

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE  
DETERIOGÊNICA DO FUNGO *Penicillium  
simplicissimum* EM BIODIESEL**

THAIS LIVRAMENTO SILVA

Porto Alegre, RS  
2018

Thais Livramento Silva

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DETERIOGÊNICA DO FUNGO  
*Penicillium simplicissimum* EM BIODIESEL**

**Trabalho de Conclusão de Curso.  
Orientador (a): Dra. Fátima Menezes Bento**

**Locais de Execução do Trabalho:**

LABBIO Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis – ICBS- UFRGS  
Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química. – UFRGS  
Laboratório de Pesquisa e Análises Químicas, Instituto de Química - UFRGS

**Equipe participante:**

ProfªDrª Maria do Carmo RuaroPeralba  
Prof Dr. Marco Flôres Ferrão  
Doutoranda Camila Correa

Porto Alegre, RS  
2018

*“Estudar não é tudo,  
mas em certo ponto se torna a base de tudo.”*

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Emilson e Mara, por todo apoio e compreensão que tive desde o início do curso, em cada momento em que eu quis desistir e também a cada vitória. Por sempre me incentivarem a estudar e me ensinar que o estudo e o conhecimento é algo que ninguém pode te tirar. Aos meus irmãos, Emilson e Nicholas, que sempre me apoiaram quando precisei. Obrigada por estarem do meu lado e sempre me mostrarem o caminho.

A minha madrinha e primos que torceram por mim me acompanhando nessa caminhada.

A minha querida, professora e orientadora, Dra. Fátima Menezes Bento, por ter me acolhido e proporcionado essa oportunidade única de trabalhar na área que eu gosto.

Às minhas queridíssimas do LAB-BIO, Juciana, Gabriela e Mariane que me ensinaram muito sobre pesquisa e que continuam me ensinando, com toda paciência do mundo. Sempre dispostas a me ajudar e solucionar todas as minhas dúvidas. Obrigada de coração.

Aos professores e os alunos do Departamento de Química da UFRGS pela colaboração ao trabalho.

Aos professores da graduação que foram um incentivo para continuar o curso.

Às minhas colegas de graduação passaram por todas pelas mesmas dificuldades desde o início do curso que no final de tudo estarão se formando junto comigo.

Aos meus amigos que conheci pela internet, mesmo distante são vocês que me escutam nas dificuldades e me apoiam da melhor maneira possível

Ao GOT7, por me motivarem, aliviarem o meu estresse através de músicas maravilhosas e pelas risadas que me proporcionaram.

A mim por nunca ter descreditado no meu potencial, por seguir em frente mesmo com todas as dificuldades e por sempre acreditar.

Ao universo por ter conspirado a favor da minha formação colocando tudo em seu lugar, no seu devido tempo.

A UFRGS que sempre foi minha meta e que eu espero que ainda seja o meu segundo lar por alguns anos.

## RESUMO

### Avaliação da capacidade deteriorogênica do fungo *Penicillium simplicissimum* em biodiesel

O biodiesel é um importante biocombustível dentro da matriz energética brasileira pois é renovável, menos poluente e compatível com motores diesel. Porém, durante o armazenamento é mais suscetível à biodeterioração do que o diesel, tendo como consequência uma maior formação de sedimentos de origem biológica. A presença de água no lastro de tanques e a capacidade dos microrganismos de utilizar tanto o diesel quanto o biodiesel como fonte de carbono são condições importantes para o desenvolvimento microbiano. O objetivo desse trabalho é avaliar a capacidade deteriorogênica de um isolado do gênero *Penicillium* prospectado de resíduo de tanques de estocagem de biodiesel comercial aditivado com antioxidante de uma usina produtora de Biodiesel. A cada sete dias avaliou-se: formação de biomassa na interface óleo-água (gravimetria); detecção da produção de enzimas envolvidas na degradação de biodiesel por inoculação nos meios rodamina b e tributirina (lipase); produção de metabólitos pelo fungo através de medidas como o pH e tensão superficial; e a detecção da degradação das cadeias carbônicas do biodiesel realizada através da técnica de espectroscopia do infravermelho (IFTR) nos tempos iniciais e final. Foi constatado aumento de biomassa ao longo dos 28 dias de avaliação tendo seu maior valor no tempo final (28 dias) ( $372 \pm 64$  mg). A produção de lipase pelo fungo filamentososo foi identificada em todos os tempos. O pH apresentou redução estatística dos valores de 7,0 para  $6,4 \pm 0,16$  apenas aos 28 dias. A medida de tensão superficial da fase aquosa apresentou redução no início do experimento (7 dias), quando comparada ao meio mínimo mineral no tempo inicial, sem contato com biodiesel. Estes valores se mantiveram inalterados até o fim do experimento (28 dias), tanto para a condição com e sem o fungo, confirmando o efeito surfactante do biodiesel. A análise multivariada realizada sobre os dados de infravermelho na faixa de  $1800 - 800 \text{ cm}^{-1}$  sugeriu uma biodegradação dos ésteres presentes no biodiesel pelo fungo *Penicillium simplicissimum* após 28 dias de incubação, evidenciando a sua capacidade deteriorogênica em biodiesel puro.

**Palavras-chave:** biodegradação, biodiesel, *Penicillium simplicissimum*, fungo filamentososo.

## ABSTRACT

### Deteriogenic capacity evaluation of fungus *Penicillium simplicissimum* in biodiesel

Biodiesel is an important biofuel within the Brazilian energy matrix because it is renewable, less polluting and compatible with diesel engines. However, during storage is more susceptible to biodeterioration than diesel, resulting in a higher formation of sediments of biological origin. The presence of water in the ballast of tanks and the ability of microorganisms to use both diesel and biodiesel as a source of carbon are important conditions for microbial development. The objective of this work is to evaluate the deteriogenic capacity of an isolate of the genus *Penicillium* prospected of the residue of commercial biodiesel storage tanks with antioxidant from a biodiesel production plant. Every seven days it was evaluated: biomass formation at the oil-water interface (gravimetry); detection of production of enzymes involved in the degradation of biodiesel by inoculation in the media rhodamine b and tributyrin (lipase); production of metabolites by the fungus through measures such as pH and surface tension; and degradation of the carbonic chains from biodiesel realized by the technique of infrared spectroscopy (IFTR) in the initial and final times. An increase in biomass was observed over the 28 days of evaluation and its highest value in the final time (T28) ( $372 \pm 64$  mg). Lipase production by filamentous fungi was identified at all times. The pH presented a statistical reduction from 7.0 to  $6.4 \pm 0.16$  at 28 days. The surface tension measurement of the aqueous phase showed reduction at the beginning of the experiment (7 days), when compared to the minimal mineral medium in the initial time, without contact with biodiesel. These values remained unchanged until the end of the experiment (28 days), both for the condition with and without the fungus, confirming the surfactant effect of biodiesel. The multivariate analysis performed on infrared data in the 1800 - 800  $\text{cm}^{-1}$  range suggested a biodegradation of the esters present in the biodiesel by the fungus *Penicillium simplicissimum* after 28 days of incubation, evidencing its deteriogenic capacity in pure biodiesel.

