



Universidade de Brasília - Instituto de Química - IQUNB

Laboratório de Materiais e Combustíveis – LMC

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica



**CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIESEL COMERCIAL NO
DISTRITO FEDERAL**

Tamyris Borges Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Ellen Tanus Rangel

Brasília - DF

2015

Universidade de Brasília - Instituto de Química - IQUNB
Laboratório de Materiais e Combustíveis – LMC
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica

**CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIESEL COMERCIAL NO
DISTRITO FEDERAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica no Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre.

Tamyris Borges Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Ellen Tanus Rangel

Brasília - DF

2015



COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Tamyris Borges Silva**, matrícula nº **13/0092142**, intitulada "**Contaminação Microbiológica de Diesel Comercial no Distrito Federal**", apresentada no (a) Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDT) da Universidade de Brasília (UnB) em 9 de julho de 2015.

Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Fábio Moreira da Silva
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues dos Santos
Membro Titular (UNIP)

Prof. Dr. Marcos Juliano Prauchner
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 9 de julho de 2015.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(Simone de Beauvoir)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da minha vida e por me proporcionar a emoção de estar vivendo esse momento.

Gostaria de agradecer ao meu filho Gabriel, por ser o maior motivo para que eu buscasse com total afinco o melhor resultado e por ser o melhor presente que pude ganhar durante esse período do mestrado.

Aos meus pais e irmãos, por nunca terem desistido de mim e me incentivado em todas as decisões da minha vida, rezando para que tudo desse certo, além de terem sido essenciais cuidando do Gabriel enquanto eu estudava.

À toda a minha família, por serem meus grandes incentivadores, principalmente pelos meus avós maternos que agora estão no céu e que se foram durante esse processo. Lembro-me das palavras de minha avó dizendo que meu caminho seria somente de flores e que eu merecia toda essa alegria da realização de um sonho.

Ao meu namorado Guilherme, por toda a paciência e por ter estado ao meu lado me dando força quando o desânimo batia, além de sempre estar me apoiando em todas as minhas decisões.

Aos meus amigos que antes mesmo de saberem da minha conquista, sempre torceram por mim e estiveram comigo nos melhores e piores momentos, orando por mim e me dando força.

Ao professor Paulo Suarez por toda a orientação, contribuição e auxílio no desenvolvimento deste trabalho e por me permitir fazer parte dessa equipe fantástica do Laboratório de Materiais e Combustíveis, onde conheci pessoas incríveis e ganhei grandes amigos.

À professora Ellen Tanus por ser mais que uma co-orientadora, por ser uma grande amiga e conselheira e por ter sido tão presente na elaboração deste trabalho.

Por fim, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Relação das substâncias avaliadas nos testes biocidas.....	30
Tabela 2: Relação das amostras coletadas nos postos de combustíveis do Distrito Federal.....	34
Tabela 3: Identificação microbiológica das amostras coletadas em postos de combustíveis.....	39
Tabela 4: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de EMAGHIM para cepas fúngicas.....	44
Tabela 5: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de EMAGHIM para cepas bacterianas.....	44
Tabela 6: CIM das blendas de EMAGHIM na análise de susceptibilidade fúngica.....	45
Tabela 7: CIM das blendas de EMAGHIM na análise de susceptibilidade bacteriana.....	46
Tabela 8: Resultados para os testes de perfuração em ágar dos produtos de aminólise/ abertura de EMAGE.....	47
Tabela 9: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de CuAc 380 °C com Diesel S10 para cepas fúngicas e bacterianas.....	48
Tabela 10: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de CuAc 380 °C com Diesel S500 para cepas fúngicas e bacterianas.....	49
Tabela 11: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de CuAc 380 °C com Diesel S1800 para cepas fúngicas e bacterianas.....	49
Tabela 12: Resultados do teste de perfuração em ágar da amostra de Biodiesel de <i>Sterculia Striata</i> para cepas fúngicas e bacterianas.....	51
Tabela 13: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de Biodiesel de Chichá amido para cepas fúngicas e bacterianas.....	52

Tabela 14: Resultados do teste de perfuração em ágar das amostras de Bio-óleo, Biocida, Craqueado e Resíduo para cepas fúngicas e bacterianas.....	54
Tabela 15: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas para cepas fúngicas.....	55
Tabela 16: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas para cepas bacterianas.....	55
Tabela 17: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas das amidas graxas para cepas fúngicas.....	57
Tabela 18: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas das amidas graxas para cepas bacterianas.....	57

Lista de Figuras

Figura 1: Aparência de um fundo de tanque de armazenamento com resíduo de contaminação.....	13
Figura 2: Esquema do processo realizado no teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	18
Figura 3: Frasco utilizado para coleta das amostras.....	23
Figura 4: Capela usada para a inoculação das amostras. A imagem mostra algumas placas já inoculadas e as amostras devidamente identificadas.....	25
Figura 5: Placas inoculadas e identificadas antes de serem armazenadas.....	25
Figura 6: Processo de realização do teste de perfuração em ágar.....	28
Figura 7: Distribuição da coleta das amostras por cidades do Distrito Federal.....	35
Figura 8: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 1: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	35
Figura 9: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 2: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	36
Figura 10: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 3: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	36
Figura 11: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 4: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	36
Figura 12: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 5: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	37
Figura 13: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 6: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	37
Figura 14: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 7: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	37
Figura 15: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 8: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	38

Figura 16: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 9: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.....	38
Figura 17: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 10: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud...	38
Figura 18: Fórmula estrutural do EMAGHIM.....	43
Figura 19: Fórmula estrutural do produto final da reação de aminólise/abertura realizada a temperatura ambiente por 24 h.....	46
Figura 20: Fórmula estrutural do produto final da reação de aminólise/abertura realizada a 120 °C por 4 h.....	46
Figura 21: Estrutura molecular do Biodiesel de <i>Sterculia Striata</i>	50
Figura 22: Estrutura molecular do Biodiesel de Chichá amidado.....	52
Figura 23: Fórmula estrutural utilizada na análise de atividade antimicrobiana.....	55
Figura 24: Obtenção de amidas graxas a partir da reação de aminólise de óleo de soja.....	56

Resumo

Os combustíveis são substâncias que possuem como característica principal reagir com o oxigênio ou outro comburente resultando na produção de calor, gases e chamas; sendo amplamente utilizados como forma de energia elétrica ou para movimentar carros, caminhões, maquinários industriais, dentre outros. Um grave problema encontrado nos combustíveis, principalmente naqueles obtidos a partir da biomassa é sua degradação. Em relação a esse problema, pode-se destacar fatores determinantes como: a degradação físico-química e a contaminação microbiológica, sendo que estas situações comprometem o rendimento dos motores e, conseqüentemente, o funcionamento de veículos e máquinas. O trabalho possui o objetivo de identificar os microrganismos encontrados em maior evidência em combustíveis comercializados nos postos do Distrito Federal e, também, propor soluções para tal contaminação através do uso de biocidas. Todas as amostras apresentaram crescimento de microrganismos, com predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*. Diante do problema de contaminação, principalmente pelas conseqüências causadas pela mesma, faz-se necessária a produção e utilização de biocidas e outros produtos que diminuam o crescimento microbiológico nos combustíveis sem alterar suas características. Substâncias nitrogenadas, bio-óleos, biodiesel a base de plantas, dentre outras moléculas demonstraram ser boas opções de aditivos para combater o problema de contaminação fúngica e bacteriana, sem alteração das propriedades físico-químicas dos combustíveis. Contudo, a solução mais adequada para essa realidade são os métodos de prevenção, a partir das boas práticas de manipulação, efetiva limpeza de tanques de armazenamento, descontaminação e drenagem constante da água de lastro.

Palavras-Chave: Biodiesel/ Diesel/ Identificação Microbiológica/ Biocidas.

Abstract

The fuels are substances that have main characteristics of reacting with oxygen or another oxidizing agent resulting in the production of heat, gases and flames; being widely used as a form of energy that can be, electricity or to move cars, trucks, industrial machinery, among others. A major problem encountered in fuels, especially those derived from biomass, is the degradation of these fuels. Highlighting factors regarding this issue can be determined as: the physiochemical degradation and microbiological contamination, being that these situations are the ones that end up compromising the efficiency of the motors and thus consequently, the operation of vehicles and machinery. The study aimed to identify the microorganisms most evident in fuels sold at gas stations in the Federal District and propose solutions to such contamination through the use of biocides. All samples showed growth of microorganisms, with predominance of the genus *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*. Because of all this problem of contamination, especially for the consequences caused by the same, it is necessary the production and use of biocides and other products that reduce microbiological growth in fuel without changing its characteristics. Nitrogenous substances, bio-oils, plant-based biodiesel, among other molecules proved to be good choices additives to combat the problem of fungal and bacterial contamination without altering the physical and chemical properties of fuels. However, still the best solution to this reality remains prevention methods, from the good practices of handling, effective cleaning of storage tanks, decontamination and constant drainage of ballast water.

Key Words: Biodiesel / Diesel / Microbial Identification / Biocides.

Lista de abreviaturas e siglas

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP = Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM = American Society for Testing and Materials
CIM = Concentração Inibitória Mínima
CMB = Concentração Mínima Biocida
DF = Distrito Federal
Diesel S10 = Diesel com teor de 10 ppm de enxofre
Diesel S500 = Diesel com teor de 500 ppm de enxofre
Diesel S1800 = Diesel com teor de 1800 ppm de enxofre
EMAGE = Éster metílico de ácido graxo epoxidado
EMAGHIM = Éster metílico de ácido graxo hidroiminometilado
GLP = Gás Liquefeito de Petróleo
GO = Goiás
NBR = Norma Brasileira
pH = Potencial Hidrogeniônico
PNPB = Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PPM = Partes por milhão
UV-Vis = Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Introdução.....	2
OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3. Revisão Bibliográfica.....	7
3.1. Histórico.....	7
3.2. Combustíveis.....	7
3.3. Diesel.....	9
3.4. Biodiesel.....	10
3.5. Modificações provocadas pela degradação dos combustíveis....	11
3.6. Degradação Físico-Química.....	11
3.7. Contaminação Microbiológica.....	12
3.8. Fatores que influenciam a contaminação.....	13
3.9. Desenvolvimento Microbiológico.....	15
3.10. Testes para a análise da contaminação microbiológica.....	16
3.11. Principais Consequências da Contaminação.....	18
3.12. Principais meios de controle para redução da contaminação.....	19
METODOLOGIA.....	22
4. Metodologia.....	23
4.1. Metodologia.....	23
4.1.1. Coleta do diesel comercial.....	23
4.1.2. Identificação da microbiota existente no diesel comercial.	24
4.1.3. Teste de cultivos em meio de cultura.....	24
4.1.4. Identificação microbiológica.....	26
4.2. Ensaio microbiológicos.....	26

4.2.1. Teste de perfuração em ágar.....	27
4.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM).....	28
4.2.3. Substâncias utilizadas nos testes biocidas.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5. Resultados e Discussão.....	34
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	59
6. Conclusões e Perspectivas.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
7. Referências.....	63

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

Os combustíveis são definidos como qualquer substância que apresenta capacidade de gerar energia e calor ao reagir com o oxigênio ou outro comburente. Eles são largamente utilizados para geração de energia elétrica e para movimentar carros, caminhões, aviões, ônibus, maquinários industriais, dentre outros.¹

Pode-se classificar os combustíveis em dois grandes grupos: os combustíveis fósseis, como aqueles que são derivados do petróleo, e os combustíveis renováveis, oriundos de matéria orgânica na tentativa de utilizar matéria-prima que é encontrada com maior facilidade e produzir menor impacto ambiental.²

Os combustíveis fósseis são advindos da decomposição de matéria orgânica e de substâncias minerais no decorrer de milhões de anos, tendo como exemplos a gasolina, o querosene, o diesel, o gás natural e o carvão mineral. Já o biodiesel, o biogás e o bioetanol são denominados biocombustíveis por serem obtidos a partir da biomassa, uma fonte renovável de energia. O biodiesel é definido de acordo com a ANP, como “combustível composto de ésteres alquílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa provenientes da reação de transesterificação ou esterificação de gorduras vegetais ou gorduras animais, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012”.^{2,3}

O óleo diesel, regulamentado de acordo com a ANP nº 3/ 2014, é um combustível derivado do petróleo, onde sua composição é basicamente constituída por hidrocarbonetos, sendo compostos principalmente por átomos de carbono e hidrogênio, além de baixas quantidades de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Tem como características ser um produto inflamável, volátil, razoavelmente tóxico, límpido, odor característico e livre de materiais em suspensão.⁴ O diesel é bastante usado como combustível em motores de combustão interna e ignição por compressão encontrados em automóveis, ônibus, caminhões, embarcações marítimas, geradores, dentre outros.⁵

Porém, um grande problema encontrado no diesel e também em outros combustíveis é a contaminação física, química ou microbiológica desse combustível. Existe a contaminação física e química, ocorre por partículas de

poeira, que são abrasivas, e água, além da contaminação devido à instabilidade química desse combustível, principalmente causada pela presença de compostos aromáticos, oleofínicos e diolefínicos que tendem a reagir com o oxigênio formando as gomas.^{4,6}

Outro grande vilão, que tem sido o foco de grandes discussões e de muitos trabalhos científicos na tentativa de reverter e solucionar esse problema, é baseado na contaminação microbiana. De fato, o crescimento de populações de fungos e bactérias no combustível pode acarretar em diversos problemas, tais como obstrução de filtros e mangueiras, a produção de biossurfactantes, a migração da biomassa microbiana para a fase oleosa, o escurecimento da água presente no fundo dos tanques, dentre outros que acabam comprometendo o rendimento dos motores e conseqüentemente no funcionamento dos veículos e máquinas.^{4,5,6}

Dessa forma, a proposta foi desenvolvida em quatro etapas: I- Avaliação dos microrganismos presentes no diesel comercializado nos postos de Brasília; II- Determinação da microbiota mais comum na contaminação do diesel comercial; III- Propor soluções através de substâncias com possível atividade biocida através de parceria com alunos do Laboratório de Materiais e Combustíveis.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Demonstrar os principais microrganismos encontrados na contaminação das blendas de diesel/biodiesel comercialmente vendidas; e propor soluções para a contaminação microbiológica através da adição de biocidas.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a microbiota de fungos e bactérias mais comuns no diesel B5 comercializado nos postos de Brasília/DF;
- Isolar e identificar os microrganismos mais comuns na contaminação do diesel B5 comercial;
- Avaliar através do teste de perfuração em ágar a atividade biocida (fungicida e bactericida) de diversas substâncias produzidas no Laboratório de Materiais e Combustíveis da UnB e por parceiros em várias concentrações com culturas padrões e culturas isoladas do diesel/biodiesel;
- Avaliar por meio do teste de microdiluição a atividade microbiana determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração biocida mínima (CBM) de diversas substâncias produzidas no Laboratório de Materiais e Combustíveis da UnB e por parceiros em várias concentrações;
- Propor soluções para contaminação microbiológica a partir do uso dos biocidas em questão.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Histórico

A demanda energética tem crescido rapidamente nos últimos tempos por conta do aumento populacional, mas principalmente pelo avanço tecnológico. Durante a Revolução Industrial, foi estabelecida a utilização do carvão mineral como fonte de energia iniciando, dessa forma, a época dos combustíveis fósseis.¹

Porém, o uso foi realizado de maneira tão desenfreada que foram diminuindo as reservas mundiais e com isso, o mercado mundial consagrou o petróleo como a principal fonte de energia, além de utilizá-lo nos mais diversificados ramos, até mesmo nas indústrias farmacêuticas. Nos séculos XX e XXI, dessa forma, vincularam ao petróleo um significativo desenvolvimento tecnológico e importantes mudanças no ramo industrial.⁸

