamente identificados no extrato realizado com água ultrapura e na tabela 18 os compostos do extrato obtido com NaOH 1M.

Tabela 17 Relação dos compostos fenólicos do extrato obtido com água ultrapura classificados com nome, fórmula e área.

<b>Nome do composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Área(%)</b>
<b>Phenol</b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O</b>	<b>36,7982</b>
<b>Phenol, 2-methyl-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O</b>	<b>14,52415</b>
<b>cis-1,2-Cyclohexanediol</b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>0,267209</b>
<b>Phenol, 4-methyl-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O</b>	<b>20,21919</b>
<b>Phenol, 2-methyl-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O</b>	<b>0,067001</b>
<b>Phenol, 4-methyl-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O</b>	<b>0,919698</b>
<b>Phenol, 2-methoxy-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>3,191435</b>
<b>1,4-Benzenediol, 2-methoxy-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>0,114691</b>
<b>Phenol, 2,6-dimethyl-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O</b>	<b>0,974324</b>
<b>Phenol, 4-ethyl-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O</b>	<b>1,922713</b>
<b>Phenol, 2,4-dimethyl-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O</b>	<b>7,087835</b>
<b>Phenol, 3-ethyl-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O</b>	<b>4,629101</b>
<b>3-Pyridinol, 2,6-dimethyl-</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO</b>	<b>1,421224</b>
<b>Phenol, 2,3-dimethyl-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O</b>	<b>1,110641</b>
<b>Phenol, 2-ethyl-6-methyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,313358</b>
<b>Phenol, 3,4-dimethyl-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O</b>	<b>1,796895</b>
<b>Phenol, 2,4,6-trimethyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,179306</b>
<b>Phenol, 2-ethyl-6-methyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,637135</b>
<b>Phenol, 4-ethyl-3-methyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,519879</b>
<b>Phenol, 2-ethyl-6-methyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,160679</b>
<b>Phenol, 4-propyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,428766</b>
<b>Phenol, 2-ethyl-6-methyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,376365</b>
<b>Phenol, 4-(ethylamino)-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO</b>	<b>0,382204</b>
<b>Phenol, 2,3,6-trimethyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,329555</b>
<b>Phenol, 2,3,6-trimethyl-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,165614</b>
<b>Phenol, 3-(1-methylethyl)-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O</b>	<b>0,281689</b>
<b>Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>0,61315</b>
<b>Phenol, 2,6-dimethoxy-</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>0,400126</b>
<b>1,2,3-Benzenetriol</b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>0,071384</b>
<b>Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-</b>	<b>C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O</b>	<b>0,096482</b>

Trinta compostos fenólicos foram tentativamente identificados no extrato obtido pela SPE com água ultrapura, enquanto que na amostra da SPE com NaOH 1M foram 71 compostos (Tabela 18). Portanto, com base nestes dados, foi possível identificar tentativamente aproximadamente 40 compostos a mais no extrato obtido pelo procedimento com NaOH.

Tabela 18 Relação dos compostos fenólicos do extrato obtido por NaOH classificados com nome, fórmula e área.

<b>Nome do composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Área (%)</b>
Phenol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	3,08
Phenol, 2-methyl-	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	5,06
cis-1,2-Cyclohexanediol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,05
Phenol, 3-methyl-	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	24,10
Phenol, 4-methyl-	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	0,88
Phenol, 2-methoxy-	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,11
Phenol, 3-methyl-	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	0,11
Phenol, 2,6-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	0,49
Phenol, 2-ethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	3,62
Phenol, 2,3-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	8,08
Phenol, 3,4-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	0,06
Phenol, 4-ethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	10,47
Phenol, 3,4-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	0,03
Phenol, 2,3-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	2,59
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,66
Phenol, 3,4-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	3,84
Phenol, 2-(1-methylethyl)-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,23
Phenol, 2,4,6-trimethyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,74
Phenol, 4-ethenyl-, acetate	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	0,06
4-Methoxyphenol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,02
Phenol, 2-propyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	1,50
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	3,08
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	1,13
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	5,97
Phenol, 4-propyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	2,69
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	2,67
2-Methylenecyclohexanol	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	0,11
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,43
2-Methylenecyclohexanol	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	0,21
2-Allylphenol	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	0,03
Phenol, 3,4,5-trimethyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	1,96
Phenol, 2,3,6-trimethyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,60
Phenol, 2-ethyl-6-methyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	1,14
Phenol, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1,17
Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1,11
2-Isopropyl-5-methylphenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,08
Phenol, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,06
1-methoxy-2-propan-2-ylbenzene	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,54
3-Methyl-4-isopropylphenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,03
Phenol, 2,3,6-trimethyl-	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,54
2-Methyl-6-propylphenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,42
2,5-Diethylphenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1,39
Phenol, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,16

<b>2-Methyl-6-propylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,24
<b>Phenol, 3,4,5-trimethyl-</b>	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	0,22
<b>Phenol, 2-butyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,74
<b>Phenol, 3,5-diethyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,45
<b>2-Methyl-6-propylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,49
<b>3-Methyl-4-isopropylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,27
<b>2-Methyl-6-propylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,19
<b>5-Indanol</b>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	0,58
<b>Phenol, 2-(1-methylpropyl)-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,56
<b>Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,72
<b>Phenol, 2-ethyl-4,5-dimethyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,30
<b>1-methyl-1-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,38
<b>Phenol, 2-butyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,42
<b>2-Allyl-4-methylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,30
<b>Phenol, 3,5-diethyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,30
<b>Phenol, 2,3,4,6-tetramethyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,15
<b>Phenol, 2-methoxy-4-propyl-</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	0,04
<b>2-Allyl-4-methylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,18
<b>2-Isopropyl-5-methylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,13
<b>1-methyl-1-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,29
<b>6-Methyl-4-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,36
<b>Phenol, 4-(1,1-dimethylpropyl)-</b>	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	0,05
<b>2,5-Diethylphenol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,03
<b>Benzene, (1-methoxy-4-methyl-3-pentenyl)-</b>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O	0,04
<b>6-Methyl-4-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,45
<b>6-Methyl-4-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,29
<b>6-Methyl-4-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,19
<b>6-Methyl-4-indanol</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	0,17
<b>Phenol, 4-pentyl-</b>	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	0,18

Oliveira e colaboradores (2007) estudaram extratos fenólicos quanto à sua atividade antifúngica sobre o *Aspergillus flavus*, sendo que foi observado que o fungo filamentosos teve seu desenvolvimento inibido devido à ação dos extratos. Além de fungos filamentosos, os leveduriformes também foram inibidos em pesquisa conduzida por Kim e colaboradores (2008) fazendo uso de timol, um óleo essencial fenólico encontrado no orégano. O mesmo composto foi testado em *Saccharomyces cerevisiae*, o qual teve sua concentração mínima inibitória com 128 µg.mL<sup>-1</sup> de timol (Bi et al., 2010).

Em nossa avaliação, a bactéria deteriorogênica *Bacillus pumilus* após 10 dias de incubação apresentou CIM de 1% (Figura 31) e CBM de 3,3% (Tabela 14). As espécies do gênero *Bacillus* caracterizam-se por serem gram-positivas, formadoras de endósporos e aeróbias estritas ou facultativas (Harvey, R; Champe, P & Fischer, B., 2008). As espécies esporuladas são conhecidas como mais resistentes que as não esporuladas. A presença de esporos garante a bactéria, uma forma de resistência, pois parte de seu genoma está armazenado em um local seguro (o endósporo). Em condições desfavoráveis, a forma vegetativa (célula) pode morrer e liberar o endósporo. O endósporo somente irá germinar quando condições ambientais estiverem adequadas permitindo que ocorra a germinação e a formação das novas células.

