



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

Karen Sartori Jeunon Gontijo

**BIODEGRADAÇÃO DO SURFACTANTE LINEAR ALQUILBENZENO
SULFONATO DE SÓDIO UTILIZANDO OS FUNGOS
FILAMENTOSOS *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium crustosum* EM UM
EFLUENTE SINTÉTICO CONTENDO UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO**

Orientador: Prof. Dr. Enio Nazaré Oliveira Júnior

Ouro Branco – MG

Novembro de 2016

**BIODEGRADAÇÃO DO SURFACTANTE LINEAR ALQUILBENZENO
SULFONATO DE SÓDIO UTILIZANDO OS FUNGOS
FILAMENTOSOS *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium crustosum* EM UM
EFLUENTE SINTÉTICO CONTENDO UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO**

Karen Sartori Jeunon Gontijo

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

Novembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**BIODEGRADAÇÃO DO SURFACTANTE LINEAR ALQUILBENZENO
SULFONATO DE SÓDIO UTILIZANDO OS FUNGOS
FILAMENTOSOS *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium crustosum* EM UM
EFLUENTE SINTÉTICO CONTENDO UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO**

Karen Sartori Jeunon Gontijo

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

Prof. Dr. Enio Nazaré Oliveira Júnior – Orientador

Prof. Mayara Franco Costa – Examinador 1

Prof. Dr. Edson Romano Nucci – Examinador 2

Ouro Branco, 24/11/2016

RESUMO

A água é um recurso de extrema importância para os seres vivos, e é encontrada em abundância em nosso planeta, mas somente uma pequena parte é utilizada por nós, além do grande uso de produtos contendo em sua composição surfactantes, como por exemplo, materiais de limpeza, faz com que cada vez mais esse recurso se torne inadequado, devido a contaminação. Ao alcançarem as estações de tratamento boa parte dos surfactantes ainda permanecem na água, após o tratamento, mostrando que podem ser bioacumulativos. Assim causam danos aos seres humanos e a outras espécies. Logo faz-se necessário estudos para que se consigam tratamentos mais eficazes para a biodegradação destes surfactantes. Neste presente trabalho tem-se como principal objetivo a verificação da influência, tanto da ureia como do, no processo de biodegradação. Foram preparados efluentes sintéticos, a partir de um planejamento 2^2 com quatro pontos axiais e três centrais, fazendo a variação das concentrações de ureia como também do LAS. O efluente foi tratado com dois tipos de fungos filamentosos, *Penicillium crustosum* e *Penicillium chrysogenum*, isolados de efluente têxtil da cidade de Divinópolis/MG. Diante dos resultados apresentados pelos dois micro-organismos, tem-se que as duas espécies apresentaram um valor significativo para a biodegradação do surfactante tendo o *Penicillium crustosum* o que apresentou maior redução chegando a 98%, em contrapartida o *Penicillium chrysogenum* também apresentou resultados satisfatórios de redução chegando em valores de 96% sendo um bom micro-organismo biodegradante do surfactante. Também analisou-se que em determinados valores não houve um grande crescimento dos micro-organismos, podendo ter como causa a inibição dos mesmos devido a um grande valor da substância adicionada ao meio. O fungo *P. crustosum* apresentou crescimento de massa seca fúngica muito menor que do *P. chrysogenum*, esse resultado é importante, pois devido a sua grande redução e sua pouca produção de massa seca, o mesmo pode ser utilizado para tratamento de efluentes tendo ótimos resultados.

Palavras-chave: Surfactante, LAS, Fungos Filamentosos, biodegradação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. POLUIÇÃO DAS ÁGUAS	4
3.2. ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: LEGISLAÇÃO	5
3.3. SURFACTANTES	7
3.4. LINEAR ALQUILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO (LAS)	8
3.5. BIODEGRADAÇÃO DO LAS	10
3.6. TOXICIDADE CAUSADA PELOS SURFACTANTES	12
3.7. IMPACTOS CAUSADOS POR SABÕES E DETERGENTES AO MEIO AMBIENTE	14
3.8. SURFACTANTES EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO BIOLÓGICO	16
3.9. BIODEGRADAÇÃO UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS	17
3.10. FUNGOS <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i> E <i>PENICILLIUM CRUSTOSUM</i>	19
4. METODOLOGIA	21
4.1. REATIVAÇÃO DOS FUNGOS	21
4.2. COLETA DOS ESPOROS	21
4.3. CONTAGEM DOS ESPOROS	22
4.4. CURVA DE CRESCIMENTO	23
4.5. CULTIVO AERÓBIO	24
4.6. ANÁLISE (MBAS)	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. REATIVAÇÃO	28
5.2. COLETA DE ESPOROS	28
5.3. CONTAGEM DOS ESPOROS	29
5.4. CURVA DE CRESCIMENTO	30
5.5. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MÉTODO MBAS	31
5.6. CULTIVO AERÓBIO <i>P. CHRYSOGENUM</i>	32
5.7. CULTIVO AERÓBIO <i>P. CRUSTOSUM</i>	44
6. CONCLUSÃO	55
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABS	Dodecil benzeno sulfonato de sódio ramificado
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
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
MBAS	Substâncias Ativas ao Azul de Metileno
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
SEMA	Secretaria Especial do Meio Ambiente
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
Unicef	Fundo das Nações Unidas para a Infância
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
IBGE	Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso essencial para a sobrevivência de todos os seres vivos entretanto, devido ao rápido crescimento da população mundial pode causar grandes efeitos negativos na qualidade e na quantidade da água disponível (MEC, 2005).

Mesmo em países com grande quantidade disponível de recursos hídricos, como por exemplo o Brasil, não estão livres da ameaça de uma crise. Dentre as principais causas da diminuição da água potável estão o crescente aumento do consumo, o desperdício e a poluição das águas superficiais e subterrâneas por esgotos domésticos e resíduos tóxicos provenientes da indústria e da agricultura (MEC, 2005).

O esgoto doméstico é composto por matéria orgânica e inorgânica, onde os principais constituintes são as proteínas, açúcares, óleos e gorduras, micro-organismos, sais orgânicos e componentes dos produtos saneantes, dentre eles, surfactantes. (CHAVES, 2008).

Os tensoativos constituem uma classe importante de compostos químicos que são amplamente utilizados em diversos setores industriais. São exemplos os surfactantes iônicos, utilizados comercialmente, os ésteres sulfatos ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE, 2002).

Em uma mesma molécula, de um surfactante, devido a presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, eles tendem a distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade. Também, há uma formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduzindo a tensão superficial e interfacial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Essas propriedades fazem com que esses compostos sejam utilizados em uma alta gama de aplicações que envolvem detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Dentre todas as aplicações, a maior utilização dos surfactantes é nos produtos de limpeza, principalmente como componentes de detergentes (NITSCHKE, 2002).

Alguns surfactantes são considerados perturbadores endócrinos, dentre eles o 4-nonilfenol e 4-octilfenol. Esses compostos podem causar distúrbios no sistema endócrino de animais e humanos, mesmo em baixas concentrações (RAIMUNDO, 2007). Já o LAS, pode vir a causar sérios problemas ambientais, e também em estações de tratamento de esgoto, devido a formação de camadas densas de espumas. Isso dificulta o processo de aeração nos tanques de tratamento de efluentes, e desta forma, leva ao transporte de um grande número de poluentes, bem como bactérias. (PENTEADO *et al.*, 2006).

