



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Anna Carolina Ameno Ayres Silva

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DO SURFACTANTE
LINEAR ALQUILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO UTILIZANDO FUNGOS
FILAMENTOSOS**

Orientador: Prof. Dr. Enio Nazaré Oliveira Júnior

Ouro Branco – MG

Dezembro de 2014

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DO SURFACTANTE
LINEAR ALQUILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO UTILIZANDO FUNGOS
FILAMENTOSOS**

Anna Carolina Ameno Ayres Silva

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del Rei.

Orientador: Prof. Dr. Enio Nazaré Oliveira Júnior

Ouro Branco – MG

Dezembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DO SURFACTANTE
LINEAR ALQUILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO UTILIZANDO FUNGOS
FILAMENTOSOS**

Anna Carolina Ameno Ayres Silva

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Prof. Dr. Enio Nazaré Oliveira Júnior – Orientador

Prof. Dr. Edson Romano Nucci – Examinador 1

Prof^a. M^a. Flávia Donária Reis da Silva – Examinadora 2

Ouro Branco, ____/____/____

Resumo

O elevado crescimento populacional, e paralelamente, a grande utilização dos diversos produtos de limpeza disponíveis no mercado acelera cotidianamente o grau de poluição nos recursos hídricos do planeta. Estes produtos apresentam surfactantes em sua composição, os quais não são completamente biodegradados e, com isto, os tratamentos de água empregados alcançam em média 60 - 75% de redução destes compostos. Estes surfactantes são nocivos aos seres vivos e alguns destes são bioacumulativos, por isto se faz necessário a busca de tratamentos que consigam degradá-los. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo verificar a influência da glicose e do linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (LAS) no processo de biodegradação. No estudo, foram utilizados efluentes sintéticos, os quais foram preparados previamente a partir do planejamento 2² com três pontos axiais a fim de variar as concentrações de glicose e LAS em um total de onze ensaios. Foi avaliado a capacidade de biodegradação de dois micro-organismos, *Penicillium crustosum* e *Penicillium chrysogenum*, isolados de um efluente têxtil da cidade de Divinópolis. Os fungos encontravam-se inativos em óleo mineral e foram colocados para crescer em meio de cultura Batata dextrose ágar 39 g/L, em seguida seus esporos foram coletados e armazenados em solução salina 0,85% (m/v). Foi inoculado 200 µL destes esporos em meio mínimo para crescimento dos micro-organismos em pH 3,0. Os ensaios foram incubados no shaker a 25°C e 180 rpm durante um período de cinco dias para fermentação. Após a fermentação, as amostras foram avaliadas visualmente e analiticamente em termos da quantidade de massa seca produzida e redução do surfactante. Para quantificar esta redução foi realizada uma análise que se baseia no método de azul de metileno (MBAS), no qual o efluente passa por um sistema aquoso de duas fases, sendo uma polar (água e azul de metileno) e outra apolar (clorofórmio). Após o processo de extração, as absorbâncias das soluções finais foram lidas em um espectrofotômetro a 652 nm. Os resultados mostraram que, majoritariamente, as duas espécies de fungos apresentaram maior potencial para biodegradação do surfactante em condições nas quais a concentração da glicose estava próxima a 10 g/L e do LAS entre 2 mg/L e 8 mg/L. Em altas concentrações de LAS percebeu-se que houve baixo crescimento dos micro-organismos, em determinados valores praticamente não houve crescimento, o que indica provável inibição por excesso desta substância.

Palavras chave: água, biodegradação, LAS, surfactante, fungos filamentosos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo principal	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Poluição das águas	3
3.1.1. Água para consumo humano - legislação	4
3.2. Surfactantes	5
3.2.1. Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio (LAS)	6
3.2.2. Biodegradação do LAS	7
3.3. Micro-organismos	8
4. METODOLOGIA.....	9
4.1. Reativação dos fungos	9
4.2. Coleta dos esporos	10
4.3. Contagem dos esporos	10
4.4. Curva de crescimento	11
4.5. Fermentação	12
4.6. Análise (MBAS).....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1. Reativação	15
5.2. Coleta dos esporos	16
5.3. Contagem dos esporos	16
5.4. Curva de crescimento	17
5.5. Curva de calibração do método MBAS	18
5.6. Fermentação <i>P. crustosum</i>	19
5.7. Fermentação <i>P. chrysogenum</i>	27
6. CONCLUSÕES.....	34
7. ATIVIDADES FUTURAS.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ABS	Dodecil benzeno sulfonato de sódio ramificado
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CN	Caldo nutriente
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
$CuSO_4$	Sulfato de cobre
ETE	Estação de tratamento de esgoto
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
IPMCA	Índice de Parâmetros Mínimos para a Preservação da Vida Aquática
K_2HPO_4	Fosfato monoácido de potássio
KH_2PO_4	Fosfato diácido de potássio
LAS	Linear alquilbenzeno sulfonato de sódio
MM	Meio mínimo
MBAS	Substâncias Ativas ao Azul de Metileno
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônio
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PCBs	Bifenilas policloradas
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
SEMA	Secretaria Especial do Meio Ambiente
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
USEPA	United States Environmental Protection Agency

1. INTRODUÇÃO

A água é um bem natural de valor inestimável que em muito precede não apenas o aparecimento do homem como também o surgimento de qualquer forma de vida. Porém, para que possa cumprir seu papel de mantenedora das formas de vida, dentre as quais se inclui a humana, a água deve apresentar-se em condições de potabilidade, de modo a poder ser consumida seguramente, sem prejuízos para aquele que a ingere (HERCULIN et al., 2014).

Além do consumo humano, a água pode ser empregada nas indústrias de diversas formas, tais como incorporação aos produtos, limpezas de pisos, tubulações e equipamentos e também para uso sanitário. Os esgotos sanitários contêm excrementos humanos líquidos e sólidos, produtos diversos de limpezas, resíduos alimentícios, produtos desinfetantes e pesticidas. Eles são compostos de matéria orgânica e inorgânica, sendo os principais constituintes orgânicos: proteínas, açúcares, óleos e gorduras, micro-organismos, sais orgânicos e componentes dos produtos saneantes (CHAVES, 2008).

Os produtos de limpezas normalmente possuem em suas composições surfactantes, os quais são conhecidos como substâncias tensoativas que atuam na redução da tensão superficial da água facilitando assim a remoção de partículas de gordura e formação de micelas. Alguns destes surfactantes, como o 4-nonilfenol e 4-octilfenol, são classificados como interferentes endócrinos, ou seja, são compostos orgânicos hormonalmente ativos que podem causar distúrbios no sistema endócrino, de animais e humanos, mesmo em baixas concentrações (RAIMUNDO, 2007). Outros, como por exemplo, o LAS podem gerar problemas aos ecossistemas aquáticos devido à formação de espuma, contribuindo para a dispersão de poluentes, além da inibição dos micro-organismos responsáveis pelos processos de depuração natural (OKADA et al, 2009).

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é um surfactante aniônico formado por uma cadeia alquílica, composta por 10 a 14 carbonos, e um grupo sulfonado. Encontra-se amplamente em produtos de limpeza devido às suas propriedades tensoativas e baixo custo relativo (OKADA et al, 2009). Segundo Holt et al. apud Esteves (2010), em esgotos domésticos, a concentração de LAS pode variar entre 1 a 22 mg/L. Uma vez utilizados em detergentes ou outros produtos de limpeza, o LAS pode atingir o meio ambiente como um componente dos efluentes de estações de tratamento, ou como ingredientes de descargas de esgotos não tratados.

Normalmente, são empregados processos físico-químicos para remoção do LAS nas águas residuárias, no entanto, são os processos microbiológicos, como por exemplo, os sistemas de lodo ativado que apresentam melhor eficiência em seus resultados. Este tipo de

tratamento alcança valores entre 90 e 95% de remoção destas substâncias, mas pelo menos 20% da carga de massa de LAS que entra na estação ficam adsorvidos nos sólidos suspensos (ESTEVES, 2010).

No Brasil, são poucos os municípios beneficiados com uma estação de tratamento de esgoto (ETE), a maioria possui apenas a rede de coleta de esgoto e muitos são totalmente desfavorecidos, i. e., o esgoto é despejado a céu aberto. Esta falta de saneamento básico tem acarretado vários problemas à população, pois a proliferação de doenças de veiculação hídrica é gerada por meio destes esgotos que correm a céu aberto e também pela poluição dos mananciais (NASCIMENTO; FERREIRA, 2007).

Desta forma, a situação se diz preocupante, pois os seres humanos tornam-se expostos aos contaminantes emergentes tanto por meio da ingestão de alimentos como frango, peixes, carnes bovina e suína, legumes e verduras; como também pela água contaminada e, em menor proporção, pelo contato via derme e inalação dos mesmos. Sendo o grupo destes contaminantes emergentes constituídos por analgésicos, drogas psiquiátricas, antibióticos, hormônios, produtos de higiene pessoal, inseticidas repelentes, bem como os surfactantes amplamente utilizados no consumo doméstico (RAIMUNDO, 2007).

A partir desta situação vê-se a necessidade de realizar estudos relacionados ao tratamento de efluentes a fim de remover estes contaminantes despejados no meio ambiente. Muitos destes compostos apresentam toxicidade aos organismos vivos mesmo em concentrações traços, sendo assim percebe-se a importância de aprimorar os processos de biodegradação, os quais apresentam grandes potenciais de eliminar estas substâncias tóxicas dos recursos hídricos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

O trabalho tem como objetivo avaliar a ação dos micro-organismos *Penicillium crustosum* e *Penicillium chrysogenum* em efluentes sintéticos simulando condições ambientais adversas, variando as quantidades de glicose e do surfactante linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (LAS) presentes nos ensaios.

2.2. Objetivos específicos

Analisar a eficiência destes fungos filamentosos na biodegradação do LAS;

Analisar o comportamento dos micro-organismos na presença de diferentes concentrações das fontes de substrato (glicose e surfactante) e se pode ocorrer inibição de crescimento pelo excesso destes constituintes;

Determinar a melhor relação existente entre as fontes de carbono disponíveis para a fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Poluição das águas

Os problemas de escassez hídricas no Brasil decorreram, principalmente, da combinação do crescimento exagerado das demandas localizadas e da degradação da qualidade das águas. Este quadro é consequência do aumento desordenado dos processos de urbanização, industrialização e expansão agrícola, verificados a partir de 1950 (RAIMUNDO, 2007).

No mundo, os problemas de escassez de água acentuaram-se a partir dos anos 30 em um período subsequente à Primeira Guerra Mundial que ficou conhecido como “Era Tecnológica”. Após a Segunda Guerra Mundial, a produção e o uso indiscriminado de pesticidas marcaram o início do desenvolvimento acelerado das atividades industriais (RAIMUNDO, 2007).

A demanda por produtos industrializados era intensa, o que motivava ainda mais o desenvolvimento tecnológico, no qual muitos compostos inovadores foram produzidos e distribuídos para consumo no mundo todo. Entretanto, nesta época, os avanços industriais eram promovidos sem qualquer tipo de cuidado com relação a possíveis contaminações do meio ambiente (RAIMUNDO, 2007).

Atualmente a contaminação dos recursos hídricos por compostos orgânicos tóxicos é um grande problema ambiental. Mesmo com a vasta gama de tratamentos empregando produtos químicos e/ou processos físicos a fim de eliminar estes resíduos contaminantes, a maior parte deles não promove a degradação destas substâncias tóxicas, simplesmente favorecem a diluição ou a transferência para outra fase (COSTA, 2014).

Esta preocupação com os problemas ambientais começaram a aparecer ao longo da década de 70, quando a sociedade despertava para as ameaças a que estava sujeita se não mudasse o comportamento quanto ao uso de seus recursos hídricos. Então, a partir deste momento, várias organizações não governamentais foram criadas e comissões interministeriais, como a SEMA (Secretaria Especial do Meio Ambiente), foram instituídas para encontrar meios de

aprimorar nosso sistema de uso múltiplo dos recursos hídricos e minimizar os efeitos tóxicos na qualidade da água, principalmente no que se refere às futuras gerações. (COSTA, 2014). Além disto o interesse da comunidade acadêmica e a criação de órgãos de proteção ambiental, como a USEPA (United States Environmental Protection Agency), promoveram um aumento no número de pesquisas no mundo todo envolvendo monitoramento dos compostos xenobióticos, em diversos compartimentos ambientais (RAIMUNDO, 2007).

3.1.1. Água para consumo humano - legislação

Segundo Nascimento (2007), o Brasil tem buscado seu desenvolvimento sem garantir a qualidade do meio ambiente, acarretando, assim, vários impactos. O país tardou em obter uma lei específica para o saneamento, retardando a implantação dos sistemas de tratamento de esgotos urbanos nos municípios. Hoje, com a lei de saneamento já criada, estes sistemas devem atender os padrões vigentes, garantindo um tratamento eficaz para a população.