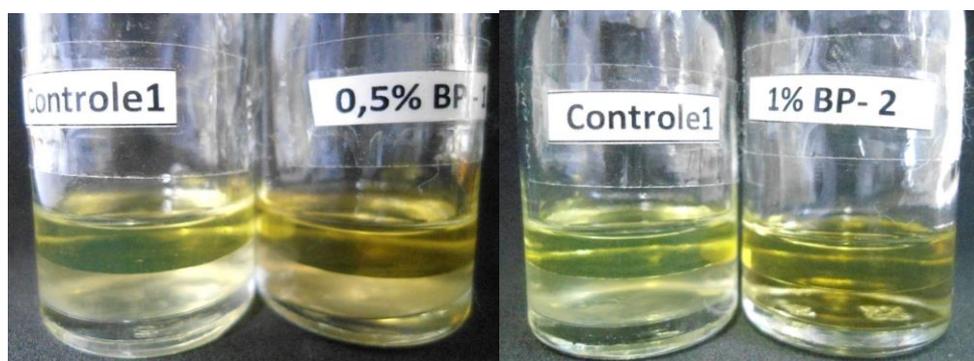


Figura 31 Frascos experimentais contendo inóculo de *Bacillus pumilus* nas concentrações de 0,5% e 1%, respectivamente, e seu controle. (Fonte: Foto de Sabrina Beker)

Em comparação aos valores de CIM dos fungos, a bactéria *B. pumillus* demandou um menor valor de bio-óleo, apresentando-se mais suscetível à presença dos fenóis. Possivelmente, este fato deve-se à sua constituição celular. O revestimento celular das bactérias gram-positivas é composto por uma densa camada de peptidoglicano contendo ácidos teicóicos e lipoteicóicos, proteínas associadas à essa camada e membrana citoplasmática,

enquanto que os fungos apresentam parede celular e membrana celular fúngica fundamentalmente diferente das de bactérias e outros eucariotos. Ambas estruturas (membrana e parede celular) são vitais para a célula, e sua ruptura pode levar à morte celular (Harvey, R; Champe, P & Fischer, B., 2008).

A diferença entre os revestimentos celulares dos diferentes micro-organismos pode ter influenciado nos valores encontrados referente a CIM e CBM. Os compostos fenólicos, conhecidos por desestabilizarem a membrana citoplasmática dos micro-organismos (Chapman, 2003), podem ter atingido mais eficazmente a membrana da bactéria do que dos fungos avaliados no presente ensaio, evidenciando dessa maneira um menor valor de CIM e CBM do bio-óleo.

Os endósporos presentes nas bactérias gram-positivas caracterizam-se por apresentarem diversas camadas de revestimento rígidas e altamente resistentes à diversos métodos físicos e químicos de eliminação, inclusive aos compostos fenólicos. Os endósporos são, na maioria das vezes, eliminados por um alto tempo de exposição a alta temperatura e pressão. No presente estudo, observa-se que a bactéria *B. pumillus* não apresentou resistência aos fenóis, tendo sua CIM em 0,5% e CBM em 1%, relativamente baixa em comparação aos fungos. Provavelmente, as bactérias não se encontravam em sua forma esporulada.

Walsch e colaboradores (2003) pesquisaram a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação de dois produtos fenólicos e observaram o extravasamento dos constituintes celulares pela membrana de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ou seja, tanto a gram-negativa

quanto a gram-positiva foram afetadas pela ação dos produtos fenólicos. Dong e colaboradores (2011) também observaram a inibição de bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *Listeria monocytogenes*) quando utilizaram extrato fenólico obtido de bio-óleo produzido por resíduo de palha de milho (rica em lignina), no entanto, nos ensaios utilizando *E.coli* O157:H7 e *Salmonella enteritidis*, ambas gram-negativas, não foi observada ação antimicrobiana por parte do extrato fenólico.

Para o inóculo não caracterizado a CIM foi de 0,25% (Figura 32) e CBM de 0,5% (Tabela 14). Estes resultados foram menores do que os obtidos pelos grupos de micro-organismos avaliados isoladamente.



Figura 32 Aspecto do frascos experimentais contendo inóculo não caracterizado nas concentrações de 0,1% e 0,25%, respectivamente, e seus controles. (Fonte: Foto de Sabrina Beker).

O uso de um inóculo não caracterizado tem sido recomendado na Norma ASTM E1259-10 para avaliações de antimicrobianos para uso em combustíveis. O inóculo não caracterizado é prospectado de tanques contaminados por micro-organismos e pressupõem que a população microbiana é deteriogênica. Considerando que não foi realizado um levantamento de quais espécies efetivamente estavam presentes, os

resultados indicam que componentes do bio-óleo na concentração de 0,25% foram efetivos em inibir a população microbiana. Estes resultados sugerem que a comunidade microbiana utilizada nesta avaliação foi mais sensível aos componentes do bio-óleo (Bücker et al., 2011; Zimmer et al., 2013).

Sugere-se que devido a esse conjunto de fatores os valores referente a CIM e CBM do inóculo não caracterizado tenham sido menores que os valores obtidos pelos micro-organismos isolados. O resultado final dos valores de CIM e CBM dos ensaios dos micro-organismos isolados e do inóculo não caracterizado, pode ser visualizado na figura 33.

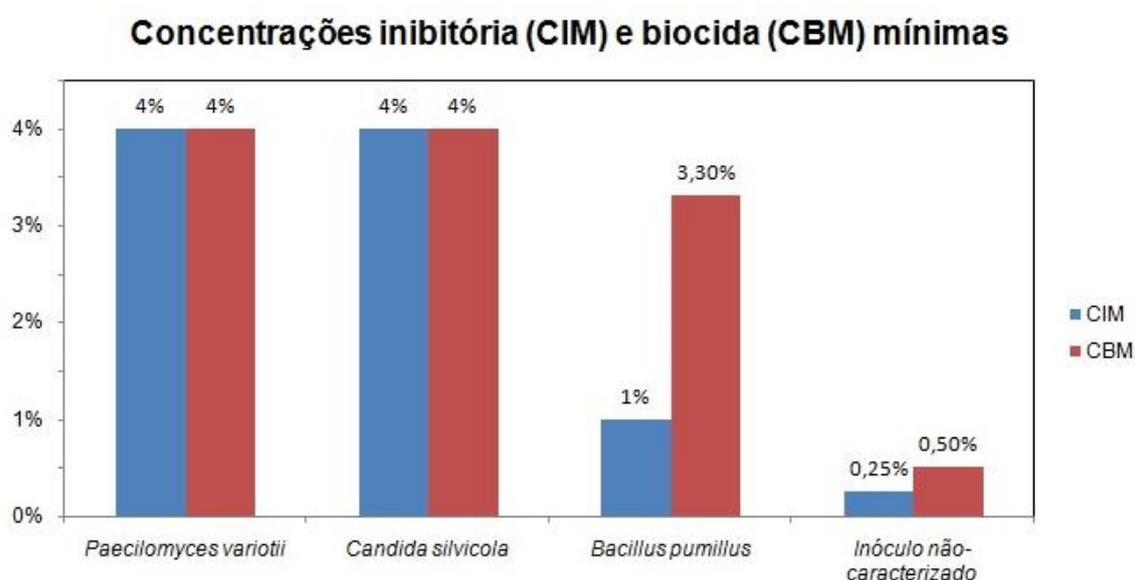


Figura 33 Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM) do bio-óleo frente aos micro-organismos deteriorogênicos de óleo diesel B10 e inóculo não caracterizado

### 3.2.4 Conclusões

O bio-óleo apresentou atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados. Quando adicionado à mistura B10, o bio-óleo apresentou Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração biocida mínima (CBM)

de 4% para os fungos *Paecilomyces variotii* e *Candida silvicola*. Para a bactéria *Bacillus pumillus* a CIM foi de 1% e a CBM de 3,3%. Para o inóculo não caracterizado (Norma ASTM E1259-10) a CIM foi de 0,25% e a CBM de 0,50%.