O LAS (Linear alquilbenzeno sulfonato de sódio) é um tensoativo aniônico constituído de uma mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares, onde há uma variação de C₁₀ a C₁₆ (PENTEADO *et al.*, 2006). É usado em produtos de limpeza devido por ser biodegradável e também devido as suas propriedades surfactantes. É considerado tóxico devido ao seu grupamento polar e com o comprimento da cadeia alquila apolar (DELFORNO, 2011).

No Brasil, mesmo após a avanços sociais alcançados nos últimos anos, 80% do esgoto não tem tratamento adequado de acordo com o levantamento de 2008 do IBGE (IBGE, 2014). Assim, a falta de saneamento básico causa grandes problemas à população, como a proliferação de doenças de veiculação hídrica, isso devido à poluição de solos, e do contato com os esgotos sem a correta canalização (NASCIMENTO; FERREIRA, 2007).

Cada vez mais o número de contaminantes aumenta nas águas devido aos componentes químicos lançados para o uso da agricultura, nas indústrias e nos domicílios, que podem persistir no meio ambiente (ANA, 2013). Segundo MAYERHOFF (2007), novas tecnologias estão sendo geradas há várias décadas em todo o mundo, visando garantir uma melhor qualidade da água dos mananciais. A demanda dessas tecnologias para o tratamento de efluentes industriais e municipais é cada vez maior.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliação da capacidade dos micro-organismos *Penicillium crustosum* e *Penicillium chrysogenum* em biodegradar o surfactante Linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (LAS) em amostras de efluentes sintéticos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de crescimento e produção de massa seca dos fungos filamentosos em presença de glicose e surfactante como fontes de carbono;
- Determinar as condições que maximizem a biodegradação do surfactante na presença dos fungos *Penicillium crustosum* e *Penicillium chrysogenum* por meio de um planejamento experimental;
- Analisar a influência das concentrações de ureia e de LAS no processo de biodegradação e na produção de massa seca, através do software Statistica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Poluição das águas

O Brasil é um país privilegiado devido ao seu grande volume de recursos hídricos, entretanto aproximadamente 73% dessa porção encontra-se na bacia Amazônica, que é habitada por menos de 5% da população (Setti *et al.*, 2001). Atualmente, não existe um planejamento de saneamento básico e ambiental adequado que preserve esse recurso (RAIMUNDO, 2007).

Nos anos 30, os problemas relacionados à escassez da água aumentaram devido a "Era Tecnológica", uma época seguinte a Primeira Guerra Mundial, em que o interesse militar era um fator determinante no desenvolvimento de novas rotas sintéticas e na produção de novos compostos. Posteriormente, na Segunda Guerra, houve um período de uso de pesticidas, decorrente do grande desenvolvimento nas atividades industriais (RAIMUNDO, 2007).

Nessa mesma época da Segunda Guerra Mundial houve uma demanda pelos produtos industrializados, o que motivou ainda mais o desenvolvimento tecnológico, tendo como produtos inovadores os produtos farmacêuticos e alimentícios. Nessa época, não havia nenhum tipo de precaução em relação a contaminação dos recursos ambientais (RAIMUNDO, 2007).

O problema da escassez hídrica no país ocorreu principalmente devido à combinação do aumento de demandas localizadas e da queda da qualidade das águas. Esses fatores são consequências do aumento dos processos de urbanização, industrialização e expansão agrícola, incentivados em meados dos anos de 1950 (RAIMUNDO, 2007).

Segundo RATTNER (2009), a poluição de rios, lagos, zonas costeiras e baías vem causado uma grande degradação ambiental contínua, por despejo de volumes crescentes de resíduos e dejetos industriais e orgânicos. Houve um grande aumento nas últimas décadas do lançamento de esgotos não tratados, ocasionando, em grandes impactos eutróficos severos sobre a fauna, a flora e aos próprios seres humanos.

Devido a geração e o destino dos resíduos, resultantes das atividades domiciliares e urbanas, fez-se com que estes sejam os principais problemas ambientais identificados nos pequenos, médios e grandes centros urbanos, tornando-se ameaça à saúde pública e também aos recursos naturais (SALAMONI *et al.*, 2009). A contaminação das águas ocorre muitas vezes por compostos orgânicos tóxicos, recalcitrantes e persistentes aos tratamentos, pois mesmo com diversos tratamentos. Assim, o que ocorre na verdade é a diluição do contaminante a transferência dele para uma outra fase (SILVA, 2013).

A partir da década de 70, diversos órgãos de proteção ambiental, foram criados, dentre eles a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*). Estes promoveram o aumento nas pesquisas envolvendo o monitoramento de substâncias xenobióticas, em diversos compartimentos ambientais, onde atualmente existem mais de 11 milhões de substâncias químicas que estão registradas no CAS (*Chemical Abstracts Service*). Dentre os compostos classificados como emergentes estão incluídos os surfactantes muito utilizados no consumo doméstico. Estes podem ser chamados de interferentes endócrinos, por conterem propriedades que podem provocar alterações no sistema endócrino de seres vivos (RAIMUNDO, 2007). Existe uma diversidade de compostos que podem ser considerados como IE, uma vez que sejam suspeitos de interferir no funcionamento do sistema endócrino (SOUZA, 2011). Um exemplo de uma substância que é considerada um perturbador endócrino são os pesticidas, pois em sua maioria são persistentes no meio ambiente, devido a sua estabilidade química, baixa solubilidade em água e muito bioacumulativo. Há muito interesse em relação à essas substâncias devido à alta toxicidade, sendo considerado uma das maiores fontes de dioxina para o meio ambiente (GHISELLI; JARDIM, 2007).

3.2. Água para consumo humano: Legislação

De acordo com a Unicef e a OMS 2,6 bilhões de pessoas não contam com o serviço de saneamento básico e 1,1 bilhão de pessoas não possui um sistema de abastecimento de água adequado. Além disso, conforme a ONU, se em 2050 essa tendência continuar, mais de 45% da população mundial estará vivendo em lugares

onde não há garantia de cota diária mínima de 50 litros de água por pessoa (MEC, 2005).

Diariamente o consumo da água varia muito no mundo, além da disponibilidade local, o consumo médio está bastante relacionado ao o nível de desenvolvimento do país e também com a rentabilidade populacional. Para uma pessoa sobreviver deve dispor de 40 litros de água por dia para ingestão, higiene pessoal e para trabalhos domésticos. Segundo a ONU, a Europa consome em média 150 litros de água por pessoa, sendo que um indiano consome 25 litros por dia. As estimativas da Unesco, afirmam que se o ritmo atual acompanhar o crescimento demográfico e não se estabelecermos um uso sustentável da água, em 2025 o consumo humano pode chegar a 90% restando somente 10% para os outros seres vivos do planeta (MEC, 2005).