O consumo expressivo de detergentes no Brasil e a falta de tratamento de esgoto doméstico nas regiões urbanas têm causado efeitos ambientais indesejáveis. Além da questão estética, representada pela formação das espumas, a presença de surfactantes em recursos hídricos têm acarretado problemas ambientais graves (COSTA, 2014), tais como a diminuição da concentração de elementos necessários para a vida aquática, como por exemplo, o oxigênio dissolvido, devido à diminuição da tensão superficial água/ar; diminuição da permeabilidade da luz, por manter as partículas presentes em suspensão; aumento da concentração de compostos xenobióticos, como PCBs e PAHs presentes no sedimento, por solubilização micelar inibindo assim sua degradação (PENTEADO et al, 2006).

Von Sperling apud Nascimento e Ferreira (2007) vai de encontro com a realidade encontrada na maioria das cidades brasileiras e caracteriza o uso da água para abastecimento doméstico seguindo os seguintes requisitos de qualidade:

- isenta de substâncias químicas prejudiciais à saúde;
- adequada para serviços domésticos;
- baixa agressividade e dureza;
- esteticamente agradável (baixa turbidez, cor, sabor e odor);
- ausência de micro-organismos.

O artigo 16, capítulo IV (Padrão de potabilidade), portaria nº 518 do Ministério de Estado da Saúde determina o padrão de aceitação para consumo humano em relação aos surfactantes menor ou igual a 0,5 mg/L (PORTARIA Nº 357, 2005). Este também é o valor indicado para atender ao Índice de Parâmetros Mínimos para a Preservação da Vida Aquática

(IPMCA). Tal índice é recomendado pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) e está incluído no artigo 07, decreto 88351 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) sobre águas de classe 1, ou seja, aquelas com características desejáveis para manter a sobrevivência e a reprodução dos organismos aquáticos (PENTEADO et al., 2006).

3.2. Surfactantes

Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos são compostos orgânicos que possuem comportamento anfifílico, isto é, possuem duas regiões, hidrofóbica e hidrofílica, como pode ser observado na Figura 3.1. A parte hidrofóbica do tensoativo geralmente é composta de cadeias alquílicas ou alquilfenílicas, contendo de 10 a 18 átomos de carbono. A região hidrofílica é constituída por grupos iônicos ou não iônicos ligados à cadeia carbônica (PENTEADO et al., 2006).

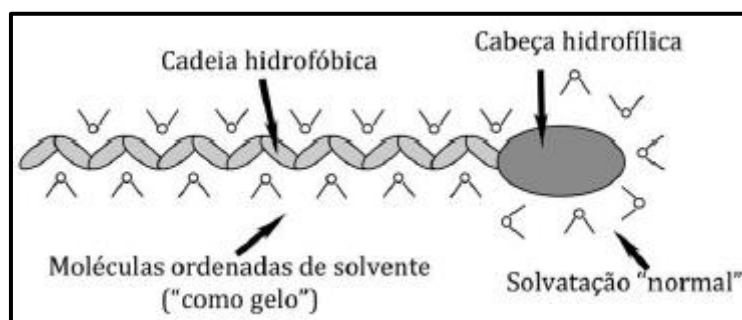


Figura 3.1. Imagem pictorial da solvatação de um tensoativo pela água. A cadeia hidrofóbica será solvatada por uma estrutura formada pela associação de moléculas de solvente (“como gelo”, do inglês, icelike). A cabeça-polar, hidrofílica será solvatada pela forma usual.

Fonte: GALGANO, 2012.

Os tensoativos podem ser classificados de acordo com a carga do grupo hidrofílico, como aniônicos, catiônicos, não iônicos ou zwitteriônicos. Os tensoativos mais consumidos atualmente são os aniônicos e os não iônicos, na forma de detergentes, emulsificantes, dispersantes e umectantes. Os catiônicos possuem atividade germicida, são empregados em composições antissépticas, além de seu uso como amaciantes de roupas e de condicionadores de cabelos. Os zwitteriônicos, devido ao seu baixo poder de irritação à pele e aos olhos, têm tido crescente aplicação em produtos para higiene pessoal (GALGANO, 2012).

Os surfactantes compõem um grupo de produtos químicos que têm considerável importância ambiental devido suas propriedades inerentes, seu alto volume de consumo e amplo uso, por serem constituintes essenciais nos produtos de limpeza. Além disto, também

são bastante utilizados em outras áreas, como por exemplo, em cosméticos, trabalhos com metal, agricultura, papel e indústrias de couro (CAROSIA, 2011).

3.2.1. Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio (LAS)

O LAS é um tensoativo aniônico constituído de uma mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares variando de C_{10} a C_{16} com predominância de C_{10} a C_{13} (Figura 3.2). O grupo fenila do LAS pode apresentar substituição em todas as posições dos átomos de carbono da cadeia linear, exceto a posição do carbono 1, podendo formar 26 moléculas diferentes (PENTEADO et al., 2006).

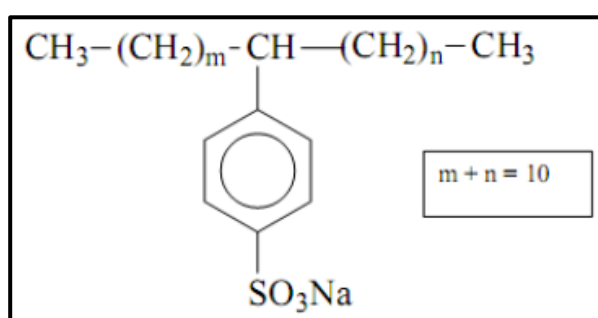


Figura 3.2. Estrutura molecular do Alquilbenzeno Sulfonado linear (LAS).

Fonte: CAROSIA, 2011.

O LAS foi introduzido no mercado em 1964 como substituto biodegradável para o altamente ramificado alquilbenzeno sulfonado (ABS) (ESTEVES, 2010). O ABS teve grande aceitação no mercado de detergentes devido ao melhor desempenho quando comparado ao do sabão, sendo consumido mundialmente em larga escala. O uso deste produto provocou um problema sério nas estações de tratamento de esgoto, devido à formação de camadas densas de espumas. Além disto, o ABS é resistente à biodegradação (BARBIERI, 2000) no meio ambiente devido, principalmente, à presença de carbonos quaternários na sua cadeia hidrofóbica, por isto foi necessário a sua substituição por um composto linear, ou seja, biodegradável (PENTEADO et al., 2006).

Segundo Penteado (2006), a complexidade estrutural do LAS comercial torna difícil a tarefa de avaliação toxicológica dos componentes individuais. Mas, sabe-se que o aumento do tamanho da cadeia do LAS provoca um aumento da toxicidade.

Hera apud Carosia (2011) alega que o LAS é considerado um poluente de alta prioridade e sua toxicidade aos micro-organismos, plantas, animais terrestres e humanos são bem documentados. Além disto, estudos ecotoxicológicos verificaram a toxicidade de LAS

em organismos aquáticos e relataram bioacumulação em *Daphnia magna* e no peixe *Cyprinus carpio* (CAROSIA, 2011). Ademais o acúmulo deste surfactante pode levar a inibição dos micro-organismos responsáveis pelos processos de depuração natural (OKADA, 2009).

3.2.2. Biodegradação do LAS

Hera apud Carosia (2011) afirma que a remoção do LAS pode ocorrer pelos mecanismos de precipitação, adsorção ou degradação. No entanto, existem relatos que consideram a degradação o mais importante mecanismo de remoção desse composto em ambientes aquáticos.

A biodegradação do LAS pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, ocorre a quebra da cadeia hidrofóbica do tensoativo o que leva a alteração de suas propriedades, diminuindo assim alguns de seus efeitos indesejáveis no meio ambiente, tais como a formação de espumas. Na segunda etapa, os produtos resultantes da degradação são transformados em CO₂, água e sais minerais. O principal mecanismo de biodegradação aeróbico do LAS envolve a degradação da cadeia alquílica, seguida do grupo sulfonato e, finalmente, do anel aromático (PENTEADO et al., 2006).

Esteves (2010) afirma que a degradação de surfactante por via aeróbia tem sido intensivamente estudada, e uma remoção eficiente tem sido observada por vários pesquisadores. Anaerobicamente, supunha-se que o LAS não era biodegradado. No entanto pesquisas têm mostrado que é possível alguma degradação primária deste surfactante no tratamento anaeróbio, principalmente em reator UASB, como pode ser observado na Tabela III.1.

Tabela III.1. Utilização do reator UASB para degradação de LAS.

TDH (h)	LAS (mg/L)	Condição	Degradação (%)
48	10	Mesofílica (37°C)	40-80
12	10	Termofílica (55°C)	37
24	4-5	Termofílica (55°C)	64-85
12	1	Termofílica (55°C)	40
6	20	Mesofílica (37°C)	26
24	50	Mesofílica (37°C)	26

Adaptado: Esteves, 2010.

Esteves (2010) relata um estudo envolvendo consórcio de bactérias capazes de degradar o LAS, as quais foram obtidas de uma estação de tratamento de água residuária. O cultivo dos micro-organismos foi realizado em meio mínimo (MM) e em caldo nutriente (CN), obtendo os respectivos valores de degradação, 36% e 70%. Além disso, a remoção do consórcio bacteriano foi maior do que em cultura individual.

Carosia (2011) também descreve alguns estudos relacionados ao tratamento anaeróbio. Em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) com espuma de poliuretano para imobilizar a biomassa e alimentação com substrato sintético contendo extrato de carne, amido e sacarose como co-substratos foi verificada 35% de degradação biológica de LAS. Outro estudo, também empregando reatores RAHLF, o primeiro preenchido com carvão vegetal como material suporte e o outro com leito misto de argila expandida e espuma de poliuretano, apresentaram respectivamente, 28% e 27% de remoção de LAS. Além disto, foi observada a remoção de 50% de LAS em reator UASB para concentração afluente de 14mg/L e alimentação de meio mineral, com etanol como co-substrato, e solução de vitaminas.

Oliveira et al. apud Carosia (2011) avaliaram a remoção anaeróbia de LAS em quatro reatores de leito fluidizado com diferentes materiais suportes, sendo carvão ativado, argila expandida, pérolas de vidro e areia, os quais apresentaram respectivamente, 96%, 83%, 99% e 98% de biodegradação.

Sanz et al. apud Okada (2009) observaram 85% de degradação de LAS para concentração de 4 a 5 mg/L, em reator em escala de bancada sem co-substratos. Por outro lado, outros estudos indicam a necessidade de co-substratos para os micro-organismos responsáveis pela degradação de LAS manterem a atividade enzimática. Abboud *et al.* apud Okada (2009) observaram aumento de 60 a 90 % da degradação de LAS com a adição de outras fontes de carbono e nitrogênio, em consórcio de bactérias facultativas anaeróbias.

Penteado et al. (2006) chamam a atenção para as estações de tratamento de efluentes, quanto a geração e o armazenamento inadequado do lodo ativado e sua utilização posterior na agricultura, os quais podem trazer malefícios ao lençol freático e à biota. O reaproveitamento desse lodo na agricultura exige critérios cuidadosos, pois o mesmo pode conter concentrações altas de LAS, 0,5 g/kg em condições aeróbicas e 1 a 30 g/kg em condições anaeróbicas.

3.3. Micro-organismos

Araújo et al. apud Silva (2013) afirmam que os micro-organismos existem há mais de 3,5 bilhões de anos, são as mais versáteis e adaptáveis formas de vida na terra. Hibbett et al. apud Silva (2013) declaram que os fungos pertencem a um grande grupo de micro-

organismos, chamado Reino Fungi, possuem diversas espécies e são amplamente disseminados; do total de 1,5 milhões de espécies apenas 70.000 espécies são conhecidas.

A maioria dos fungos é multicelular, formando uma rede de filamentos denominados hifas (Figura 3.3), que são paredes celulares tubulares que envolvem a membrana plasmática. As unidades de reprodução dos fungos filamentosos são denominadas conídios ou esporos, os quais são capazes de resistir a condições adversas tanto ambientais quanto químicas e podem variar morfológicamente de acordo com a espécie (SILVA, 2013).

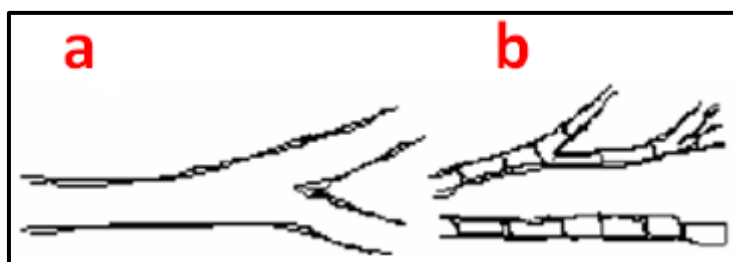


Figura 3.3. Imagem representativa da morfologia das hifas, onde no item (a) representa-se a hifa contínua e no item (b) hifa septada.

Fonte: SILVA, 2013.

Stolz apud Soares (2013) relata que os fungos possuem sistemas metabólicos que têm por característica a inespecificidade enzimática, tornando-os bons candidatos para utilização em processos de tratamentos de efluentes complexos.

O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes (BAPTISTA, 2011).