Os extratos obtidos pelos dois procedimentos, tanto com água ultrapura quanto por solução de hidróxido de sódio (NaOH), apresentaram semelhança entre si, sendo que a classe de compostos majoritários foi a de fenóis seguida de cetonas em ambos extratos. No entanto, a extração realizada com água ultrapura apresentou maior diversidade de compostos extraídos com 278 compostos, enquanto que NaOH apresentou 178 compostos.

#### 4 Considerações Gerais

Considerando o primeiro capítulo desta dissertação, a avaliação preliminar da concentração inibitória e biocida mínima em meio de cultura permitiu verificar que o antioxidante butil-hidroxi-tolueno (BHT) não apresentou atividade antimicrobiana até 1000 ppm, entretanto, o antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ) apresentou ação inibitória de 250 ppm para *Bacillus pumilus*, 500 ppm para *Pseudallescheria boydii* e 1000 ppm para *Candida silvicola* e *Paecilomyces variotii*. O TBHQ apresentou ação biocida em 500 ppm para *B. pumilus* e *P. boydii*, e 1000 ppm para *C. silvicola*.

Em escala laboratorial, o TBHQ não apresentou atividade antimicrobiana. Porém, não pôde ser estabelecida uma relação linear entre a concentração do antioxidante e os valores de biomassa obtidos, assim como não pôde ser detectada influência de TBHQ nas alterações genotípicas das comunidades bacterianas e fúngicas.

A estabilidade oxidativa foi mantida dentro do período mínimo durante o ensaio, o que demonstrou a efetividade do TBHQ como antioxidante em todas as concentrações utilizadas. Entretanto, os valores de viscosidade cinemática, índice de acidez e teor de água da fase oleosa aumentaram ao longo de 45 dias, caracterizando o biodiesel como fora da especificação.

Com relação ao segundo capítulo da presente dissertação, pôde-se verificar que o bio-óleo apresentou atividade antimicrobiana na faixa de 0,25% a 4% e a análise cromatográfica dos compostos que conferiram a característica antimicrobiana ao bio-óleo apresentou um perfil majoritário de compostos fenólicos seguido de cetonas.

## 5 Referências

ABNT NBR 10441: 2007 – Produtos de Petróleo – Líquidos transparentes e opacos – Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica.

ABNT NBR 15764 - Biodiesel — Determinação do teor total de ésteres por cromatografia gasosa.

ABNT NBR 14448:2005 - Óleos lubrificantes e fluidos hidráulicos - Determinação do índice de acidez pelo método de titulação potenciométrica. Disponível em <<http://www.abntcatalogo.com.br/>>.

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.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Resolução ANP N° 14**, de 11 de maio de 2012 - DOU 18.5.2012. Regulamenta as especificações do biodiesel, contidas no Regulamento Técnico ANP n° 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.

AKTAS, D.F. Anaerobic metabolism of biodiesel and its impact on metal corrosion. **Energy Fuels**, 24:2924-2928, 2010.

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**, v. 90, p. 3480–3484, 2011.

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 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](http://www.astm.org).doi: 10.1520/D6304-07

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](http://www.astm.org). doi:10.1520/E1259-10.

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.

AMOURIC, A.; QUÉMÉNEUR, M.;GROSSI, V.; LIEBGOTT1, P. P.; AURIA, R.;CASALOT, L. Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber strain* SP2B, an hexane-degrading actinomycete The Society for Applied Microbiology, **Journal of Applied Microbiology**, França, v. 108, n. 6, p.1903–1916, 2010.

ANDREAS, W. Oleochemical esters—environmentally compatible raw materials for oils and lubricants from renewable resources. **Fett/Lipid**, v.101, n. 6, p. 192–198, 1999.

ARAÚJO S.V.; MURILO T. F.; LUNA, F. M. T.; ROLA JR, E. M.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTEJR, C. L. A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration. **Fuel Process Technol**, v. 90, n. 10, p. 1272–7, 2009.

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.

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.

AZAM, M.; WARIS, A.; NAHAR, N.M.. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass Bioenergy**. V. 29, p. 293–302, 2005.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL 2014 - Ano base 2013. Ministério de Minas e Energia/MME. Empresas de Pesquisas Energéticas - EPE.

BALAT, M. & BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**. V. 87, n. 6, p. 1815–35, 2010.

BARRETO, C.K.; OLIVERIRA, C.C.; SOUZA, P.A.Z.; RUBIM, J.C.. Evaluation of the stability during storage of a diesel-like fuel obtained by pyrolysis of soybean oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p 42-48, 2012.

BASHA, S.A.; GOPAL, K.R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renew Sustain Energy Rev**, v.13, p. 1628–1634, 2009.

BEDMUTHA , R.; BOOKERA , C. J.; FERRANTE, L.; BRIENS, C.; BERRUTI, F.; YEUNGA, K.K.C.; SCOTT, I.; CONN, K. Insecticidal and bactericidal

characteristics of the bio-oil from the fast pyrolysis of coffee grounds. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 90, p. 224–231, 2011.

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

BENTO, F.M.; ENGLERT, G.E.; GAYLARDE, C.C.; MULLER, I.L. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. **Materials and Corrosion**, v. 55, p. 577-585, 2004.

BENTO, F. M. et al. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 135–142 LA – English, 2005a.

BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, jun. 2005b.

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>

BERRIOS , M., MARTÍN , M.A. , CHICA, A.F., MARTÍN , A. Storage effect in the quality of different methyl esters and blends with diesel. **Fuel**. V. 91, p. 119–125, 2012.

BI, X.; GUO, N.; JIN, J.; LIU, J.; FENG, H.; SHI, J.; XIANG, H.; WU, X.; DONG, J.; HU, H.; YAN, S.; YU, C.; WANG, X.; DENG, X.; E YU, L. . The global gene expression profile of the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 712–722, 2010.

BOCZAR, B. A.; FORNEY, L. J.; BEGLEY, W. M.; LARSON, R. J.; FEDERLE, T. W. Characterization and Distribution of Esterase Activity in Activated Sludge. **Water Research**, USA, v. 35, n. 17, p. 4208–4216, 2001.

BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; VERONESE, S. & SALA, M. Storage stability of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 699-702, 1995.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **Microbiology reviews**, Alemanha, v. 26, n. 17, p. 73 – 81, 2002.

BORSATO, D.; MAIA, E.C.R.; DALL'ANTONIA, L.H.; SILVA, H.C.; PEREIRA, J.L. Cinética da oxidação de biodiesel de óleo de soja em mistura com TBHQ: Determinação do tempo de estocagem. **Química Nova**, v.35, n. 4, p. 733-737, 2012.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v. 86, p. 2596–2602, 2007.

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](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm)>.

BRASIL, ANP, Resolução ANP Nº14, de 11.5.2012. Diário oficial da União, 18 de maio de 2012.

BROXTON, P., WOODCOCK, P.M., GILBERT, P. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* 8739. **Journal of Applied Microbiology**, v. 54, p. 345–353, 1983.