**Keywords:** biodegradation, biodiesel, *Penicillium simplicissimum*, filamentous fungus.

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. HIPÓTESE.....	11
3. OBJETIVO.....	11
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. METODOLOGIA.....	12
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÕES.....	26
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

## 1. INTRODUÇÃO

As reservas de fontes não renováveis para a produção de combustíveis, como o petróleo, são limitadas. Entre as desvantagens no uso de combustíveis fósseis é importante destacar que durante sua combustão ocorre a liberação de compostos (CO, NOx e SOx) que tem impactos significativos sobre o meio ambiente (Kumar *et al.*, 2016). O aumento da produção e utilização de combustíveis, combinado à busca por benefícios ambientais, acelerou o desenvolvimento de uma nova geração de combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis, os biocombustíveis (Demirbas, 2017).

O biodiesel, é um biocombustível, que pode ser definido como uma mistura de mono alquil ésteres de cadeia longa, derivados de fontes renováveis, é obtido pela transesterificação (de óleo ou gordura) com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) e que, na presença de catalisadores tem sua eficiência e velocidade de reação aumentadas (Knothe & Razon, 2017). A fonte de ácido graxo utilizado para a produção de biodiesel pode ser proveniente das mais variadas matérias primas como: gordura vegetal, gordura animal e óleos residuais (Bento *et al.*, 2016).

No Brasil o biodiesel é um importante biocombustível dentro da matriz energética. A Lei 11.097/2005, aprovada em 13 de janeiro de 2005, que determinou a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao diesel de petróleo no Brasil. Com porcentagem atual de biodiesel adicionado ao diesel de 8% (B8), a Lei nº 13.23/2016 determinou um cronograma de aumento do teor de biodiesel a partir de 2017 (ANP, 2016). Em novembro, de 2017, foi aprovada pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) a antecipação para março de 2018, da mistura de 10% de biodiesel ao diesel (B10) (ANP, 2017). Dentre as diversas matérias primas utilizadas para sua produção, a soja representa aproximadamente 77,7% da produção brasileira, principalmente em virtude da capacidade de cultivo, potencial de aproveitamento e pela baixa viscosidade quando comparada às outras matérias-primas vegetais (Cavalett & Ortega, 2010; Macedo, 2013; ANP 2016).

Em 26 de dezembro de 2017 foi decretada a Lei n<sup>o</sup> 13.576 que cria a Política Nacional dos biocombustíveis, o RenovaBio. O RenovaBio visa contribuir com a redução e emissão de gases do efeito estufa, na produção, na comercialização e no uso de biocombustíveis, expandir o uso e a produção de biocombustíveis na matriz energética nacional, dando ênfase na regularidade do abastecimento de combustíveis e viabilizar a oferta de energia cada vez mais sustentável protegendo os interesses do consumidor quanto a preço, qualidade e oferta de produtos.

O biodiesel é uma eficiente e natural alternativa a combustíveis que tem sua produção a partir do petróleo, como o óleo diesel, pois apresenta muitas vantagens em seu uso (Chand, 2002; Knothe & Razon, 2017). Entre essas vantagens podemos citar: seguro para uso em todos os motores à diesel convencionais, oferece o mesmo desempenho e durabilidade que o combustível diesel de petróleo, não inflamável e não tóxico, reduz as emissões de fumaça visível, vapores e odores nocivos (Chand, 2002). No entanto, pode apresentar uma suscetibilidade à oxidação durante o armazenamento que é fortemente influenciada pela composição dos seus ácidos graxos provenientes da matéria prima. Os produtos das reações de oxidação degradam a qualidade, aumentam a acidez, viscosidade, e componentes insolúveis do biodiesel (Leonardo *et al.*, 2017). Sabe-se também que reações de hidrólises ocorrem dependendo da umidade do ambiente. A habilidade higroscópica do biodiesel contribui para que ele eleve seu teor de água apenas em entrar em contato com a umidade do ar (Gerpen *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2006). A água pode hidrolisar o biodiesel produzindo ácidos graxos e álcool que resulta em um aumento acidez do biodiesel (Silva *et al.*, 2017).

A biodegradabilidade do biodiesel pode ser considerada um fator positivo sob o ponto de vista de proteção ambiental, no entanto é um problema quando ocorre em sistemas de armazenamento de combustíveis (Allsopp *et al.*, 2016). Dentre as consequências diretas da contaminação microbiana destacam-se danos como entupimento de filtros e tubulações, desgastes prematuros do sistema de injeção e comprometimento da qualidade final do combustível (Bento *et al.*, 2016). A presença de água e a habilidade dos microrganismos de utilizar o biocombustível, como fonte de carbono são condições importantes para o crescimento microbiano e possível contaminação em tanques de armazenamento (Luz *et al.*, 2011).

Em um sistema de estocagem de combustível, é possível encontrar água presente em três formas distintas. A primeira delas é como água livre, denominada de água de lastro, encontrada decantada no fundo do tanque. A segunda é em pequenas quantidades dissolvida no próprio combustível e uma terceira forma considerada emulsionada, juntamente com o lodo biológico característico do crescimento microbiano quando presente (Hill & Hill, 2008; Passman, 2013). Como consequência da presença de microrganismos e de água, pode ocorrer o desenvolvimento microbiano, evidenciada pela presença de biomassa na interface combustível-água (Cazarolli *et al.*, 2014).

O controle da contaminação microbiana em tanques de armazenamento envolve tanto métodos físicos como métodos químicos e ambos visam assegurar a integridade do combustível. A remoção de água, através da drenagem, e a limpeza física regular são métodos físicos efetivos de controle, mas apresentam desvantagens, pois a localização dos tanques e seu formato podem dificultar a drenagem de água. Os biocidas são um grupo de produtos com componentes e estruturas químicas diversas. São utilizados como controle químico pois possuem a capacidade de matar ou inibir o crescimento microbiano e para seu emprego é importante obter conhecimento sobre a população alvo que se deseja eliminar, e também das condições de sistema para a garantia de eficácia do produto. A utilização de biocidas é bastante recomendada em países da Europa e nos Estados Unidos, no Brasil ainda não possui legislação (Bento *et al.*, 2016; Passman 2013).

O primeiro isolamento de microrganismo em tanques de combustível no Brasil ocorreu em 1966, com o querosene de aviação. O fungo *Cladosporium resinae* foi isolado de tanques de querosene por Gutheil e desde então muitos outros microrganismos foram isolados. Estudos posteriores demonstraram que a adição de biodiesel ao diesel nas proporções de 5% (B5), 7% (B7) e 100% (B100) faz com que os combustíveis sejam mais suscetíveis a contaminação microbiana durante seu armazenamento (Bücker *et al.*, 2011; Zimmer *et al.*, 2013; Gassen *et al.*, 2015).

Dentre os microrganismos que tem sido isolados dos tanques de combustíveis tem se dado uma importância maior aos fungos filamentosos, pois estes crescem formando uma malha e são extremamente problemáticos no

entupimento de filtros e sistemas de injeção nos motores além de serem capazes de penetrar no revestimento dos tanques. Os organismos representantes dessa classe, isolados mais frequentemente e considerados deteriogênicos ao diesel, são *Hormoconis resinae*, *Apergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii* e *Penicillium sp.* (Bento *et al.*, 2016).