Só que, com isso, veio a emissão de enormes quantidades de gases poluentes na atmosfera que provocam um aumento do efeito estufa, acarretando em preocupantes mudanças no clima de maneira mundial. Além disso, o petróleo é uma fonte esgotável com suas principais jazidas localizadas em zonas de instabilidade política, o que gera instabilidade também no seu preço.^{1,9}

Frente a todos esses pontos, faz-se necessária a busca por uma nova opção energética, onde as fontes renováveis e menos poluentes tornam-se destaques, surgindo, dessa forma, o biodiesel como uma boa alternativa.¹⁰ Deve-se destacar que o marco inicial da utilização de óleos vegetais para fins como combustíveis ocorreu no final do século XIX pelo próprio inventor Rudolf Diesel, usando inicialmente óleo de amendoim.⁷

3.2. Combustíveis

Os combustíveis fósseis são compostos orgânicos formados por um longo processo que dura milhões de anos, onde seus principais representantes são o carvão mineral, o gás natural, a gasolina, o gás liquefeito de petróleo (GLP), o querosene, o óleo diesel, dentre outros.^{1,2}

O carvão mineral obtido no Brasil apresenta uma alta concentração de enxofre e cinzas, onde sua maior utilização é concentrada nas usinas termoelétricas e nas fábricas de cimento, não sendo uma fonte energética largamente usada nas indústrias brasileiras.^{2,4,11}

Já o gás natural é composto por metano em maior quantidade, também com presença de propano e etano em menores teores, sendo um produto obtido em bacias produtoras de gás natural ou através da extração do petróleo que também libera o gás.^{2,4,11}

Os derivados do petróleo, que é composto basicamente por hidrocarbonetos, normalmente são obtidos por processos de destilação ou craqueamento, sendo esse último podendo ser térmico ou catalítico, onde a diferenciação dos produtos é realizada principalmente de acordo com o intervalo de destilação de cada componente.¹¹

A necessidade por combustíveis alternativos vem crescendo rapidamente nas últimas décadas. Além de ser uma fonte esgotável, os combustíveis de origem fóssil envolvem problemas ambientais, sociais e econômicos, sendo tema de grandes discussões mundiais.^{4,9}

Surgem, então, os biocombustíveis como uma alternativa viável, sendo uma fonte energética produzida a partir de biomassa, com algumas vantagens que se destacam frente aos combustíveis derivados do petróleo, como: não apresentarem enxofre e compostos aromáticos em sua composição, menor emissão gases que provocam a poluição atmosférica e um aumento do efeito estufa, não são tóxicos e principalmente são biodegradáveis.^{9,12}

Os biocombustíveis podem ser originados de resíduos orgânicos, biomassa florestal, vegetais como a cana de açúcar, a soja, a mamona, o milho, o dendê, dentre outros. O biodiesel, presente obrigatoriamente na concentração de 7% em todo o diesel atualmente comercializado no Brasil, é obtido por processos de transesterificação de óleos e gorduras.^{9,12}

O bioetanol é um produto largamente usado tanto como combustível puro ou associado à gasolina, além de suas outras utilizações como na indústria farmacêutica e na indústria de produtos de limpeza, em bebidas alcoólicas, dentre outras, destacando o Brasil como maior produtor mundial desse produto que é obtido a partir de um processo de fermentação seguido da destilação. Já

o biogás é produzido a partir da digestão anaeróbia da biomassa com a produção de metano em maior concentração.³

3.3. Diesel

O diesel é o produto obtido a partir do processo de destilação do petróleo, sendo basicamente constituído por carbono e hidrogênio, além de oxigênio, nitrogênio e enxofre em menores concentrações. Sua composição química é formada por querosene, naftas e em sua maioria por compostos mais pesados como, por exemplo, o óleo leve. Além de todos os produtos obtidos através do craqueamento catalítico, ao diesel são adicionadas substâncias dispersantes, detergentes, anticorrosivas, antiespumantes, antioxidantes, dentre outras, todas objetivando melhorar as características para chegar ao produto final mais adequado para o uso.^{13,14}

O óleo diesel apresenta características compatíveis com sua utilização como combustível, sendo um líquido límpido, odor característico forte, e baixas inflamabilidade, toxicidade e volatilidade. Dentro da câmara de combustão através da alta compressão, o diesel é queimado para que seja gerada a energia cinética necessária para o movimento, sendo que esse produto é largamente usado em ônibus, caminhões, navios, geradores elétricos, dentre outros.¹³

Devido às características do transporte brasileiro onde observa-se liderança do ramo rodoviário, o diesel é o produto derivado do petróleo mais comercializado no país, sendo encontrada para comercialização os chamados óleo diesel S10 e S500 de acordo com seu teor de enxofre máximo preconizado pela Resolução da ANP nº 50/2013. O teor de enxofre tem sido reduzido com a finalidade de diminuir a poluição do ar, principalmente nos grandes centros urbanos a partir da emissão desse constituinte do diesel.¹⁵

A redução do enxofre tem sido realizada de maneira gradativa e com precaução, uma vez que essa alteração vem aliada a mudança da lubricidade do diesel, acarretando muitas vezes em desgaste de motores.¹⁶

Também existe a classificação devido a adição ou ausência de biodiesel, onde o óleo diesel A é aquele onde não há adição de biodiesel e o óleo diesel B é aquele que apresenta biodiesel juntamente com o óleo diesel A na concentração exigida pela legislação.¹⁴

A introdução do biodiesel ao diesel comercial veio através da criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) a partir do Decreto-Lei em 04 de dezembro de 2004 e também através da lei brasileira 11.097/2005, realizadas conseguintes alterações para adequações.¹⁷

Até junho de 2014, era comercializado o diesel denominado B5, que continha 5% de biodiesel no óleo diesel A, sendo que a partir de julho de 2014 houve um aumento B6 e em novembro de 2014 para B7. Prevê-se, ainda, um aumento para B10 até o ano de 2020.^{14,18}

3.4. Biodiesel

Biodiesel é definido segundo a ANP como: “Combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e ou/esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012”. É um combustível renovável, biodegradável e ecologicamente correto.¹⁵

A utilização de maneira ampla do biodiesel está diretamente relacionada ao eficiente processo de transesterificação, que diminui a viscosidade do óleo ou gordura, além de ter pontos positivos como não apresentar enxofre e compostos aromáticos em sua composição, como também uma menor emissão de gases tóxicos, sendo dessa forma uma boa opção frente aos combustíveis fósseis. Porém, algumas desvantagens podem ser relacionadas ao uso desse biocombustível, principalmente quando analisam-se as estabilidades oxidativa e microbiológica e seu caráter higroscópico.^{6, 17, 19}

Os biocombustíveis, principalmente o biodiesel, apresentam uma maior suscetibilidade à contaminação microbiológica, devido à sua composição e principalmente por ter uma característica higroscópica, onde, somente pelo fato de estar em contato com a umidade do ar, os mesmos aumentam consideravelmente seu teor de água, capacidade muito maior de absorção de água quando comparados com os combustíveis fósseis e fato este que favorece o crescimento dos microrganismos no meio.^{20,21,22}

3.5. Modificações provocadas pela degradação dos combustíveis

Diversas reações e produtos estão relacionadas às alterações provocadas seja nas propriedades ou na estrutura dos combustíveis, a partir de processos físicos, químicos e até mesmo microbiológicos.²³

Geralmente, a fotodegradação, que é um processo físico, é o primeiro a modificar as características, sendo que os processos fotoquímicos também atuam nas modificações tanto na composição, solubilidade e características físicas. Já a ação microbiológica, muitas vezes em conjunto com os processos fotoquímicos, também provoca diversas alterações nos combustíveis.²³

3.6. Degradação Físico-Química

Diversas são as consequências advindas de processos de degradação térmicos e/ou oxidativos que ocorrem durante o processo de armazenamento dos combustíveis, destacando-se a formação de gomas e sedimentos, além de produtos oxigenados.²⁰ Existem fatores que podem acelerar o processo de degradação, principalmente quando se trata de diesel e biodiesel, sendo os principais: temperatura, produtos oxidantes, microrganismos, presença de íons de metais.²⁴

Em decorrência da oxidação dos combustíveis, existem alterações nas características que acarretam seja em problemas no funcionamento dos veículos como também em danos nos tanques, bombas e tubulações de armazenamento e transporte. Várias consequências já foram verificadas devido a essas mudanças nos combustíveis, dentre elas, pode-se destacar: elevação no consumo de combustíveis, filtros e tubos entupidos devido a presença de gomas e sedimentos, corrosão de tanques, alterações no funcionamento da câmara de combustão, dentre outros.²⁵

Um dos grandes problemas relacionados à oxidação de combustíveis, principalmente o biodiesel, estão diretamente interligados a temperatura e a incidência de luz resultando na formação de radicais livres, fatores estes que

devem ser evitados para que sejam mantidas as características físico-químicas dos produtos.²⁶

O biodiesel é mais susceptível aos processos de oxidação, principalmente devido à presença de insaturações. A partir da oxidação, há a presença de peróxidos e hidroperóxidos, que levam a formação de compostos oxigenados.^{23,26}

Para serem evitados os problemas provocados pelos processos oxidativos, alguns procedimentos podem ser realizados para que isso não venha a ocorrer, tais como a limpeza de tanques de transporte e armazenamento de combustíveis, drenagem da água nos tanques de armazenamento, um adequado revestimento interno, dentre outros.^{24,26}

3.7. Contaminação Microbiológica

Com o aumento da utilização do biodiesel, vem juntamente uma elevação no problema relacionado à contaminação microbiológica, sendo uma desvantagem da utilização dessa classe de combustíveis, frente a todos os seus benefícios em relação aos combustíveis fósseis.^{4,8}

Foi, a partir dos anos 1950, que surgiram os primeiros relatos de contaminação microbiana dos combustíveis. No Brasil, o início dos estudos é baseado na análise de um tanque de querosene onde foi isolado o fungo *Cladosporium resinae*. A partir de então, foram realizados diversos estudos sobre contaminação microbiológica em combustíveis no país, uma vez que, os microrganismos estão frequentemente presentes e os relatos do crescimento dos mesmos em tanques e reservatórios têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, principalmente quando os combustíveis são armazenados por longos períodos, ocasionando grandes problemas.^{27,28,29}

Os microrganismos podem contaminar o combustível de várias formas, dentre elas, através do ar, do solo, da água para limpeza já contaminada, do biofilme presente nas paredes dos reservatórios, caso estes não recebam a devida limpeza, entre outros. O biofilme formado apresenta-se como uma aglomeração de microrganismos que formam uma película sobre os tanques, geralmente relacionadas ao entupimento de bicos e válvulas.³⁰ Na figura 1, é

possível observar a aparência de um tanque de armazenamento em sua parte inferior, onde verifica-se a presença de resíduo de contaminação.



Figura 1: Aparência de um fundo de tanque de armazenamento com resíduo de contaminação.

Fonte: Zimmer *et al*, 2011.³¹

A contaminação microbiológica está diretamente relacionada com algumas condições favoráveis do meio, principalmente no caso de combustíveis armazenados quando esse crescimento ocorre no sistema de estocagem, dentre elas: a presença de água, condições ideais de temperatura, oxigênio, pH, umidade e nutrientes levando à formação de sedimentos biológicos e biofilmes.
32,33,34,35,36

3.8. Fatores que influenciam a contaminação

De acordo com a ANP e outras agências reguladoras, a forma ideal de armazenamento de combustíveis deve ser feita em tanques de aço carbono ou de concreto, além de ser localizar em ambientes ventilados e distantes de fontes de ignição, apresentando respiradouros de emergência ou instalados em superfície, estando protegidos contra exposição direta com poeiras, água, dentre

outros, e com a realização de limpezas periódicas adequadas para o tipo de tanque.

A existência da água no sistema é essencial para o desenvolvimento dos microrganismos, além de aumentar a oxidação do combustível. No Brasil, segundo a resolução da ANP nº 65/2011, por exemplo, é permitida uma concentração máxima de 0,05% de água no óleo diesel.¹⁵

É importante ressaltar que nessa concentração já é possível um crescimento microbiológico inicial, mesmo que 1% seja considerada uma concentração ideal para esse desenvolvimento dos microrganismos. Logo após o início do crescimento, observa-se que ocorre a produção de água no sistema, levando a um aumento da contaminação.^{16,17}

Um importante fator limitante do crescimento microbiológico é baseado na falta de nutrientes minerais, uma vez que, até existem microrganismos que devido a características de suas estruturas de resistência conseguem permanecer vivos na falta de água, porém, a ausência de nutrientes como magnésio, fósforo, potássio, dentre outros, dificulta e limita a sobrevivência desses microrganismos em um sistema de armazenamento. Esses nutrientes podem entrar nos tanques através de alguns insetos ou pequenos animais ou ainda por fragmentos de poeira que adentrem ao sistema. Como exceção, existem alguns microrganismos que utilizam apenas hidrocarbonetos como sua fonte de energia para o desenvolvimento.¹⁹

Ao se deparar com as condições ideais de nutrientes e água, uma população de microrganismos consegue rapidamente se desenvolver em um tanque de estocagem em uma extensa faixa de pH e temperatura, podendo variar o pH entre 4 e 9 e a temperatura de 4 a 60 °C.^{20,21}

O desenvolvimento microbiológico pode acarretar na redução do pH na fase aquosa dos combustíveis devido ao seu metabolismo produzir metabólitos ácidos, levando a um aumento na corrosão interna dos tanques de armazenamento. Além disso, observa-se a formação de cetonas, aldeídos e ácidos, produtos relacionados ao processo de oxidação nos sistemas de estocagem.⁴

O oxigênio é geralmente encontrado nos combustíveis em concentrações satisfatórias, sendo que o mesmo segue reabastecido sempre que ocorre recarregamento dos tanques de estocagem. A existência de oxigênio nos tanques favorece o desenvolvimento microbiológico de microrganismos aeróbios, porém, sua falta não resulta na ausência de contaminação microbiológica, uma vez que existem microrganismos anaeróbios e outros facultativos que continuam a se desenvolver em ambientes anaeróbios.²²

3.9. Desenvolvimento Microbiológico

Mediante a todas essas características para o ideal desenvolvimento microbiológico, também se faz necessário que os microrganismos consigam utilizar os combustíveis como fonte de carbono para que possa efetivamente ocorrer a contaminação. Normalmente, esses microrganismos estão presentes no ambiente, como solo, ar e água.¹⁵

Muitos estudos já foram realizados e muitas espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras já foram isoladas dos combustíveis, demonstrando sua capacidade de desenvolvimento nos sistemas de armazenamento.^{4,27,30,31,37}

Dentre os microrganismos isolados, foram identificadas algumas bactérias, como: *Acinetobacter*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter cerificans*, *Actinomycetes*, *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes*, *Bacillus sp.*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Clostridium sporogenes*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter glomerans*, *Flavobacterium arborescens*, *Flavobacterium diffusum*, *Micrococcus sp.*, *Moraxella sp.*, *Ochrobactrum anthropii*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas maliphora*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Serratia odorífera* e *SRB*.^{4,30,31}

Dentre as leveduras, foram identificadas: *Aureobasidium pullulans*, *Candida sp.*, *Candida famata*, *Candida fluviatilis*, *Candida guilliermondii*, *Candida*

lipolytica, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Hansenula mrakii*, *Rhodotorula sp.* e *Saccharomyces sp.*^{4,30,31}