BÜCKER, F. et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 172–178, 2011.

BÜCKER, F., et al., Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.030> (In Press).

BUSHNELL, C. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 654-674, 1941.

CATALUÑA, R; KUAMOTO, P; PETZHOLD, C.; CARAMAO, E.; MACHADO, M. E. ; SILVA, R. Using Bio-oil Produced by Biomass Pyrolysis as Diesel Fuel. **Energy & Fuels**, v. 27, p. 6831–6838, 2013.

CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do Biodiesel e misturas – Abrangência, limitações dos métodos de avaliação e alternativas futuras. **Biodieselbr**, Curitiba, 71-73, 2009.

CAVALCANTI, E. Estabilidade ao armazenamento de biodiesel metílico de soja & misturas / Projeto Rede ARMAZBIODI. Seminário ANP, Rio de Janeiro, julho de 2010.

CAZAROLLI, J.C., et al., Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*, **International Biodeterioration & Biodegradation** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.025>

CHAO, Y. N. LIU, T.; ZHANG. H. & CHEN, S. Isolation and Characterization of Bacteria from Engine Sludge Generated from Biodiesel-Diesel Blends. **Fuel**, v. 89, n. 11, p. 3358-3364, 2010.

CHAPMAN, J.S., DIEHL, M.A. Methylchlorisothiazolone-induced growth inhibition and lethality in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 134–141, 1995.

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

CHAWNER, J.A., GILBERT, P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 253–258, 1989.

CHESNEAU, H.L. The silent fuel killers (Stability and Microbiologicals). INTERNATIONAL JOINT POWER GENERATION CONFERENCE. **Proceedings**. Miami Beach. 2000.

CHUM, H.L.; OVEREND, R.P. Biomass and renewable fuels. **Fuel Process. Technol**, v. 71, p. 187–195, 2001.

CLAPP P.A.; DAVIES, M. J.; FRENCH, M. S.; GILBERT, B. C. The bactericidal action of peroxides: an EPR spintrapping study. **Free Radic Res**, 21(3): 147–167, 1994.

COLLIER, P.J., RAMSEY, A.J., AUSTIN, P., GILBERT, P. Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 569–577, 1990.

CORSEUIL, H. X.; MONIER, A. L.; GOMES, A, P, N.; CHIARANDA, H. S.; ROSARIO, M.; ALVAREZ, P. J. J. Biodegradation of Soybean and Castor Oil Biodiesel: Implications on the Natural Attenuation of Monoaromatic Hydrocarbons in Groundwater. **Groundwater Monitoring & Remediation**, V. 31, n. 3, p. 111–118, 2011.

CZERNIK, S.; BRIDGWATER, A. V. Overview of application of biomass fast pyrolysis oil. **Energy & Fuels**, V. 18, p. 590-598, 2004.

DANTAS, M. B. ; ALBUQUERQUE, A. R. ; SOLEDADE, L. E. B. ; QUEIROZ, N.; MAIA, A. S. ; SANTOS, I. M. G. ; SOUZA, A. L. ; CAVALCANTI, E. H. S.; BARRO, A. K. ; SOUZA, A. G. . Biodiesel from soybean oil, castor oil and their blends: Oxidative Stability by PDSC and rancimat. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 26, p. 1-5, 2011.

DAS, L. M.; KUMAR, B. D.; SUBHALAXMI, P.; NALAYA, K. & NAIK, S. N. Long-term storage stability of biodiesel produced from Karanja oil. **Fuel**, v. 88 n. 11, p. 2315–2318, 2009.

DAVIDSON, P. M. Phenolic compounds. In A. L. Branen, & P. M. Davidson (Eds.), **Antimicrobial in foods** (p. 37-73). New York: Marcel Dekker, 1983.

DAVID LEE NELSON, A. L. L. Lehninger. Principios de Bioquímica. **Barcelona, Omega**, v. 3a edición, p. 120, 625, 632, 823, 2001.

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**, v. 54, p. 894-904, 2007.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 1, p. 14–34, jan. 2009.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in energy and Combustion Science**, v. 31(5-6), p. 466-487, 2005.

DOMINGOS, A. K. *et al.* The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (Biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.18, n.2, p.416-423, 2007.

DONG, X., DONG, M., LU, Y., TURLEY, A., JIN, T., WUA, C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p.1629– 1634, 2011.

DORADO, M.P.; REDEL-MACÍAS, M.D.; PINZI, S.; LEIVA-CANDIA, D.E.; CUBERO-ATIENZA, A.J. Influence of fatty acid unsaturation degree over exhaust and noise emissions through biodiesel combustion. **Fuel**, v. 109, p 248-255, 2013.

DU PLESSIS, L.M; DE VILLIERS, J.B.M; VAN DER WALT, W. H.; J. M. **Oil Chemists. Soc**, v. 62, n. 4, p. 748, 1985.

DUKAN, S. & TOUATI, D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. **J Bacteriol**, v. 176, p. 6145–6150, 1996.

DUKAN, S., BELKIN, S., TOUATI, D. Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, p. 311–316, 1999.

DUNN, R.O. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). **Fuel Processing Technology**, Pennsylvania, v.86, n.10, p.1071–1085, 2005.

DUNN, R.O. Antioxidants for improving storage stability os biodiesel. **Biofuels**, v. 83, p 304-318, 2008.

EKLUND, T. The efect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 73–76, 1985.

EN 14112: 2003 – Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME): Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test).

FARAG, R. S., DAW, Z. Y., HEWEDI, F. M., & EL-BAROTY, G. S. A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v.52, p. 665–667, 1989.

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**, v, 30, p. 356-370, 2014.

FERNANDES, D. M.; MONTES, R. H. O.; ALMEIDA, E. S.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V.; RICHTER, E. M. Storage stability and corrosive character of stabilized biodiesel exposed to carbon and galvanized steels. **Fuel**, v. 14, p. 107-609, 2013.

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**,v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

**FOOD INGREDIENTS BRASIL**, 2009. Nº 6, disponível em: <http://www.revista-fi.com>

FREIRE, L. M. S. **Propriedades térmica, oxidativa e fluidodinâmica de biodiesels obtidos a partir de misturas quartenárias de óleos vegetais**. 2012, 150 f. Tese de Doutorado em Química Orgânica na Universidade Federal da Paraíba/UFPB, João Pessoa.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 01–10, 1999.

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.

GERPEN, J. H. V. et al. Determining the influence of contaminants on biodiesel properties . **SP - Society of Automotive Engineers**, New York, n.1274, p.173-190, 1997.

GILBERT, P., BEVERIDGE, E.G., CRONE, P.B. The lethal action of 2-phenoxyethanol and its analogues upon *Escherichia coli* NCTC 5933. **Microbios**, v. 19, p. 125–141, 1977.

GOMES, A. P. N. **Biodegradação de biodiesel soja, mamoma e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos**. Florianópolis: UFSC, 2008, 102p. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M.; RÚA, J.; ARRIAGA, D.; VALLE, P.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. **Food Control**, v. 30, p. 393-399, 2013.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. 2ª edição. Tradução: Augusto Schrank, Marilene H. Vainstein – Porto Alegre: Artmed, 2008.

HAUS, F., G.A. JUNTER, AND J. GERMAN. Viscosity properties of mineral paraffinic base oils as a key factor in their primary biodegradability. **Biodegradation**, v. 11, n. 6, p. 365–369, 2000.

HE, B.B., THOMPSON, J.C., ROUTT, D.W., VAN GERPEN, J.H. Moisture absorption in biodiesel and its petro-diesel blends. **Appl. Eng. Agric**, V. 23, p. 71–76, 2007

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 11<sup>th</sup> International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, October, 2009.