O grande consumo de detergentes no país aliada às defasagens do tratamento dos esgotos domésticos, principalmente nas zonas urbanas, causam diversos problemas ambientais. De acordo com Penteado *et al.*, 2006, a diminuição da concentração dos elementos essenciais para a vida aquática e o aumento da concentração de compostos xenobióticos, como por exemplo os PCBs (*polychlorinated biphenyl*) e PAHs (*polyaromatic hydrocarbons*), são encontrados em sedimentos, fazendo com que ocorra a inibição da degradação, problemas estes que são um dos principais causadores dos problemas ambientais.

Através do artigo 16, capítulo IV (Padrão de potabilidade), portaria n° 518 do Ministério de Estado da Saúde, diz-se que o padrão aceitável para o consumo humano em relação aos surfactantes é menor ou igual a 0,5 mg/L (PORTARIA N° 357, 2005). O valor mostrado também é adequado para o atendimento a ao Índice de Parâmetros Mínimos para a Preservação da Vida Aquática (IPMCA). Esse índice é proposto pela CETESB, que pode-se ser confirmando no artigo 07, decreto 88351 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) sobre águas de classe 1, tendo a água características ótimas para a sobrevivência e reprodução da vida aquática (PENTEADO *et al.*, 2006).

3.3. Surfactantes

Os surfactantes podem ser naturais ou sintéticos, com uma parte de sua estrutura lipofílica e outra hidrofílica que é responsável por adsorver moléculas tensoativas nas interfaces líquido-líquido, líquido-gás ou sólido-líquido de um dado sistema (HUNTER, 1992). Na Figura 1 tem-se uma imagem esquemática de um tensoativo.



Figura 1: Estrutura de um surfactante especificando a sua parte com afinidade com o óleo e com a água (SCHRAMM, 2000).

Os surfactantes possuem estruturas e propriedades que, em presença de água e óleo, adsorvem-se nas interfaces de maneira que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase oleosa, fazendo com que se forme um filme molecular ordenado nas interfaces, que diminui as tensões interfacial e superficial (PROSSER e FRANCES, 2001; HUNTER, 1992; ATWOOD e FLORENCE, 1985). Na Figura 2 é mostrada a estabilidade do filme, que depende da natureza dos grupos hidrofílicos e lipofílicos do tensoativo (ROSSI, 2006).

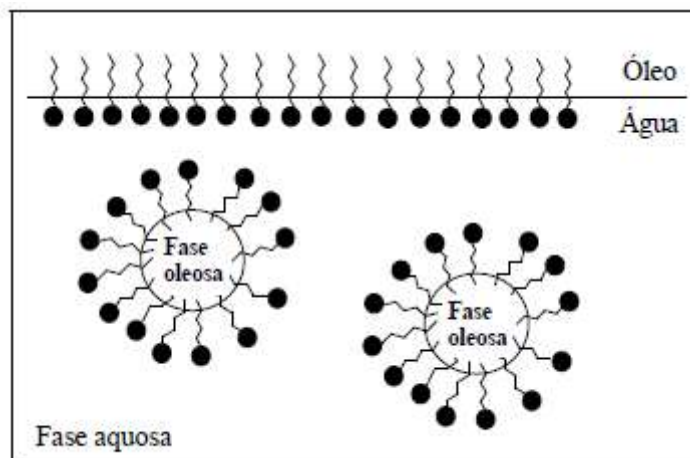


Figura 2: Estabilidade do filme dependente da natureza de seus grupos hidrofílicos e lipofílicos do tensoativo. Fonte: (ROSSI, 2006).

O grupo lipofílico dos tensoativos é responsável pela solubilização em óleo, e normalmente é formado por cadeias hidrocarbônicas lineares ou com ramificações, podendo conter ou não grupos aromáticos (HUNTER, 1992; ATWOOD e FLORENCE, 1985). O grupo hidrofílico que determina a solubilidade do tensoativo em água é muito polar, podendo ser iônico ou não-iônico. A afinidade desta parte da molécula pela água faz com que solubilize o grupo lipofílico (ROSSI, 2006).

Os tensoativos possuem uma classe de compostos com uso totalmente versátil, são utilizados em diversos processos tecnológicos, como na produção de fármacos, detergentes, óleos para automóveis, emulsificação, dentre outros. Também possuem propriedades reacionais de grande importância, a solubilização de compostos pouco solúveis (TAVARES, 2011).

3.4. Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio (LAS)

Na década de 40 surgiu um principal tensoativo sintético conhecido como Alquilbenzeno Sulfonato (ABS) possuindo ramificações, sendo produzido a partir de precursores derivados do petróleo (PENTEADO *et al.*, 2006). Atualmente, um dos tensoativos mais usados é o Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio. Como há um

grande consumo mundial do LAS, esse componente tem sido de grande interesse de pesquisadores na área de controle ambiental.

O LAS (Figura 3) é um tensoativo aniônico que possui uma mistura de homólogos e isômeros de cadeias alquiladas lineares onde há uma variação de C₁₀ a C₁₆. É utilizado em produtos de limpeza devido a sua degradabilidade e também por causa de suas propriedades surfactantes (DELFORNO, 2011).

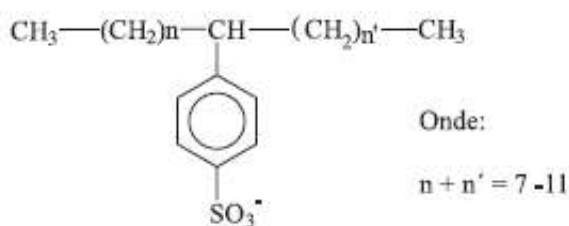


Figura 3: Estrutura molecular do Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio (LAS).

Fonte: PENTEADO, 2005.

De acordo com o posicionamento do grupo fenila na cadeia carbônica, tem-se diversos isômeros de um determinado homólogo. Existem os isômeros externos, em que o grupo fenila está mais próximo ao átomo de carbono terminal da cadeia alquílica, e os internos, que possuem o grupo fenila um pouco mais distante (PENTEADO *et al.*, 2006).

O detergente sintético possui uma composição complexa, e dependendo de sua aplicação pode possuir enzimas (amilase, lipase, protease), como outros componentes que colaboram na remoção de manchas específicas (amido, gorduras e proteínas) ou branqueamentos ópticos que aumentam o brilho e a alvura do tecido (PENTEADO, 2005).

Ainda que possa ser considerado biodegradável o LAS é um surfactante considerado tóxico, essa toxicidade pode causar efeitos mais rigorosos onde pode provocar a destruição da membrana celular como também a desnaturação de proteínas. Essa toxicidade do LAS relaciona-se à localização do anel aromático que está mais próximo da extremidade da cadeia alquílica (DELFORNO, 2011).

De acordo com Venhuis & Mehrvar, (2004) uma concentração entre 40 a 60 mg/L de LAS pode causar uma interferência na reprodução e no crescimento de invertebrados do solo além de apresentar efeitos agudos ao plâncton de água doce, bactérias e crustáceos. As plantas que tiveram contato com o LAS apresentaram as membranas das células radiculares destruídas, alterações na permeabilidade e nos processos fisiológicos e fotossintéticos (MIEURE *et al.*, 1990).