Já os fungos filamentosos isolados foram: *Acremonium sp.*, *Acremonium strictum*, *Alternaria sp.*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus paradoxus*, *Aspergillus sejunctus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus tamarii*, *Botrytis cinérea*, *Cephalosporium sp.*, *Chaetomium dolichotrichum*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium sp.*, *Cladosporium cladosporoides*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Curvularia lunatus*, *Drechslera cynodontis*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium sp.*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Geomyces cretaceus*, *Geotrichum candidum*, *Gliomastix sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Hormoconis resinae*, *Humicola grisea*, *Mucor sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces virvus*, *Penicillium sp.*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium canescens*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium hirsutum*, *Penicillium minioluteum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium thomii*, *Penicillium waksmanii*, *Pestalotiopsis aquatica*, *Phialophora sp.*, *Phialophora richardsiae*, *Phoma sp.*, *Phomopsis sp.*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhinocladiella sp.*, *Rhizopus oryzae*, *Sordaria fimicola*, *Stemphylium botryosum*, *Thielavia sp.*, *Trichoderma sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Trichosporon sp.*, *Trichothecium roseum*, *Tritirachium oryzae*, *Ulocladium sp.*, *Ulocladium atrum*, *Ulocladium chartarum*.^{4,30,31}

3.10. Testes para a análise da contaminação microbiológica

Alguns testes são realizados para a análise de contaminação, sendo que os mais utilizados de acordo com os estudos realizados na área para a detecção de microrganismos nos combustíveis são: filtração seguida por microscopia e/ou

cultura do filtrado, realização de semeadura das amostras de combustível ou da água drenada em meios de cultura adequados, onde o teste realizado com a água drenada é feito por ser muito importante analisar se os microrganismos estão presentes somente na fase aquosa ou na interface formada por água e combustível. ¹⁷

Existem testes com a finalidade de avaliar a ação biocida de algumas substâncias, diferentemente dos anteriores que verificam a presença ou não de contaminação advinda dos microrganismos. ¹⁹

O teste de concentração inibitória mínima, também bastante conhecido pela sua sigla MIC, é baseado na concentração mínima do agente analisado como antimicrobiano para que não haja desenvolvimento visível do microrganismo, analisando sua atividade biostática a partir da inibição do crescimento microbiológico. Por outro lado, o teste de concentração mínima biocida, o CMB, analisa a mínima concentração do agente necessária para que o microrganismo seja totalmente destruído, observando sua atividade biocida. ^{19,21}

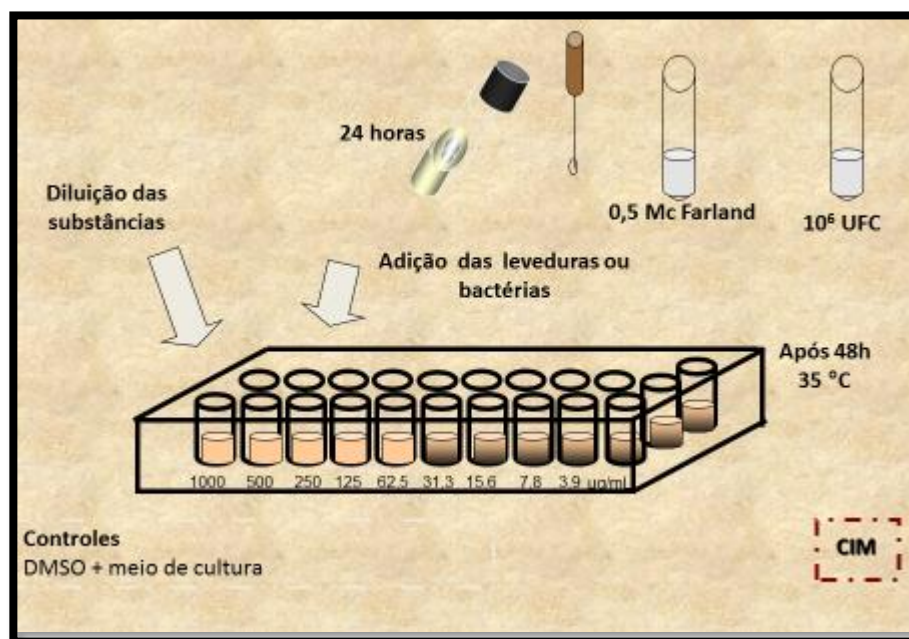


Figura 2: Esquema do processo realizado no teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC).

Ainda não existe um padrão publicado oficialmente no Brasil para a análise e determinação da contaminação microbiológica em combustíveis, sendo que a maioria dos trabalhos publicados na área baseiam-se em outros parâmetros que não para combustíveis. ^{14,19}

Alguns estudos realizam a contagem de fragmentos de fungos de forma visual, porém, sem grande êxito, como também ocorre quando busca-se normatizar o resultado baseado em unidades formadoras de colônia. Devido ao grande desenvolvimento tecnológico focado em novos métodos, estima-se que em breve seja padronizado os testes ideais para a determinação e quantificação dos contaminantes microbiológicos nos combustíveis. ^{4,14}

3.11. Principais Consequências da Contaminação

O assunto contaminação microbiológica só é considerado relevante e começa a ser analisado quando se inicia os danos dos equipamentos e corrosão dos tanques, uma vez que, são altos os custos e gastos com desativação e recuperação de tanques de armazenamento já deteriorados. ^{28,38}

Muitos são os problemas relacionados ao crescimento microbiológico nos combustíveis, destacando-se:

(a) corrosão de tanques de estocagem e tubulações com a possibilidade de vazamento do conteúdo para solos e reservas naturais de água e consequente contaminação;

(b) oclusão de filtros, mangueiras e tubos acarretando no desgaste das bombas;

(c) produção de lodo e de biossurfactantes que levam à incorporação do hidrocarboneto à água com a consequente migração da biomassa microbiana para a fase oleosa devido à redução da tensão superficial;

(d) produção de substâncias poliméricas fora das células bacterianas, além do aparecimento de uma água mais escura na parte final dos tanques. ²¹

Devido a contaminação microbiológica nos combustíveis, observa-se uma elevação na instabilidade dos hidrocarbonetos, acelerando reações que produzem mais partículas de procedência química. Por conta dessa contaminação constatam-se efeitos negativos sobre o funcionamento dos veículos, comprometendo o rendimento dos motores, além de afetá-los com a saturação de filtros, desgaste de bicos injetores, comprometimento da qualidade e a queima incompleta do combustível, dentre outros.^{22,31,39,40}

3.12. Principais meios de controle para redução da contaminação

Visto as grandes consequências da contaminação microbiológica, faz-se necessária a busca por novas opções de substâncias que visem melhorar os combustíveis tanto na parte química quanto física para a redução do crescimento microbiológico, surgindo, dessa forma, os biocidas.¹⁴

Os biocidas são definidos como substâncias ativas que apresentam a capacidade inibir, neutralizar ou eliminar organismos vivos, principalmente microrganismos, indesejados e/ou nocivos presentes no meio.¹⁴

Existem diferentes tipos de biocidas, podendo se apresentar das seguintes formas: físicos, químicos e biológicos e podem ser usados em diversas áreas, como insumos e princípios ativos da indústria farmacêutica, desinfetantes, esterilizantes de artigos termo-sensíveis, agrotóxicos, repelentes de insetos, químicos industriais, dentre outros.^{14,20,38}

Muitos aditivos tem sido produzidos com o intuito de ser um bom biocida, porém, por enquanto, eles não são viáveis por mudarem as características físico-químicas dos combustíveis; por afetarem a eficácia e rendimento dos motores, bombas, dentre outros; por serem altamente corrosivos; por não apresentarem adequada biodegradabilidade; por serem em alguns casos inativados pela presença de outras substâncias no meio; por terem alto custo ou até mesmo por não terem amplo espectro e não agirem na maioria das espécies de microrganismos responsáveis pela contaminação. Deve-se observar também a efetividade do biocida, uma vez que essas substâncias podem sofrer

degradação por fatores como ação enzimática, temperatura, pH ou pela formação de biofilmes. ^{14,20,38}

Um importante aspecto que deve ser analisado ao utilizar biocidas em tanques de estocagem é o descarte da água de lastro quando o tratamento já foi finalizado. Dependendo de como essa retirada é feita e a água é manuseada, a mesma pode acidentalmente cair em solos e corpos de água, sendo que esse biocida ficará exposto no ambiente de maneira totalmente inadequada. Vale salientar que os biocidas produzidos atualmente têm uma maior preocupação ambiental, porém, ainda causam impactos ambientais uma vez que, em sua maioria são tóxicos e nocivos não somente para os microrganismos contaminantes dos combustíveis, afetando o meio ambiente de maneira geral.⁴⁰

A utilização de biocidas é liberada nos Estados Unidos, diferentemente do Brasil, sendo utilizados em combustíveis já contaminados, não tendo a prática de adicioná-los como um aditivo do combustível. Geralmente são autorizados como microbicidas pela agência reguladora americana as isotiazolonas, dioxiborinanas, ditiocarbamatos, oxazolidinas e glutaraldeídos.^{14,28}

Os biocidas atualmente utilizados podem agir de três maneiras diferentes: interagindo com a parede celular dos microrganismos ou outras estruturas celulares externas, ou com estruturas citoplasmáticas ou ainda com elementos da membrana plasmática. Essas substâncias já estavam disponíveis no mercado antes de serem utilizadas nos combustíveis. ^{14,22}

Por sua ação antimicrobiana, algumas delas como as oxazolidinas são largamente usadas na indústria farmacêutica por inibir a síntese de proteínas.¹⁴

No Brasil, não há autorização para a utilização de biocidas juntamente com os aditivos mesmo em tanques já contaminados, mesmo que haja no país vários estudos com substâncias efetivas e já disponíveis no mercado.^{14,19,22}

Há, na União Européia, a regulamentação UE 528/ 2012 que visa aumentar segurança e diminuir a complexidade durante o procedimento de autorização dos biocidas utilizados e colocados no mercado, importante legislação não só para a região européia, sendo utilizada em todo o mundo como base para a regulação dos produtos em questão. ^{19,22}

METODOLOGIA

4. Metodologia

4.1. Metodologia

Os testes e análises foram realizados no Laboratório de Materiais e Combustíveis (LMC) no Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB).

4.1.1. Coleta do diesel B5 comercial

Segundo Regulamento Técnico ANP nº 1/2007, as amostras foram coletadas em frascos de vidro escuro, fechados com batoque, tampa plástica e armazenadas em lugar arejado, sem a direta incidência da luz e relativamente distante de fontes de calor.⁴¹ Na figura 2, tem-se o frasco âmbar utilizado para a coleta das amostras nos postos de combustíveis.



Figura 3: Frasco utilizado para coleta das amostras.

As coletas foram realizadas em pontos comerciais de venda em diferentes locais do DF para uma análise mais detalhada e com maior reprodutibilidade, obtendo-se o total de dez amostras para o trabalho.

4.1.2. Identificação da microbiota existente no diesel comercial

O cultivo e isolamento dos microrganismos do diesel B5 comercial foram realizados através do processo descrito por Bento e Gaylarde^{4,34} e a identificação será realizada por técnicas de microcultivo e análise morfológica de acordo com Barnett.⁴²

4.1.3. Teste de cultivos em meio de cultura

A técnica é baseada em estriamento das amostras em meios de cultivo específicos para crescimento de fungos e bactérias. O estriamento é realizado com um auxílio de um swab, sendo a amostra espalhada pela placa, já contendo o meio, de maneira uniforme cobrindo toda a área.

No caso do desenvolvimento de fungos, foi utilizado um meio chamado Ágar Sabouraud previamente preparado da marca Hexis/Acumedica. Já para o cultivo de bactérias, o meio específico usado foi o Ágar Nutriente advindo da marca Himedia Laboratories.

Para o preparo dos meios de cultura, há um padrão de acordo com o fabricante. No caso do Ágar Sabouraud Hexis/Acumedica, foi medido 1000mL de água destilada, colocada em um enlarmeyer e adicionados 65 g do meio que é comercializado na forma de pó. Em seguida, são misturados e colocados na autoclave Vetclave pelo período de 15 min, a 1 atm e 121 °C.

Já para o preparo do meio Ágar Nutriente, foram pesados 28 g de meio e dissolvidos em 1000mL de água destilada, sendo que em seguida essa mistura foi colocada na autoclave Vetclave pelo período de 15 min, a 1 atm e 121 °C. Após o processo de esterilização dos meios, os mesmos são vertidos em placas de Petri estéreis para a solidificação e sua posterior utilização. A figura 3 mostra a capela utilizada durante os procedimentos para a inoculação das amostras.



Figura 4: Capela usada para a inoculação das amostras. A imagem mostra algumas placas já inoculadas e as amostras devidamente identificadas.

Utilizaram-se placas de Petri com meio de cultura para a inoculação das amostras coletadas. As placas devidamente inoculadas foram armazenadas em temperatura ambiente (22-24 °C) por um período de 60 dias para o desenvolvimento dos microrganismos presentes nas amostras e, em seguida, realizado o isolamento dos fungos e bactérias desenvolvidos nas placas. Na figura 4, é possível observar o final do procedimento de inoculação, com as placas devidamente identificadas e antes do armazenamento.

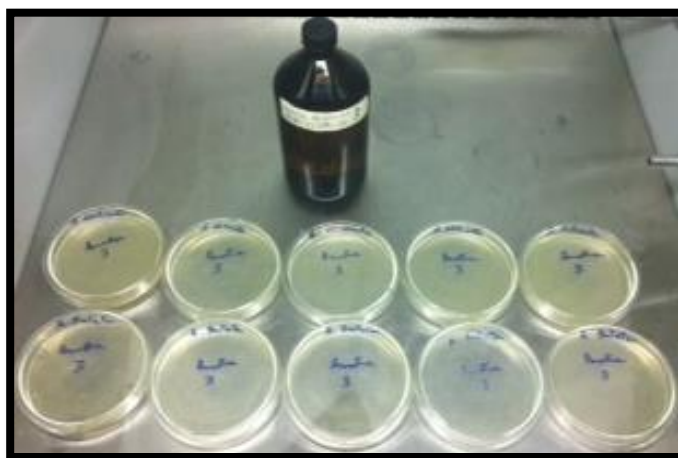


Figura 5: Placas inoculadas e identificadas antes de serem armazenadas.

Após esse período, as placas foram analisadas minuciosamente e as mesmas que apresentaram desenvolvimento microbiológico foram analisadas macroscopicamente, principalmente a morfologia das colônias e em seguida, quando necessário, foram realizados testes específicos.

Cada análise de crescimento foi realizada em quintuplicata para melhor reprodutibilidade dos resultados.

4.1.4. Identificação microbiológica

A identificação dos microrganismos desenvolvidos nas amostras seguiu a rotina de processos usados na área de Microbiologia, a partir de procedimentos específicos para diferenciação de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, sendo realizada inicialmente através da análise macroscópica das colônias acopladas a consultas em atlas específicos e análise microscópica. A seguir, testes específicos foram realizados para a confirmação das identificações macroscópicas.^{43,44,45}

Na identificação de fungos filamentosos, realizou-se a análise macromorfológica, onde avaliou-se aspectos e pigmentação das colônias, além da avaliação micromorfológica que inclui a análise de estruturas de reprodução, esporos e hifas vegetativas.^{44,46,47,48}

Para a identificação de leveduras, foram analisados os testes de coloração de Gram, teste diferencial cromogênico (CHROMagar), além da avaliação de tubo germinativo e testes de pseudofilamentação e clamidoconídio.^{44,46,47,48}

Já para a identificação de bactérias, foram realizadas análises como prova de mobilidade, indol, lactose, cultivo em ágar sangue, testes de catalase e oxidase, além de coloração de Gram.^{44,45,49}

4.2. Ensaio microbiológicos

Para a realização dos testes microbiológicos, as substâncias em análise foram dissolvidas em biodiesel/diesel para atingir as concentrações apropriadas.