HOEKMAN, S. K.; ROBBINS, C. Review of the effects of biodiesel on NOx emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 96, p. 237-249, 2012.

JAEGER, K; DIJKSTRA, B.W; REETZ, M. T. Bacterial biocatalists: Molecular biology, three dimension structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAIN , S., SHARMA, M.P. Stability of biodiesel and its blends: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 667–678, 2010.

JAKERIA, M. R.; FAZAL, M. A.; HASEEB, A. S. M. A. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, n. 0, p. 154–163, fev. 2014.

KARAVALAKIS, G.; HILARI,D.; GIVALOU,L.; KARONIS, D. & STOURNAS, S. Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants. **Energy**, v. 36, p. 369-374, 2011.

KAWASAKI, K. & YAMANE, K., Experimental Study of a Dual-Fuel Diesel Engine with Biodiesel and Low-Calorie Gas Fuels. **SAE Technical Paper**, v. 01, p. 2026, 2007.

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.

KHOURY, R. R. et al. Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. **Fuel**, v. 90, n. 8, p. 2677–2683, ago. 2011.

KIM, J., CAMPBELL, B., MAHONEY, N., CHAN, K., MOLYNEUX, R. AND MAY, G. Chemosensitization prevents tolerance of *Aspergillus fumigatus* to antimycotic drugs. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 372, p. 266–271, 2008.

KIM, K. H.; JEONG, H. S.; KIM, J. Y.; HAN, G. S.; CHOI, I. G.; CHOI, J. W. Evaluation of the antifungal effects of bio-oil prepared with lignocellulosic biomass using fast pyrolysis technology. *Chemosphere*, v. 89, p. 688–693, 2012.

KIMURA, T. N. H. Intracellular generation of superoxide by copper sulfate in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 389, p. 237–242, 1997.

KIVEVELE T.T.; MBARAWA, M. M.; BERECZKY, A.; LAZA, T.; MADARASZ, J. Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of biodiesel produced from roton *Megalocarpus* oil. **Fuel Process Technol**, v. 92, p. 1244–8, 2011.

KLINKSPON, N. Impact of Biodeterioration on Diesel Fuel Systems. In: IASH 2009- 11<sup>th</sup> **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czeth Republic, October, 2009.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel**. Traduzido do original “The Biodiesel Handbook” por Luiz Pereira Ramos, São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, Pennsylvania, v. 88, n. 7, p. 669–677, 2007.

KNOTHE G. Designer biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy Fuel**, v. 22, p. 1358–1364, 2008.

LAI, P. K.; ROY, J. Antimicrobial and chemo-preventive properties of herbs and spices. **Curr. Med. Chem**, v. 11, p. 1451–1460, 2004.

LAPUERTA, M.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J.; OLIVA, F.; CANOIRA, L. Biodiesel from Low-Grade Animal Fats: Diesel Engine Performance and Emissions. **Energy & Fuels**, V.23, p. 121-129, 2009.

LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J.; RAMOS, Á.; ÁLVAREZ, B. Effect of the test temperature and anti-oxidant addition on the oxidation stability of commercial biodiesel fuels. *Fuel*, v. 93, p. 391-396, 2012.

LEE, J. S.; RAY, R. I.; LITTLE, B. J. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. **Biofouling**, v. 26, n. 6, p. 623–635, 12 jul. 2010.

LEUNG, D.Y.C.; KOO, B. C. P.; GUO Y. Degradation of Biodiesel under Different Storage Conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 250-256, 2006.

LIANG, Y.C. et al. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, Nottingham, v.85, n.5-6, p.867-870, 2006.

LIN, C.Y, CHIU, C.C. Effects of oxidation during long term storage on the fuel properties of palm-oil based biodiesel. **Energy Fuel** , v. 23, p. 3285–3289, 2009.

LINGBECK , J. M; CORDERO, P.; O'BRYAN, C. A.; JOHNSON, M. G.; RICKE, S. C; CRANDALL, P. G. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Science**, v. 97, p. 197–206, 2014.

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

LÓPEZ-MALO VIGIL, A., PALOU, E., & ALZAMORA, S. M. Naturally occurring compounds. Plant sources. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), **Antimicrobials in food** (3rd ed.) (pp. 429e452). Boca Ratón: CRC Press, Taylor and Francis Group. 2005

LUQUE, R., HERRERO-DAVILA, L., CAMPELO, J.M., CLARK, J.H., HIDALGO, J.M., LUNA, D., MARINAS, J.M., ROMERO, A.A. Biofuels: a technological perspective. **Energy Environ. Sci.**, v. 1, p. 542–564, 2008.

LUTZ, J.; CHAVARRA, M.; ARIAS, M.L . & MATA-SEGREDA, J.F. Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. **Revista de biologia tropical**, v. 54, n. 1, p. 59–63, 2006.

MACIEL, G. P. S. Estudo da fração aquosa proveniente da pirólise da palha da cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado** no Programa de Pós-Graduação em Química Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. 106 f. 2011.

MAILLARD, J. Y. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern?. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. S2, p. 60–72, 2007.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; CONTIERO, J.; ANGELIS, D.F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal Biotechnology**, São Paulo, v. 7, n. 9, p.1323-1328, 2008.

MAZELA, B. Fungicidal value of wood tar from pyrolysis of treated wood. **Waste Management**, v. 27, p. 461–465, 2006.

MCCORMICK, R.L. The impact of biodiesel on pollutant emissions and public health. **Inhalation Toxicology**, v. 19, n. 12, p. 1033-1039, 2007.

MCCORNICK, R.L.; WESTBROOK, S.R. Storage Stability and Biodiesel Blends. **Energy Fuels**, v. 24, p. 690-698, 2010.

MCDONNELL, G. & RUSSELL, A. D. Antiseptic and disinfectants: activity, action and resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MEIER, D.; ANDERSON, B.; IRBE, I.; CHIRKOVA, J.; FAIX, O. Preliminary study on fungicide and sorption effects of fast pyrolysis liquids used as a wood preservative. **Prog. Thermochem. Biomass Convers.**, v. 2, p. 1550–1563, 2001.

MINKOVA, V.; MARINOV, S.P.; ZANZI, R. ; BJORNBOM, E.; BUDINOVA, T.; STEFANOVA, M.; LAKOV, L. Thermochemical treatment of biomass in a flow of steam or in a mixture of steam and carbon dioxide. **Fuel Process. Technol.**, v. 62, p. 45–52, 2000.

MIRANDA, R.C. et al. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco –Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 50, n. 1, p.147-152, 2007.

MOHAN, D., SHI, J., NICHOLAS, D.D., PITTMAN JR., C.U., STEELE, P.H., COOPER, J.E. Fungicidal values of bio-oils and their lignin-rich fractions obtained from wood/bark fast pyrolysis. **Chemosphere**, v. 71, p. 456–465. 2008.

MORENTE, E. O.; FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A.; GRANDE BURGOS, M. J.; ABRIOUEL, H. ; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 13–25, 2013.

MOURANT, D.; YANG, X. D.-Q.; ET AL. Anti-fungal properties of the pyrolygneous liquor from the pyrolysis of softwood bark. **Wood Fiber Sci.**, v. 73, p. 542–548, 2005.

MUDGE, S.M., PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & Technology Bulletin**, New York, v. 5, n. 5-6, p. 353–355, 1999.