3.5. Biodegradação do LAS

A biodegradação de um determinado material ocorre quando ele é usado como nutriente por um determinado conjunto de micro-organismos (bactérias, fungos ou algas) que existe no meio ambiente onde o material vai ser degradado. Para que essa colônia de micro-organismos cresça usando o material como nutriente é necessário que eles produzam as enzimas adequadas para quebrar alguma das ligações químicas da cadeia principal do polímero. Além disso, é necessário ter as condições adequadas de temperatura, umidade, pH e disponibilidade de oxigênio. Essa é uma das maneiras de redução de resíduos através da decomposição orgânica (PENTEADO *et al.*, 2006).

O LAS é considerado biodegradável por apresentar níveis de remoção na ordem de 98 a 99%. Diversos fatores interferem na biodegradação desse tensoativo, dentre eles a concentração de oxigênio dissolvido, complexação com tensoativos catiônicos, formação de sais insolúveis de cálcio e magnésio, e outros. A biodegradação pode ser dividida em duas partes (PENTEADO *et al.*, 2006).

Na primeira etapa há quebra da cadeia hidrofóbica do tensoativo, fazendo que ocorra um aumento na concentração micelar crítica. Essa modificação na estrutura do tensoativo faz com que ocorra alteração em suas propriedades, diminuindo alguns de seus efeitos indesejáveis no meio ambiente, por exemplo a formação de espumas. Já na segunda etapa, conhecida também como mineralização, ocorre a conversão completa da molécula do tensoativo em CO₂, água, sais e biomassa. (PENTEADO *et al.*, 2006).

A degradação da cadeia alquílica, seguida do grupo sulfonato e finalmente, do anel aromático (Figura 4), relaciona-se ao principal mecanismo de biodegradação aeróbico do LAS (Theraulaz, 2001). O rompimento da cadeia alquílica começa com a oxidação enzimática (oxidação ω) do grupo metila terminal em que se transforma em álcool, aldeído e em seguida, em ácido carboxílico, que é sujeito a uma oxidação β , catalisada por enzimas alceno monoxigenase e desidrogenases. Devido aos efeitos estéricos, a biodegradação aeróbica é mais acelerada quanto mais linear for a cadeia de LAS. Vale ressaltar que a velocidade e o grau de biodegradação estão associados com o meio e com os micro-organismos presentes (PENTEADO *et al.*, 2006).

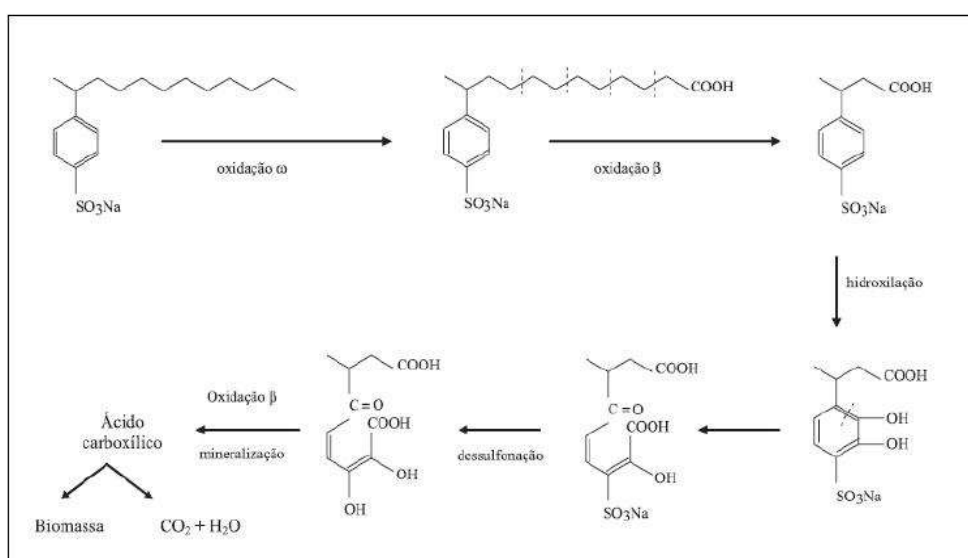


Figura 4: Reação de biodegradação do LAS (Theraulaz, 2001).

Nas reações de oxidação, há formação de um subproduto intermediário da primeira etapa de oxidação, o ácido sulfafenil carboxílico (SPC) (ESTEVES, 2010). Esse subproduto foi encontrado em sedimentos marinhos anaeróbios, já os demais intermediários, produzidos, a partir da degradação anaeróbia não foram totalmente identificados (FILHO, 2008).

A degradação anaeróbia dessa substância requer consórcio de bactérias que atuam em diferentes partes da molécula, devido a alteração em uma cadeia de alquila pela catálise do LAS, em um anel de benzeno e em uma ligação com o grupo sulfonato (ESTEVES, 2010).

Altas concentrações de LAS foram encontradas (5 a 10 g / kg de sólido seco), enquanto que as lamas tratadas aerobiamente contêm baixas concentrações de LAS (0,1 a 0,8 g/kg de sólido seco), apesar da atividade anaeróbia ter sido relatada.

Tal diferença pode ser explicada pela presença de uma pequena concentração de O₂ nos sedimentos o que inibiria o processo de digestão anaeróbia (GARCÍA *et al.*, 2005).

As possíveis quedas na biodegradação do LAS em ambientes anaeróbios podem ser contornadas com a utilização de um co-substrato, como o extrato de levedura. Esse substrato favoreceu maior eficiência na remoção do surfactante, bem como, da matéria orgânica presente (ESTEVES, 2010).

A biodegradação do LAS tem uma grande vantagem, devido à eliminação de contaminantes orgânicos prejudiciais, já que o sulfônico acaba perdendo suas propriedades nocivas à natureza. (PENTEADO, 2006).

3.6. Toxicidade causada pelos surfactantes

Detergentes e surfactantes são alguns dos principais componentes orgânicos antropogênicos em efluentes e lodos tratados, encontrados em concentrações suficientes para causarem diversos problemas toxicológicos em organismos aquáticos (Sandbacka *et al.*, 2000).

Devido a sua natureza química, tais compostos tem a capacidade de interagir com os principais componentes da membrana celular, como proteínas e lipídeos, desestruturando os sistemas de membranas além de tornar frágeis as estruturas de proteção dos organismos (BRAGA, 2002). Além disso, podem apresentar ação bactericida e bacteriostática em pequenas concentrações devido a sua interação com a membrana celular da bactéria (Gloxhuber, 1980).

Estudos sobre os efeitos toxicológicos crônicos do LAS foram conduzidos usando organismos aquáticos, dentre eles o de Malagrino *et al.*, 1985, onde os principais efeitos causados subletais dos surfactantes são o retardamento do crescimento, a alteração do comportamento alimentar e a inibição químio-receptores.

Segundo Moraes (2004), a toxicidade crônica dos surfactantes aniônicos ocorrem em concentrações normalmente maiores que 0,1 mg/L. Os efeitos causados por esses surfactantes em parâmetros comportamentais e fisiológicos dos organismos aquáticos situam-se nas concentrações entre 0,002 mg/L a 40,0 mg/L.