Diversos estudos isolaram o gênero *Penicillium* de tanques de armazenamento de diesel e de misturas diesel-biodiesel (Gaylarde *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 2015; Allsopp *et al.*, 2016) e alguns deles demonstram que o gênero é encontrado como deteriogênico de misturas diesel e biodiesel além de trabalhos com biorremediação (Al-Nasrawi, 2012; Vanishree, et al 2014; Okougbo & De, 2016). Neste sentido, a espécie *Penicillium simplicissimum* foi avaliada neste estudo, quanto sua capacidade de crescer utilizando o biodiesel como fonte de carbono e energia.

## **2. HIPÓTESE**

O fungo *Penicillium simplicissimum* isolado de uma borra de tanques de estocagem de uma usina produtora de biodiesel, apresenta capacidade deteriogênica de biodiesel (degradação dos ésteres e produção de biomassa), comprometendo a qualidade final do biocombustível estocado.

## **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral do trabalho é avaliar a capacidade deteriogênica de um isolado da espécie *Penicillium simplicissimum* prospectado de resíduo de tanques de estocagem de biodiesel comercial de usina produtora de Biodiesel.

### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o crescimento fúngico do isolado *Penicillium simplicissimum* em biodiesel durante 28 dias.

Detectar e caracterizar a capacidade de produção de enzimas degradadoras e metabólitos ácidos ou básicos durante o crescimento do isolado em biodiesel.

Caracterizar a degradação dos ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel causada pelo crescimento do fungo *Penicillium simplicissimum*.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Microrganismo utilizado:**

#### **4.1.1 Microrganismo e prospecção:**

A espécie *Penicillium simplicissimum* pertence ao filo Ascomycota e está incluso na ordem *Eurotiales*. O microrganismo foi prospectado de uma borra de tanques de estocagem de uma usina produtora de biodiesel no Rio Grande do Sul, Brasil.

#### **4.1.2 Caracterização molecular:**

Foi realizada a extração de DNA do fungo pelo método de Ferreira e Grattapaglia (1996). A identificação foi realizada inicialmente pela técnica de microcultivo e posteriormente através da PCR com a amplificação da região ITS-5.8S-ITS2 com o uso dos primers ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTCGCG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Os produtos de PCR foram purificados com auxílio do Kit PureLink™ PCR Purification da Invitrogen. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Reaction kit (AppliedBioSystems, Foster City, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as análises dos fragmentos foram processadas através do seqüenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied BioSystems, Foster City, CA). As sequências geradas pelo sequenciamento foram comparadas com o banco de dados GenBank (ferramenta online disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **4.2 Biocombustível avaliado:**

O biocombustível avaliado foi biodiesel puro (B100), produzido a partir de óleo de soja, com antioxidante (especificação de biodiesel comercial) em sua composição. O biodiesel foi esterilizado utilizando sistema de filtração à vácuo com

auxílio de um frasco Kitassato e um filtro com membranas com porosidade de 0,22 µm (Milipore), sendo todo conjunto previamente esterilizado em autoclave. O procedimento de filtração foi realizado em condições assépticas.

### **4.3 Condições do crescimento fúngico:**

A avaliação do crescimento do fungo filamentosso utilizando o biodiesel de soja como fonte de carbono e energia, foi conduzido em frascos de vidro, previamente esterilizados, utilizando-se uma fase aquosa e uma fase oleosa. A fase aquosa foi constituída por 60 mL de meio mineral Bushnell & Haas (1941). A fase oleosa foi constituída por 15 mL de biodiesel de soja (B100) esterilizado, conforme citado previamente. Os fracos foram esterilizados contendo a fase aquosa em autoclave por 15 minutos, a 121°C, a 1atm, antes de ser adicionados a fase oleosa. O experimento foi realizado em triplicata, montado com repetições destrutivas, teve duração de 28 dias e foi avaliado nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Para comparação dos experimentos foi utilizado um controle (sem adição do inóculo) estéril.

#### **4.3.1 Preparação do inóculo:**

A preparação do inóculo foi realizada a partir de culturas de *Penicillium simplicissimum* com 7 dias, cultivadas em ágar BDA em tubo inclinado, mediante a adição de 3mL salina e 2 mL de surfactante, Tween 80, 0,01%. O uso do surfactante tem como objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que estes apresentam propriedades adstringentes. Os esporos foram lavados com solução Tween 80 e esta solução adicionada foi mantida em agitação a 120 rpm, 28°C, durante 24 horas, na tentativa de esgotar possíveis reservas nutritivas presentes nos esporos do fungo. Após 24 horas, foi utilizada uma alíquota da suspensão do inóculo em cada frasco do cultivo do experimento, em que, por contagem em câmara de Neubauer, obteve-se uma concentração final no frasco de  $10^3$  esporos mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4 Análises:**

As análises foram realizadas nos tempos estipulados separando a fase aquosa, oleosa e a biomassa proveniente do crescimento do fungo em cada tempo amostral com o auxílio de um funil de separação. A fase oleosa foi utilizada para verificar a degradação de ésteres do tratamento B100 ao final do experimento (28 dias). A fase aquosa foi monitorada para a produção de metabólitos com caráter ácido ou básicos através de medidas de pH.

##### **4.4.1 Crescimento microbiano:**

Para a quantificação do crescimento fúngico, foi realizada inicialmente a separação da biomassa formada na interface óleo-água em sistemas de filtração. A biomassa fúngica foi quantificada através de técnica gravimétrica.

###### **4.4.1.1 Quantificação de biomassa:**

Posteriormente à separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco, a biomassa formada foi filtrada em discos de papel filtro (Marca J Prolab, gramatura 80, espessura 205  $\mu\text{m}$ , porosidade 14  $\mu\text{m}$ ), previamente pesados balança de precisão. A preparação dos discos foi realizada em estufa a 30°C, onde permaneceram durante 4 dias para remoção da umidade. Após esse período, foram transferidos diretamente para um dessecador, de onde foram retirados somente para a pesagem em balança de precisão.

###### **4.4.1.2 Interface: caracterização visual da biomassa formada:**

A biomassa formada na interface óleo-água ao final de cada tempo amostral, foi inicialmente registrada com fotografias do microcosmo e a biomassa foi colocada em placas de petri de vidro e o aspecto fúngico foi avaliado com lupa estereoscópica.

##### **4.4.2 Fase aquosa:**

###### **4.4.2.1 Detecção da produção de metabólitos ácidos:**

Foram realizadas medidas de pH da fase aquosa, visando a detecção da natureza de possíveis metabólitos (ácida e ou básica), determinadas à temperatura ambiente com auxílio de um pHmetro digital (Digimed, modelo DM-22).