Diversas moléculas foram testadas, as quais foram preparadas no Laboratório de Materiais e Combustíveis da UnB ou por parceiros, com a finalidade de buscar soluções para o problema da contaminação microbiológica, utilizando moléculas com potencial biocida como aditivos sem modificar as características físico-químicas dos combustíveis.

Após a preparação das blendas, foram realizados os testes de perfuração em ágar e concentração inibitória mínima (CIM).

4.2.1. Teste de perfuração em ágar

O método utiliza como reservatório um orifício no ágar, onde o mesmo acondiciona a substância a ser testada no meio de cultura e, em seguida, a placa é incubada. Depois do período de incubação, o diâmetro da zona inibida, ou seja, a região onde não houve o desenvolvimento de microrganismos, foi medida.

Durante o processo, as substâncias difundiram-se dos orifícios para o meio de cultura. Para a análise em questão, foram utilizadas cepas de bactérias e fungos padronizadas ATCC (*American Type Culture Collection*). Os microrganismos usados na análise foram escolhidos a partir dos estudos na área, selecionando os mais detectados nos combustíveis diesel/biodiesel, como os fungos *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Saccharomyces cerevisiae*, e as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.³⁴ Os primeiros testes foram realizados com diversos microrganismos, depois foram selecionados quatro cepas onde observou-se predominância na contaminação dos combustíveis, sendo eles: *Acinetobacter* sp, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*.

O teste foi realizado sobre os meios de cultura ágar Sabouraud e ágar nutriente e os resultados observados a partir de 48 h de incubação a 32-37 °C. Os halos de inibição foram medidos, incluindo o diâmetro da perfuração com o auxílio de um paquímetro.

Cada procedimento foi realizado em triplicata e o cálculo para a medição final dos halos foi realizado através da média das três leituras da amostra analisada. Colônias que cresceram no halo de inibição são consideradas resistentes. As blendas que apresentaram halo de inibição superior a 10 mm foram consideradas ativas.

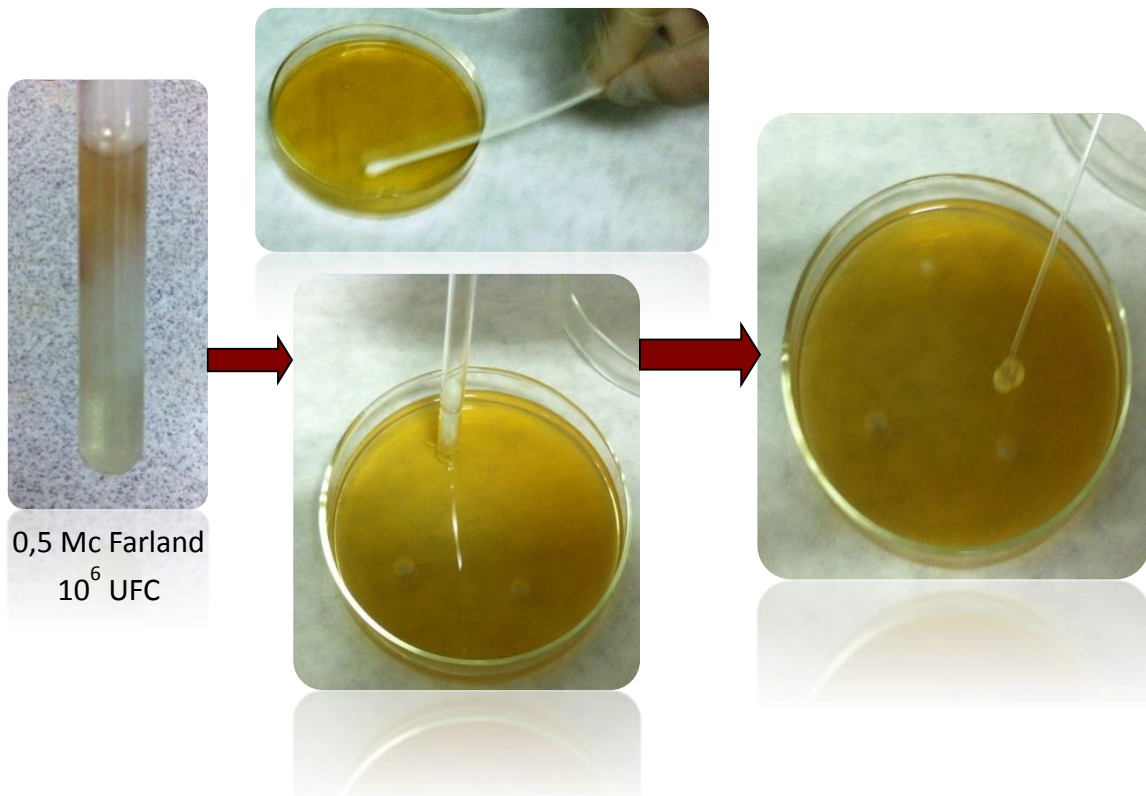


Figura 6: Processo de realização do teste de perfuração em ágar.

4.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

Outra análise importante realizada foi o teste de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS/CLSI.^{50, 51}

No momento da realização da análise, as amostras foram diluídas em meio de cultura próprio para cada microrganismo, para que as concentrações das substâncias atinjam a variação de 1 a 512 $\mu\text{g/mL}$.

O Meio de Cultura utilizado foi o RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 mol/L de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) para pH 7,0, e esterilizado por filtração.

A preparação do inóculo foi realizado a partir de colônias de leveduras cultivadas em ágar batata dextrose por 48 h a 35 °C conforme a padronização. Houve a preparação de uma suspensão salina na concentração de 0,85%, que passou pelo processo de esterilização e sua densidade celular medida em espectrofotometria para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm. A suspensão em questão foi, em seguida, diluída a 1:100 e, por conseguinte, a 1:20 em RPMI 1640 de modo que no final do processo foi obtida uma concentração do inóculo de 0,5 a 2,5 X 10³ células/mL.

Para fungos filamentosos, o inóculo foi obtido a partir do micélio oriundo de culturas cultivadas em batata dextrose por um período de 5 dias e temperatura de 35 °C. Foi preparada uma suspensão com os esporos dos fungos filamentosos com salina 0,85% esterilizada, onde foi em seguida medida a densidade celular através de espectrofotometria para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm. Essa suspensão foi então diluída em meio RPMI 1640 na proporção 1:5, para que a concentração final do inóculo fosse 0,4 a 5,0 x10⁴ UFC/mL aproximadamente.

Para o preparo do inóculo bacteriano, foram usadas colônias de bactérias cultivadas em ágar nutriente por um período de 24 h e temperatura de 35 °C. Após a incubação, colônias bem isoladas foram isoladas com auxílio de uma alça bacteriológica e, por conseguinte, transferidas para um tubo de solução salina 0,85 %. A suspensão bacteriana foi comparada com o padrão 0,5 da escala McFarland.

Após o processo de preparação, foram adicionados 100 µL do inóculo em cada poço contendo as amostras já diluídas na placa. As placas foram incubadas a 35 °C por um período de 48 h no caso do inóculo bacteriano, até 72 h para leveduras e 5 dias para fungos filamentosos.

Os microrganismos usados no teste estão de acordo com a literatura da área, sendo os mesmos do teste de perfuração em ágar: *Acinetobacter* sp,

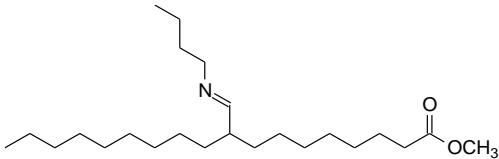
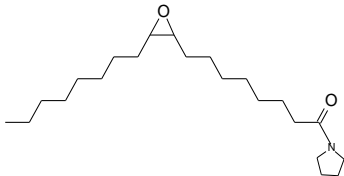
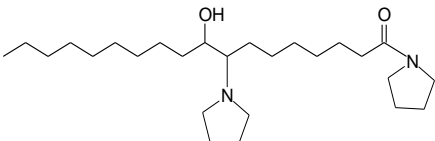
Aspergillus niger, *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus subtilis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Fusarium solani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporium canis*, *Pseudomonas sp*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton rubrum*.³⁴

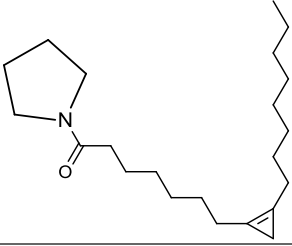
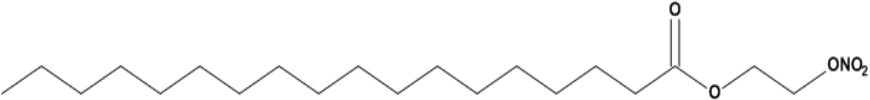
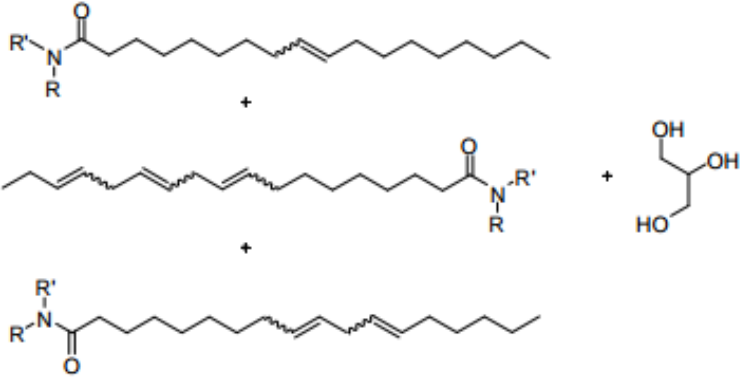
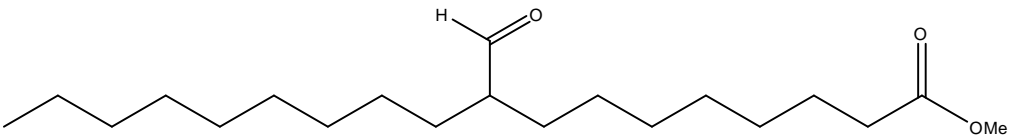
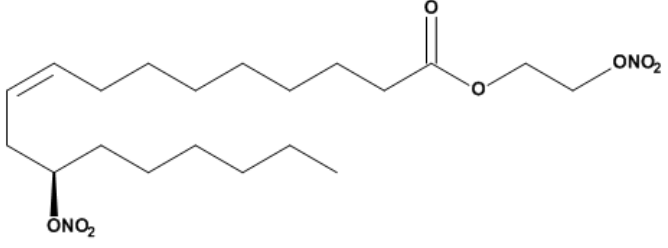
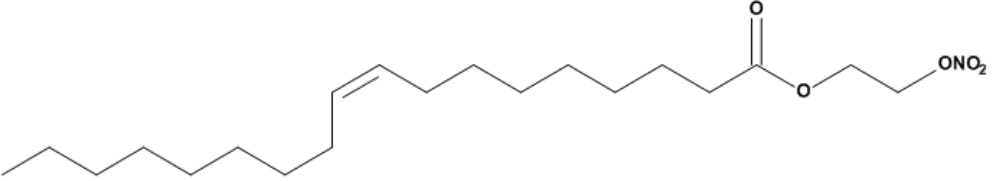
Todas as análises foram realizadas em triplicata e a leitura feita a partir da visualização de crescimento da levedura através da turvação no meio de cultura. Foram considerados suscetíveis resultados com CIM $\leq 256 \mu\text{g/mL}$.⁵⁰

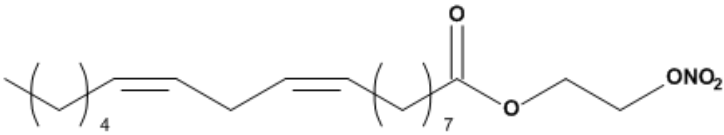
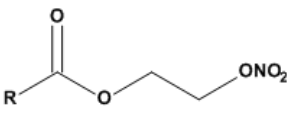
4.2.3. Substâncias utilizadas nos testes biocidas

Diversas substâncias foram avaliadas com a finalidade de sua utilização como biocidas, onde tais foram listadas na tabela 1.

Tabela 1: Relação das substâncias avaliadas nos testes biocidas.

Substâncias utilizadas nos testes biocidas	
1	
2	
3	
4	Bio-óleo CuAc 380 °C
5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{---} \text{C} \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{CO}_2\text{H}$ <p>n = 6: Ácido malválico n = 7: Ácido esterculico</p>

6	
7	Bio-óleo, Biocida, Craqueado e Resíduo de uma indústria de latas.
8	
9	
10	
11	
12	

13	
14	

As moléculas denominadas como Bio-óleo, Biocida, Craqueado e Resíduo de uma indústria de latas não apresentaram suas estruturas divulgadas no trabalho por fazerem parte de um sigilo de patente, assim como o bio-óleo CuAc 380 °C. No entanto, pode-se dizer que são uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, essencialmente ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas, originados de processos de craqueamento termo-catalíticos de materiais graxos residuais, obtidos em processos semelhantes aos descritos pelo grupo em trabalhos anteriores.⁶⁴

As substâncias 10, 11, 12, 13 e 14 não apresentaram atividades fungicidas e bactericidas para nenhuma das cepas analisadas, nem mesmo na sua concentração de 100%, por isso, não sendo discutidas nos resultados dos testes biocidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

5.1. Identificação Microbiológica

5.1.1. Desenvolvimento microbiológico em Placas de Petri

As amostras foram coletadas segundo o Regulamento Técnico ANP nº 1/2007 em pontos comerciais de venda de combustíveis em diferentes locais do Distrito Federal e o armazenamento foi realizado em temperatura ambiente e não exposto diretamente a luz. A lista contendo os postos usados para a amostragem e sua localização estão relacionados na tabela 2.

Tabela 2: Relação das amostras coletadas nos postos de combustíveis do Distrito Federal.

Amostra	Ponto comercial usado para coleta
1	Posto de Combustíveis – Águas Claras
2	Posto de Combustíveis – Ceilândia Norte
3	Posto de Combustíveis – Ceilândia Sul
4	Posto de Combustíveis – Jardim Botânico
5	Posto de Combustíveis – Lago Sul
6	Posto de Combustíveis – Plano Piloto (Asa Norte)
7	Posto de Combustíveis – Plano Piloto (Asa Sul)
8	Posto de Combustíveis – Samambaia
9	Posto de Combustíveis – Taguatinga Norte
10	Posto de Combustíveis – Taguatinga Sul

Na figura 7, é possível avaliar a distribuição por região na coleta das amostras pelo território do Distrito Federal.