Braga et al. apud Baptista (2011) afirma que o uso de enzimas é considerado na atualidade, um dos maiores setores da indústria biotecnológica, tendo os fungos como o principal organismo, sendo amplamente utilizados como produtores de substâncias de interesse econômico.

4. METODOLOGIA

4.1. Reativação dos fungos

Inicialmente, foi preparado o meio de cultura Batata dextrose ágar 39 g/L, como sugerido pelo fabricante. Em um béquer adicionou-se 5,85 g do meio em 150 mL de água

destilada. A solução foi vertida em um erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, o meio de cultura juntamente com as placas de Petri foram autoclavados.

Após a esterilização e utilizando o fluxo laminar, foram preparadas 3 placas de Petri para cada fungo (*P. crustosum* e *P. chrysogenum*) em análise. Pequenos pedaços de ágar contendo os fungos foram retirados dos recipientes de óleo mineral, nos quais os micro-organismos encontravam-se inativos, e inseridos nas respectivas placas de Petri previamente preparadas. Posteriormente as placas de petri foram incubadas em estufas com temperatura de 25°C por 5 dias.

4.2. Coleta dos esporos

Para o preparo da solução salina 0,85% (m/v) adicionou-se 0,85 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada. Esta solução juntamente com os tubos falcon, funil de vidro e gase foram autoclavados.

A solução salina foi adicionada na placa de petri para retirada dos esporos. Com o uso do alça de Drigalski a solução foi moderadamente esfregada contra os esporos para que os mesmos se soltassem. Após se desprenderem a solução foi vertida em um funil de vidro com gase, apoiado em um erlenmeyer, promovendo assim a passagem da solução contendo os esporos e retenção de hifas e pedaços do ágar. A solução salina contendo os esporos foi armazenada em tubos do tipo falcon de 50 mL, os quais foram incubados a 4°C. Este procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

4.3. Contagem dos esporos

Primeiramente a solução de esporos foi diluída 10 vezes em água destilada. Em seguida utilizou-se uma câmara de Neubauer para contagem dos esporos, na qual foi vertida uma gota da solução diluída, aproximadamente 10 µL. A contagem foi realizada na diagonal como mostra a Figura 4.1.

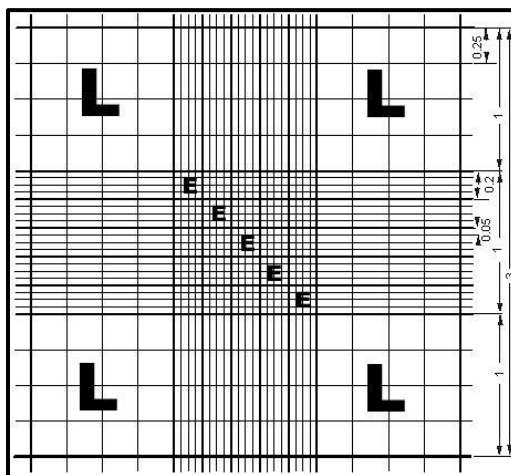


Figura 4.1. Representação da câmara de Neubauer utilizada para contagem dos esporos.

Fonte: <http://portuguese.alibaba.com/product-gs/medical-hospital-neubauer-improved-blood-counting-chamber-with-darkline-and-bright-line-582564180.html>

Após a contagem dos esporos presentes em cada uma das cinco áreas de $0,04 \text{ mm}^2$, calculou-se a média dos valores encontrados. Para o cálculo do volume foi considerada a altura de $0,1 \text{ mm}$ indicada na lâmina. Sendo assim foi possível calcular o número de células presentes em um mL.

4.4. Curva de crescimento

Primeiramente preparou-se o meio mínimo para o crescimento dos micro-organismos seguindo as concentrações apresentadas na Tabela IV.1.

Tabela IV.1. Composição do meio mínimo para crescimento dos micro-organismos.

Componente	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	MgSO_4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4	K_2HPO_4	CuSO_4
1L	10g	1,1g	1,0g	5,44g	6,98g	0,01g
0,4L	4g	0,44g	0,4g	2,176g	2,792g	0,004g

Em seguida, o meio mínimo foi autoclavado juntamente com os demais materiais necessários para o procedimento, 30 tubos falcon e uma pipeta de 10 mL . Após esfriar, foi vertido 10 mL de meio de cultura em cada tubo falcon. Posteriormente adicionou-se em cada tubo $20 \mu\text{L}$ da solução de esporos. Os tubos foram nomeados e incubados no shaker a 25°C e 180 rpm . Foi utilizada a seguinte codificação para identificar as cepas dos fungos, letra C para o fungo *P. chrysogenum* e U para o *P. crustosum*, seguida de dois numerais, o primeiro referente ao dia da análise (1 a 5) e o segundo referente à numeração da triplicata (1 a 3).

Desta forma o crescimento dos fungos foi determinado seguindo o método da massa seca. Para isto 30 filtros foram previamente secos em estufas a 40°C, pesados e tarados para posterior secagem e pesagem das massas obtidas a cada dia de análise.

4.5. Fermentação

- Preparo do tampão citrato

Para o preparo da solução tampão adicionou-se 86,1 g de ácido cítrico (57,40 g/L) e 26,46 g de citrato de sódio diidratado (17,64 g/L) em 1,5 L de água destilada. Mexeu-se até dissolver todo o sólido presente. Todo o conteúdo foi homogeneizado até dissolução completa dos reagentes sólidos.

- Preparo do meio de fermentação

O meio para fermentação foi preparado a partir do planejamento experimental axial variando as concentrações de LAS e glicose como pode ser observado na Tabela IV.2. Os demais componentes do meio de cultura foram empregados nas concentrações indicadas na Tabela IV.1. Todos os ensaios foram preparados em amostras com volume total de 100 mL em 12 erlenmeyers respectivamente, sendo o ensaio 12 utilizado como controle, isto é, sem adição de micro-organismos. Todos os componentes foram adicionados à solução tampão de citrato para obtenção do meio com pH 3,0.

Foi preparada também a solução super concentrada de LAS para posterior aquisição das concentrações desejadas. Esta solução foi preparada adicionando 6 g de LAS em 100 mL de água destilada. O volume retirado desta solução inicial para alcançar a concentração necessária para cada efluente é apresentado na Tabela IV.2.

Tabela IV.2. Planejamento experimental variando a concentração de LAS e Glicose.

Ensaio	LAS (g/L) ¹	VOLUME retirado da solução LAS saturada (μL) ¹	LAS (g/L) ²	VOLUME retirado da solução LAS saturada (μL) ²	Glicose (g/L)
1	-1 (0,010)	17	-1 (0,003)	5	-1 (6,45)
2	-1 (0,010)	17	-1 (0,003)	5	+1 (13,55)
3	+1 (0,030)	50	+1 (0,009)	15	-1 (6,45)
4	+1 (0,030)	50	+1 (0,009)	15	+1 (13,55)
5	-1,41(0,006)	10	-1,41(0,002)	3,3	0 (10)
6	+1,41(0,034)	57	+1,41(0,010)	17	0 (10)
7	0 (0,020)	34	0 (0,006)	10	-1,41 (5)
8	0 (0,020)	34	0 (0,006)	10	+1,41 (15)
9*	0 (0,020)	34	0 (0,006)	10	0 (10)
10*	0 (0,020)	34	0 (0,006)	10	0 (10)
11*	0 (0,020)	34	0 (0,006)	10	0 (10)

¹ Primeiro planejamento experimental, no qual a faixa da variação de concentração de LAS foi maior.

² Segundo planejamento experimental, no qual a faixa da variação de concentração de LAS foi reduzida.

Após a etapa de preparo as amostras foram autoclavadas. Foi esperado que a temperatura das amostras abaixasse para adição de 200 μL da solução de esporos, o que correspondeu a $1,78 \times 10^7$ de esporos para o *P. chrysogenum* e $1,36 \times 10^7$ de esporos para o *P. crustosum*. Em seguida os ensaios foram dispostos no shaker a 25°C e 180 rpm durante um período de cinco dias.

Primeiramente foi realizada a fermentação do *P. crustosum* e posteriormente do *P. chrysogenum*.

4.6. Análise (MBAS)

- Medição do pH

Anterior aos testes analíticos o pH de todos os ensaios foram medidos para verificar alteração do mesmo durante o processo de biodegradação.

- Preparo das soluções

As soluções empregadas nas análises foram preparadas considerando redução de 40% do volume seguindo a proporcionalidade apresentada pelo protocolo MBAS, uma vez que estas são consideradas efluentes tóxicos. A Tabela IV.3 exibe os volumes definidos pela literatura e os valores empregados experimentalmente.

Tabela IV.3. Relação das reduções dos volumes das soluções empregadas para análise das fermentações, protocolo MBAS.

Solução	Volume indicado na literatura por análise (mL)	Volume empregado por análise (mL)
Amostra	100	60
Azul de metileno	25	15
Clorofórmio	30	18
Álcool*	5	3
Lavagem	50	30

*Recomendado pela literatura adicionar este composto se houver agitação excessiva em altas concentrações de surfactante, para evitar formação de espumas.

- Solução de azul de metileno (500 mL)

Primeiramente foi dissolvido 15 mg (0,015 g) de azul de metileno em 30 mL de água e em seguida esta solução foi transferida para um frasco de 500 mL, no qual foi adicionado mais 250 mL de água, 20,5 mL de H₂SO₄ 6M e 25 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado. Mexeu-se até que o sólido presente se dissolvesse e posteriormente completou-se o volume para 500 mL.

- Solução de lavagem

Foi adicionado 41 mL de H₂SO₄ 6M a 500 mL de água em um frasco de 1000 mL. Posteriormente acrescentou-se 50 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, mexeu-se até dissolver e fez-se a diluição para 1000 mL.

- Procedimento analítico / Extração

A extração foi realizada de acordo com a metodologia proposta no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998), com algumas modificações descritas a seguir.

Doze papéis de filtro foram cortados previamente e inseridos em estufa para remoção de toda água presente. Em seguida foram pesados para posterior obtenção do valor da tara. As doze amostras fermentadas passaram por uma filtração de bomba a vácuo. Desta forma o líquido foi reservado e a massa retida no papel filtro foi levada para estufa para retirada de todo líquido presente.

Em um funil de separação foi inserido 60 mL do filtrado e 15 mL da solução de azul de metileno. Em seguida adicionou-se 6 mL de clorofórmio e mexeu-se vigorosamente 30 vezes o funil para homogeneização, após a separação das fases retirou-se a fase mais densa. Este procedimento foi realizado três vezes. A amostra restante no funil foi descartada e a fase densa total retida em um béquer foi vertida no funil, no qual foi adicionado também 30 mL da solução de lavagem. O funil foi agitado novamente 30 vezes, após o repouso e separação das fases retirou-se a fase mais densa, a qual foi levada para leitura da absorbância no espectrofotômetro a 652 nm. O branco (água destilada) utilizado para zerar o instrumento passou por todos os passos descritos anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Reativação

Os fungos encontravam-se em óleo mineral, o qual conserva a integridade destes micro-organismos e ao mesmo tempo os mantém inativos, ou seja, sem que haja crescimento de hifas e formação de esporos.

Após os cinco dias de incubação o *P. crustosum* havia esporulado (coloração verde), no entanto o *P. chrysogenum* não apresentava esporulação, apenas crescimento de hifas (coloração branca), o que poderia ser resultado de uma possível contaminação. No dia seguinte havia aparecido uma coloração verde na placa do *P. chrysogenum*, desta forma concluiu-se após análise das placas que o fungo provavelmente desta espécie tem a necessidade de um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de ausência de luz. Por isto a coleta dos esporos foi realizada no dia posterior. Esta análise pode ser observada na Figura 5.1.

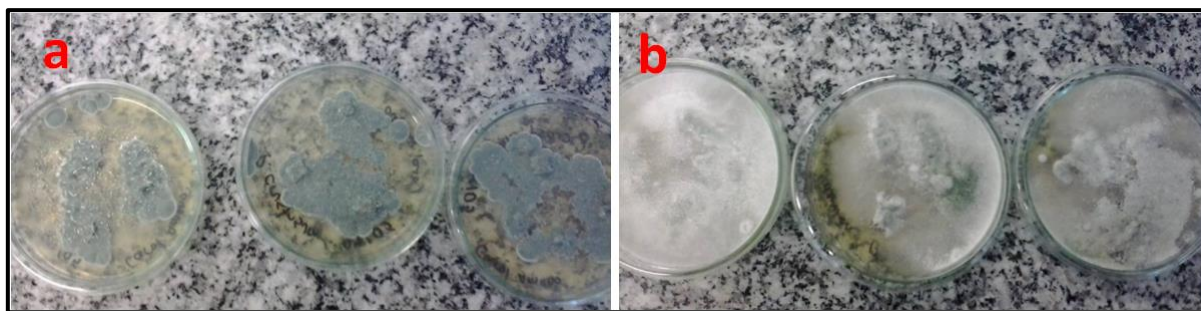


Figura 5.1. Reativação dos micro-organismos em Batata dextrose ágar. a) *P. crustosum* apresentou esporos dentro do período de cinco dias. b) *P. chrysogenum* devido o fotoperíodo apresentou esporos após seis dias de incubação.