A presença dos surfactantes está relacionada a outros efeitos em sistemas biológicos, como alterações na fosforilação oxidativa e alterações estruturais em mitocôndrias, que aumentam de acordo com o número de carbonos presentes na molécula do surfactante, além de alterações na permeabilidade da membrana ao potássio e a inibição da síntese de DNA que foram estudadas em leveduras (Gloxhuber, 1980). Pesquisas constataram que em baixas concentrações de surfactantes aniônicos na formação de feixes filamentosos *Brachidontes solisianus*, demonstrou que os danos causados ao bisso¹ são mínimos, porém, o comportamento do molusco é alterado em função do seu estágio de crescimento e concentração do surfactante na água, independentemente de ser biodegradável ou não. Esse composto, a médio prazo poderá ocasionar a uma diminuição da fauna aquática impedindo ou até mesmo dificultando a fixação do animal ao substrato (Malagrino *et al.*, 1987).

Entre os problemas ambientais decorrentes do acúmulo de LAS nos recursos hídricos destacamos os seguintes efeitos: diminuição da concentração de elementos necessários para a vida aquática, por ex., o oxigênio dissolvido, devido à diminuição da tensão superficial água/ar; diminuição da permeabilidade da luz, por manter as partículas presentes em suspensão. O LAS foi também investigado para verificar se a bioacumulação por cádmio é favorecida na presença de LAS empregando bioindicadores de poluição marinha, mas os dados obtidos no estudo não foram conclusivos; bioacumulação, como foi constatado em Sáez, Espanha, em um estudo com bivalves e peixes nos quais foram encontrados valores de 1,29 a 2,98 µg/g para o homólogo com onze átomos de carbono na cadeia principal. Em outro estudo foram observados fatores de bioacumulação de 500 a 1300, usando a *Daphnia magna* como bioindicador e 4 a 9000 usando o peixe *Cyprinus carpio*. Em alguns tipos de algas, como a *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina* em Cadiz, Espanha, foi evidenciado que ocorreu absorção do tensoativo e seus intermediários de degradação. A presença do LAS em concentração de 16 mg/kg foi também constatada

¹Bisso: nome dado ao feixe de filamentos pelos quais moluscos bivalves, como o mexilhão, fixam-se ao substrato. Apresenta uma textura similar à seda e é secretado por uma glândula situada na base do pé.

em arroz proveniente de plantações que receberam irrigação de efluente doméstico in natura²; interferência em processos biológicos: a troca do contra-íon de LAS (Na^+) pelo (NH_4^+) perturba o equilíbrio no ciclo do nitrogênio, o que inibe o processo de nitrificação, conversão oxidativa da amônia em nitrato, que é promovido por certas bactérias autótrofas como as nitrossomas, acarretando na mortandade de organismos (PENTEADO, 2006).

3.7. Impactos causados por sabões e detergentes ao meio ambiente

Devido ao grande aumento da utilização dos detergentes sintéticos nas últimas décadas, diversos problemas ecológicos tem surgido devido ao uso desse produto. Diversas vezes, os surfactantes são encontrados acima das concentrações permitidas pela legislação. Um grande exemplo a ser citado é na cidade de Pirapora do Bom Jesus localizada a 100 km de São Paulo, no rio Tietê, em que o acúmulo de surfactantes é evidenciado pela formação de espumas espalhadas pelo rio (ROMANELLI, 2004). A formação de espumas na superfície é um grande problema (Figura 5), pois impede a entrada da luz nos corpos d'água, fazendo com que não ocorra a fotossíntese prejudicando os organismos que necessitam do processo para sobreviver (ECYCLE, 2015).

Para os sistemas dependentes do oxigênio, como as tonas aeróbias de rios e lagos, quando em contato com agentes tensoativos faz com que haja uma interferência na taxa de aeração devido a redução da tensão superficial do meio, devido a formação de bolhas de ar que aprisionam o O_2 . Um outro prejuízo causado por surfactantes é a interferência que provocam nas aves aquáticas, que por possuírem óleo em suas penas para que aprisionem o ar para que possam boiar nas águas, quando removido essas aves acabam se afogando (ECYCLE, 2015).

De acordo com a ANVISA, atualmente, todos os detergentes devem possuir tensoativos biodegradáveis, entretanto esses não são os únicos componentes dos detergentes, há também substâncias conhecidas como agentes sequestrantes, cuja função é melhorar o poder de limpeza em águas duras, como exemplo tem-se o tripolifosfato de sódio. As sequestrantes podem causar eutrofização nos corpos hídricos, por servirem como nutrientes para as algas favorecendo a proliferação dessa

população. Como consequência, muitas indústrias estão substituindo esses componentes prejudiciais de suas fórmulas, por componentes naturais. (ECYCLE, 2015).



Figura 5: Espumas formadas na superfície devido aos detergentes e sabões despejados no Rio Tietê (ECYCLE, 2015).

De acordo com Dentel *et al.*, (1993), o surfactante presente no solo facilita a dessorção de poluentes ambientais polares e apolares, como os pesticidas, pentaclorofenol, triclorobenzeno, hidrocarbonetos poliaromáticos, produtos petroquímicos e outros. Além disso, para que o surfactante depositado no solo seja biodegradado é necessário um certo número de micro-organismos presentes no solo, e pode-se ainda ocorrer a lixiviação, com a contaminação do lençol freático. Assim, não somente os surfactantes atingem as águas subterrâneas, mas também arrastam os poluentes orgânicos hidrofóbicos.

Muitos estudos têm demonstrado que a presença de tensoativos pode causar sérios distúrbios ecológicos, afetando organismos aquáticos, inclusive peixes (Barbieri *et al.*, 2000).

Vale ressaltar que, qualquer produto de higiene causa algum tipo de impacto, e uma das alternativas para a diminuição desses problemas é sempre ponderar o uso desses produtos, além de um aprofundamento em estudos para a formulação de componentes alternativos que não prejudiquem o ambiente.

3.8. Surfactantes em estações de tratamento biológico

Os surfactantes são os principais componentes orgânicos antropogênicos em efluentes e lodos não tratados (ROMANELLI, 2004). Estudos mostraram que concentrações de surfactantes aniônicos entre 3 mg/L e 21 mg/L são encontrados nos efluentes não tratados, que por fim, chegam as estações de tratamento, e boas quantidades desses surfactantes acabam sendo levados para o ambiente através dessas estações (Brunner *et al.*, 1988).

Os surfactantes têm uma natureza ambifílica, e devido a isso, podem ser adsorvidos na superfície do material particulado, associados com o lodo sólido de efluentes. De acordo com Romanelli (2004), diversos autores relataram a presença de 10% a 35% de LAS adsorvido no material particulado, em um efluente não tratado. Os mesmo podem precipitar na presença de íons metálicos, sendo o principal o Ca^{2+} .