#### **4.4.2.2 Tensão superficial:**

A fase aquosa foi avaliada após a filtração da biomassa formada na interface óleo-água. As amostras permaneceram por 30 minutos a temperatura ambiente e a medida de tensão superficial foi determinada em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando-se o método da placa de Wilhelmy. Para a medida foram utilizados cerca de 10 mL de fase aquosa. Para a calibração do aparelho utilizou-se como padrões líquidos a água destilada ( $72,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) e etanol ( $24,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

#### **4.4.2.3 Detecção da produção de Lipase:**

Foi realizada a detecção da capacidade de produção pelo fungo de enzimas envolvidas na etapa de degradação do biodiesel, como a lipase. Foi inoculado em todos os tempos 2  $\mu\text{l}$  da fase aquosa, sobre a superfície de meios de cultura como o meio tributirina (Anderson, 1939) e o meio rodamina B (Kouker & Jaeger, 1987).

#### **4.4.3 Fase oleosa:**

##### **4.4.3.1 Espectroscopia de infravermelho:**

As análises nos tempos inicial e final para avaliar a degradação das cadeias carbônicas do combustível foram realizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR/ATR) em espectrofotômetro Cary 630 Agilent Technologies FTIR acoplado em acessório de reflectância total atenuada horizontal (HATR).

##### **4.4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio:**

A fase oleosa foi analisada quanto à degradação das cadeias de ésteres de ácidos graxos pelos microrganismos através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN) aos 0 e 28 dias, em um equipamento da marca Bruker, modelo Avance, com intensidade de campo magnético de 9,4 T

(correspondente a uma frequência de ressonância de 400 MHz para átomos de hidrogênio). Aproximadamente 15 mg de amostra de biodiesel foram solubilizadas em Clorofórmio Deuterado (CDCl<sub>3</sub>) – 0.5 mL. Como referência interna foi usado Tetrametilsilano (TMS). O tempo de relaxação (tempo entre pulsos) foi de 10 segundos, para permitir a quantificação de todos os hidrogênios da molécula.

#### 4.4 Análises estatísticas:

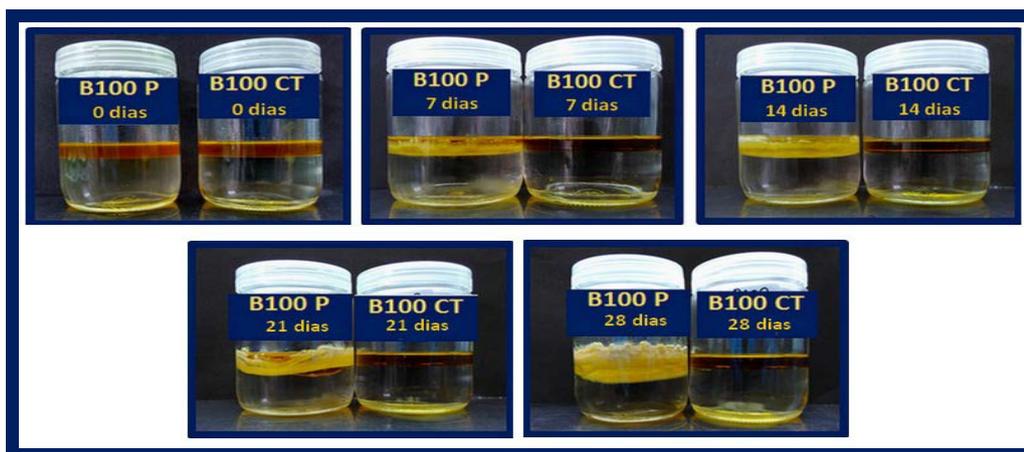
Foi realizado a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância, para verificar diferenças entre os diferentes tratamentos, nos tempos avaliados utilizando o Programa Statistics, Versão 10.0 (2010).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análises da Interface óleo-água:

#### 5.1.1 Biomassa:

O aspecto do crescimento fúngico ao longo dos 28 dias de experimento pode ser observado na Figura 1. Durante o desenvolvimento da biomassa foi detectada a presença de um biofilme com aspecto membranoso na interface óleo-água (Figura 2).



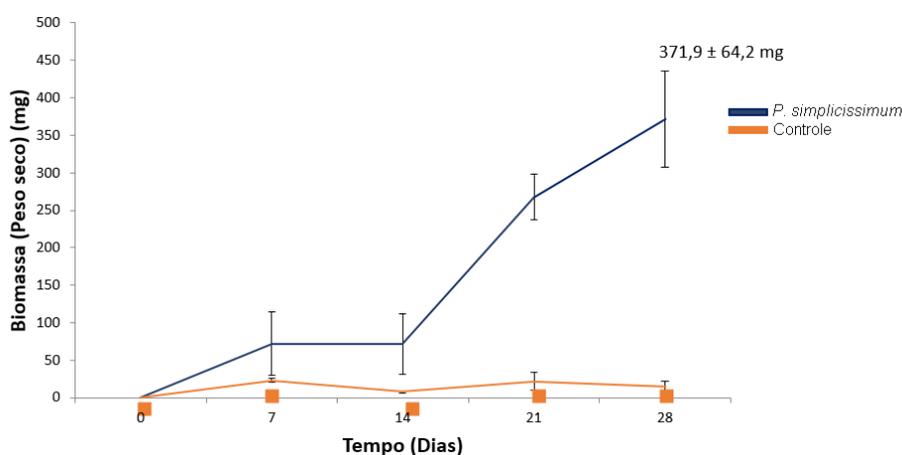
**Figura 1:** Aspecto dos frascos ao longo do experimento mostrando a formação de biomassa pelo fungo *Penicillium simplicissimum* às expensas de biodiesel. **B100 P:** Tratamento com adição de inóculo; **B100 CT:** Meio mineral BH em contato com o biodiesel sem adição de inóculo.



**Figura 2:** Aspecto do frasco aos 14 dias de experimento mostrando a formação de biomassa de aspecto membranoso separando a fase aquosa da fase oleosa.

### 5.1.2 Crescimento fúngico:

Os valores de biomassa referentes ao crescimento fúngico, foram avaliados ao longo de 28 dias (Figura 3). Observou-se nos tempos iniciais de 0 (0mg), 7 ( $72 \pm 23$  mg) e 14 ( $72 \pm 8$  mg) dias a ocorrência de uma fase de adaptação em que os valores expressos, de crescimento, são reduzidos se comparados com os tempos finais, 21 ( $268 \pm 30$  mg) e 28 dias ( $372 \pm 64$  mg). Os tempos finais de 21 e 28 dias apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com seus respectivos controles. O maior valor de biomassa ( $372 \pm 64$  mg) foi observado aos 28 dias.