OKUTUCU, C.; DUMANA, G.; UCAR, S.; YASAC , I.; YANIKA, J. Production of fungicidal oil and activated carbon from pistachio shell. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 91, p. 140–146, 2011.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alim. Nutr.**, Araraquara ISSN 0103-4235 v.18, n.3, p. 267-275, jul./set. 2007.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERREIRA, I. C. F. R; FERRERES, F.; BENTO, AL.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1018–1025, 2007.

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**, v. 36, n. 5, p. S1-S6, 2013.

OMACHI, I.H; RODRIGUES, L. G; STOLF, M. CANNAVAL, R.; SOBREIRO, R. Produção de biomassa florestal para exportação: o caso da amcel. **Biomassa & Energia**, v. 1, n. 1, p.29-36, 2004.

OVREAS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, 1 set. 1997.

OZÇIMEN, D.; ERSOY-MERİÇBOYU, A. **Renew. Energy**. V. 35, p. 1319-1324, 2010.

PASSMAN, F. J. Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, Manual 47. **ASTM International**, WestConshohocken, 2003, 114 p.

PASSMANN, F.; DOBRANICK, J.K. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9., 2005. **Proceeding**. Espanha, Setembro, p.18-22, 2005.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, n. 0, p. 88–104, jul. 2013.

PEREIRA, J. A.; PEREIRA, A. P. G.; FERREIRA, I. C. F. R., VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R.; et al. Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 8425–8431, 2006.

POLLARD, A.S.; ROVER, M.R.; BROWN, R.C. Characterization of bio-oil recovered as stage fractions with unique chemical and physical properties. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 93, p. 129–138, 2012.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1190-1195, 2005.

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

PULLEN, J. & SAEED, K. Experimental study of the factors affecting the oxidation stability of biodiesel FAME fuels. **Fuel Processing Technology**, v. 125, p. 223–235, 2014.

PUUPPONEN-PIMIAË, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KAËHKOËNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494±507, 2001.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 755. , 2006.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M. ET AL. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing avonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3±12, 2000.

RESTREPO-FLÓREZ, J.-M. et al. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 456–463, 2013.

RODRIGUES, W.C., 2014. DivEs - **Diversidade de Espécies v3.0** - Guia do Usuário. Entomologistas do Brasil. 30p. Disponível em: <<http://www.dives.ebras.bio.br>>.

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**, v. 22, n. 10, p. 1595–1601, 2010.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. **Journal Hosp Infect**, v. 104, p. 57:97, 2004.

SANTOS, N. A.; DAMASCENO, S. S.; DE ARAÚJO, P. H. M.; MARQUES, V. N.; ROSENHAIM, R.; FERNANDES, V. J.; et al. Caffeic acid: an efficient antioxidant for soybean biodiesel contaminated with metals. **Energy Fuels**, v. 25, p. 4190–4, 2011.

SCHLEICHER, T., WERKMEISTER, R., RUSS, W. & MEYER PITTROFF, R. Microbiological stability of biodiesel - diesel mixtures. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 724-730, 2009.

SCHULTZ, L. C. Avaliação de micro-organismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel Porto Alegre: UFRGS, 2010, 137p. **Dissertação de Mestrado** – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SHAHID, E.M., JAMAL, Y. A review of biodiesel as vehicular fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 2484–2494, 2008.

SIEGERT, W. Microbial Contamination in Diesel Fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009- **11<sup>th</sup> International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Prague, Czech Republic, 18-22, 2009.

SILVA, G. S., MARQUES, E.L.S., DIAS, J. C.T., LOBO, I. P., ET AL. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 27–35, 2012.

SILVA, E. S. ; CONCEICAO, M. M. ; CAVALCANTI, E. H. S. ; FERNANDES JR, V. J. ; MEDEIROS, A. C. D. ; Antonio G Souza . Analysis of thermal and oxidative stability of biodiesel from *Jatropha curcas* L. and beef tallow. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** (Dordrecht Online), v. 1, p. 1, 2012.

SILVA, T. R. et al. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, n. 0, p. 57–70, jul. 2013.

SLAWSON, R.M., LEE, H., TREVORS, J.T. Bacterial interactions with silver. **Biology of Metals**, v. 3, p. 151–154. 1990.

SORENSEN ,G.; PEDERSEN, D.V.; NORGAARD,A.K.; SORENSEN, K.B. & NYGAARD,S.D. Microbial growth in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5259-5264, 2011.

SUBRAMANIAM , D.; MURUGESAN , A.; AVINASH , A.; KUMARAVEL , A. Bio-diesel production and its engine characteristics — An expatiate view. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, p. 361–370, 2013.

SUGIURA, K.; ISHIHARA, M.; SHIMAUCHI, T.; HARAYAMA, S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 1, p. 45–51, 1996.

SUZUKI, T.; DOI, S.; YAMAKAWA, M.; YAMAMOTO, K.; WATANABE, T.; FUNAKI, M. Recovery of wood preservatives from wood pyrolysis tar by solvent extraction. **Holzforschung**,v. 51, p. 214–218, 1997.

THURMAN, R.B.; GERBA, C.P. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. **CRC Critical Reviews in Environmental Control**, v. 18, p. 295–315, 1989.

TORMIN, T.; CUNHA, R.; RICHTER, E.; MUNOZ, R. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. *Talanta*, v. 99, n. 15, p. 527–531, 2012.

ULTEE , A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1561–1568, 2002.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. v. 104, n. August, p. 927–936, 2000.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Canadá, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VIEIRA, T. M. *et al.* Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Artigos técnico-científico**. Brasília: Estação Gráfica, v.1. p. 218-22, 2006.

WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y.; RUSSELL, A. D., ET AL. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. **J Hosp Infect**, v. 55, p.98-107, 2003.

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.**, v. 34, p. 933–939, 2000.

WHITE, J.; GILBERT, J.; HILL, G.; HILL, E.; HUSE, S.M.; WEIGHTMAN, A. J. & MAHENTHIRALINGAM, E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4527-4538, 2011.

XIN J.; IMAHARA, H.; SAKA, S. Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidant. **Fuel**, v. 6, p. 88:282, 2009.

XU, J.; JIANG, J.; SUN, Y.; LU, Y. **Biomass Bioenergy**, v. 32, p. 1056-1061, 2008.

XUE, J.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified with whey protein isolate-maltodextrin conjugate: the enhanced emulsifying capacity and anti-listerial properties in milk by propylene glycol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** . v. 61, n. 51, p. 12720–12726, 2013.

YANG, Z.; HOLLEBONE, B.; WANG, Z.; YANG, C.; LANDRIAULT, M. Effect o storage period on the dominant weathering processes of biodiesel and its blends with diesel in ambient conditions. **Fuel**, v. 104, p. 342-350, 2013.

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

ZHANG, X.; PETERSON C.; REECE, D.; HAWS, R.; MÖLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 41, n. 5, p. 1423-1430, 1998.

ZHU, X., ZHANG, H., & LO, R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus L.*) and their antimicrobial activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 7272-7278, 2004.