Tanto o LAS, como diversos outros surfactantes comuns, são degradados rapidamente por processos biológicos. A maioria dos surfactantes (20% a 50%) é levada a estação de tratamento agregados à sólidos em suspensão, não passando por tratamentos aeróbios, sendo diretamente depositados no lodo. Esse material rico em surfactantes, é comum ser tratado anaerobicamente, mas a maioria dos surfactantes só é degradado pela via aeróbica. Grande parte dos surfactantes não passa por tratamento com os sólidos do lodo (Dentel *et al.*, 1993). O surfactante LAS tem uma grande representatividade, sendo mais de 1% da DBO no esgoto doméstico, e concentrações de LAS bem próximas a 10 mg/L tem sido medidas constantemente em efluentes (Guilhermino *et al.*, 2000). De acordo com Eichhorn *et al.*, (2002), o LAS é efetivamente removido dos efluentes por processos físicos, químicos e biológicos: aproximadamente 30% e 70% de sua remoção ocorre através da precipitação e adsorção em sólidos em suspensão.

Através da degradação biológica há uma redução do LAS aproximada de 95 à 99% em lodo ativado, mas compostos intermediários da quebra aeróbica do LAS, os principais produtos de degradação do LAS como os carboxiletos sulfonílicos (CFS), chegam aos corpos receptores através das estações de tratamento. A alta solubilidade de LAS em água e a elevada polaridade dos seus metabólitos faz como que sejam transportados a grandes distâncias (Eichhorn *et al.*, 2002). Estudos de estações de tratamento biológico, em escala piloto, mostraram que nas amostras do efluente, apenas 2-8% do LAS estava dissolvido, enquanto o restante (92-98%) estava adsorvido ao lodo. Importante ressaltar que, 99% do LAS foi metabolizado em condições aeróbicas, pelo processo de biodegradação, envolveu a fração solúvel e fração adsorvida (Temminck & Klapwijk, 2004).

3.9. Biodegradação utilizando fungos filamentosos

De acordo com Atllhas e Bartha (1998), os micro-organismos foram os primeiros seres vivos que colonizaram a Terra. Calcula-se que os primeiros surgiram há mais de 3,5 milhões de anos, época em que a Terra passava por grandes transformações geológicas e químicas, e a atmosfera ainda não possuía oxigênio. Devido a ação de processos metabólicos microbianos, durante milhões de anos transcorreu a formação de uma atmosfera nova, contendo oxigênio, fazendo com que começasse a surgir e evoluir novas formas de vidas aeróbicas, organismos multicelulares complexos, plantas e também animais superiores.

Logo, os micro-organismo são congregações de táxons variados de organismos unicelulares microscópicos, que vivem no meio ambiente como células isoladas ou em agregados celulares. Essa definição incluem bactérias, arqueas, fungos, protozoários e vírus (MANFIO, 2003).

Os fungos são pertencentes ao Reino *Fungi* e são organismos heterotróficos, multicelulares, constituídos em sua maioria, por um sistemas de hifas (Figura 6), que obtêm nutrientes por absorção. São encontrados distribuídos na natureza, presentes no solo, no ar, na matéria orgânica e em ambientes aquáticos (SILVA, 2006). Possuem a capacidade de crescer agregados a um substrato, como constituinte da microbiota de um sistema de distribuição de águas. O crescimento de fungos em biofilmes, lhes

confere proteção e sobrevivência, além de ser um método de tratamento de efluentes (GRABINSKA, 2007).

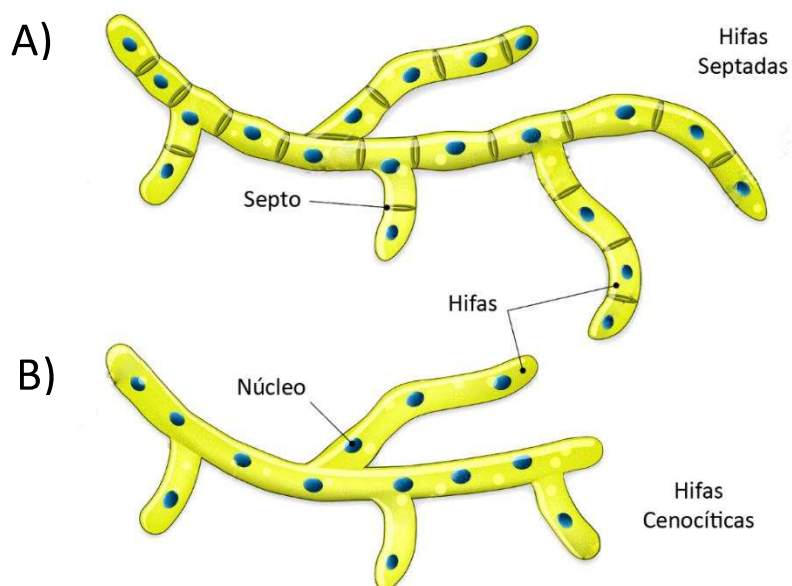


Figura 6: Imagem esquemática da morfologia das hifas.

A) Hifa septada. B) Hifa não septada.

Fonte: [http://pt.123rf.com/photo_36478919_fungos.-classifica%C3%A7%C3%A3o-baseada-em-divis%C3%A3o-celular.-hifas-septadas-\(com-septos\)-e-hifas-asseptados-\(ce.html](http://pt.123rf.com/photo_36478919_fungos.-classifica%C3%A7%C3%A3o-baseada-em-divis%C3%A3o-celular.-hifas-septadas-(com-septos)-e-hifas-asseptados-(ce.html)

Os fungos são compreendidos em 4 filos sendo eles: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*. Para a identificação morfológica dos fungos filamentosos é necessário saber suas características macroscópicas e microscópicas, sendo a microscópica de maior importância. (SAMSON, 2010).

É de extrema importância que haja a preservação dos fungos, pois dessa forma há a conservação da biodiversidade existente e o seu estudo sempre quando for necessário (FAIA, 2011). Os métodos mais comuns para a preservação das culturas dos fungos filamentosos são: separação de suspensões de esporos conservadas à baixas temperaturas e, a preservação em meio sólido, para o caso de fungos que produzem esporos. Também se faz possível a preservação do micélio de fungos filamentosos em água estéril (BUENO, 1998).

Os fungos possuem um sistema metabólico, tendo como principal característica a produção de enzimas não específicas. Isso faz com que estes possam ter grande potencialidade para tratamento de efluentes complexos (SOARES, 2013).

Esses micro-organismos são muito utilizados na produção industrial de produtos químicos como os ácidos cítrico, glucônico, láctico e málico, antibióticos, e até de gangas deslavadas. Também fontes de enzimas industriais, como as lipases usadas em detergentes biológicos, amilases, celulasas, invertases, proteases e xilanases (Kumar, 2008). Existem também fungos que produzem enzimas com propriedades biodegradantes como alguns *Penicilliums* que produzem a lacase e a xilanase, que vem sendo utilizadas em diversos estudos para a remoção de surfactantes em recursos hídricos sintéticos.

Os fungos possuem uma grande capacidade de biodegradação, devido a produção de enzimas não específicas produzidas por eles, como exemplo, a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (SILVA, 2013). Apresentam baixa especificidade para o substrato, podendo atuar com eficácia em diversos componentes orgânicos, fazendo com que esses micro-organismos sejam interessantes para o tratamento de resíduos de diversas características, como exemplo, efluentes contendo surfactantes.