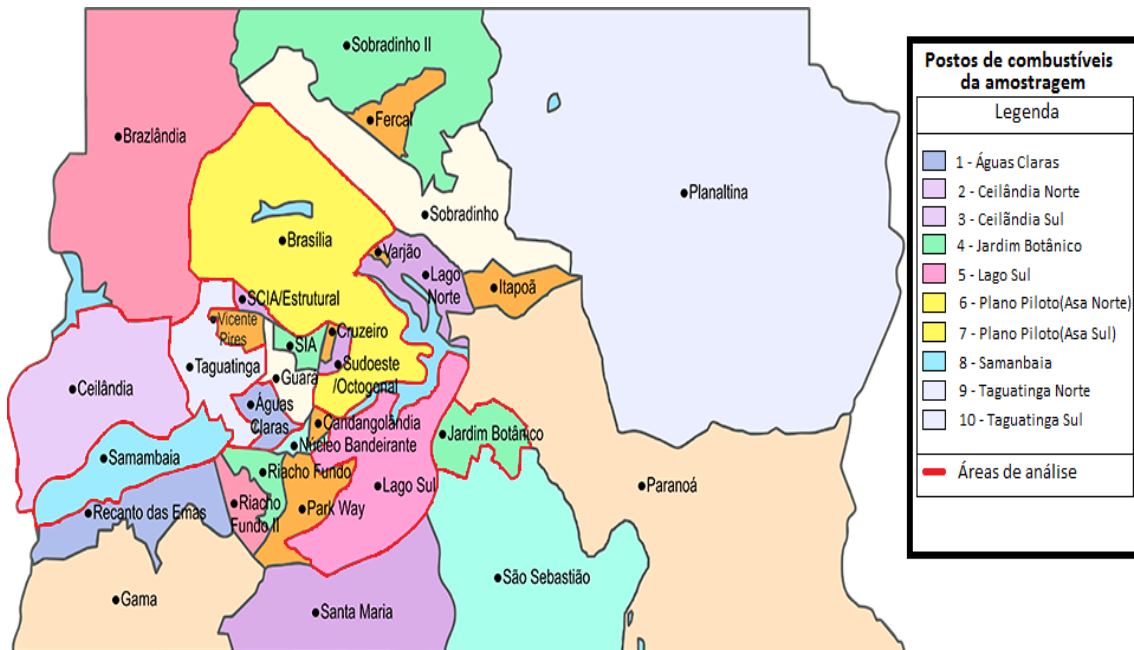


Figura 7: Distribuição da coleta das amostras por cidades do Distrito Federal.

Após o período de 60 dias de incubação, todas as placas foram avaliadas e observou-se o desenvolvimento de bactérias e fungos em todas as amostras. Para as etapas seguintes, foram selecionadas quatro das cinco placas de cada meio de cultura onde excluíram-se os resultados que não se enquadravam nas mesmas características das colônias encontradas nas outras quatro placas. Os resultados obtidos foram apresentados nas Figuras 8 a 17.

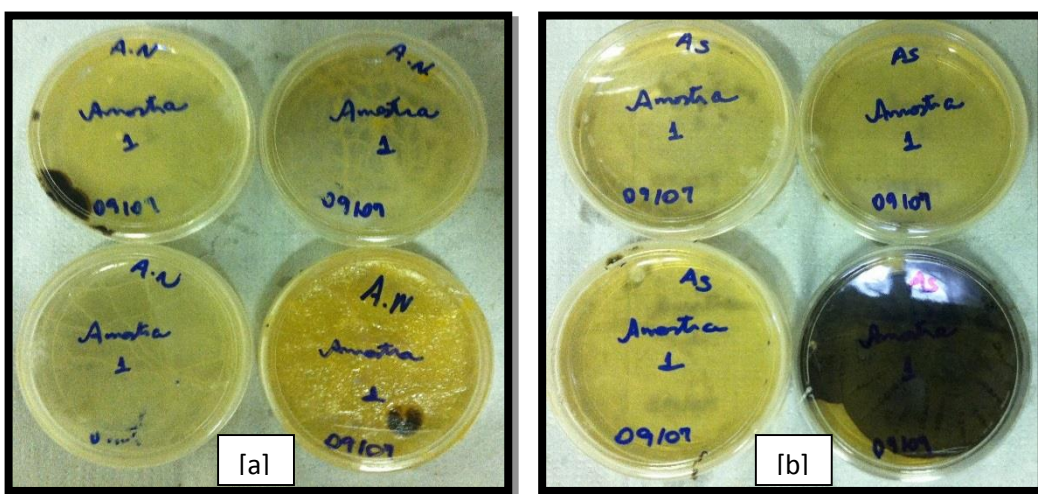


Figura 8: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 1: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

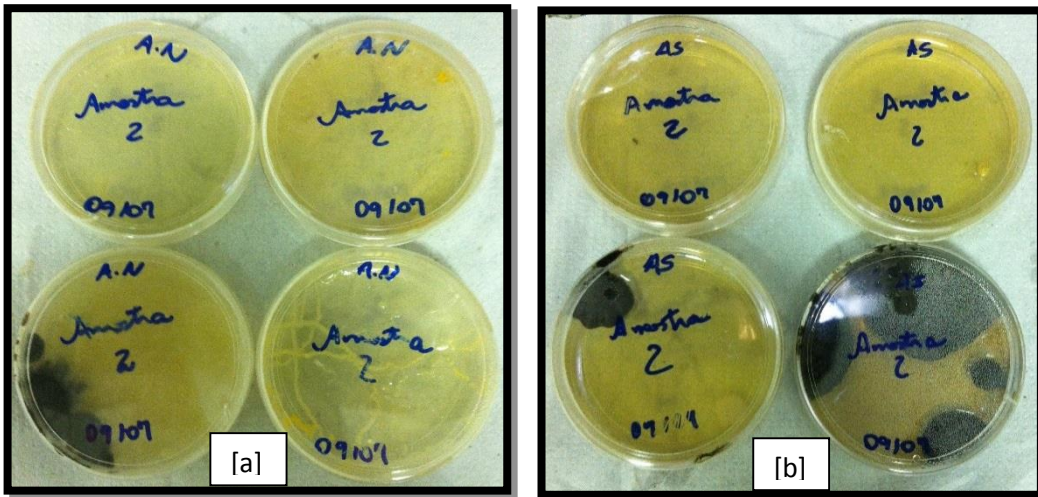


Figura 9: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 2: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

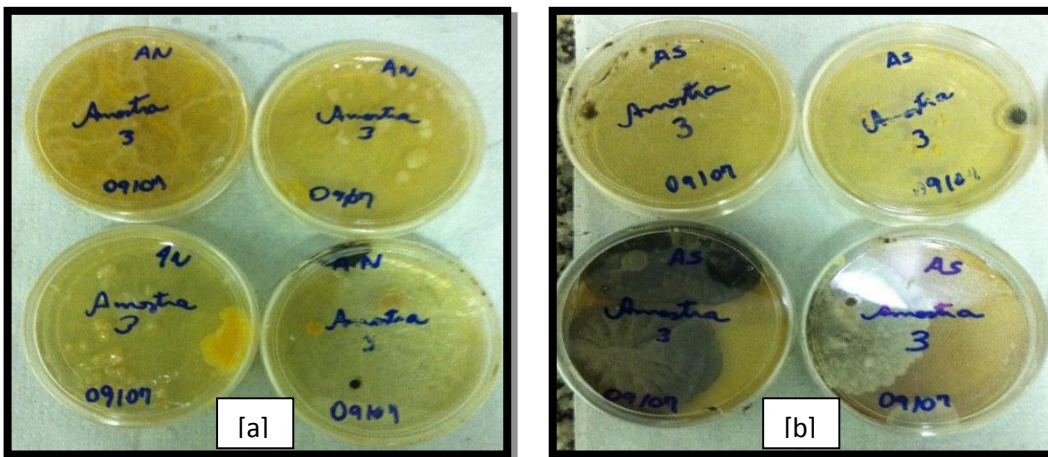


Figura 10: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 3: [a] Ágar Nutriente e [b] Ágar Sabouraud.

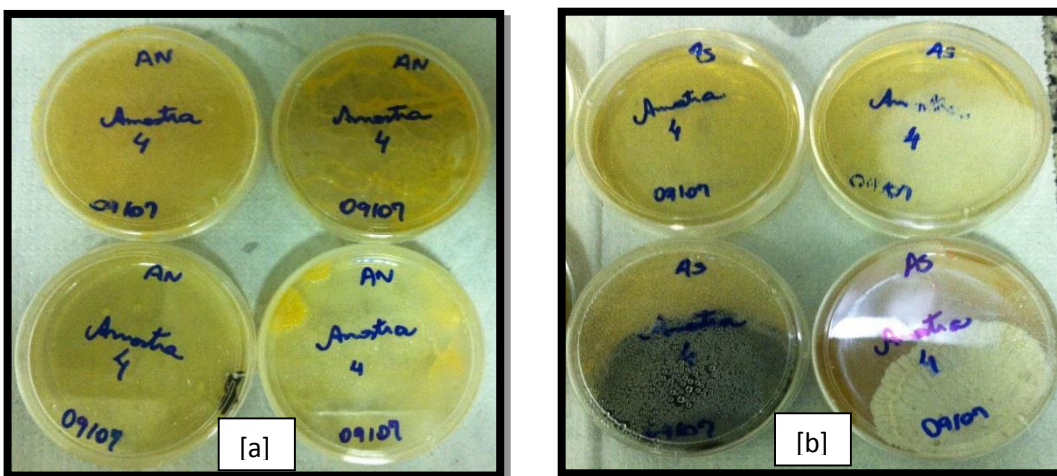


Figura 11: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 4: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

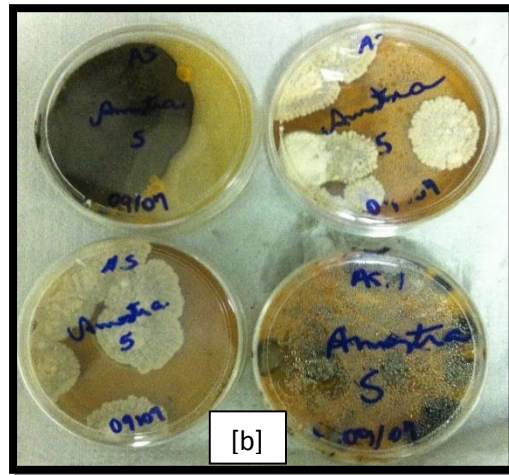
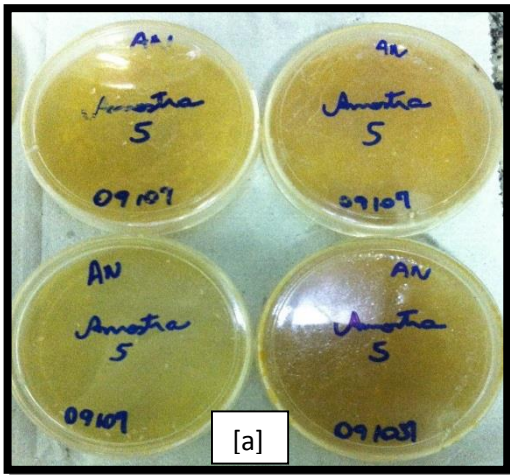


Figura 12: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 5: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

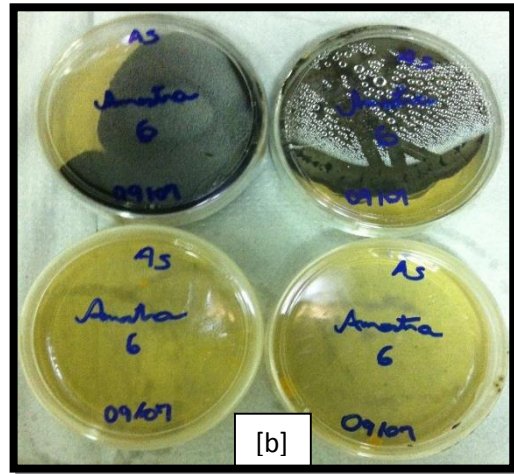
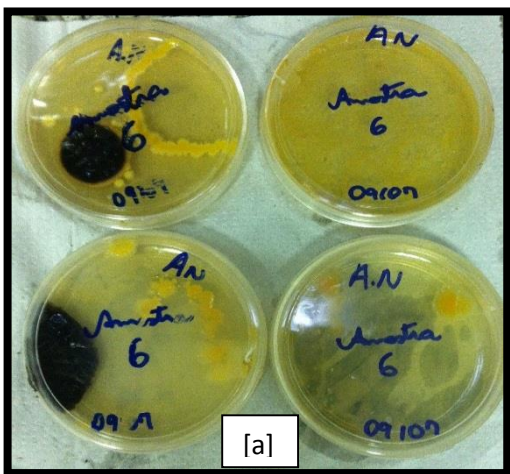


Figura 13: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 6: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

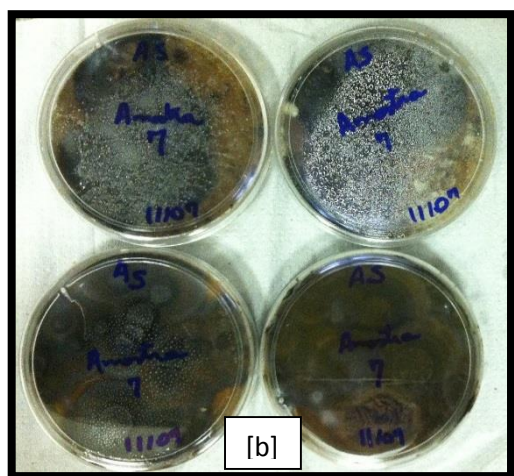
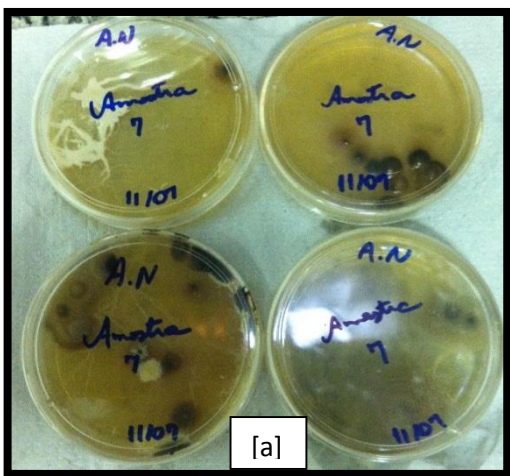


Figura 14: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 7: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

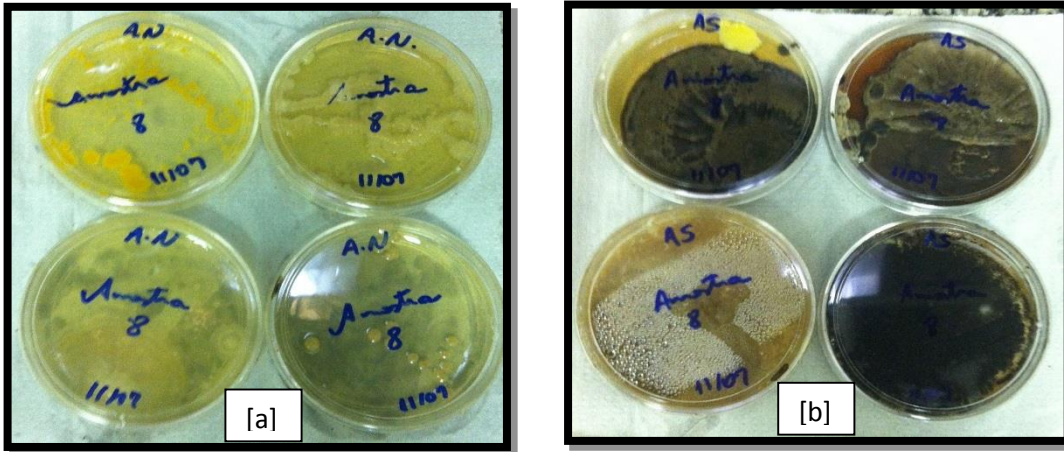


Figura 15: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 8: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