5.2. Coleta dos esporos

Os esporos foram armazenados em solução salina para evitar que ocorresse o processo de osmose e, conseqüentemente, rompimento dos mesmos, apesar da estrutura e resistência da parede dos esporos. A osmose pode acontecer devido a diferença de íons entre o meio interno do esporo e o meio externo, caso não fosse utilizada a solução salina.

5.3. Contagem dos esporos

Para o fungo *P. chrysogenum* foram contados 35,55 esporos em $0,04\text{mm}^2$. A câmara possuía profundidade equivalente a $0,1\text{mm}$, logo seu volume é equivalente a $0,004\text{mm}^3$. Desta forma é possível encontrar a quantidade de esporos presentes em um mL de solução.

$$\begin{aligned} \frac{35,55 \text{ esporos}}{0,004\text{mm}^3} &= \frac{35,55 \text{ esporos}}{0,004 \times 10^{-9}\text{m}^3} = \left(\frac{35,55 \times 10^9 \text{ esporos}}{0,004\text{m}^3} \right) \times \left(\frac{1\text{m}^3}{10^6\text{mL}} \right) \\ &= \frac{8,89 \times 10^6 \text{ esporos}}{\text{mL}} \end{aligned}$$

Considerando o fator de diluição, tem-se:

$$\left(\frac{8,89 \times 10^6 \text{ esporos}}{\text{mL}} \right) \times 10 = \frac{8,89 \times 10^7 \text{ esporos}}{\text{mL}}$$

Para o fungo *P. crustosum* foram contados 27,40 esporos em $0,004\text{mm}^3$. Seguindo o raciocínio anterior foi calculado $6,8 \times 10^7$ esporos/mL para este micro-organismo. Considerando também diluição de dez vezes da solução.

5.4. Curva de crescimento

Durante um período de cinco dias os tubos falcon foram retirados, três a cada dia, para o acompanhamento e construção da curva de crescimento de cada fungo. Os valores da massa seca de crescimento obtido para os dois micro-organismos encontra-se na Tabela V.1.

Tabela V.1. Massa seca das análises realizadas durante intervalo de cinco dias para construção da curva de crescimento dos micro-organismos.

Dia	1-peso(g)	2-peso(g)	3-peso(g)	4-peso(g)	5-peso(g)
<i>P. chrysogenum</i>	0,0007	0,0182	0,0269	0,0218	0,0331
(leituras)	0,0014	0,0208	0,0244	0,0240	0,0290
Média	0,0025	0,0182	0,0205	0,0258	0,0264
<i>P. crustosum</i>	0,0045	0,0127	0,0195	0,0230	0,0360
(leituras)	0,0057	0,0099	0,0214	0,0275	0,0459
Média	0,0042	0,0113	0,0327	0,0249	0,0457
Média	0,0048	0,0113	0,0245	0,0251	0,0425

Analisando as Figuras 5.2 e 5.3 percebe-se que os dois micro-organismos alcançam a fase estacionária do crescimento entre o terceiro e quarto dia de incubação.

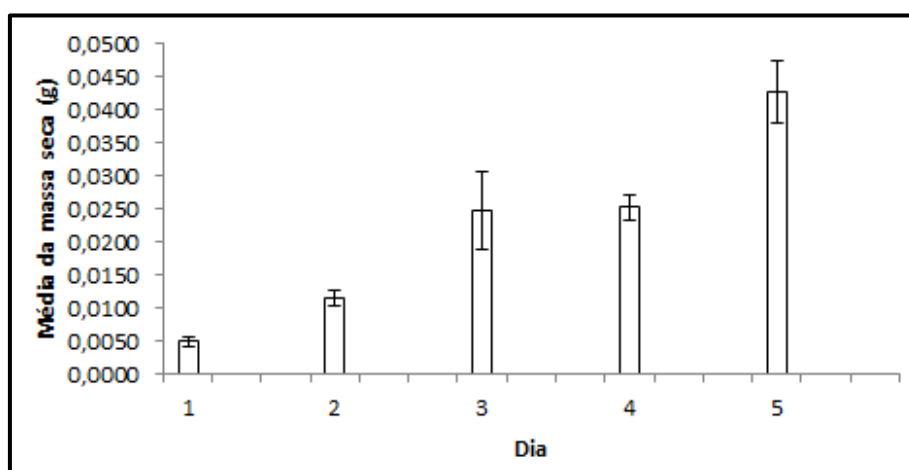


Figura 5.2. Curva de crescimento do *P. crustosum*.

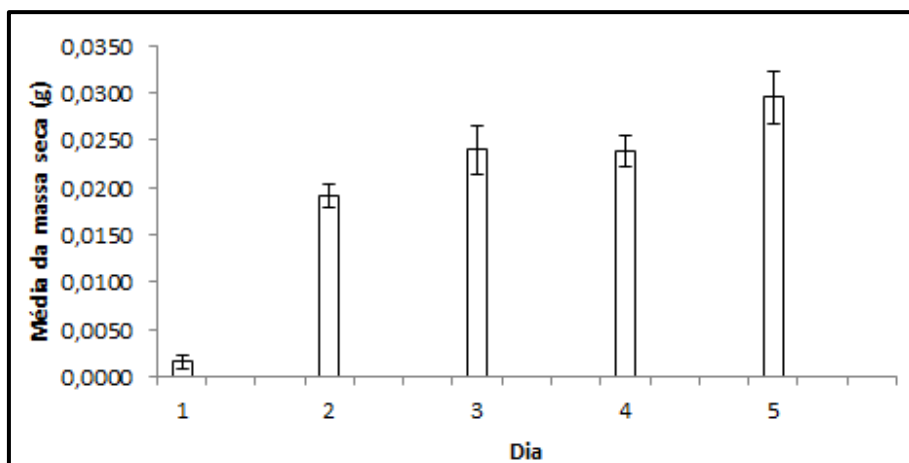


Figura 5.3. Curva de crescimento do *P. chrysogenum*.

5.5. Curva de calibração do método MBAS

A curva de calibração é fundamental para determinar a concentração final do surfactante após os processos de fermentação e extração, uma vez que ela fornece a equação linear para a realização do cálculo.

A metodologia utilizada para construção da curva requer o uso de reagentes tóxicos, desta forma a fim de reduzir o volume de efluentes contaminantes foi empregada a curva de calibração do método determinada em estudos anteriores, a qual apresenta alto grau de confiança ($R^2 = 0,998$). A curva é exibida na Figura 5.4.

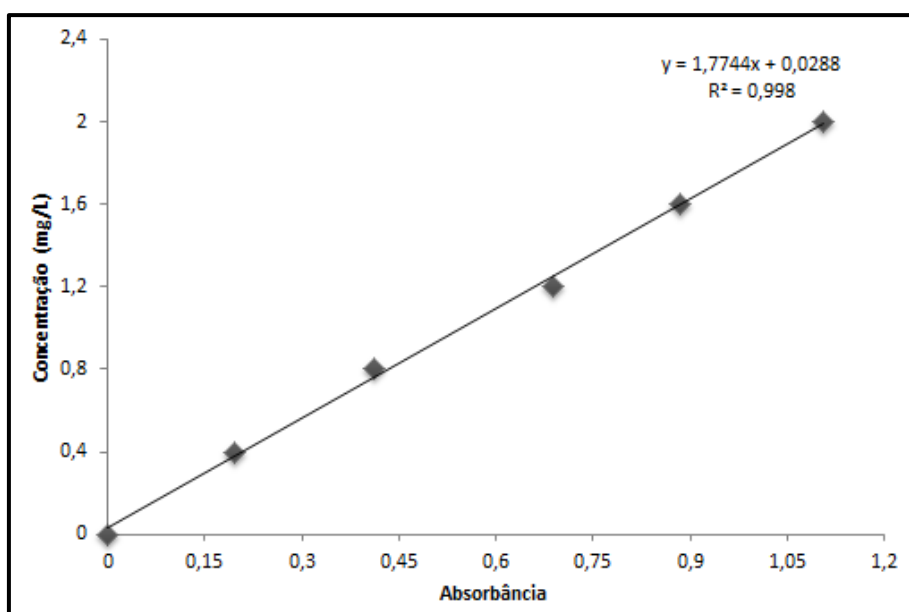


Figura 5.4. Curva de calibração do método MBAS aplicada na análise da biodegradação de surfactantes.

5.6. Fermentação *P. crustosum*

O resultado da fermentação do *P. crustosum* empregando as concentrações estabelecidas no primeiro planejamento experimental (Tabela IV.2) levou a elaboração do segundo planejamento, uma vez que houve crescimento do micro-organismo apenas na amostra 5 (Figura 5.5) que apresentava menor concentração de surfactante. Desta forma, foi realizada análise da biodegradação na amostra 5 e no ensaio utilizado como controle, como pode ser observado na Figura 5.6. Os valores encontrados com a medição do pH e do teste analítico são apresentados na Tabela V.2.



Figura 5.5. Resultado da primeira fermentação realizado com o *P. crustosum*, na qual houve crescimento somente na amostra 5.

Tabela V.2. Resultados para fermentação do *P. crustosum* seguindo o primeiro planejamento experimental.

Ensaio	pH	Absorbância	Massa seca (g)	Redução (%)
Amostra 5	2,82	0,468	0,1814	71,8220
Controle	2,81	0,556	0,0140	0,0000

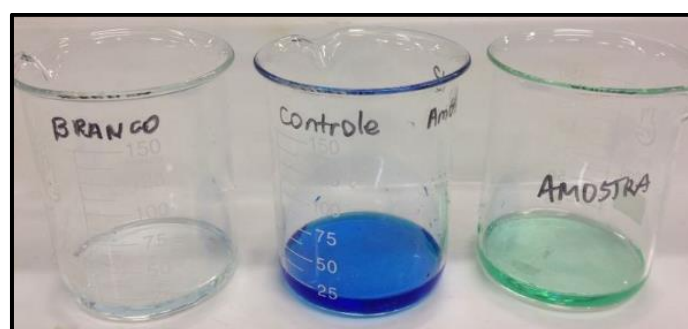


Figura 5.6. Resultado da análise MBAS relacionadas à primeira fermentação do *P. crustosum*.

O crescimento do micro-organismo apenas no ensaio que apresentava a menor concentração do surfactante sugere que o excesso deste composto, utilizado também como substrato, inibiu o crescimento do fungo. Sendo assim, o novo planejamento foi preparado considerando menores concentrações do surfactante. Os resultados obtidos após a realização da segunda fermentação e do processo de extração são apresentados na Tabela V.3 e na Figura 5.7.

Tabela V.3. Resultados para fermentação do *P. crustosum* seguindo o segundo planejamento experimental.

Ensaio	pH	Abs média	Massa seca (g)	Redução (%)
Amostra 1	3,08	0,225	0,4331	92,2248
Amostra 2	3,03	0,128	0,4574	95,3577
Amostra 3*	3,00	0,084	0,0717	89,2091
Amostra 4*	2,99	0,115	0,0901	85,8716
Amostra 5	3,04	0,121	0,4652	93,3758
Amostra 6*	2,98	0,444	0,0631	55,4061
Amostra 7	2,96	1,099	0,0880	81,9981
Amostra 8	3,00	0,378	0,3812	93,6416
Amostra 9	3,00	0,681	0,1035	88,7403
Amostra 10	2,98	1,927	0,0714	68,6185
Amostra 11	2,97	0,413	0,1548	93,0683
Controle*	3,00	0,603	0,0695	0,0000
Branco	-	0	-	-

*Amostra diluída 10 vezes para leitura no espectrofotômetro a 652 nm.

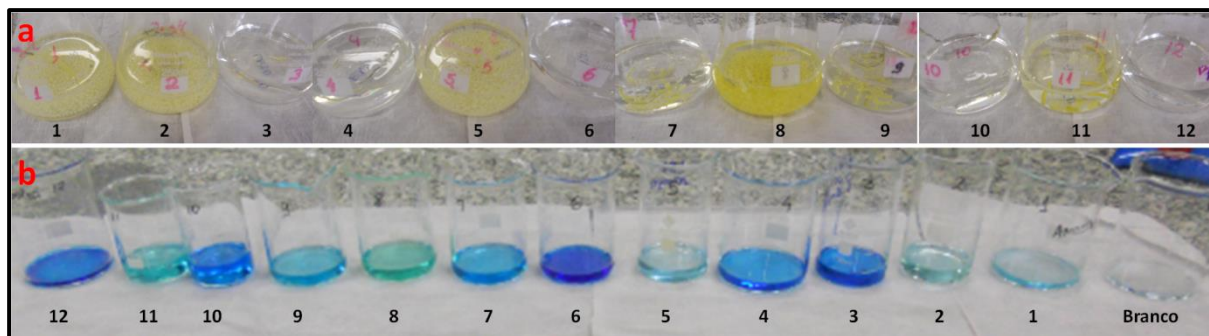


Figura 5.7. Resultados do micro-organismo *P. crustosum* (a) logo após a fermentação, apresentando a quantidade de massa presente em cada amostra e (b) resultados dos testes analíticos segundo protocolo MBAS.