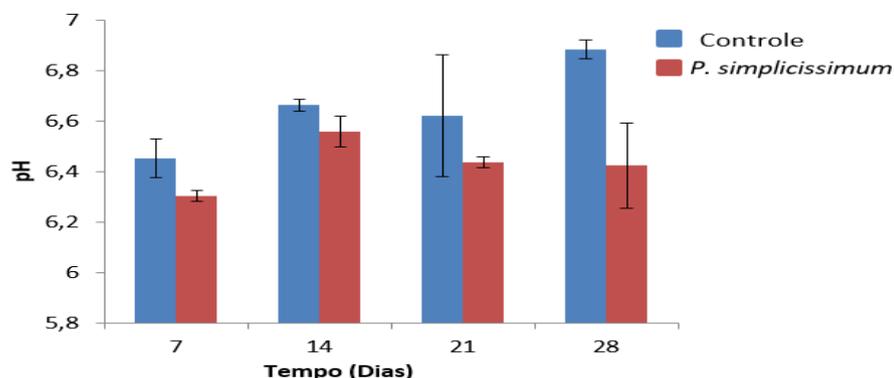
**Figura 3:** Valores de biomassa (mg) durante 28 dias de crescimento do fungo *Penicillium simplicissimum*. ***Penicillium simplicissimum***: Condição do microcosmo

com a adição de inóculo; **Controle**: Condição do microcosmo com meio mineral BH em contato com o biodiesel sem adição de inóculo.

## 5.2 Análises da fase aquosa:

### 5.2.1 pH:

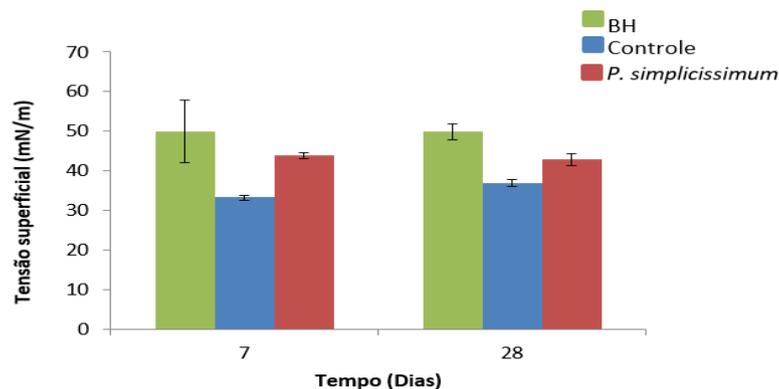
A análise de produção de metabólitos foi feita através da medida de pH da fase aquosa. O pH apresentou redução estatística ( $p < 0,05$ ) dos valores de 7,0 para  $6,4 \pm 0,16$  apenas aos 28 dias (Figura 4).



**Figura 4.** Valores de medidas de pH da fase aquosa durante 28 dias de incubação. *Penicillium simplicissimum*: Condição de microcosmos com adição de inóculo. **Controle**: Condição de microcosmos com meio mineral BH em contato com o biodiesel sem adição de inóculo.

### 5.2.2 Tensão superficial:

As medidas de tensão superficial da fase aquosa (Figura 5) apresentaram redução no início do experimento (7 dias), quando comparada ao meio mínimo mineral no tempo inicial, sem contato com biodiesel. Estes valores diferiram significativamente dos tempos controles ( $p < 0,05$ ) e se mantiveram inalterados até o fim do experimento (28 dias) para ambas as condições, confirmando o efeito emulsificante do biodiesel.



**Figura 5.** Medidas de tensão superficial da fase aquosa durante 28 dias de incubação. *Penicillium simplicissimum*: Com adição de inóculo; **Controle**: Meio mineral BH em contato com o biodiesel sem adição de inóculo.

### 5.2.3 Lipase:

Os resultados dos plaqueamentos, em meios rodamina b e tributirina, estão representados na Tabela 1. A produção de lipase pelo fungo foi identificada em todos os tempos para ambos os testes.

**Tabela 1.** Produção de enzima através da inoculação do fungo, em meios rodamina e tributirina

DIAS	RODAMINA B		TRIBUTIRINA	
	Controle	<i>P. simplicissimum</i>	Controle	<i>P. simplicissimum</i>
0	-	+	-	+
7	-	+	-	+
14	-	+	-	+
21	-	+	-	+
28	-	+	-	+

+: positivo para lipase; -: negativo para lipase. *Penicillium simplicissimum*: Com adição de inóculo; Controle: Meio mineral BH em contato com o biodiesel sem adição de inóculo.

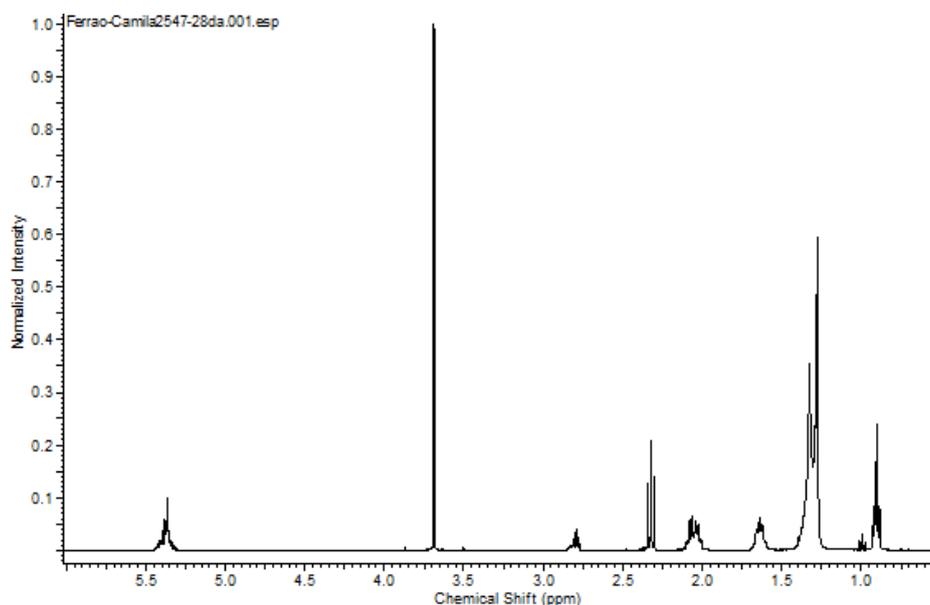
### 5.3 Análises da fase oleosa:

#### 5.3.1 Degradação de Ésteres:

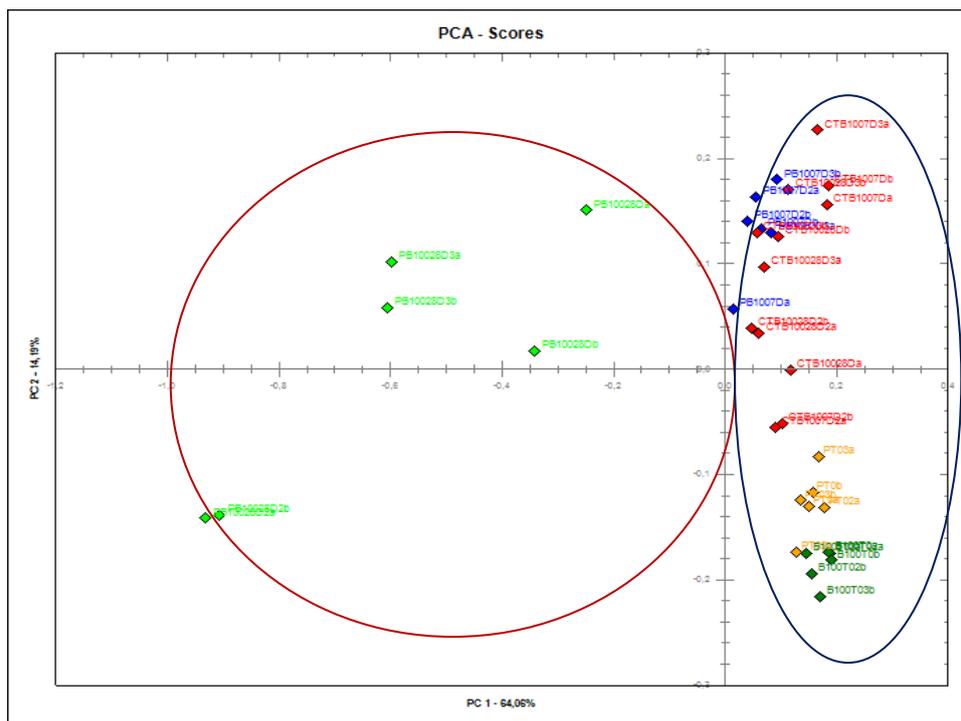
Segundo a área dos hidrogênios do grupo metila dos ésteres do biodiesel obtido pelos espectros de RMN (Figura 6), a degradação observada na presença do fungo, foi de **2,55%**.