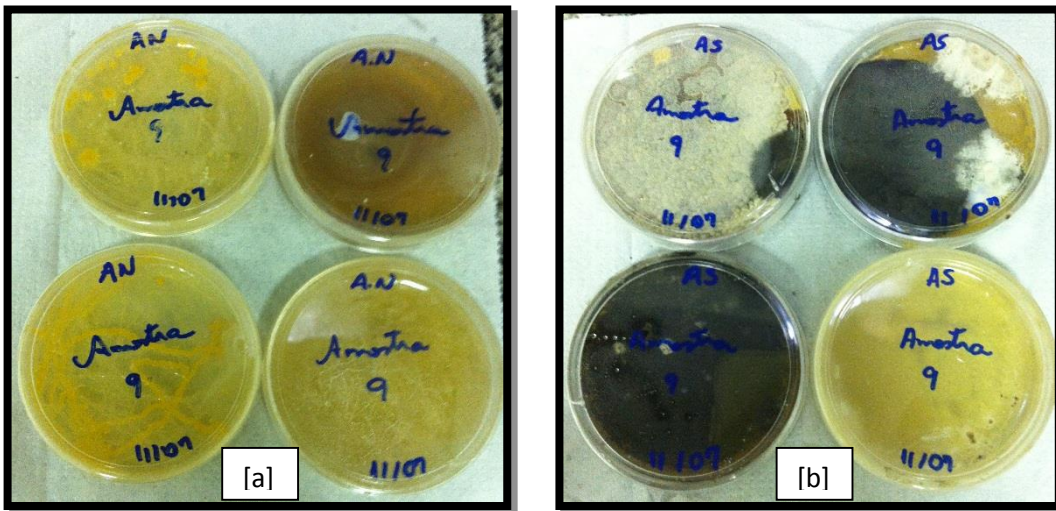


Figura 16: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 9: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

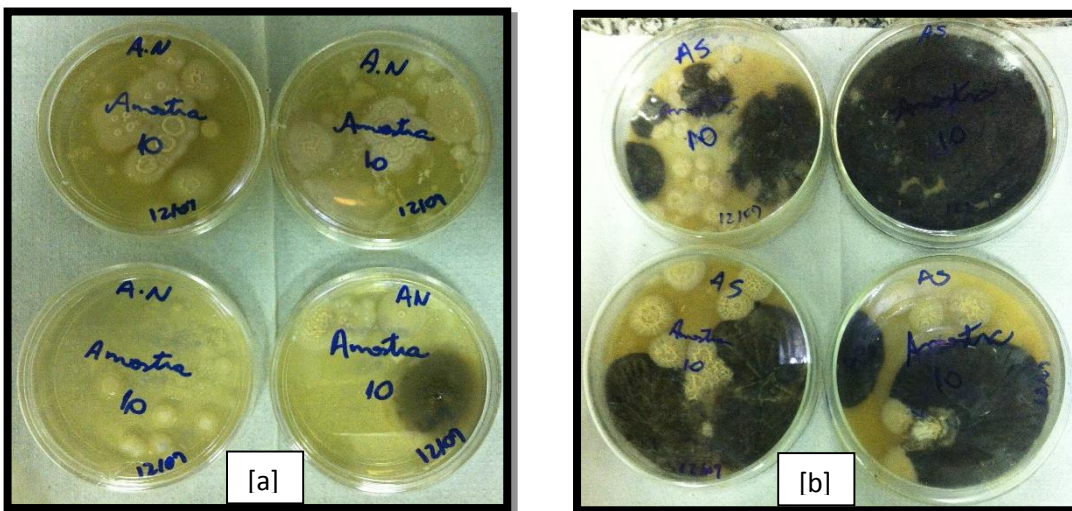


Figura 17: Placas selecionadas para as análises (macroscópica, microscópica e testes específicos) da amostra 10: [a] Ágar Nutriente, [b] Ágar Sabouraud.

Na tabela 3, encontram-se descritos os microrganismos identificados em cada amostra, após os devidos procedimentos com isolamentos e testes específicos de identificação:

Tabela 3: Identificação microbiológica das amostras coletadas em postos de combustíveis.

Amostra	Bactérias	Fungos
1	<i>Bacillus sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
2	<i>Bacillus sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
3	<i>Flavobacterium sp/ Micrococcus sp</i>	<i>Aspergillus niger/ Aspergillus fumigatus</i>
4	<i>Flavobacterium sp/ Bacillus sp</i>	<i>Candida sp/ Aspergillus niger/ Aspergillus fumigatus</i>
5	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Rodhotorula sp/ Aspergillus niger/ Aspergillus fumigatus</i>
6	<i>Flavobacterium sp/ Bacillus sp</i>	<i>Aspergillus niger/ Candida sp</i>
7	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Phialophora sp</i>
8	<i>Bacillus sp/ Micrococcus sp/ Flavobacterium sp</i>	<i>Aspergillus niger/ Aspergillus fumigatus</i>
9	<i>Flavobacterium sp/ Bacillus sp</i>	<i>Aspergillus niger/ Trichophyton sp</i>
10	<i>Bacillus sp</i>	<i>Aspergillus niger/ Candida krusei</i>

As análises foram iniciadas realizando a diferenciação das colônias de acordo com suas características, como: brilho, umidade, algodinoso, granuloso, pulverulento, aveludado, penugento, liso, coloração de anverso e reverso, dentre outras, sendo comum esse tipo de análise.⁵²

Dentre as bactérias identificadas nas amostras, o microrganismo *Bacillus sp* foi encontrado nas amostras 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, apresentando-se por colônias de contorno ondulado, diâmetro em torno de 3 a 4mm, consistência cremosa, com confirmação através de seu desenvolvimento em meio de cultura Ágar Sangue e por apresentar reação positiva no teste de catalase, a partir da reação: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.^{52, 53}

Já a bactéria *Bacillus subtilis*, detectada na amostra 7, apresenta uma diferenciação observada em placas com maior tempo de cultivo, sendo que as

colônias se apresentaram com características rugosas e mais secas, acabando por incrustar no ágar.^{52, 53}

As amostras 3, 4, 6, 8 e 9 apresentaram colônias de *Flavobacterium* sp, que geralmente se apresentam em colônias arredondadas de coloração alaranjada com característica de bactérias gram-negativas e por decompor diversos polissacarídeos, com exceção da celulose.⁵⁴

Colônias com coloração alaranjada e aspecto cremoso foram encontradas nas amostras 3 e 8, onde após a realização dos testes específicos pode-se identificar a bactéria *Micrococcus* sp. Os testes realizados para a identificação do microrganismo tiveram como resultados: teste de catalase positivo, análise de motilidade negativa e teste de oxidase positiva na coloração de Gram.⁵⁵

Já na amostra 5, foi detectado um microrganismo com odor característico e colônias circulares e lisas com coloração esverdeada. Após o teste de lactose com resultado negativo, prova de indol negativa e a detecção de hemólise quando cultivado em meio Ágar sangue, pode-se concluir que a bactéria em questão é *Pseudomonas* sp.⁵⁶

Em relação aos fungos encontrados nas amostras, *Aspergillus niger* foi um microrganismo encontrado em quase todas as amostras com exceção da amostra 7. Apresentando-se como colônias filamentosas e granulosas de coloração preta no anverso, o reverso tem coloração castanha. Já a análise microscópica, o microrganismo tem como características ser um fungo filamentoso septado e hialino e seus conídios com disposição radiada.⁴⁴

Outro microrganismo encontrado em diversas amostras foi o *Aspergillus fumigatus*, identificado nas amostras 3, 4, 5 e 8, sendo observado colônias filamentosas e granulosas com coloração cinza no anverso e com reverso de cor castanha. Esse fungo é comumente encontrado em combustíveis. Na análise microscópica, foi possível verificar a presença de hifas septadas e conidióforos característicos.^{44, 57}

Nas amostras 3 e 6 foram identificadas colônias do fungo *Candida* sp, caracterizado por colônias leveduriforme de coloração branca e algumas vezes bege no anverso com seu reverso na coloração incolor, além do aspecto liso e

cremoso quando desenvolvido em Ágar Sabouraud. No teste de coloração de Gram, esse fungo apresenta-se corado positivamente e na análise no meio diferencial cromogênico (CHROMagar) quando incubado a 37 °C por um período de 48 h, observa-se o desenvolvimento de colônias de coloração branca, diferentemente do resultado obtido na amostra 10 que teve o desenvolvimento de colônias com coloração rosa, identificando o microrganismo como *Candida krusei*, que apresentou-se no Ágar Sabouraud com colônias mais foscas quando comparadas com as colônias de *Candida* sp.^{58, 59, 60}

Na amostra 5, foram observadas colônias com características de coloração coral no anverso e reverso, além de apresentarem-se pregueadas. Ao realizar a avaliação microscópica, foi possível avaliar a ausência de hifas e balistoconídio na estrutura do fungo, concluindo-se tratar de fungo *Rodhotorula* sp.⁶¹

Já o microrganismo *Phialophora* sp foi identificado na amostra 7, apresentando-se por colônias de coloração inicialmente cinza e transformando-se em marrom com o passar do tempo. Na análise microscópica, pode-se observar a presença de diversos conídios unicelulares aglomerados e fiálides em formas cilíndricas.⁶²

A amostra 9 apresentou além do fungo *Aspergillus niger*, o microrganismo com colônias filamentosas e algodonosas de coloração esbranquiçada identificado como *Trichophyton* sp.⁴⁴

Mediante todas as características necessárias para um desenvolvimento microbiológico ideal é necessário que os fungos e bactérias utilizem, dentre outras fontes, o carbono presente nos combustíveis para que a contaminação ocorra. Essa contaminação é provocada, geralmente, por microrganismos largamente encontrados em ambientes como solo, ar e água.²⁷

Muitos estudos já foram realizados e muitas espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras já foram isoladas dos combustíveis, demonstrando sua capacidade de desenvolvimento nos sistemas de armazenamento.^{27,31}

Dentre os microrganismos isolados, foram identificadas algumas bactérias, como espécies dos gêneros: *Acinetobacter*, *Actinomycetes*, *Bacillus*,

Enterobacter, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, dentre outras. Dentre as leveduras, foram identificadas: *Aureobasidium*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*. Já os gêneros de fungos filamentosos mais comumente isolados foram: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Trichoderma*, *Trichosporon* e *Ulocladium*.^{4,30,31}

Após as identificações dos microrganismos presentes nas amostras, pode-se concluir que os fungos e bactérias desenvolvidos já foram citados e estudados em diversos casos e artigos sobre a contaminação microbiológica de combustíveis. ^{4, 23, 25, 27, 30, 31, 34, 37, 63}

5.2. Ensaio microbiológicos

As substâncias usadas nos testes de perfuração em ágar e microdiluição foram cedidas por integrantes do Laboratório de Materiais e Combustíveis e por outros parceiros. Por isso, sua rota de obtenção e maiores detalhes não serão descritos neste trabalho, uma vez que, a finalidade é avaliar a ação biocida de compostos que possam ser utilizados como futuros aditivos.

Cabe ressaltar que todos os compostos em estudo passaram por análises físico-químicas, pois uma desvantagem de alguns aditivos é modificar parâmetros físico-químicos dos combustíveis e afetando sua qualidade. As substâncias avaliadas não alteraram as características dos combustíveis, sendo então possível sua futura utilização para tal finalidade.

Tabela 4: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de EMAGHIM para cepas fúngicas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de EMAGHIM nas blendas										
Fungos	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>C.krusei</i>	-	-	-	11,0	12,0	12,0	13,0	13,0	16,3	14,6
<i>C.parapsilosis</i>	-	-	-	-	12,5	16,5	16,3	26,0	26,0	35,0
<i>C.albicans</i>	-	-	-	15,5	15,0	15,2	20,0	18,0	17,5	26,5
<i>A. niger</i>	-	-	-	12,5	13,0	15,2	15,5	16,0	20,0	24,3
<i>A. fumigattus</i>	-	-	-	13,4	13,5	14,0	14,5	15,0	18,3	23,5
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	14,2	15,5	16,2	16,8	17,3

Tabela 5: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de EMAGHIM para cepas bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de EMAGHIM nas blendas										
Bactérias	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	12,0	14,5	16,5	16,0	17,0
<i>B subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	13,0	13,5	14,4	15,8
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	11,0	11,3	12,5	14,6	15,3

Os testes apresentaram ótimos resultados, sendo considerados susceptíveis valores de halos de inibição maiores que 10mm. Ao avaliar as placas contaminadas com fungos, os resultados já aparecem nas blendas de 0,75% de EMAGHIM, com menor halo de 11,0 mm, sendo que os resultados foram tão promissores que a blenda de 100% da molécula atingiu halos de 35,0 mm. Todos os fungos avaliados foram inibidos pela substância estudada.

Já quando são analisados os resultados com as cepas bacterianas, os resultados foram menos efetivos, onde a inibição foi iniciada com 5% de EMAGHIM, em que houve o surgimento do maior halo na blenda 100% com o tamanho de 17,0 mm, concluindo que a molécula apresenta atividade fungicida

mais eficiente do que a ação bactericida.

No teste de susceptibilidade fúngica, onde são obtidas as concentrações inibitórias mínimas, as blendas que apresentaram ação antimicrobiana no teste de perfuração em ágar foram selecionadas para tal. Nessa análise, considerou-se ativas as blendas que apresentaram $CIM \leq 256 \mu\text{g/mL}$. Na tabela 6, é possível observar as concentrações que demonstram a susceptibilidade dos fungos avaliados nas diferentes concentrações da molécula.

Tabela 6: CIM das blendas de EMAGHIM na análise de susceptibilidade fúngica.

Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$							
Fungos	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>C.krusei</i>	512	512	512	256	256	128	128
<i>C.parapsilosis</i>	-	512	512	512	512	512	512
<i>C.albicans</i>	512	256	256	256	256	256	256
<i>A. niger</i>	512	256	256	256	256	128	64
<i>A. fumigatus</i>	256	256	128	128	128	128	64
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	512	512	256	256	256

Ao avaliar os resultados, pode-se observar boa atividade já a partir da blenda de 0,75% de EMAGHIM. Ressalta-se que a molécula apresentou melhor ação biocida para o fungo *Aspergillus fumigatus*, onde menores concentrações já demonstraram efetiva atividade.

As análises de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima das cepas bacterianas podem ser avaliadas na tabela 7:

Tabela 7: CIM das blendas de EMAGHIM na análise de susceptibilidade bacteriana.

Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL					
Bactérias	5%	10%	25%	50%	100%
<i>E. coli</i>	512	512	512	512	256
<i>B. subtilis</i>	-	512	512	256	256
<i>S. aureus</i>	512	512	512	256	256

A susceptibilidade bacteriana apresentou perfil semelhante à fúngica, onde os melhores resultados foram obtidos nas blendas de 100% de EMAGHIM.

5.2.2. Teste da atividade biocida dos produtos de aminólise/abertura de EMAGE.

Dois substâncias foram obtidas a partir da molécula inicial (EMAGE) como produtos das reações de aminólise/abertura realizada a temperatura ambiente por 24 h e aminólise/abertura a 120 °C por 4 h, como observadas nas figuras 19 e 20.

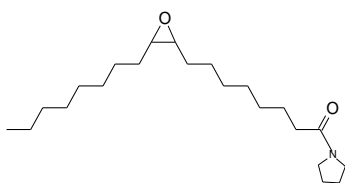


Figura 19: Fórmula estrutural do produto final da reação de aminólise/abertura realizada a temperatura ambiente por 24 h.

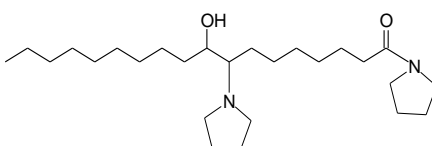


Figura 20: Fórmula estrutural do produto final da reação de aminólise/abertura realizada a 120 °C por 4 h.

Foram realizados os testes de perfuração em ágar para tais moléculas em sua forma pura (100%) de maneira preliminar para confirmação de possível atividade antimicrobiana, com os seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Acinetobacter* sp e *Bacillus subtilis*. Importante ressaltar que o prosseguimento das análises está em andamento com as blendas dissolvidas em biodiesel, diesel S10, diesel S500 e diesel S1800 nas diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50% e 100%).