Durante o processo de extração ocorre a formação de um complexo entre o azul de metileno (catiônico) e o surfactante (aniônico). Esta interação ocorre pelo fato de o azul de metileno ser sensível a compostos aniônicos que contenham uma parte hidrofóbica na sua constituição. Em consequência dessa interação, o par surfactante-azul de metileno é migrado para a fase orgânica (clorofórmio) e é facilmente extraível. O corante não associado apresenta solubildade extremamente pequena em clorofórmio. A quantidade de LAS contida na fase extraída é obtida através da medida da absorbância a uma faixa de 652 nm (COSTA, 2014).

A partir da Figura 5.7 percebe-se a diferença de tonalidade entre as análises das amostras. O tom azulado muito intenso indica pouca degradação do LAS, uma vez que a molécula do surfactante presente interage com as moléculas da solução de azul de metileno adicionada durante o teste analítico. Sendo assim, quanto mais azul, menor o processo de biodegradação e consequentemente maior a quantidade de LAS ainda presente. Por outro lado, quanto mais claro o tom da solução, maior a biodegradação do surfactante. As amostras 1, 2, 5, 8 e 11 são aquelas que apresentaram maiores quantidades de micro-organismos, menor tonalidade e maiores reduções do LAS, como também pode ser observado na Tabela V.3. Ainda em relação a estes cinco ensaios, durante o teste analítico, foi notado a presença de aglomerados nas soluções (Figura 5.8), muito provavelmente de proteínas, uma vez que foi utilizado um solvente orgânico e a presença do mesmo provoca a união de moléculas proteicas e posteriormente a precipitação delas.

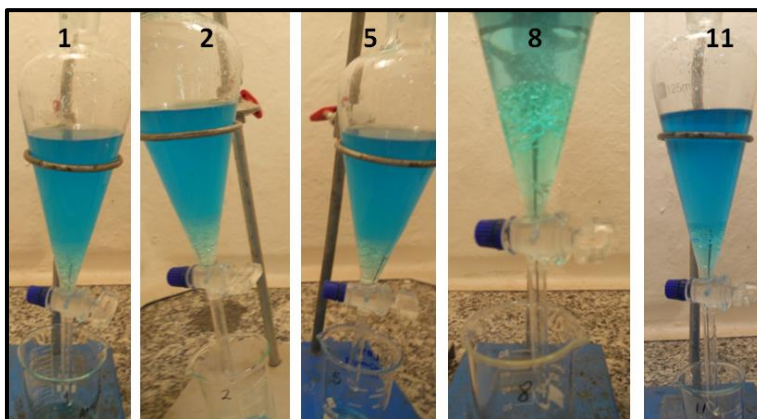


Figura 5.8. Destaque para a formação dos aglomerados, supostamente proteicos, observados nas amostras em destaque.

Além da análise visual, foi realizado um diagnóstico estatístico dos dados coletados utilizando o software Statistica, a partir do qual foi possível verificar se o planejamento realizado é significativo e preditivo. Para isto foram utilizadas duas variáveis de entrada (LAS e glicose) e duas variáveis de saída (massa seca e redução) para construção dos gráficos e tabelas e posteriormente realizar análise dos resultados.

As superfícies de resposta e curvas de contorno em relação às variáveis de saída, massa seca e redução, obtidas após a fermentação do *P. crustosum* podem ser observadas nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente.

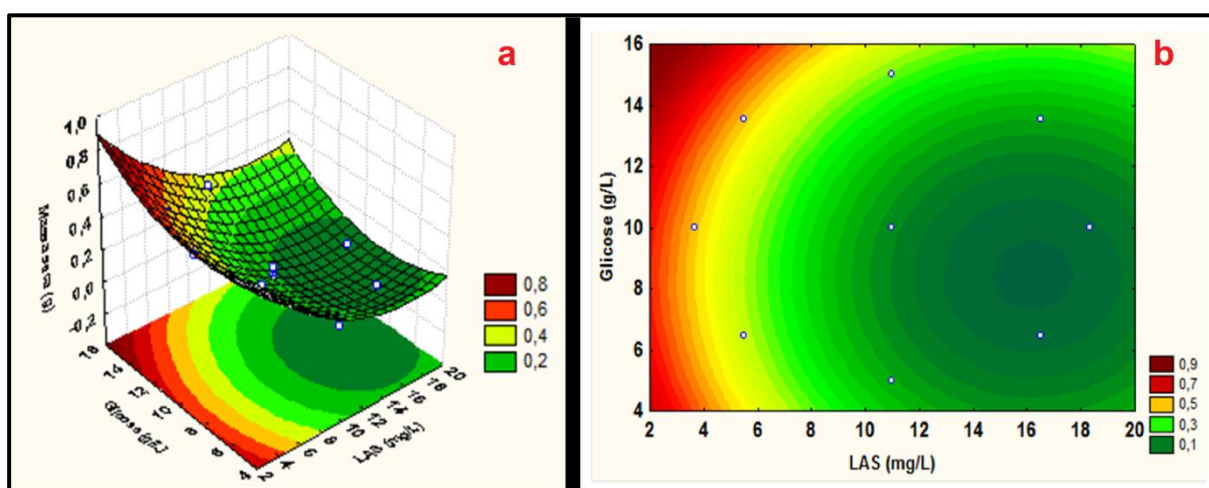


Figura 5.9. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a Massa seca (g) em função das concentrações de glicose (g/L) e LAS (mg/L) para o micro-organismo *P. crustosum*.

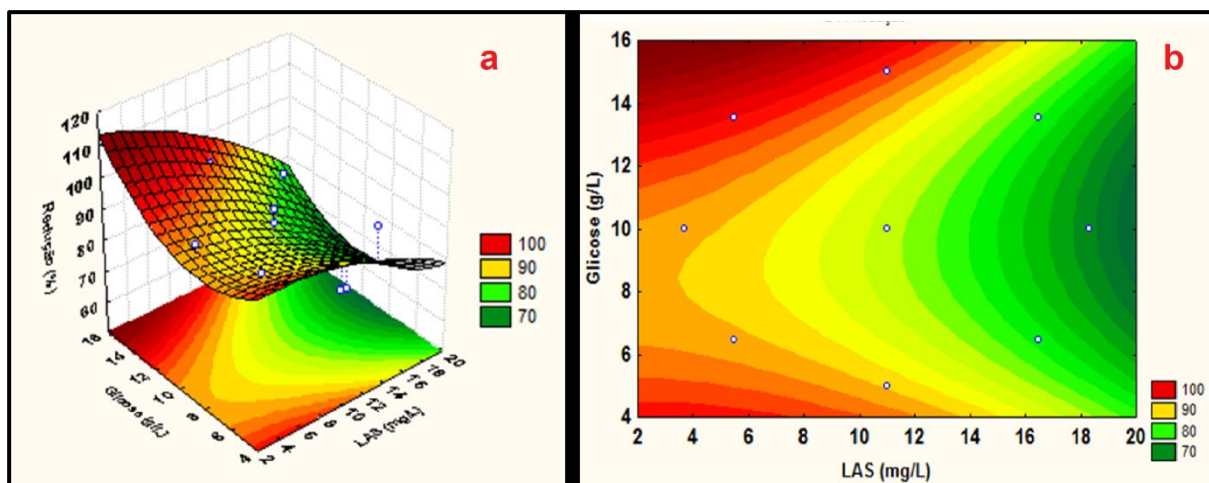


Figura 5.10. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução de LAS (%) em função das concentrações de glicose (g/L) e LAS (mg/L) para o micro-organismo *P. crustosum*.

Avaliando a Figura 5.9, percebe-se que grandes concentrações do LAS estão associadas a baixas quantidades de massa seca, ou seja, o aumento do surfactante está relacionado com a pequena presença de micro-organismos. Analisando a glicose, separadamente, nota-se que o ponto central escolhido (10 g/L) está localizado em regiões que apresentaram resultados satisfatórios tanto para a massa seca quanto para a redução, indicando assim que em experimentos futuros esta variável pode ser mantida fixa neste valor. Assim como foi observado para a massa seca, os gráficos referentes à redução do surfactante (Figura 5.10) mostram que quanto maior a concentração do LAS menor porcentagem de redução. As curvas de superfície também revelam que o valor do ponto central determinado para a glicose (10 g/L) condiz com um ponto que apresenta alta porcentagem de redução do surfactante (90 a 100%), em baixas concentrações de LAS (2 mg/L a 6 mg/L).

Além dos gráficos apresentados anteriormente, o software utilizado fornece os diagramas de Pareto para as variáveis de entrada analisadas, os quais são apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12.

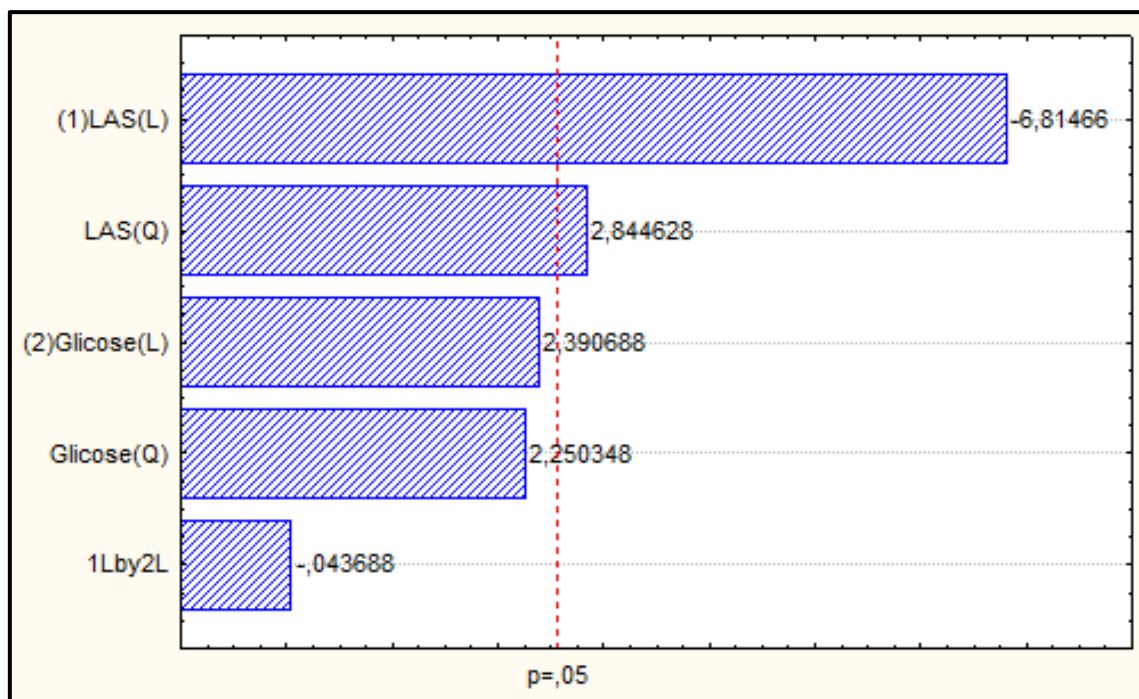


Figura 5.11. Diagrama de Pareto – variável massa seca da fermentação do *P. crustosum*.

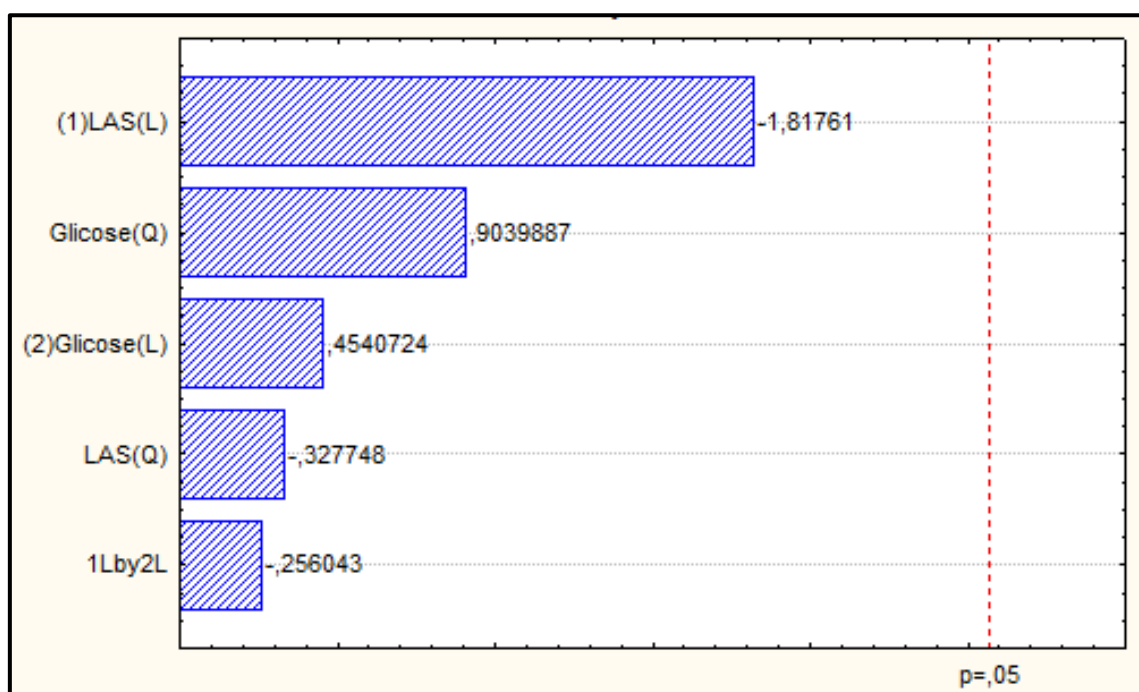


Figura 5.12. Diagrama de Pareto – variável redução da fermentação do *P. crustosum*.