#### 5.3.2 Análise das componentes principais:

Os resultados pela análise das componentes principais (PCA) (Figura 7) sugerem que, com duas componentes principais, foi possível explicar 78.25% da variância dos dados. De acordo com o gráfico de pesos da primeira componente a principal diferença entre as amostras foi a região da banda da carbonila. Os resultados da PC1 mostram que as amostras de B100 contaminadas pelo fungo *P. simplicissimum* após 28 dias, diferiram-se das demais amostras, sugerindo a degradação pelo fungo (Figura 7).



**Figura 6.** Espectro gerado pela técnica de infravermelho do biodiesel (B100) após 28 dias de incubação com o fungo filamentoso.



**Figura 7.** Dados espectrais apresentados pela análise de componentes principais.

## 6. DISCUSSÃO

A deterioração nos tanques de armazenamento de combustíveis e biocombustíveis vem sendo avaliada e uma das principais conseqüências do crescimento microbiano é a produção de biomassa e de metabólitos ácidos que resultam na diminuição do pH da fase aquosa (Gutheil, 1966; Bento *et al.*, 2005; Mariano *et al.*, 2008; Passman, 2013; Bento et al 2016).

Em um sistema de armazenamento de combustíveis, a contaminação microbiana pode ter diversas fontes, as mais comuns são ar e água já contaminada, que é usada na limpeza de tanque. Para que ocorra crescimento microbiano é necessário um ambiente em condições ideais como a presença de nutrientes tais como: carbono, oxigênio e a presença de água, em quantidades mínimas (10 ppms), para que microrganismos passem a crescer na interface óleo e água (Bento *et al.*, 2005; Passman, 2013; Allsopp *et al.* 2016). No presente estudo, a produção de biomassa na interface óleo-água foi observada durante todos os tempos avaliados tendo a maior produção no tempo final de 28 dias. O crescimento pode ser explicado

pela fácil metabolização de biodiesel puro propiciada por conta de sua composição de ácidos graxos e/ou a utilização do meio mínimo mineral como aporte mínimo de nutrientes, que estimula o desenvolvimento de microrganismos, demonstrando a capacidade do fungo de desenvolver-se em um sistema de armazenamento simulado (Zhang *et al.*, 1998; Bento *et al.*, 2001). Este tipo de avaliação tem sido conduzida em vários estudos que avaliam a biodeterioração de microrganismos de combustíveis e biocombustíveis (Bento *et al.*, 2005; Schultz, 2010; Bucker *et al.*, 2011; Zimmer., 2014; Cazarolli *et al.* 2014; Azambuja *et al.*, 2017; Boelter, 2017).

Bücker *et al.* (2011), avaliaram a suscetibilidade à biodegradação do diesel puro (B0), das misturas B5, B10 e B20, e de biodiesel puro (B100) por *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces sp* durante 60 dias. Os autores verificaram que a biomassa formada pelos fungos aumentou conforme a elevação percentagem de adição de biodiesel ao diesel, se comparadas ao diesel puro (B0).

Cazarolli *et al.* (2010), observaram por 60 dias o crescimento de um fungo filamentoso ao utilizar Biodiesel de sebo bovino produzido com os catalizadores NaOH e KOH e purificado com diferentes métodos (via água e via magnesol) como fonte de carbono e de energia. Ao final de 60 dias de avaliação observou que os biodieseis KOH-Magnesol e KOH-Água favoreceram a formação de biomassa (891mg e 930mg, respectivamente) diferindo significativamente da biomassa formada em NaOH-Água NaOHÁgua (576mg), em que se foi observado menor crescimento.

Vários autores (Bento *et al.*, 2005; Zimmer *et al.*, 2014; Cazarolli *et al.* 2014; Passman, 2003) utilizando medidas de pH demonstraram a produção de metabólitos ácidos e em alguns casos foram identificados compostos de degradação do diesel (Bento *et al.*, 2005) e com as misturas diesel e biodiesel (Azambuja 2017). A produção desses metabólitos pode ser uma justificativa para explicar a redução observadas nos valores de pH aos 28 dias, que indicam a formação metabólitos ácidos apenas ao final do experimento, enquanto a composição de fosfatídeos do biodiesel pode estar interferindo nas medidas de pH para os controles, visto que eles podem migrar para a fase aquosa e causar alterações nas concentrações de fosfatos para os microcosmos (Lôbo *et al.*, 2009).

Zimmer *et al.* (2014) em experimento com biocidas para a mistura B10 utilizando um consórcio microbiano, observou que o pH não apresentou variação na fase aquosa, mantendo-se em 7 até o final dos 35 dias de experimento para todos os tratamentos. Justificando que a composição do meio mineral BH utilizado como fase aquosa, apresenta efeito tampão devido as altas concentrações de fosfato (2 g/L) na sua composição que impedem variações bruscas no pH. Cazarolli (2013), avaliou o pH da fase aquosa, oriunda do crescimento de três fungos filamentosos - *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* – em três diferentes biodieseis (oliva, soja e linhaça). Nos tratamentos com os fungos não foram observadas diferenças significativas entre os biodieseis testados (oliva, soja e linhaça) em nenhum tempo amostrado.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas que atuam na interface entre as fases de um fluido com diferentes graus de polaridade e de ligação de hidrogênio. Essas propriedades tornam os surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial e formando micro emulsões em que os hidrocarbonetos podem solubilizar em água. Os biosurfactantes são aqueles produzidos por microrganismos (Nitschke *et al.*, 2002; Banat *et al.*, 2000). As medidas de tensão superficial da fase aquosa foram menores, em comparação com os controles, no tempo inicial de avaliação (7 dias) mantendo os mesmos valores até o final do experimento (28 dias). Estes resultados, deve-se provavelmente, devido a compostos que migraram para a fase aquosa. O biodiesel também é considerado um surfactante, pois apresenta a capacidade de reduzir a tensão superficial quando em contato com uma fase aquosa (Miller & Zhang, 1997; Bucker et al, 2011; Azambuja, 2016 ).