Devido à grande capacidade de biodegradação de poluentes tóxicos recalcitrantes, as enzimas lignolíticas passaram a ter um grande interesse por cientistas e no meio industrial. Por isso que o uso de enzimas foi considerado hoje em dia um dos maiores setores na indústria biotecnológica, utilizando os fungos como principais micro-organismos, utilizados como produtores de uma gama de substâncias de um grande valor e interesse econômico (BAPTISTA, 2011).

3.10. Fungos *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium crustosum*

De acordo com Samsom (1977) o micro-organismo *Penicillium chrysogenum* (Figura 7B) é um bolor encontrado na natureza, podendo viver em alimentos ou em ambientes aquáticos, se reproduzindo em formato de cadeias secas de esporos (ou conídios). Esses conídios são transportados através de correntes de ar até novos

locais de colonização, podendo ter cores que variam de verde a azul, o bolor pode sair pelos poros como um pigmento amarelo. Mas, para a identificação do *P. chrysogenum* é necessário a sua observação morfológica e de características microscópicas (SHEN, 2003). Podem ser utilizados na indústria para a obtenção de penicilina e xantocilina, no tratamento de resíduos de fabricação de polpa de papel, tratamento de efluentes, dentre outras aplicações (SAMSOM, 1977).

O *Penicillium crustosum* (Figura 7A) se encontra no filo *Ascomycota*, sendo este o mais complexo do gênero *Penicillium*. No final de cada conidióforo existem grupos de dois ou mais ramos, onde cada um destes suportam um aglomerado de células conideogênicas conhecida como fiálides. Esse micro-organismo pode tolerar temperaturas baixas, além de produzir uma neurotoxina cujo o nome é *Penitrem A* (*tremortin*) (ALEXOPOLOUS, 2004). Assim como o fungo *P. chrysogenum* (Figura 7B), o *P. crustosum* pode ter várias aplicações, sendo uma delas o tratamento de efluentes, processo de biodegradação.

Ambos os fungos apresentados tem a capacidade de produção de enzimas não específicas, tais como por exemplo, a xilanase e a lacase, que podem biodegradar surfactantes, chegando em uma redução de 90%.

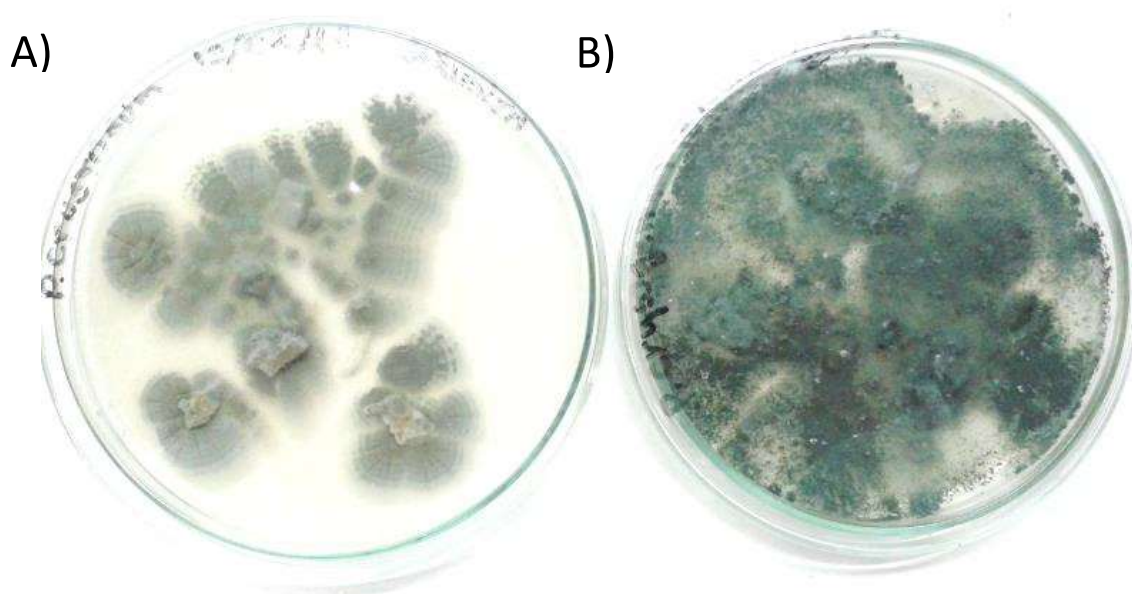


Figura 7: Fotos dos micro-organismos: A) *P. crustosum* e B) *P. chrysogenum* (Fonte: Autor).

4. METODOLOGIA

4.1. Reativação dos Fungos

O primeiro passo foi a reativação dos fungos *Penicillium crustosum* e *Penicillium chrysogenum*. Essa etapa ocorreu fazendo-se um meio de cultura utilizando Batata dextrose ágar 39 g/L e através de um béquer adicionou-se 5,85 g do meio em 150 mL de água destilada. Por fim, esse meio foi colocado em um *erlenmeyer* de 250 mL. Após a preparação do meio, o mesmo juntamente com as placas de Petri foram autoclavados. Depois de autoclavar, as placas foram preparadas em fluxo laminar. Alguns pedaços de fungos foram colocados devidamente nas placas, e posteriormente foram incubados em estufa por cinco dias em temperaturas de 25°C.

4.2. Coleta dos esporos

Para a coleta de esporos (Figura 8), preparou-se uma solução salina 0,85% (m/v) adicionou-se 0,85 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada. Em seguida para a preparação do meio, foram autoclavados o meio juntamente com tubos *falcon*, um funil de vidro e também gaze.

Após o material ser auto-clavado, o mesmo foi colocado em fluxo laminar, e assim, a solução salina foi adicionado, nas placas de Petri para retirar os esporos. Com a ajuda de uma alça de *Drigalski*, a solução foi raspada delicadamente para que os esporos se soltassem e fossem colhidos. O meio foi vertido no funil de vidro (onde se encontrava a gaze) apoiado por cima de um *erlenmeyer* e filtrado, restando as hifas e pedaços de ágar. A solução filtrada contendo os esporos foi armazenada em tubos *Falcon* e guardada na geladeira para os próximos passos.