Na Figura 5.11, podemos verificar que as variáveis independentes, LAS e glicose, são significativas para a variável de saída massa seca, uma vez que o LAS apresenta 95% de confiança e a glicose também se aproxima muito deste valor. No entanto a relação entre estas variáveis de entrada não é significativa para o presente estudo. O diagrama referente à

variável de saída redução (Figura 5.12) revela que o LAS, a glicose e a relação entre ambas não são confiáveis para construção do modelo matemático a partir do planejamento proposto.

A partir do diagnóstico do diagrama de Pareto da massa seca percebe-se que é interessante avaliar o modelo matemático estatisticamente, ou seja, se o mesmo é preditivo e significativo. Para isto é necessário calcular o F total do planejamento, o qual pode ser obtido a partir dos dados disponíveis na tabela ANOVA, fornecida pelo Statistica. Este cálculo pode ser observado na Tabela V.4.

Tabela V.4. ANOVA para a variável resposta massa seca na fermentação do *P. crustosum*.

Fonte	Soma dos quadrados (SS)	Grau de liberdade (df)	Quadrado médio (MS)	F
Regressão	0,285746	5	0,057149	12,5343
Resíduo	0,022797	5	0,004559	
Total	0,308543	10	-	

O valor F_{tabelado} é equivalente a 4,7350 e o valor $F_{\text{calculado}}$ é igual a 12,5343, sendo assim pode-se afirmar que o modelo matemático é estatisticamente significativo e preditivo. Desta forma é possível definir a equação matemática com as respectivas variáveis codificadas pela tabela de estimativas de efeitos gerada pelo Statistica.

$$\text{Massa seca} = 0,109753 - 0,167404(LAS) + 0,087893(LAS)^2 + 0,057190(Glicose) + 0,063775(Glicose)^2 \quad (\text{Equação I})$$

A confiabilidade da equação gerada (I) pode ser comprovada obtendo os valores preditos pelo modelo matemático descrito anteriormente. Considerando o ensaio de número 1 do planejamento, tem-se:

$$\begin{aligned} \text{Massa seca} &= 0,109753 - 0,167404(-1) + 0,087893(-1)^2 + 0,057190(-1) \\ &\quad + 0,063775(-1)^2 \\ \text{Massa seca} &= 0,371635 \text{ g} \end{aligned}$$

Comparando o valor predito (0,3716 g) e o valor observado (0,4331 g) percebe-se uma diferença ínfima no resultado (0,06 g). Esta análise também pode ser realizada graficamente como mostra a Figura 5.13.

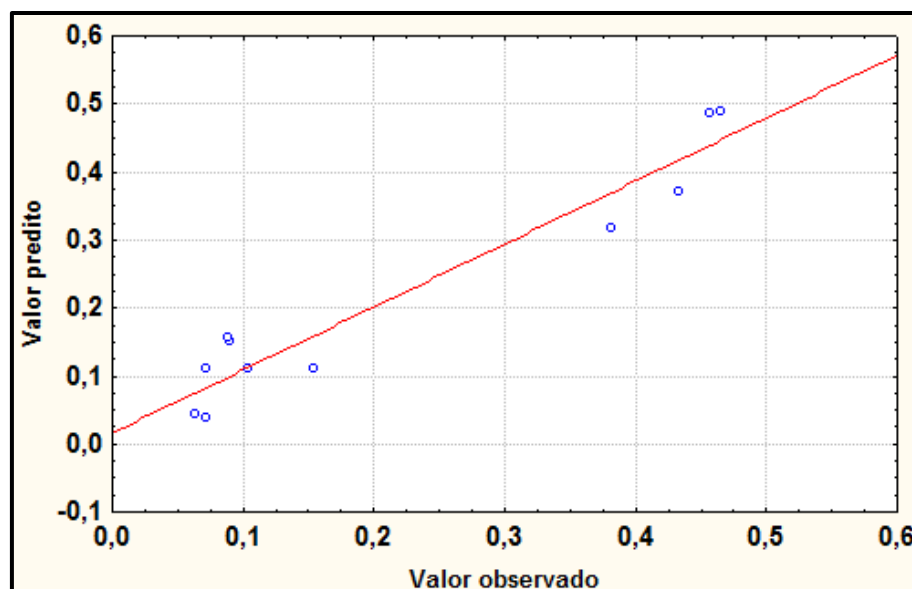


Figura 5.13. Valor predito versus valor observado para a variável massa seca do *P. crustosum*. Gráfico gerado pelo software Statistica.

Apesar do Diagrama de Pareto da variável redução não apresentar o intervalo de confiança esperado é interessante realizar o cálculo de F, como mostra a Tabela V5.

Tabela V.5. ANOVA para a variável resposta redução na fermentação do *P. crustosum*.

Fonte	Soma dos quadrados (SS)	Grau de liberdade (df)	Quadrado médio (MS)	F
Regressão	756,198	5	151,2395	0,9473
Resíduo	798,267	5	159,6535	
Total	1554,465	10	-	

Para o planejamento realizado o valor F_{tabelado} é equivalente a 4,7350 e o valor $F_{\text{calculado}}$ é igual a 0,9473, sendo assim pode-se dizer que este cálculo vai ao encontro com o que diz o Diagrama de Pareto (Figura 5.12) e com isto é possível afirmar que o modelo matemático não é estatisticamente significativo e preditivo em relação à variável redução.

5.7. Fermentação *P. chrysogenum*

Devido os resultados obtidos com a segunda fermentação do *P. crustosum* também foi empregado o segundo planejamento experimental (Tabela IV.2) para o *P. chrysogenum*. A Tabela V.6 e a Figura 5.14 mostram os resultados obtidos para este micro-organismo.

Tabela V.6. Resultados da fermentação do *P. chrysogenum*.

Ensaio	pH	Abs média	Massa seca (g)	Redução (%)
Amostra 1**	2,97	0,096	0,3847	94,6412
Amostra 2	2,92	0,899	0,0778	78,1498
Amostra 3*	3,00	0,523	0,0591	57,1278
Amostra 4*	3,00	0,723	0,0643	41,2118
Amostra 5	2,92	0,329	0,4919	87,6369
Amostra 6*	2,95	0,614	0,0724	54,8616
Amostra 7	2,97	1,387	0,0696	83,2496
Amostra 8*	2,96	0,600	0,0740	26,4405
Amostra 9*	2,92	0,533	0,0682	34,4383
Amostra 10*	2,89	0,573	0,0543	29,6635
Amostra 11*	2,85	0,489	0,0596	39,6906
Controle*	2,90	0,822	0,0576	0,0000
Branco	-	0	-	-

*Amostra diluída 10 vezes para leitura no espectrofotômetro a 652 nm.

**Amostra diluída 2 vezes para leitura no espectrofotômetro a 652 nm.

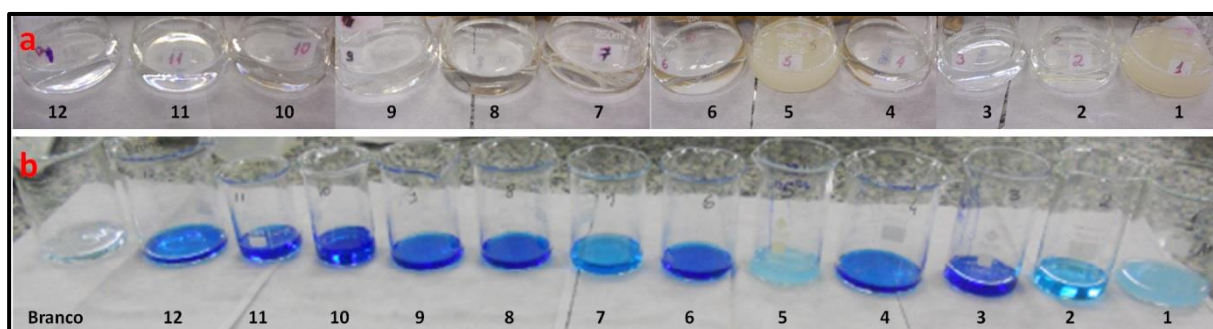


Figura 5.14. Resultados do micro-organismo *P. chrysogenum* (a) logo após a fermentação, apresentando a quantidade de massa presente em cada amostra e (b) resultados dos testes analíticos segundo protocolo MBAS.

Analisando a Figura 5.14 percebe-se que as amostras 1 e 5 apresentaram maiores quantidades de massa após a fermentação, o que também é observando na parte (b) da figura, na qual estes ensaios tem tonalidade azul muito claras. Nos ensaios de número 2 e 7 não é possível a visualização dos micro-organismos, no entanto apresentam coloração azul intermediária, indicando assim reduções moderadas. Estas considerações podem ser comprovadas através dos valores de redução do surfactante presente na Tabela V.5.

Assim como na fermentação do *P. crustosum* também foram analisados agregados, supostamente proteicos, nos ensaios que apresentaram maior porcentagem de redução do LAS (Figura 5.15).

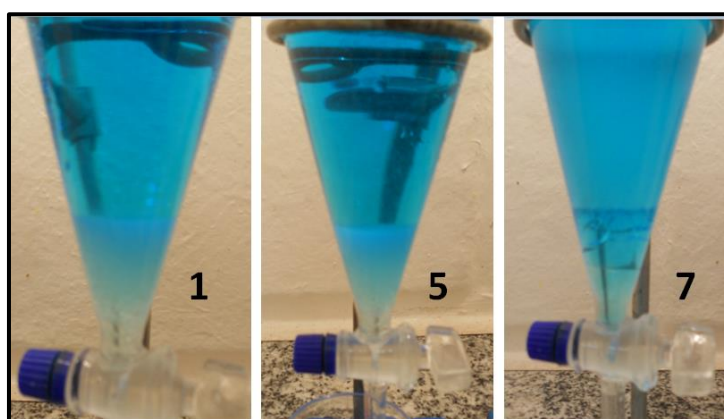


Figura 5.15. Destaque para a formação dos aglomerados, supostamente proteicos, observados nas amostras 1, 5 e 7.

As curvas de superfície geradas pelo Statistica são mostradas nas Figuras 5.16 e 5.17.

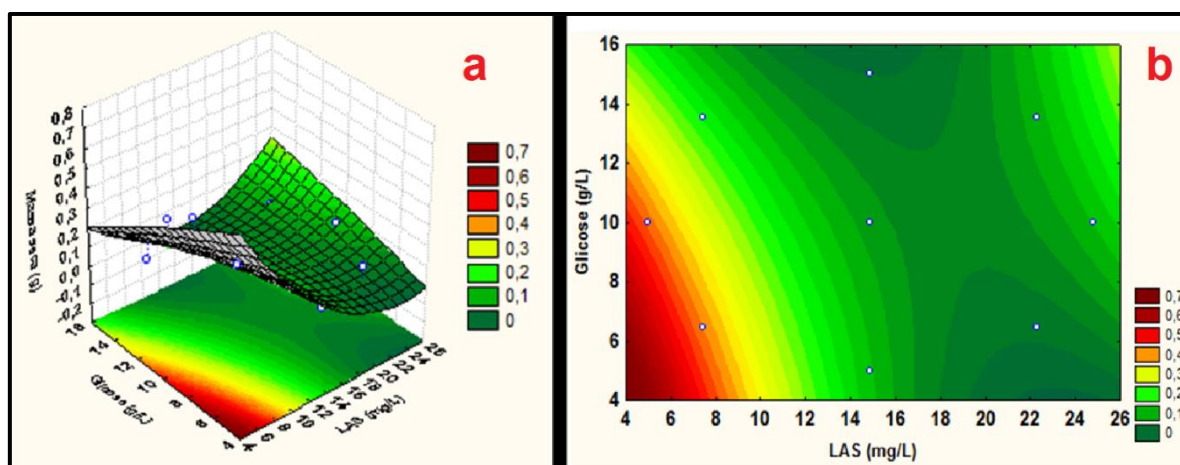


Figura 5.16. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a Massa seca (g) em função das concentrações de glicose (g/L) e LAS (mg/L) para o *P. chrysogenum*.