Schultz (2010) que obteve uma pequena redução dos valores de tensão superficial com fungos, atribuindo essa redução, à presença de biodiesel. Bucker (2009) encontrou alteração nas tensões superficiais de apenas um de seus fungos filamentosos em relação ao seu controle, e em apenas um dos tempos amostrados, enquanto os outros tratamentos permaneceram sem reduções com relação aos seus respectivos controles. Atribuiu-se a redução encontrada as substâncias que podem estar presentes no biodiesel e possuem capacidade de reduzir a tensão superficial.

A lipase está associada com uma possível rota para a biodegradação do biodiesel, pois são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol gerando glicerol e ácidos graxos. Os fungos são considerados ótimos produtores de lipases por conta de sua atividade catalítica, baixo custo de produção e fácil manipulação genética (Thakur, 2012; Marek & Bednarski, 1996). No presente estudo foi identificada a produção de lipase pelo fungo avaliado, em todos os tempos de incubação com biodiesel, o que indica que o *Penicillium Simplicissimum* uma possível capacidade de metabolizar o biodiesel.

Rodrigues *et al.* (2017) estudou a produção de lipases por diferentes gêneros de fungos filamentosos obtendo como resultado alta atividade extracelular do gênero *Penicillium sp.* quando comparado com as demais ao usar óleo de soja como substrato demonstrando a capacidade do fungo de produzir lipase.

A degradação foi avaliada pela técnica de infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A ressonância magnética nuclear de hidrogênio vem sendo aplicada em outros estudos na quantificação de ésteres presentes no biodiesel de soja e óleo de mamona em misturas com três tipos diferentes de diesel (Monteiro *et al.*, 2009). Na análise de degradação dos ésteres do Biodiesel puro de soja (B100) foi observada apenas 2,55% de degradação. A análise das componentes principais separou o tempo 28 dias com inóculo das demais, indicando a alteração nas cadeias carbônicas sendo influenciada pela presença do fungo filamentoso. O biodiesel é definido como uma composição de alquil ou metil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e é essa composição que faz com que ele seja considerado mais facilmente degradado do que o diesel (Mariano *et al.*, 2008) e a capacidade de produzir enzimas como, como as lipases e esterases são responsáveis por atuar na degradação de ésteres e ácidos graxos (Cazarolli *et al.*, 2014).

Cazarolli (2013), analisaram a degradação dos ésteres pelo fungo *Pseudallescheria boydii* ao longo de 60 dias de experimento e observaram diferenças significativas de 5, 11, e 10% nas porcentagens de ésteres de biodiesel de linhaça, soja e oliva, respectivamente quando comparados com os controles.

Boelter (2017), observou as percentagens de degradação dos biodieseis B10 e B100 ao 20 e 45 dias também pelo fungo filamentoso *Pseudallescheria boydii*. Os resultados para B10 demonstram degradação de 34,9% aos 20 dias e 48,6%, aos 45 dias, nos maiores valores. Os maiores valores de degradação para B100 são de 3,4% e 4,4% nas mesmas condições. A análise foi baseada na observação da função carbonila (C=O) dos ésteres metílicos do biodiesel através da técnica de espectroscopia de infravermelho.

Azambuja (2016), ao estudar a degradação pelos fungos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no diesel puro S50, S500 e S1800 e nas blendas confeccionados com 10 % de biodiesel v/v observaram na análise de RMN H-1 para o diesel puro e a mistura B10 a presença de grupos etilênicos, metilênicos e aromáticos do diesel identificando que, tanto no diesel puro quanto na mistura B10 com até 500 ppm de enxofre (S500), houve maior teor de compostos aromáticos comparados aos S50 e S1800. Os resultados sugerem uma explicação para a baixa biodegradabilidade de S500 observada no diesel puro e na mistura B10, especialmente pelo fungo *P. variotii*. A condição que apresentou menor biodegradabilidade, devido às ramificações ou a presença de compostos aromáticos foi o diesel S500, seguido de S50 e S1800.

## 7. CONCLUSÕES

O fungo filamentoso *P. simplicissimum* foi capaz de crescer na presença de biodiesel de soja, com valores de 2,55% de degradação dos ésteres de ácidos graxos;

A enzima lipase foi detectada durante todos os tempos analisado do crescimento do fungo *P. simplicissimum* em biodiesel.

As medidas de tensão superficial e de pH durante o crescimento do fungo não indicaram produção de biossurfactante e compostos de natureza ácidas, respectivamente quando comparadas aos tratamentos controle.

## 8. REFERÊNCIAS

- Allsopp, D.; Seal, K.; Gaylarde, C.; Bento, F. M.; Shirakawa, M.; Saad, D. S., (2016). **Introdução à biodeterioração**. UFRGS, Porto Alegre. – p. 59-85.
- Al-Nasrawi, H., (2012). **Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico**. J BioremedBiodegrad 3:147.
- Azambuja, A. O.; (2016) - **Avaliação da contaminação microbiana durante armazenamento simulado da mistura b10 e óleo diesel com diferentes teores de enxofre**. - Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S., (2000). **Potential commercial applications of microbial surfactants**. Appl. Microbiol. Biotechnol.; v. 53, p. 495-508
- Bento, F. M. and Gaylarde, C. C., (1996). **Microbial contamination of stored diesel oil**. BrazilianJournalofMicrobiology, vol. 27, p. 71-75.
- Bento, F. M., (1999). **Microrganismos e o armazenamento de óleo diesel**. Revista Petro & Química, vol. 211, p. 70-77.
- Bento, F. M.; Gaylarde, C. C., (2001). **Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil**. International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 47, no. 2, p. 107-112.
- Bento, F. M., (2005). **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos**. – Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bento, F. M.; Allsopp, D.; Seal, K.; Gaylarde, C. C., (2016). **Introdução à Biodeterioração**. Ed 1. Editora UFRGS, Porto Alegre.

Bento, F. M. ; Peralba, M. C. R.; Ferrao, M. F.; Zimmer, A.; Azambuja, A. O.; Barbosa, C. S.; Bücke, F. ; Cazarolli, J. C.; Quadros, P. D.; Beker, S. A., (2016). **Diagnóstico, Monitoramento e Controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento.** In: David Mark Mendes Pinho; Paulo Anselmo Ziani Suarez. (Org.). Armazenagem e Uso de Biodiesel: Problemas associados e formas de controle. 1ed.Brasilia: v. 1, p. 112-175.

Boelter, G., (2017). **Avaliação da capacidade deteriogênica de *Pseudallescheria boydii* durante estocagem simulada em diesel, biodiesel e mistura B10.** – Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bücke, F., (2009). **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas.** - Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bücke, F.; Santestevan, N. A.; Roesch, L. F.; Jacques, R. J. S.; Peralba, M. C. R.; Camargo, F. A. O.; Bento, F. M., (2011). **Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil.** International Biodeterioration and Biodegradation 65:172–178.