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

## 6 Apêndices

A. Laudo do óleo diesel S50 fornecido pela Ipiranga Distribuidora de Petróleo



Número: 0743-12 T

CÓPIA

### CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A S50		Código: 65P		
Local de Amostragem: TQ 373506 Data/ hora Amostragem: 02/10/12 11:40 Data/ hora Recebimento: 02/10/12 12:00		Laboratório: Transpetro/Lab Rio Grande Endereço: 2ª Secção Barra S/N Pier Petroleiro Rio Grande - RS CEP 96204-020 Telefone:(53)3234-3200 Fax: (53)3234-4215		
Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
COR	VIS 000	INAM <sup>(1)</sup>	INAM	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max	L1,0	N/A
10% RECUPERADOS	D 86	Anotar	206,8	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 310,0	264,1	grau C
90% RECUPERADOS	D 86	360 max	339,6	grau C
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	820 a 850	837,1	kg/m3
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 5,0	2,740	mm2/s
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max	0,000	% volume
AGUA (KARL FISCHER)	D 6304	Anotar	223	mg/kg
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	69,0	grau C
ENXOFRE TOTAL	D 2622	50 max	6,940	mg/kg
CONDUTIVIDADE ELETRICA	D 2624	25 min <sup>(2)</sup>	148	pS/m
<b>Notas:</b> - Todos os limites especificados sao valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29. (1) Usualmente de Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada. (2) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento do combustivel pelo produtor e distribuidor. Para o distribuidor, o controle e o atendimento ao limite especificado serão compulsório a partir de 01.01.2010. Nota de Segurança: Manusear o produto com as devidas normas aplicáveis de segurança. - Reamostragem Análise de Enxofre realizada na REFAP (ASTM D2622) Condutividade Elétrica (ASTM D2624), pS/m @ 25,0 oC = 148,0. Ensaio realizado para atendimento ao ofício 344/2011/SBQ/RJ-ANP de 28/11/2011. Tipo de Amostragem: AMOSTRA CORRIDA Tipo de Operação: Reamostragem				



Data de Emissão: 02/10/2012 16:58:35	Página: 1 de 1	Original Assinado Por:
Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada. Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.		Responsável: Raquel Madruga Mesquita CRQ: 05407218

B. Laudo do biodiesel fornecido pela Granol Indústria Comércio e Exportação S/A

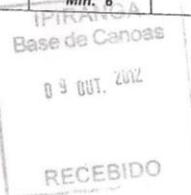
	<b>CERTIFICADO DA QUALIDADE</b> Nº 049.12 – 22/09/12	
<b>FC-BIO-2C</b>		
Cadastrado na ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Cadastro: 017      Processo ANP: 46800.001798/2009-11.		

Identificação do Produtor		Granol Indústria Comércio e Exportação S/A			
Produto		Éster Metílico de Óleo Misto * (Biodiesel -B100) *78% Óleo de Soja - 20% Sebo Bovino – 2% Gordura Sulna			
Produzido	28/08/12	Analisado	21/09/2012		
Número do Lote		GC-12-CS-049			
Lote estocado no tanque		205-2-014			
Quantidade de produto no tanque		2.184.835 L			
Numeração dos lacres do tanque		2084482/9751139/5317735/8640028			
Numeração dos lacres das amostras testemunho		1973301/1973341			
Característica	Unidade	Método de Ensaio	Resultado	ANP 04/2012 Limites	Laboratório
Aspecto a 25°C	-	VISUAL	LII*	LII	Granol Cachoeira do Sul
Massa Específica a 20°	kg/m³	NBR 7148	879	850 - 900	Granol Cachoeira do Sul
Viscosidade Cinemática a 40° C	mm²/s	NBR 10441	4,8	3,0 – 6,0	Granol Cachoeira do Sul
Teor de água	mg/kg	EN ISO 12937	256	Máx. 380	Granol Anápolis
Contaminação Total	mg/kg	EN 12662	9	Máx. 24	Granol Cachoeira do Sul
Ponto de fulgor	°C	ASTM D93	152	Mín. 100	Granol Cachoeira do Sul
Teor de éster	% massa	EN 14103	97,9	Mín. 96,5	Granol Cachoeira do Sul
Resíduo de Carbono	% massa	ASTM D4530	0,01	Máx. 0,05	Granol Anápolis
Cinzas Sulfatadas	% massa	NBR 6294	< 0,01	Máx. 0,02	Granol Cachoeira do Sul
Enxofre Total	mg/kg	ASTM D 5453	3,6	Máx. 10	Granol Anápolis
Sódio e Potássio	mg/kg	NBR 15553	3,5	Máx. 5	Granol Anápolis
Cálcio e Magnésio	mg/kg	NBR 15553	2,1	Máx. 5	Granol Anápolis
Fósforo	mg/kg	NBR 15553	< 0,01	Máx. 10	Granol Anápolis
Corrosividade ao Cobre, 3 h a 50° C	-	NBR 14359	1	Máx. 1	Granol Anápolis
Ponto de entupimento de filtro a frio	°C	NBR 14747	+ 1	*	Granol Cachoeira do Sul
Índice de acidez	mg KOH/g	NBR 14448	0,40	Máx. 0,50	Granol Cachoeira do Sul
Glicerol livre	% massa	EN 14105	< 0,01	Máx. 0,02	Granol Cachoeira do Sul
Glicerol total	% massa	EN 14105	0,18	Máx. 0,25	Granol Cachoeira do Sul
Monoacilglicerol	% massa	EN 14105	0,64	Máx. 0,80	Granol Cachoeira do Sul
Diacilglicerol	% massa	EN 14105	0,04	Máx. 0,20	Granol Cachoeira do Sul
Triacilglicerol	% massa	EN 14105	0,04	Máx. 0,20	Granol Cachoeira do Sul
Metanol	% massa	EN 14110	0,05	Máx. 0,20	Granol Cachoeira do Sul
Índice de Iodo	g/100g	EN 14111	111,32	Anotar	Granol Cachoeira do Sul
Estabilidade à oxidação a 110° C	h	EN 14112	9,2	Mín. 6	Granol Cachoeira do Sul

LII = Límpido e Isento de Impurezas.

\* Limites conforme tabela II do Regulamento Técnico ANP N° 4/2012.

Ana Beatriz Machado Costa  
CRQ 07100659 – V Região  
Bacharel Química Ambiental



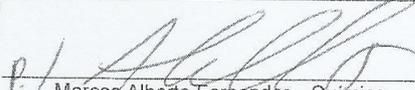
Estrada volta do Charqueada, S/N – Cachoeira do Sul /RS