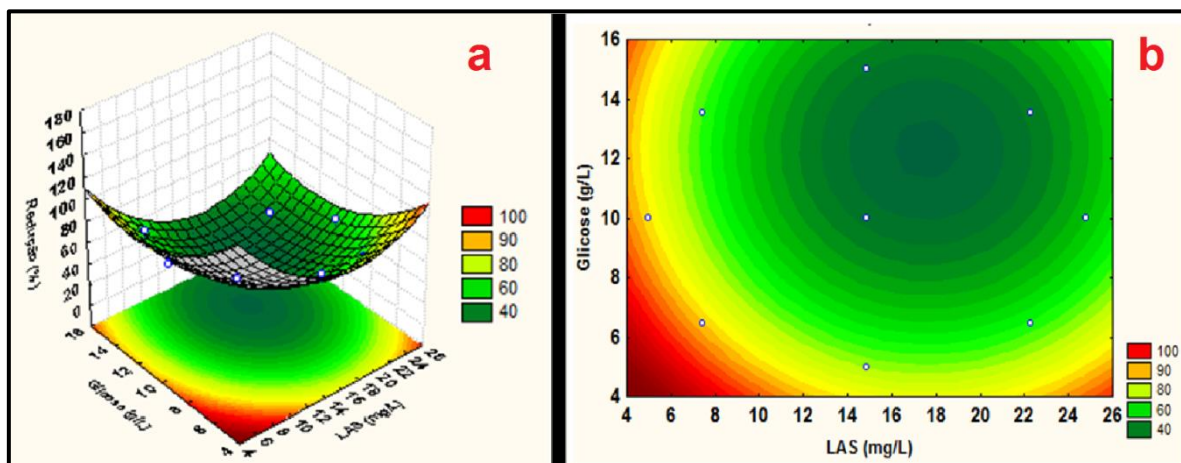


Figura 5.17. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução (%) em função das concentrações de glicose (g/L) e LAS (mg/L) para o micro-organismo *P. chrysogenum*.

Analisando a Figura 5.16 observa-se que quanto maior a concentração de LAS, menor a quantidade de massa seca obtida. Em relação à glicose percebe-se que dentro da faixa estudada, o fungo cresce satisfatoriamente no intervalo de 4 g/L a 10 g/L, sendo este último valor definido como o ponto central da glicose.

A curva de superfície exposta na Figura 5.17 retrata que dentro da faixa de variação das variáveis de entrada (glicose e LAS) a melhor combinação ocorre quando se tem pequenas concentrações de LAS (entre 4 mg/L e 8 mg/L) e também baixas concentrações de glicose (4 g/L a 10 g/L), uma vez que nesta região foi observado alto nível de redução do surfactante. Analisando a curva além do limite das concentrações máximas empregadas, sugere-se que existem outros pontos ótimos para a biodegradação, ou seja, pontos que provavelmente apresentarão alta redução do surfactante. No entanto estes pontos envolvem altas concentrações de uma das variáveis estudadas (glicose e LAS) ou até mesmo das duas variáveis, o que pode tornar o processo inviável economicamente. Sendo assim, com base nas curvas de superfície geradas, o ponto que melhor caracteriza a biodegradação do *P. chrysogenum* é aquele que envolve menores concentrações de LAS e glicose.

Os diagramas de Pareto, também fornecidos pelo software empregado, são exibidos nas Figuras 5.18 e 5.19.

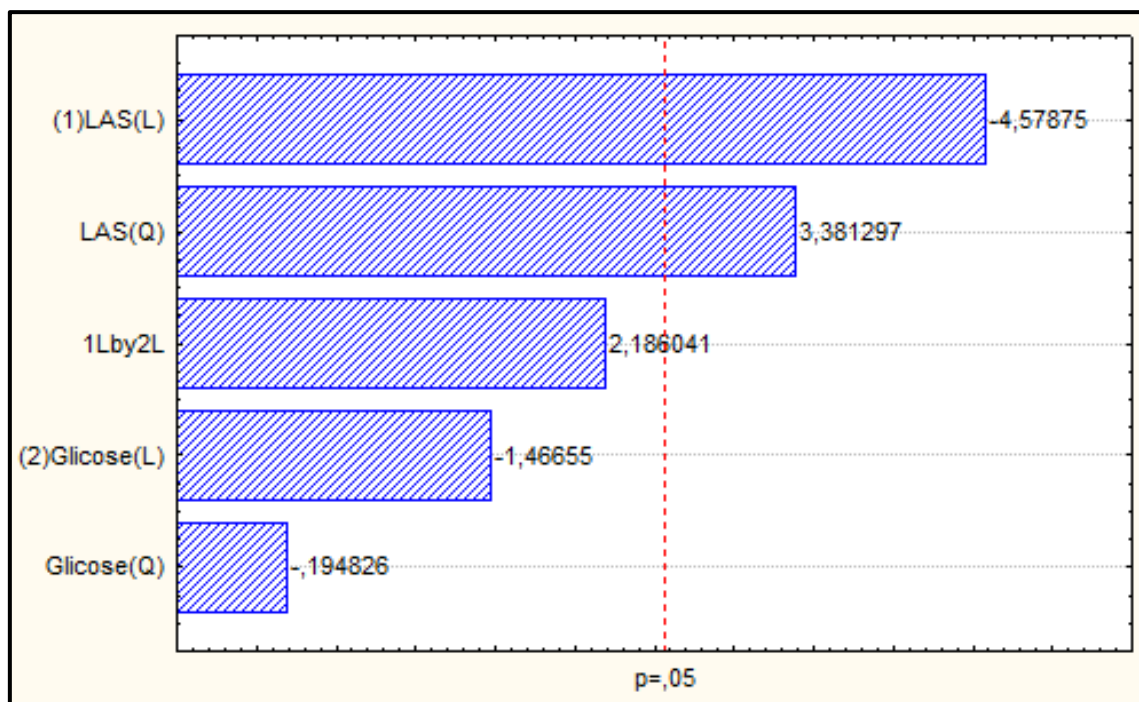


Figura 5.18. Diagrama de Pareto – variável massa seca da fermentação do *P. chrysogenum*.

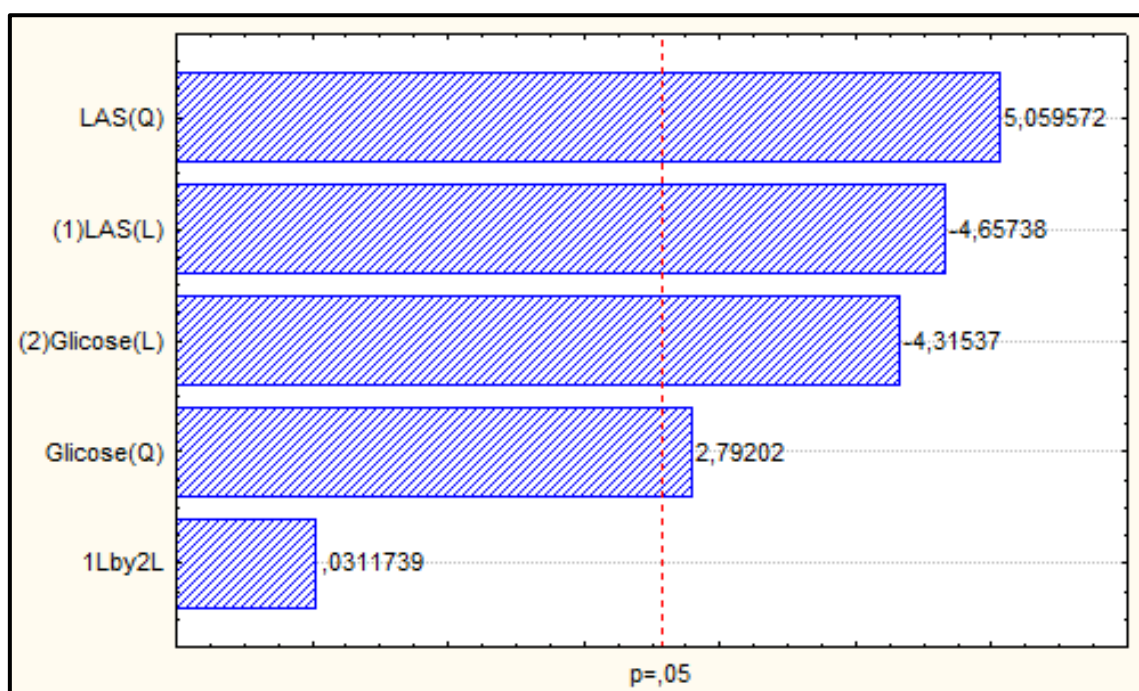


Figura 5.19. Diagrama de Pareto – variável redução da fermentação do *P. chrysogenum*.

Os diagramas mostram que a variável LAS (linear e quadrática) são significativas para a biodegradação do surfactante em relação às duas variáveis de saída. Os gráficos revelam ainda que a glicose (linear e quadrática) é expressiva em termos da redução do LAS e de menor importância em relação à massa seca gerada ao final da biodegradação. Além disto,

percebe-se que a interação das variáveis independentes, em ambas as análises, não atinge o ponto de confiança desejado (95%), sendo esta interação pouco mais significativa na análise da massa seca.

Também é interessante calcular o F total para as duas variáveis de saída, a fim de definir se o modelo matemático é significativo e preditivo em ambas as situações. Estes cálculos são realizados a partir de suas respectivas tabela ANOVA e são apresentados nas Tabelas V.7 e V.8.

Tabela V.7. ANOVA para a variável resposta massa seca na fermentação do *P. chrysogenum*.

Fonte	Soma dos quadrados (SS)	Grau de liberdade (df)	Quadrado médio (MS)	F
Regressão	0,206849	5	0,04137	8,1184
Resíduo	0,025479	5	0,005096	
Total	0,232328	10	-	

O valor F_{tabelado} é equivalente a 4,7350 e o valor $F_{\text{calculado}}$ é igual a 8,1184, sendo assim pode-se afirmar que o modelo matemático é estatisticamente significativo e preditivo. Desta forma é possível definir a equação matemática com as respectivas variáveis codificadas pela tabela de estimativas de efeitos gerada pelo Statistica.

$$Massa\ seca = 0,062536 - 0,118910(LAS) + 0,110450(LAS)^2 + 0,078025(1L\ by\ 2L)$$

(Equação II)

A confiabilidade da equação gerada (II) pode ser comprovada obtendo os valores preditos pelo modelo matemático descrito anteriormente. Considerando o ensaio de número 1 do planejamento, tem-se:

$$Massa\ seca = 0,062536 - 0,118910(-1) + 0,110450(-1)^2 + 0,078025((-1)x(-1))$$

$$Massa\ seca = 0,3699\ g$$

Comparando o valor predito (0,3699 g) e o valor observado (0,3847 g) percebe-se que a variação entre os resultados (0,01 g) é praticamente desprezível. Esta análise também pode ser realizada graficamente como mostra a Figura 5.20.

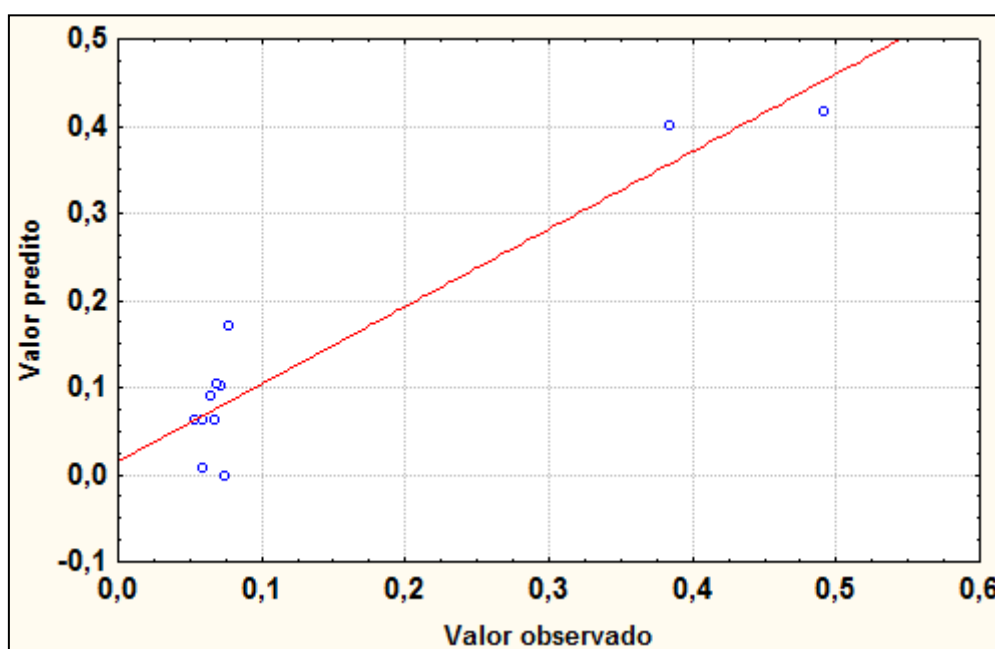


Figura 5.20. Valor predito versus valor observado para a variável massa seca do *P. chrysogenum*. Gráfico gerado pelo software Statistica.

A partir do valor de F calculado, como mostra a Tabela V.8, relacionada à variável redução, e seguindo todo o raciocínio descrito anteriormente é possível realizar conclusões a respeito do modelo matemático estatístico do planejamento.