Bushnell, L. D.; Haas, H. F., (1941). **The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms** - J.Bacteriol. 41:653

Brasil. n. 13.576, de 27 de dez. De 2017. Lei no 13.576, de 26 de dezembro de 2017. Renovabio . 247. Ed. [s.l.], p. 4-5, dez. 2017. Disponível em: <[http://www.imprensanacional.gov.br/web/guest/consulta?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&\\_101\\_struts\\_acti%e2%80%a6](http://www.imprensanacional.gov.br/web/guest/consulta?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_acti%e2%80%a6)>. Acesso em: 30 dez. 2017.

Cavalett, O.; Ortega, E., (2010). **Integrated environmental assessment of biodiesel production from soybean in Brazil.** Journal of Cleaner Production, v. 18, n. 1, p. 55-70.

Cazarolli, J. C.; (2013). **Avaliação de fungos filamentosos em Biodiesel de linhaça, soja e oliva** - Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cazarolli, J. C.; Guzatto, R.; Samios, D.; Peralba, M. C. R.; Cavalcanti, E. H. S.; Bento, F. M., (2014). **Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the detergentogenic fungus *Pseudallescheria boydii***. International Biodeterioration & Biodegradation. p 95.

Chand, N., (2002). **Plant oils — Fuel of the future**. J Sci Ind Res;61:7–16.

Demirbas, A.; Khalifea, E.; Tabatabaeib, M.; Aghbashlo, M., (2017). **Impacts of additives on performance and emission characteristics of diesel engines during steady state operation**. - Progress in Energy and Combustion Science 59

Gassen, J.; Bento M. F.; Frazzon G. P. A.; Ferrão, M. F.; Marroni, V. I., Simonetti, A. B., (2015). **Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection**. Braz. J. Biol. vol.75 no.3

Gaylarde, C.C.; Bento F.M.; Kelley, J., (1999). **Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control**. Revista de Microbiologia, Rio de Janeiro. 30:1-10.

Gerpen, J.H. V., (1997). **Determining the influence of contaminants on biodiesel properties**. SP. Society of Automotive Engineers, Ne Energy Laboratory. Cole Boulevard, Golden, Colorado. Jul.2004. 96pg.

Gutheil, N. G., (1966). **Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries em querosene de aviação no Brasil**. Boletim No. 9, Instituto Tecnológico do RS.

Hill, E.C.; Hill, G.C., (2008). **Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels, During Storage, Distribution and Use**. Advanced Materials Research, v. 38:257 - 268.

Knothe, G.H.; Razon, L.F., (2016). **Biodiesel Fuels. Progress In Energy And Combustion Science (Pecs)**. 58:36-59.7

Kumar, S.; Cho, J. H.; Park, I. M., (2013). **Advances in diesel–alcohol blends and their effects on the performance and emissions of diesel engines** - Renew Sustain Energy Rev, 22, pp. 46-72

Leonardo, R. S.; Valle, L. M.; Dweck, Jo., (2017). **Evaluation of different aging procedures on biodiesel thermal degradation process.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 130. . 10.1007/s10973-017-6291-7.

Lôbo, I. P.; Ferreira, S. L. C; Cruz, D. A., (2009). **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos.** Quim. Nova, 32:1596—1608.

Luz, C.C.; Santos, E.A.; Santos, M.O.S.; Mussu, M.Y.; Yamashita, M.; Bastos, W.R.; Bricha, G.; Reis, M.M.; Reis, M.G., (2011). **Estudos De Biodegradação De Óleo Diesel Por Consórcio Microbiano Coletado Em Porto Velho - Ro, Amazônia.** Quim. Nova, Vol. 34, No. 5, 775-779.

Macedo, O. T.; Pereira, G. P.; Pardal, M. R.; Soares S. A.; Lameira, V. J., (2013). **Viscosity of Vegetable Oils and Biodiesel and Energy Generation.** International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering Vol:7, No:5

Mariano, A.P.; Tomasella, R.C.; Oliveira, L.M.; Contiero, J.; Angelis, D.F., (2008). **Biodegradability of diesel and biodiesel blends.** Afr. J. Biotechnol. 7, 1323e1328.

Marek, A.; Bednarski, W.; (1996). **Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi.** Biotechnology Letters, 18(10), 1155-1160.

Miller, R. M.; Zhang, Y., (1997). **Chapter 4 Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons.** Bioremediation Protocols: Humana Press: Nova Jersey, p.59-66.

Monteiro, M. R; Ambrozini A. R.; Lião L. M.; Ferreira, A. G., (2009). **Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by <sup>1</sup>H NMR.** Fuel. 88(4):691-696

Nitschke, M.; Pastore, G. M., (2002). **Biossurfactantes: Propriedades e aplicações.** Química Nova, v. 25, p. 772-776.

Okougbo, E. A., De, N.; (2016) **Biodegradation of Crude Oil, Refinery Effluent and Some Petroleum Components by Penicillium Sp. and Mortierella Sp. Isolated From Oil Contaminated Soil in Auto Mechanic Workshops.** 3rd International Conference on African Development Issues.

Passman, F. J. (Ed.), (2003). **Manual 47-fuel and fuel system microbiology: fundamentals, diagnosis and contamination control.** ASTM International, West Conshohocken pp. 1–30.

Passman F. J., (2013). **Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980.** International Biodeterioration & Biodegradation - Volume 81, Pages 88–104

Pelczar Junior, Michael J., (1997). **Microbiologia: conceitos e aplicações; Microbiology: concepts and applications.** Pearson Education do Brasil.

Rodrigues, C.; Cassini, S. T. A.; Antunes, W. A. P.; Pinotti, L. M; Keller, R. P; and Gonçalves, R. G., (2016). **Lipase producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production.** African Journal of Biotechnology. Vol. 15(18), pp. 759-767.

Schultz, L. C., (2010). **Avaliação De Micro-Organismos Com Potencial De Degradação De Diesel E Biodiesel.** Dissertação De Mestrado em Microbiologia Agrícola E Do Ambiente, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Silva, L. G. W.; Salomão A. A.; Vilab, C. D. M. M.; Tubino, M., (2017). **Influence of Water and Ultraviolet Irradiation on the Induction Period of the Oxidation of Biodiesel** - J. Braz. Chem. Soc., Vol. 28, No. 4, 676-680.

Soriano, A. U.; Martins, L. F.; Ventura, S. A. E., (2015). **Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration.** IntBiodeterior Biodegradation 2015; 99; 102-14

Thakur, S. (2012). **Lipases, its sources, properties and applications: A Review.** Int J Sci Eng Res. 3(7): 1-29.

Vanishree, A. J.; Thatheyus D. R., (2014). **Biodegradation of Petrol Using the Fungus *Penicillium* sp.** Science International, 2: 26-31.

Vieira, T. M. (2006) **Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília.** Artigos técnico-científico, Brasília: Estação Gráfica, v.1. p. 218.

Zhang, X.; Peterson, C.; Reece, D.; Haws, R.; Möller, G., (1998). **Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment.** Trans Am Soc Agric Eng;41:1423–30.

Zimmer, R. A., (2014). **Monitoramento e controle da contaminação. Microbiana durante o armazenamento de misturas diese/biodiesel com uso de biocida.** Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Grande do Sul.