Fone (051) 3722 - 6550

### C. Laudo Biodiesel sem antioxidante

	<b>Laboratório de Combustíveis</b> Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Sul		
	Emitido em: 22/05/2014	<b>Relatório de Ensaio</b>	
<b>Dados do Solicitante</b>			
Produto: BODIESEL			
Solicitante: PROFA. CLARISSE PIATNICKI / SABRINA BEKER			
Endereço: UFRGS -- IQ			
<b>Dados da Amostra</b>			
Código de Recebimento: 020/2014A		Data de Recebimento no Laboratório: 30/04/14	
Descrição da amostra: biodiesel puro sem antioxidante.		Código da Amostra do Solicitante: B1	
Quantidade de amostra: aproximadamente 100 mL		Amostra entregue por: Sabrina Anderson Beker	
Data de Realização dos Ensaios: 05 à 20/05/14.			
CARACTERÍSTICA	UNIDADE	RESULTADO MÉDIO	MÉTODO
Aspecto	--	Límpido e isento de impurezas	PP 01.2.037
Massa específica	kg/m <sup>3</sup>	881,4	ABNT NBR 14065
Teor de água	mg/kg	261	ASTM D 6304
Estabilidade a Oxidação	h	3,6 <sup>1</sup>	EN 14112
Índice de acidez	mg KOH/g	0,49	ABNT NBR 14448
Índice de Iodo	g/100g	129	EN 14111
Ponto de Fulgor	°C	142,0	ABNT NBR 14598
Viscosidade Cinemática	mm <sup>2</sup> /s	4,088	ABNT NBR 10441
Sódio + Potássio,	mg/kg	< LQ <sup>2</sup>	ABNT NBR 15556
Cálcio + Magnésio	mg/kg	0,36 <sup>3</sup>	ABNT NBR 15556
Teor de Enxofre	mg/kg	0,9	ASTM D 5453
Metanol	% massa	0,06	EN 14110
Ponto de Entupimento a Frio	°C	-6,0	ABNT NBR 14747
Os resultados são restritos ao material entregue ao LABCOM. Não nos responsabilizamos, portanto, pelos procedimentos de coleta da amostra, assim como por sua procedência. Salvo autorização específica do LABCOM, é proibido qualquer tipo de cópia ou divulgação deste documento.			
Observações:			
1 - média dos dois resultados não atendeu a repetibilidade do método: medidas 3,4 e 3,7 h;			
2 - O valor encontrado para os elementos sódio e potássio são menores que o limite de quantificação do laboratório (Na: 0,02 mg/kg e K: 0,03 mg/kg).			
3 - O valor encontrado para o elemento magnésio é menor que o limite de quantificação do laboratório (0,06 mg/kg).			
 Marcos Alberto Fernandes - Químico CRQ 05201347		 Alexandre Flores Helgueira - Químico CRQ 05201242	
Visto: 			
Prof. Dr. Dimitrios Samios Coordenador do LABCOM / CECOM - IQ / UFRGS			
Laboratório de Combustíveis – Instituto de Química – UFRGS Av. Bento Gonçalves, 9500, Setor 6, Prédio 105, Bairro Agronomia – Porto Alegre - RS e-mail: <a href="mailto:lcomb@iq.ufrgs.br">lcomb@iq.ufrgs.br</a> Fone (51) 3308-9880 / 9916 5564. Fax (51) 3308-9892			
			Código: FR 01.3.110 Revisão: 03

D. Laudo biodiesel com antioxidante

	<b>Laboratório de Combustíveis</b> Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Sul		
	Emitido em: 22/05/2014	<b>Relatório de Ensaio</b>	
<b>Dados do Solicitante</b>			
<b>Produto:</b> BODIESEL			
<b>Solicitante:</b> PROFA. CLARISSE PIATNICKI / SABRINA BEKER			
<b>Endereço:</b> UFRGS – IQ			
<b>Dados da Amostra</b>			
<b>Código de Recebimento:</b> 020/2014A		<b>Data de Recebimento no Laboratório:</b> 30/04/14	
<b>Descrição da amostra:</b> biodiesel puro com antioxidante(TBHQ) adicionado na usina.		<b>Código da Amostra do Solicitante:</b> B2	
<b>Quantidade de amostra:</b> aproximadamente 100 mL		<b>Amostra entregue por:</b> Sabrina Anderson Beker	
<b>Data de Realização dos Ensaios:</b> 05 à 20/05/14.			
<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>RESULTADO MÉDIO</b>	<b>MÉTODO</b>
Aspecto	--	Limpido e isento de impurezas	PP 01.2.037
Massa específica	kg/m <sup>3</sup>	881,4	ABNT NBR 14065
Teor de água	mg/kg	819	ASTM D 6304
Estabilidade a Oxidação	h	5,4	EN 14112
Índice de acidez	mg KOH/g	0,47	ABNT NBR 14448
Índice de Iodo	g/100g	132	EN 14111
Ponto de Fulgor	°C	151,0	ABNT NBR 15764
Viscosidade Cinemática	mm <sup>2</sup> /s	4.095	ABNT NBR 10441
Sódio + Potássio,	mg/kg	< LQ <sup>1</sup>	ABNT NBR 15556
Cálcio + Magnésio	mg/kg	0,37 <sup>2</sup>	ABNT NBR 15556
Teor de Enxofre	mg/kg	0,8	ASTM D 5453
Metanol	% massa	0,05	EN 14110
Ponto de Entupimento a Frio	°C	-6,0	ABNT NBR 14747
<p>Os resultados são restritos ao material entregue ao LABCOM. Não nos responsabilizamos, portanto, pelos procedimentos de coleta da amostra, assim como por sua procedência.</p> <p>Salvo autorização específica do LABCOM, é proibido qualquer tipo de cópia ou divulgação deste documento.</p>			
Observações:			
1 - O valor encontrado para os elementos sódio e potássio são menores que o limite de quantificação do laboratório (Na: 0,02 mg/kg e K:0,08 mg/kg).			
2 - O valor encontrado para o elemento magnésio é menor que o limite de quantificação do laboratório (0,06 mg/kg).			
 Marcos Alberto Fernandes - Químico CRQ 05201347		 Alexsandro Flores Helgueira - Químico CRQ 05201242	
Visto:  Prof. Dr. Dimitrios Samios Coordenador do LABCOM / CECOM - IQ / UFRGS			
Laboratório de Combustíveis – Instituto de Química – UFRGS Av. Bento Gonçalves, 9500, Setor 6, Prédio 105, Bairro Agronomia – Porto Alegre - RS e-mail: <a href="mailto:lcomb@iq.ufrgs.br">lcomb@iq.ufrgs.br</a> Fone (51) 3308-9880 / 9916 5564, Fax (51) 3308-9892			
			Código: FR 01.3.110 Revisão: 03

## 7 Anexos

### 1. **Ágar malte**

- Extrato de malte: 30 g/L
- Peptona: 5 g/L
- Ágar: 15 g/L
- pH: 5,4

### 2. **Ágar Luria Bertani**

- Triptona: 10 g/L
- Extrato de levedura: 5 g/L
- NaCl: 10g/L
- Ágar: 15 g/L
- pH: 7,0

### 3. **Meio Luria Bertani**

- Triptona: 10 g/L
- Extrato de levedura: 5 g/L
- NaCl: 10 g/L
- pH: 7,0

### 4. **Caldo Malte**

- Extrato de malte: 30 g/L
- Peptona: 5 g/L
- pH: 5,4

### 5. **Meio Mineral Mínimo Bushnell-Haas (1941)**

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,2 g/L
- $\text{CaCl}_2$  : 0,02 g/L
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,0 g/L
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 1,0 g/L
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  : 1,0 g/L
- $\text{FeCl}_3$  : 0,05 g/L
- pH: 7,2

## 8 Vitta

### Dados pessoais

Nome: Sabrina Anderson Beker  
E-mail: [sabrinabeker@gmail.com](mailto:sabrinabeker@gmail.com)  
Data de nascimento: 10/05/1988

### Formação Acadêmica

**2012-2014:** Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

**2006-2011:** Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

### Experiência Profissional

**2012 - 2014: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre/RS**

Cargo: Bolsista de Mestrado Acadêmico pela CAPES.  
Principais atividades: Desenvolveu o projeto de Mestrado na área de Microbiologia Ambiental com foco na investigação de processos e aspectos químicos e microbiológicos da biodegradação de biocombustíveis sob condições simuladas em laboratório.

**2010 - 2011: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre/RS**

Cargo: Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial pelo CNPq.  
Principais atividades: Realização do trabalho de conclusão de curso sobre a biodegradabilidade da mistura diesel e biodiesel (B7) por bactérias isoladas de *landfarming*.

**2009 - 2010: Fundação PROAMB – Bento Gonçalves/RS**

Cargo: Estagiária de auxiliar administrativo.  
Principais atividades: Auxílio em atividades envolvendo a organização de feira internacional relacionada à novas tecnologias na área do meio ambiente (FIEMA BRASIL 2010).

**2007 – 2009: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Uva e Vinho – Bento Gonçalves/RS**

Cargo: Bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq.  
Principais atividades: Bolsista na área de Biologia Molecular Vegetal com foco em estudo molecular envolvendo a quebra de dormência em gemas de macieira.