Tabela V.8. ANOVA para a variável resposta redução na fermentação do *P. chrysogenum*.

Fonte	Soma dos quadrados (SS)	Grau de liberdade (df)	Quadrado médio (MS)	F
Regressão	5809,614339	5	1161,923	13,6409
Resíduo	425,895	5	85,17896	
Total	6235,509	10	-	

O $F_{\text{calculado}}$ para redução (13,6409) também apresenta valor superior ao F_{tabelado} (4,7350), predizendo assim que este modelo também é significativo e preditivo. Sendo assim a equação matemática obtida da tabela de efeitos do software é apresentada abaixo:

$$\text{Redução} = 34,4997 - 15,6376(LAS) + 21,3677(LAS)^2 - 14,1099(Glicose) + 10,8152(Glicose)^2 \quad \text{Equação (III)}$$

Substituindo as variáveis de entrada pelos respectivos valores do ensaio número 1, ou seja, -1 para ambas, tem-se:

$$\begin{aligned} \text{Redução} &= 34,4997 - 15,6376(-1) + 21,3677(-1)^2 - 14,1099(-1) + 10,8152(-1)^2 \\ \text{Redução} &= 96,43\% \end{aligned}$$

Desta forma percebe-se que a variação entre o valor predito (96,43%) e o valor obtido (94,6412%) é igual a 1,79%, ou seja, a diferença é mínima, garantindo assim a confiabilidade da equação (III). Esta credibilidade também pode ser confirmada graficamente (Figura 5.21).

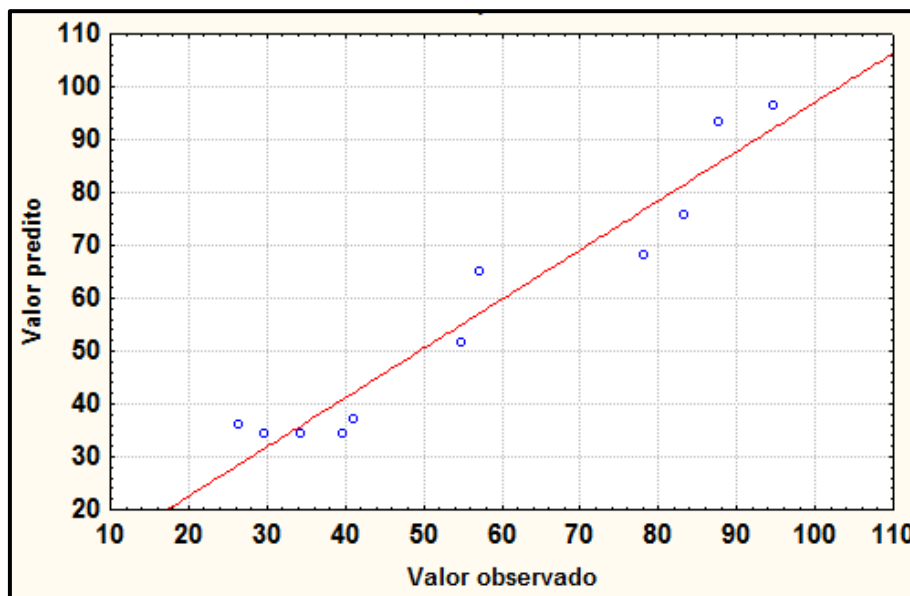


Figura 5.21. Valor predito versus valor observado para a variável redução do *P. chrysogenum*. Gráfico gerado pelo software Statistica.

Após todo tratamento de dados e análise dos resultados da biodegradação utilizando os fungos do gênero *Penicillium*, percebe-se que as porcentagens de redução do LAS, em determinadas condições, encontrados no presente trabalho (entre 90 e 95%) se mostram superiores em relação à grande parte dos valores presentes na literatura.

Esteves (2010) observou a adaptação dos micro-organismos e consequente biodegradação do LAS em quatro etapas distintas de operação do reator UASB, variando os substratos adicionados em cada uma delas. A etapa I (adição de 14 ± 1 mg/L de LAS) foi aquela que apresentou elevada remoção (90%), no entanto, essa etapa também foi

caracterizada pela ocorrência de adsorção de LAS na biomassa, o que reduziu a eficiência de remoção por biodegradação. A etapa IV, na qual houve adição de extrato de levedura, percebeu-se a maior remoção de LAS efetivamente ($53,3 \pm 10,7\%$). A menor remoção foi observada na etapa III ($31,1 \pm 14,6\%$), na qual houve instabilidade pelo aumento da concentração de oxigênio na água de abastecimento usada no preparo do meio.

Okada et al. (2009) também estudaram o processo de biodegradação em reatores UASB, considerando duas etapas, a primeira de adaptação e a segunda com adição de LAS na concentração de 14mg/L. Nesta segunda etapa foi observada remoção de $50 \pm 20\%$ do surfactante.

Analisando os resultados apresentados à cima e os dados obtidos neste presente trabalho, percebe-se que a biodegradação utilizando fungos filamentosos se mostra bastante eficiente, uma vez que foram alcançados elevados valores de redução do LAS. No entanto é importante destacar que Okada et al. (2009) relataram significativa redução do LAS ($50 \pm 20\%$), pois a concentração de surfactante analisada se diz consideravelmente alta (14 mg/L). Desta forma, é interessante considerar a viabilidade de estudos que avaliem a adaptação e biodegradação dos fungos *P. crustosum* e *P. chrysogenum* em maiores concentrações de LAS.

6. CONCLUSÕES

Analisando, de forma generalizada, os resultados obtidos com os experimentos mostraram que a presença de altas concentrações de surfactante leva a inibição no crescimento dos micro-organismos, o que pode ser comprovado com a análise quantitativa da massa seca. Esta inibição, provavelmente, provoca uma baixa na porcentagem da redução do LAS, pois também foi observado que altas concentrações deste surfactante estão associadas a pequenos valores de reduções.

Analisando isoladamente o *P. crustosum*, dentro da faixa estudada, percebe-se que este micro-organismo cresceu satisfatoriamente dentro de toda faixa de glicose estudada (5 g/L a 15 g/L). No entanto o crescimento foi significativo apenas em baixas concentrações de LAS, entre 2 mg/L e 4 mg/L. Consideravelmente relacionado à massa seca, a redução do surfactante mostrou-se eficiente (90 a 100%) dentro de toda faixa de glicose estipulada, contemplando também um intervalo maior de variação do LAS (2 mg/L a 8 mg/L).

O *P. chrysogenum*, particularmente, apresentou significativa quantidade de massa seca até a concentração de 12 g/L de glicose e entre os valores de 2 mg/L a 8 mg/L de LAS. Em

relação à redução do LAS, esta ocorreu satisfatoriamente até o valor de 10 g/L de glicose e 10 mg/L de surfactante, aproximadamente. Também foram observados outros dois pontos de redução eficientes, um em altas concentrações de glicose e baixas quantidades de LAS e o outro em grandes concentrações de LAS e pequenas quantidades de glicose. No entanto estes últimos pontos podem ser considerados críticos, uma vez que atingir os altos valores necessários de glicose ou LAS pode ser inviável na prática e até mesmo economicamente.

Avaliando todas as considerações conjuntamente, percebe-se que o ponto de 10 g/L de glicose apresentou resultados satisfatórios em todas as análises. Desta forma, em estudos futuros esta variável pode se tornar ponto fixo do experimento e iniciar a análise de outra componente que possa ser considerada interferente, positiva ou negativamente, no processo de biodegradação.

Além disto, na maioria das análises, foi notório que ensaios que continham grandes quantidades de LAS não apresentaram resultados aceitáveis, ou seja, houve pouco crescimento dos micro-organismos e consequentemente também ocorreram baixas reduções do surfactante. Numericamente a melhor faixa de LAS foi observada entre 2 mg/L e 8 mg/L. Paralelamente a esta observação é importante destacar que alguns estudos mostraram que a concentração de surfactante presente nas saídas das ETE's está aproximadamente entre, 1,39 mg/L e 2,61 mg/L, como avaliou Bonfim (2006). Bonfim também relatou que ainda nestes estudos a redução do LAS atingiu valores entre 36% e 90%.

Para obtenção de resultados satisfatórios de redução do LAS em elevadas concentrações do surfactante é necessário verificar a viabilidade e realizar estudos de adaptações das culturas de micro-organismos avaliados neste trabalho.

O processo de biodegradação estudado apresentou algumas reduções próximas a 90%, em alguns casos chegando alcançar 95%. A maior redução (95,36%) foi alcançada pelo *P. crustosum* com 3 mg/L de LAS e 13,55 g/L de glicose. Em condições parecidas o *P. chrysogenum* também apresentou 94,64% de biodegradação na presença de 3 mg/L de LAS e 6,45 g/L de glicose. Desta forma percebe-se que este processo de degradação, empregando fungos filamentosos, se mostra como um método interessante para ser inserido como um processo de tratamento após as etapas convencionais já utilizadas, uma vez que, os melhores resultados foram observados em baixas concentrações de LAS. Visando, assim, atingir maiores reduções destes compostos que se classificam como substâncias tóxicas aos organismos vivos e mesmo assim são altamente empregados em processos de higienização, o que os tornam presentes em grandes quantidades nos recursos hídricos do planeta.

7. ATIVIDADES FUTURAS

A área de estudos relacionada às questões ambientais, principalmente no que se diz respeito à descontaminação dos recursos hídricos, é uma atividade constante e que necessita de atualizações frequentemente. A origem dos contaminantes despejados nas águas e solos é imensa e com isto os processos de tratamentos de efluentes devem ser avaliados e reformulados rotineiramente. Desta forma, vê-se a necessidade da continuidade dos estudos realizados e com isto são sugeridas algumas atividades futuras, as quais poderão aperfeiçoar os processos estudados neste presente trabalho:

- ✓ Fixar a variável glicose na concentração máxima de 10 g/L, ou seja, o valor empregado pode ser inferior à esta concentração, uma vez que, foi observado resultados satisfatórios de massa seca e redução em quantidades menores deste substrato;
- ✓ Realizar estudos de adaptações das culturas de micro-organismos avaliados neste trabalho, visando, assim, atingir valores de reduções elevados em altas concentrações do LAS;
- ✓ Estudar a biodegradação do LAS considerando o consórcio dos fungos *P. crustosum* e *P. chrysogenum*;
- ✓ Estudar o planejamento experimental empregado neste trabalho, considerando também outras variáveis, a fim de aumentar a adaptação fisiológica dos micro-organismos, bem como, buscar resultados mais satisfatórios para a biodegradação do LAS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19ª Edição: Washington, 1998.

BAPTISTA, N. M. de Q. *Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos*. Recife, 2011. Dissertação (Especialização em Micologia) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.

BARBIERI, E. et al. Efeito do LAS-C12, dodecil benzeno sulfonato de sódio linear, na taxa metabólica e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, São Paulo, 2000, p.69-75.

BONFIM, J. H. *Remoção de surfactantes (LAS) no tratamento anaeróbico de esgotos domésticos*. Recife, 2006. Dissertação (Tese de mestrado) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco.

BRASIL. Portaria nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, n. 53, p. 58-63, 2005.

CAROSIA, M. F. *Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado*. São Carlos, 2011. Dissertação (Tese de mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CHAVES, E. S. *Esgotos*. Florianópolis, 2008. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAALp4AL/apostila-esgotos>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

COSTA, M. F. *Biodegradação do surfactante linear alquilbenzeno sulfonato de sódio utilizando fungos filamentosos*. Ouro Branco, 2014. Dissertação (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) – Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João del Rei.

ESTEVES, A. dos S. *Degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente*. São Carlos, 2010. Dissertação (Graduação) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

GALGANO, P. D. *Líquidos iônicos tensoativos: correlação entre estrutura molecular e propriedades micelares de cloretos de 1,3-dialquilimidazólio*. São Paulo, 2012. Dissertação (Tese de doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

HERCULIN, J. et al. Avaliação e comparação da potabilidade de água da Unicamp. *Revista Ciências do Ambiente On-Line*, Junho 2014, Volume 10, Número 1.

NASCIMENTO, M. de S. F.; FERREIRA, O. M. *Tratamento de esgoto urbano: comparação de custos e avaliação da eficiência*. Goiânia, 2007. Dissertação (Relatório) – Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Goiás.

OKADA, D. Y. et al. *Degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente*. VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM, 2009.

PENTEADO, J. C. P. et al. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova*, São Paulo, vol. 29, nº 5, p. 1038-1046, mai. 2006.

RAIMUNDO, C. C. M. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia*. Campinas, 2007. Dissertação (Tese de mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, K. C. da. *Estudo do potencial de degradação do corante reativo preto intenso n por fungos filamentosos isolados de efluente industrial têxtil*. Divinópolis, 2013. Dissertação (Tese de mestrado) – Biotecnologia, Universidade Federal de São João del Rei.

SOARES, B. M. *Diversidade de fungos decompositores de madeira presentes em ecossistemas brasileiros: bioprospecção de espécies úteis em processo de biodegradação de poluentes aromáticos*. Belo Horizonte, 2013. Dissertação (Tese de mestrado) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.