Os resultados obtidos, relacionados na tabela 8, demonstram o grande potencial biocida em sua concentração 100%, até mesmo comparadas com a molécula EMAGHIM, formando halos de inibição maiores que esta última. Ao comparar o produto da reação a 120 °C com àquela realizada a 50 °C, a primeira apresenta melhor atividade antimicrobiana e isso pode estar diretamente relacionado ao maior número de grupos nitrogenados compondo a molécula.

Tabela 8: Resultados para os testes de perfuração em ágar dos produtos de aminólise/ abertura de EMAGE.

Tamanho do halo (mm) em função da amostra na concentração 100%		
Microrganismo	TA 24 h*	120 °C 4 h
<i>Aspergillus niger</i>	30,0	32,0
<i>Fusarium solani</i>	29,0	33,0
<i>Acinetobacter</i> sp	32,0	33,0
<i>Bacillus subtilis</i>	27,0	29,5

*TA = temperatura ambiente

5.2.3. Testes da atividade biocida utilizando Bio-óleo CuAc 380 °C.

As blendas do bio-óleo CuAc 380 °C foram preparadas usando como matriz os diferentes tipos de diesel (S10, S500 e S1800) nas concentrações de 0,25 %; 0,5 %, 0,75%; 1%, 5%, 10%, 25%; 50% e 100%. Os fungos utilizados

para o teste de perfuração foram: *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*. As cepas bacterianas do teste em questão foram: *Acinetobacter* sp e *Bacillus subtilis*. Os resultados obtidos a partir do teste de perfuração em ágar nas blendas com diesel S10 são encontrados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de CuAc 380 °C com Diesel S10 para cepas fúngicas e bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de CuAc 380 °C nas blendas de Diesel S10										
Microrganismo	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	11,0	13,0	14,0	15,0	18,0	24,0	25,0
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-	11,5	12,0	14,0	15,5	19,0	20,5
<i>Acinetobacter</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,0
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	22,0	25,0	18,0

Ao avaliar os resultados, verifica-se que as blendas dissolvidas em diesel S10 apresentaram boa atividade antifúngica já a partir da blenda de 0,75% para a cepa de *Aspergillus niger* e para a blenda de 1% no caso do fungo *Fusarium solani*. A molécula também apresentou ação biocida para as bactérias analisadas, porém, com em blendas de maior concentração, somente a blenda de 100% para *Acinetobacter* sp e 25% para a cepa de *Bacillus subtilis*.

As blendas da amostra CuAc 380 °C dissolvidas em diesel S500 apresentaram os seguintes valores de halos de inibição relacionados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de CuAc 380 °C com Diesel S500 para cepas fúngicas e bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de CuAc 380 °C nas blendas de Diesel S500										
Microrganismo	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	13,0	25,5	30,0	39,0
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-	-	-	12,5	23,0	28,5	38,0
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	-	-	-	10,0	21,0	29,0	35,5
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	17,0	23,0	29,5	39,0

Quando são avaliados os halos de inibição formados frente às blendas de CuAc 380 °C com Diesel S500, observa-se boa atividade em inibir todos os microrganismos a partir da concentração de 10%, com melhor ação biocida nas cepas da bactéria *Bacillus subtilis* onde formaram-se os maiores halos de inibição, atingindo um diâmetro de 39,0 mm na substância concentrada em 100%.

A tabela 11 apresenta os resultados do teste de perfuração em ágar para as blendas de CuAc 380 °C em diesel S1800, tanto para fungos quanto para bactérias.

Tabela 11: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de CuAc 380 °C com Diesel S1800 para cepas fúngicas e bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de CuAc 380 °C nas blendas de Diesel S1800										
Microrganismo	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	17,0	25,0	32,0
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	16,5	23,5	29,5
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	17,0	25,0	26,0
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	17,0	25,5	32,5

O teste de perfuração em ágar para blendas de CuAc 380 °C com Diesel S1800 mostrou boa atividade biocida a partir das blendas de 25% para todos os microrganismos, formando halos de 17,0 mm para *Aspergillus niger*, *Acinetobacter* sp e *Bacillus subtilis* e de 16,5 mm para a cepa de *Fusarium solani*. Já nas maiores concentrações (100% da amostra), maiores halos de inibição foram estabelecidos com diâmetro de 32,5 mm para a cepa bacteriana do *Bacillus subtilis*.

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que a molécula CuAc 380 °C possui ação antimicrobiana efetiva nas diferentes amostras de diesel em análise (S10, S500 e S1800), principalmente em blendas S10 que demonstram halos de inibição já a partir de 0,75% da amostra para cepas fúngicas de *Aspergillus niger* e 1% para *Fusarium solani*.

5.2.4. Testes da atividade biocida utilizando Biodiesel de *Sterculia Striata* puro 100%.

A molécula usada no teste de perfuração em ágar foi o Biodiesel de *Sterculia Striata*(Chichá) em sua concentração pura (100%). Na figura 21, podemos observar a estrutura molecular da substância.

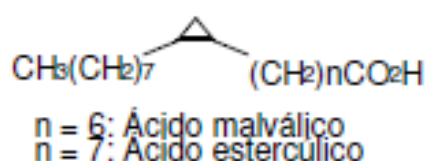


Figura 21: Estrutura molecular do Biodiesel de *Sterculia Striata*.

Fonte: Mangas *et al*; 2012.⁶⁴

A amostra de Biodiesel de *Sterculia Striata* foi avaliada em sua concentração de 100% e os microrganismos usados no teste de perfuração foram: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporum canis*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Staphylococcus aureus e *Trichophyton rubrum*. Os resultados do teste podem ser avaliados na tabela 12.

Tabela 12: Resultados do teste de perfuração em ágar da amostra de Biodiesel de *Sterculia Striata* para cepas fúngicas e bacterianas.

Tamanho do halo (mm) em função da amostra de Biodiesel de <i>Sterculia Striata</i> puro na concentração 100%	
Microrganismo	Média dos Halos
<i>Candida albicans</i>	16,0
<i>Candida krusei</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	20,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Microsporum canis</i>	10,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,0
<i>Trichophyton rubrum</i>	-

O biodiesel em análise testado em sua concentração 100% apresentou ação biocida somente com os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com halos médios não muito expressivos, por este motivo, foi descartado para o uso antimicrobiano. Já que para sua utilização como aditivo, o mesmo seria em pequenas concentrações, no qual não se mostrou ativo.

5.2.5. Testes da atividade biocida utilizando Biodiesel de Chichá amidado com Biodiesel.

A molécula em análise foi o Biodiesel de Chichá amidado em diferentes concentrações. Na figura 22, podemos observar a estrutura molecular da substância utilizada no teste de perfuração em ágar.

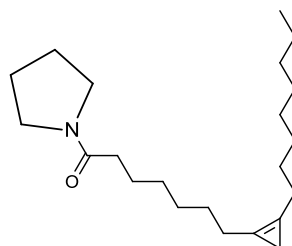


Figura 22: Estrutura molecular do Biodiesel de Chichá amidado.

As blendas de biodiesel de Chichá amidado foram dissolvidas em biodiesel de soja para atingir as seguintes concentrações: 0,25 %; 0,5 %, 0,75%; 1%, 5%, 10%, 25%; 50% e 100%. As cepas de fungos e bactérias usadas na análise foram: *Acinetobacter sp*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Fusarium solani*. Os resultados do teste de perfuração em ágar das blendas estão relacionados na tabela 13.

Tabela 13: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas de Biodiesel de Chichá amidado para cepas fúngicas e bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de Biodiesel de Chichá amidado com Biodiesel										
Microrganismo	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,5
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	12,5	14,5	11,5	25	30
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ao avaliar os resultados obtidos nas blends de biodiesel de Chichá amidado, não foram observados boa atividade biocida para a maioria dos microrganismos, sendo ativo somente para *Aspergillus niger* em blenda de 100% da amostra, *Candida krusei* na concentração de 50% do biodiesel de Chichá amidado e o melhor resultado para as cepas de *Candida parapsilosis* onde houve inibição do fungo a partir da blenda de 5%.

Dessa forma, o biodiesel em questão não se mostra efetivo para sua utilização como biocida, uma vez que a contaminação microbiológica apresenta normalmente mais de um microrganismo no combustível e um eficiente agente antimicrobiano apresenta um amplo espectro de ação.

5.2.6. Testes da atividade biocida utilizando Bio-óleo, Biocida, Craqueado e Resíduo de uma indústria de latas.

As substâncias avaliadas têm como estrutura base hidrocarbonetos de cadeia longa, ésteres e aminas, onde o composto mais complexo é o resíduo, composto por Zinc Alkenyl Carboxamide, Ácido Fosforoditóico, C1-14-Alquil Ester, Sal De Zinco(2:1) (ZDDP), 2-Piridinetiol-1-óxido, Sal de sódio, Hexahidro-1,3,5-trietil-S-triazina, Destilados (petróleo), naftênicos pesados, Éster de ácido esteárico, Éster de ácido graxos e Fosfato tris (2-etil-hexil).

As amostras de bio-óleo, biocida, craqueado e resíduo foram testados em seu estado puro: na concentração de 100%. As cepas de fungos e bactérias da análise foram: *Acinetobacter* sp, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilise* *Fusarium solani*.

A tabela 14 apresenta os resultados do teste de perfuração para as amostras de bio-óleo, biocida, craqueado e resíduo na concentração de 100% para avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana.

Tabela 14: Resultados do teste de perfuração em ágar das amostras de Bio-óleo, Biocida, Craqueado e Resíduo para cepas fúngicas e bacterianas.

Tamanho do halo (mm) em função das diferentes moléculas testadas na concentração 100%				
Microrganismo	Bio-óleo	Biocida	Craqueado	Resíduo
<i>Aspergillus niger</i>	30,0	Toda a placa	Toda a placa	-
<i>Fusarium solani</i>	29,0	Toda a placa	Toda a placa	-
<i>Acinetobacter sp</i>	37,5	62,0	58,0	-
<i>Bacillus subtilis</i>	19,0	Toda a placa	Toda a placa	-

As substâncias analisadas apresentaram uma eficiente ação biocida, exceto a amostra denominada resíduo, a qual não obteve resultado antimicrobiano diante de nenhum dos microrganismos utilizados.

A partir dos resultados, pode-se observar que o bio-óleo mostrou a menor atividade biocida quando comparado com as amostras de biocida e craqueado, na concentração de 100%. Para a análise das placas com os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, tanto o biocida quanto o craqueado mostraram completa inibição, como também no caso da cepa de *Bacillus subtilis*. Enquanto isso, para a bactéria *Acinetobacter sp*, os halos de inibição atingiram 62,0 mm para o biocida e 58,0 para o craqueado.

Com base nos valores de halos de inibição obtidos, as substâncias de bio-óleo, biocida e craqueado demonstraram grande potencial para sua utilização como aditivo com função biocida para os combustíveis. Vale destacar que as análises com as blendas dissolvidas em diesel S10, diesel S500 e diesel S1800 nas diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50% e 100%) estão em andamento.

5.2.7. Testes da atividade biocida utilizando nitro-compostos

Em parceria com o Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ-UFRJ), uma amostra foi enviada para a realização do teste de

perfuração em ágar para avaliação de sua potencial atividade antimicrobiana. A fórmula estrutural pode ser observada na figura 23.

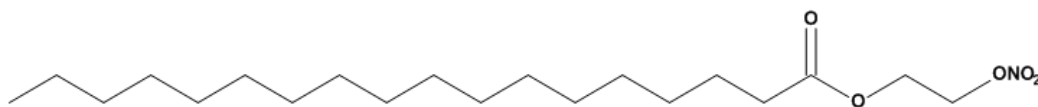


Figura 23: Fórmula estrutural utilizada na análise de atividade antimicrobiana.

As blendas da amostra foram preparadas com biodiesel de soja nas concentrações de 0,25 %; 0,5 %, 1%, 2,5%, 5%, 10, 25% e 50%. Os microrganismos usados para a análise foram: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorila glutinis*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas sp*. Os resultados dos testes de perfuração em ágar podem ser analisados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas para cepas fúngicas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de amostra nas blendas de Biodiesel de Soja										
Microrganismo	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	13,0	13,5	14,0
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	13,0	13,3	15,0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 16: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas para cepas bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de amostra nas blendas de Biodiesel de Soja										
Microrganismo	0%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A partir dos resultados, pode-se observar que somente as blendas de 25% e 50% da molécula apresentaram atividade para os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*. Não houve atividade das blendas para as demais cepas de microrganismos, dessa maneira, não se torna uma boa opção para seu uso como biocida nos combustíveis.

5.2.8. Testes da atividade biocida utilizando amidas graxas obtidas a partir de óleo de soja.

A partir do óleo de soja que contém em sua composição os ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico, foram produzidas amidas graxas a partir de uma reação de aminólise usando líquido iônico como catalisador. Os produtos da reação podem ser observados na figura 24.

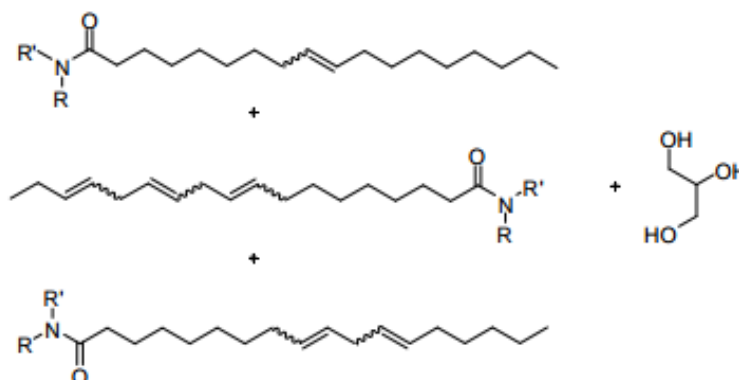


Figura 24: Obtenção de amidas graxas a partir da reação de aminólise de óleo de soja.
Fonte: Oliveira, V. M., 2011.⁶⁵

As amidas graxas foram submetidas ao teste de perfuração em ágar e as cepas utilizadas foram: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporium canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton rubrum*.

As blendas das amostras obtidas a partir do óleo de soja foram dissolvidas em biodiesel nas concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 25%, 50% e 100%. Os resultados foram disponibilizados nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas das amidas graxas para cepas fúngicas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de amostra nas blendas de Biodiesel								
Microrganismo	0%	1%	3%	5%	10%	25%	50%	100%
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	10,0	10,0	16,0
<i>Microsporium canis</i>	-	-	-	-	-	-	-	15,0
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	19,0

Tabela 18: Resultados do teste de perfuração em ágar das blendas das amidas graxas para cepas bacterianas.

Tamanho dos halos (mm) em função da porcentagem de amostra nas blendas de Biodiesel									
Microrganismo	0%	1%	3%	5%	10%	25%	50%	100%	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	13	-	21	-	-	19	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	17	15	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	

Ao avaliar a atividade biocida das amidas graxas, houve melhor ação antifúngica para *Candida albicans* com halo de inibição a partir da concentração de 25%, porém, também apresentando resultados para *Microsporium canis* e *Trichophyton rubrum* na concentração de 100%.

Já para as cepas bacterianas, duas delas foram inibidas por blendas da amostra. Para a bactéria *Escherichia coli*, houve atividade nas concentrações de 3%, 10% e 100%. As blendas de 50 e 100% apresentaram ação biocida para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com halos de 17 e 15 mm, respectivamente.

Os resultados obtidos mostram que o produto da aminólise pode ser uma promissora opção para o uso como aditivo, baseando-se na atividade antimicrobiana da amostra.

A partir dos resultados apresentados, pode-se verificar diferentes moléculas com ação antimicrobiana e ótimas opções para sua utilização como aditivos dos combustíveis, uma vez que, como já foi relatado, tais substâncias não alteram as propriedades físico-químicas do diesel e biodiesel, podendo ser usadas sem prejudicar o funcionamento dos equipamentos e veículos. É válido ressaltar que as moléculas compostas por aminas e iminas mostraram as melhores atividades fungicidas e biocidas.

Porém, é importante salientar que um bom meio para evitar a contaminação microbiológica é a prevenção. Faz-se necessário que sejam efetivas as boas práticas de produção, transporte e armazenamento dos combustíveis, pois são imprescindíveis na manutenção das características, prevenção do desenvolvimento microbiológico e da qualidade dos mesmos, sendo o melhor meio para que se evite problemas como: corrosão de tanques, saturação de filtros, desgaste de bicos injetores, tal como o comprometimento do bom funcionamento de veículos e máquinas, dentre outros.^{38, 39}

No cotidiano a realidade é completamente diferente, onde os combustíveis são muitas vezes transportados em caminhões com tanques sujos e enferrujados e armazenados em poços já contaminados, com água de lastro, em contato com as condições adversas do ambiente; sem a realização de uma limpeza periódica dos tanques, dentre outras condições que divergem com o quadro que deveria ser padrão, acarretando em combustíveis contaminados e alterados.^{38, 39, 40}

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. Conclusões e Perspectivas

Os combustíveis comercializados no Distrito Federal apresentam, como já era esperado, o desenvolvimento microbiológico em seu conteúdo de maneira efetiva. Os microrganismos mais comumente encontrados nas amostras coletadas estão de acordo com trabalhos que realizaram identificações de fungos e bactérias nos mais diversificados locais de amostragem. Os gêneros mais presentes na análise em questão foram: *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*.

A contaminação microbiológica é uma realidade preocupante, principalmente quando relacionada aos combustíveis, devido as grandes consequências provocadas como bloqueio de tubos e mangueiras, corrosão de tanques de armazenamento, dentre outras, que acabam afetando o rendimento de veículos e máquinas.

Diante dessa realidade, faz-se necessária a obtenção de substâncias biocidas que ajam nesses microrganismos ambientais que crescem nos combustíveis para a efetiva redução da contaminação e, conseqüentemente, dos problemas acarretados por ela.

Diversas substâncias apresentaram boa ação biocida como foi possível constatar neste trabalho, principalmente aquelas compostas por grupos nitrogenados que demonstraram ter amplo espectro na inibição do desenvolvimento de fungos e bactérias nos combustíveis. Ao avaliar as substâncias testadas, pode-se observar melhores resultados com o éster metílico de ácido graxo hidroiminometilado (EMAGHIM) e os produtos das reações de aminólise/abertura realizada a temperatura ambiente por 24 h e aminólise/abertura a 120 °C por 4 h a partir da molécula inicial (EMAGE), além de resultados relevantes com o bio-óleo CuAc 380 °C principalmente em blendas S10, que apresentaram atividade a partir de 0,75% da amostra para algumas cepas fúngica analisadas. Também puderam ser observados resultados promissores quando testadas as amidas graxas e bio-óleo, biocida e craqueado da indústria de latas.

Porém, a mesma atividade biocida não foi constatada para o Biodiesel de *Sterculia Striata* e Biodiesel de Chichá amidado, além dos nitrocompostos de parceria com IQ-UFRJ.

Frente aos resultados obtidos, pode-se concluir que as substâncias compostas por aminas e iminas apresentaram os melhores resultados, diretamente relacionados aos grupamentos nitrogenados das moléculas que atuam ativamente como fungicidas e bactericidas.

Cabe ressaltar que todas as moléculas em questão não resultaram em alteração das propriedades físico-químicas dos combustíveis ao serem utilizados como aditivos.

REFERÊNCIAS

7. Referências

- [1] Guedes, C.L.B.; Adão, D.C.; Quessada, T.P.; Borsato, D.; Galão, O.F.; Mauro, E.; Pérez, J.M.M.; Rocha, J.D. Avaliação de biocombustível derivado do bio-óleo obtido por pirólise rápida de biomassa lignocelulósica como aditivo para gasolina. *Química Nova*, São Paulo. **2010**, vol. 33, n. 4.
- [2] Goldemberg, J.; Lucon, O. *Energia, meio ambiente e desenvolvimento*. Editora da Universidade de São Paulo, **2008**.
- [3] Goldemberg, J. Biomassa e energia. *Química Nova*, São Paulo. **2009**, vol. 32, n. 3.
- [4] Gaylarde, C.C.; Bento, F.M.; Kelley, J. Microbial Contamination of Stored Hydrocarbon Fuels and its Control. *Revista de Microbiologia*. **1999**, vol. 30, pp. 1-10.
- [5] Pedley, J. F.; Hiley, R. W.; Hancock, R. A. Storage stability of petroleum derived diesel fuel – 1. Analysis of sediment produced during the ambient storage of diesel fuel. *Fuel*. **1987**, vol. 66, pp. 1646-1651.
- [6] Ramos, J.M. *et al.* Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*. **2009**, vol. 100, n. 1, pp. 261-268.
- [7] Souza, C. D. R.; Chaar, J. S.; Souza, R. C. R.; Jeffreys, M. F.; Souza, K. S.; Costa, E. J. C.; Santos, J. C.. Caracterização físico-química das misturas binárias de biodiesel e diesel comercializados no Amazonas. *Acta Amazonica*. **2009**, vol. 39(2), pp. 383 – 388.
- [8] Bucker, F. Biodeterioração de Misturas de Diesel e Biodiesel e seu Controle com Biocidas. 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. **2009**.
- [9] Oliveira, F.C.C.; Suarez, P.A.Z.; Santos, W.L.P. Biodiesel: Possibilidades e Desafios. *Química Nova na Escola*. **2008**, n. 28.

- [10] Shahid, E.M., Jamal, Y. A review of biodiesel as vehicular fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2008**, vol.12, pp. 2484–2494.
- [11] Bizzo, W.A. *Combustíveis. Geração, Distribuição e Utilização de Vapor*. **2003**, cap.2, pp. 18-40.
- [12] Vieira, E. *Cuidados no transporte, armazenamento e uso do Biodiesel B5*. Rio de Janeiro. **2010**.
- [13] Schaberg, P..Application of Synthetic Diesel Fuels. 11th Diesel Engine Emissions Reduction Conference, Chicago, August 21-25, 2005. Disponível em:
<http://www1.eere.energy.gov/vehiclesandfuels/pdfs/deer_2005/panel1/2005_deer_schaberg.pdf>. Acesso em 15 de Maio de 2014.
- [14] Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/definicao/o-que-e-biodiesel.htm>>. Acesso em 10 de Setembro de 2014.
- [15] Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis (ANP), *Estudo sobre as especificações internacionais para os biocombustíveis*. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 14 de Maio de 2014.
- [16] Karavalakis, G.; Stournas, S.; Karonis, D. Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Fuel*. **2010**, vol. 89, pp. 2483-2489.
- [17] PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel: Governo do Brasil. *Biodiesel: O novo Combustível do Brasil*. **2003**. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 15 de novembro de 2014.
- [18] Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nº 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. Poder Legislativo, Senado, Brasília, DF, **2006**.
- [19] Lôbo, I. P., Ferreira, S.L.C. & Cruz, R. S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*. **2009**, vol. 32(6), pp. 1596- 1608.
- [20] Singh, S. P.; Singh, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters s the substitute of diesel:

- A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. **2010**, vol. 14, pp. 200-216.
- [21] Yemashova, A.N.; Murygina, V.P.; Zhukov, D.V.; Zakharyants, A.A.; Gladchenko, M.A.; Appanna, V.; Kalyuzhnyi, S.V. Science and Biotechnology. **2007**, vol. 6(4), pp. 315.
- [22] Rios, J.L.; Recio, M.C.; Villar, A. Journal of Ethnopharmacology, **1988**, 23,127.
- [23] Sharma, Y. C.; Singh, B.; Upadhyay, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. Fuel. **2008**, vol. 87, n. 12, pp. 2355-2373.
- [24] Jain, S.; Sharma, M. P. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. Renewable and Sustainable Energy Reviews. **2010**, vol. 14, n. 2, pp. 1937-1947.
- [25] Aguiar, R. T. Avaliação física, química e microbiológica do diesel, biodiesel e suas misturas durante a logística de distribuição. 2013. 75f. Tese (Mestrado em Química)- Universidade Federal da Paraíba, Paraíba. **2013**.
- [26] Borsato, D.; Moreira, I.; Pinto, J.P.; Moreira, M.B.; Nobrega, M.M.; Constantino, L.V. Análise físico-química de diesel interior em mistura com biodiesel. Acta Scientiarum. Technology. **2010**, vol. 32, n. 2, pp. 187-192.
- [27] Passman, F. J. Ed . "Manual 47 - Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control." ASTM International. **2003**, 114 p.
- [28] Gutheil, N.G. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries em querosene de aviação no Brasil. Boletim n. 9, Instituto Tecnológico do RS, Porto Alegre, **1966**.
- [29] Hendey, N.I. Some observations on *Cladosporium resinae* as fuel contaminant and its possible role in the corrosion of aluminum alloy fuel tanks. Transactions of the British Mycological Society, London. **1964**, vol. 47, pp. 467-475.
- [30] Schultz, F.M. Avaliação de Microrganismos com Potencial de Degradação de Diesel e Biodiesel. 2010. 137f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola

e do Ambiente)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. **2010**.

- [31] Zimmer, A.R.; Cazarolli, J.; Teixeira, R. M.; Viscardi, S.L.C. ; Cavalcanti, E. S. H.; Gerbase,A.;Ferrão,M.F; Piatnick, C.M.S.; Bento, F.M. Monitoring Of Effectivity Of Biocides During Storage Simulation Of Diesel (B0), Biodiesel (B100) And Blends (B7 And B10). **2011**. The 12th International Conference On Stability, Handling And Use Of Liquid Fuels.
- [32] Resolução ANP Nº 65, de 9/12/2011, Diário Oficial da União, 12/12/2011.
- [33]Chapelle, F.H. Ground-water Microbiology and Geochemistry. 2ª ed. **2001**. 477f.
- [34]Bento, F.M.; Gaylarde, C.C. International Biodeterioration & Biodegradation. **2001**, vol. 2, pp. 107.
- [35] Chung, Y.C. *etal*. Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. Fuel, Nottingham. **2000**, vol.79, n.12, pp. 1525-1532.
- [36]Ambrozin, A.R.P.; Kuri, S.E.; Monteiro, M.R. Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. Química Nova. **2009**, vol. 32, pp. 1910-1916.
- [37]Neihof, R.; May, M. Microbial and Particulate Contamination in Fuel Tanks on Naval Ships. International Biodeterioration Bulletin, London. **1983**, vol. 19, n. 2, pp. 59-68.
- [38] Bento, F.M. Biocorrosão do Aço ASTM A283-93 em Sistemas Diesel Água e o Efeito de um Biocida. 2001. 192f. Tese(Doutorado em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. **2001**.
- [39]Videla, H.A. Corrosão Microbiológica. Biotecnologia Editora. São Paulo. **1981**, vol.4, 65f.
- [40]Gaylarde, C.C. Desing, selection and use of biocides. In: Bioextraction and Biodeterioration of Metals. Cambridge: Cambridge University Press. **1995**, cap. 10 , pp. 327-361.

- [41] Regulamento Técnico ANP Nº 1, de 10/01/2007, Diário Oficial da União, 10/01/2007.
- [42] Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. Yeasts, Characteristics and Identification. Cambridge: Cambridge University Press. **2000**. 3ªed, 1139f.
- [43] Santos, L. F. Manual de Microbiologia Clínica. **2003**. 3. ed. João Pessoa: Editora Universitária / UFPB.
- [44] Oliveira, J. C. Atlas de Micologia Médica- Colônias. **2013**. Disponível em: <http://www.controllab.com.br/pdf/atlas_micologia_colonias.pdf>. Acesso em 20 de Junho de 2014.
- [45] Hajdenwurcel, J. R. Atlas de microbiologia de alimentos. **1998**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora. 66 f.
- [46] Lacaz, C. S.; Porto, E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. **1998**. São Paulo: Sarvier. 445 f.
- [47] Lacaz, C. S.; Porto, M. J. E. Micologia Médica. **1991**. 8ª Ed. São Paulo: Sarvier. 695 f.
- [48] Kurtzman. C. P.; Fell. J. W. The Yeasts Taxonomic Study. **1998**. 4ª Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- [49] Mac Faddin, J. F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. **1980**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- [50] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement CLSI document, **2011**, M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [51] Rodríguez-Rodríguez, C. E.; Rodríguez, E.; Blanco, R.; Cordero, I.; Segura, D. Fungal Contamination Of Stored Automobile-Fuels In A Tropical Environment Journal Of Environmental Sciences. **2010**. Vol. 22, pp. 1595-1601.
- [52] Wattiau, P.; Klee, S. R., Fretin, D.; Van Hessche, M.; Meynart, M.; Franz, T.; Chasseur, C.; Butaye, P.; Imberechts, H. A. Occurrence and genetic diversity

- of *Bacillus anthracis* strains isolated in an active wool-cleaning factory. **2008**. Appl. Environ. Microbiol., vol. 74, pp. 4005–4011.
- [53] Riva, O. N.; Sorokulova, I. B.; Smirnov, V. V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. **2001**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol. 51, pp. 1361-1371.
- [54] McBride, M. J.; Braun, T. F.; Brust, J. L. *Flavobacterium johnsoniae* GldH is a lipoprotein that is required for gliding motility and chitin utilization. Journal of Bacteriology - American Society for Microbiology. **2003**. Vol. 185, n. 22, pp. 6648-6657.
- [55] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária–Brasília: Anvisa. **2013**. 149f.
- [56] Torres, J. C. N.; Menezes, E. A.; Ângelo, M. R. F.; Oliveira, I. R.N.; Salviano, M. N. C.; Xavier, D. E.; Filho, L. S. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **2006**. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, vol. 42, n. 5, pp.313-319.
- [57] Dagenais, T. R. T.; Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. **2009**. Vol. 22(3), pp. 447–465.
- [58] Odds, F.C.; Bernaerts, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol.. **1994**. Vol.32, pp.1923-1929.
- [59] Costa, K. R. C.; Candido, R. C. Diagnóstico Laboratorial da Candidíase Oral. NewsLab. **2007**. Edição 83, pp.138-145.
- [60] Ziarrusta, G. B. Vulvovaginitis candidiásica. Rer. Iberoam Micol. **2002**. Vol. 19, pp. 22-24.
- [61] Fell, J.W.; Staszell-Tallman, A. *Rhodotorula* F. C. Harrison. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. editors: The Yeasts: a taxonomic study. **2000**. New York: Elsevier, pp. 800-27.
- [62] Abliz, P.; Fukushima, K.; Takizawa, K.; Nishimura, K. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit

ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. FEMS Immunol Med Microbiol. **2004**.Vol. 40(1), pp.41-49.

[63] Rogers, M.R.; Kaplan, M.A. Role of Microbial and Nonmicrobial Contaminants in Diesel-fueled Vehicle Malfunctions. Development in Industrial Microbiology. **1982**.Vol. 24, pp. 147-165.

[64]Mangas, M. B. P., Rocha, F. N., Suarez, P. A. Z., Meneghetti, S. M. P., Barbosa, D. C., Santos, R. B. Carvalho, S. H. V., Soletti, J. I.. Charaterization of biodiesel and bio-oil from *Sterculia striata* (chichá) oil.**2012**. Industrial Crops and Products, vol. 36, pp. 349-354.

[65]Oliveira, V. M.. Líquidos iônicos como meio na modificação de ésteres e ácidos (graxos) via aminólise catalítica e na síntese de nanopartículas magnéticas. 2011. 131f. Tese(Doutorado em Química). Universidade de Brasília, Distrito Federal. **2011**.