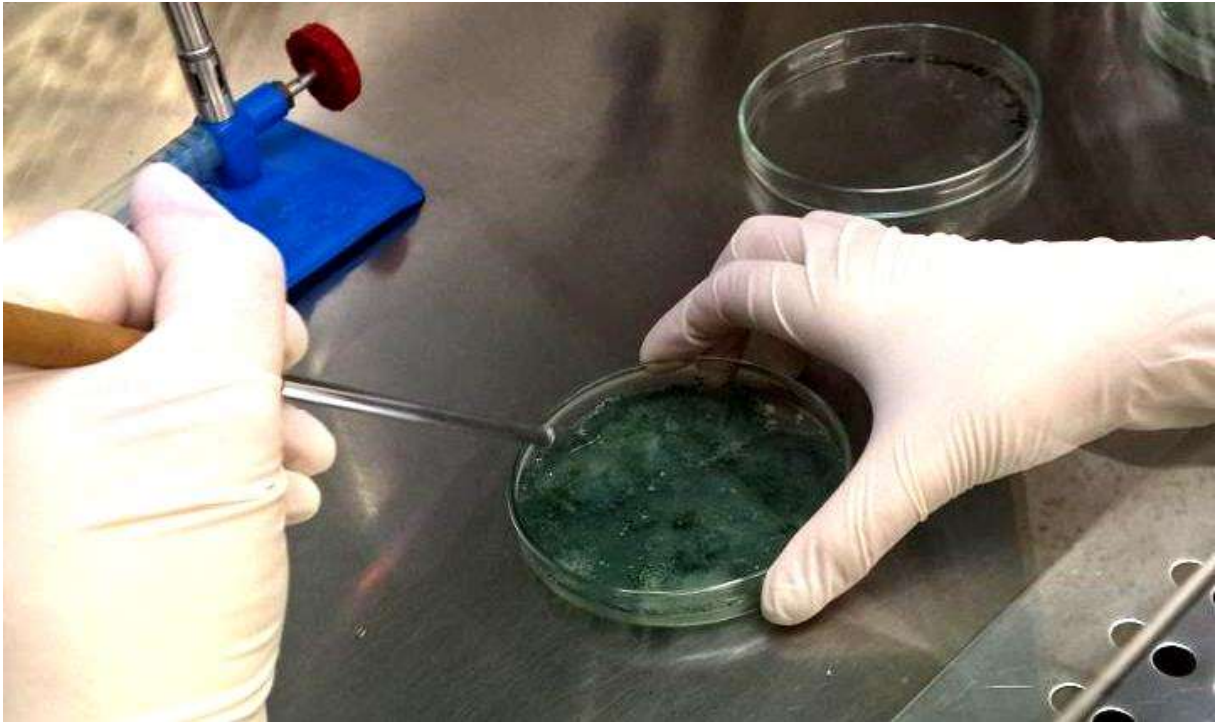


Figura 8: Coleta de esporos (Fonte: Autor).

4.3. Contagem dos esporos

Para se fazer a contagem de esporos a solução foi diluída 10 vezes em água destilada. Após a diluição utilizou-se a câmara de Neubauer (Figura 9) para a contagem dos esporos. Nessa câmara foram colocados 10 μL da solução diluída. Posteriormente à contagem esporos, calculou-se a média dos valores encontrados.

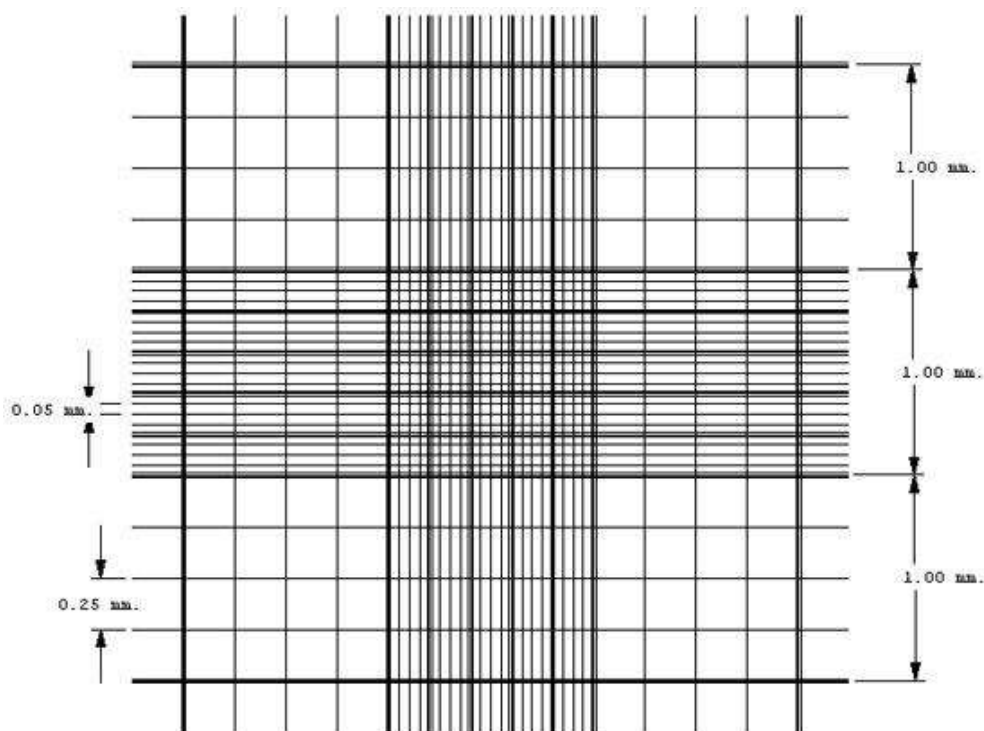


Figura 9: Representação da câmara de Neubauer utilizada para contagem dos esporos. Fonte: <http://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

4.4. Curva de crescimento

A etapa seguinte foi a cinética de crescimento, com duração de cinco dias, onde, o resultado diário correspondeu ao valor médio de uma triplicata. As concentrações dos reagentes utilizados estão descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Reagentes e suas respectivas quantidades na preparação do meio mínimo líquido (MML) adaptado (FONTE: Adaptado de SILVA, 2013).

Reagente	Concentração (g/L)
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10,0
MgSO ₄	1,1
Ureia	1,0
KH ₂ PO ₄	5,44
K ₂ HPO ₄	6,98
CuSO ₄	0,01

Em seguida, foi feita a preparação do meio e para início do procedimento os materiais foram autoclavados, utilizando-se 15 *erlenmeyers* para cada fungo e uma micropipeta de 100 µL. Após esfriar, foram vertidos 70 mL de meio de cultura em cada *erlenmeyer*. Posteriormente adicionou-se em cada tubo 100 µL da solução de esporos. Os tubos foram nomeados e incubados em agitador orbital, 180 rpm, a 25°C. Foi utilizada a seguinte codificação para identificar as cepas dos fungos: o termo CHR para o fungo *P. chrysogenum* e CRU 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).

O crescimento dos fungos foi quantificado conforme o método de massa seca, para isto, 15 filtros foram previamente secos para cada fungo em estufas a 80°C, pesados e tarados para posterior secagem e pesagem das massas obtidas a cada dia de análise.

4.5. Cultivo aeróbio

O processo de biodegradação foi estudado através de um planejamento estatístico DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) fracionado 2² com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios. Foi feito mais um ensaio controle similar ao ensaio 11, entretanto sem a presença dos fungos. A Tabela 2 lista os valores utilizados no planejamento experimental.

Tabela 2: Planejamento experimental variando as concentrações de LAS (g/L) e Ureia (g/L) como fonte de nitrogênio.

Ensaio	LAS (g/L)	Ureia (g/L)
1	-1 (0,003)	-1 (6,45)
2	-1 (0,003)	+1 (13,55)
3	+1 (0,009)	-1 (6,45)
4	+1 (0,009)	+1 (13,55)
5	-1,41 (0,002)	0 (10)
6	+1,41 (0,010)	0 (10)
7	0 (0,006)	-1,41 (5)
8	0 (0,006)	+1,41 (15)
9*	0 (0,006)	0 (10)
10*	0 (0,006)	0 (10)
11*	0 (0,006)	0 (10)
12 (controle)	0 (0,006)	0 (10)

*Ensaio com pontos centrais.

As amostras foram preparadas baseadas nos dados da Tabela 1, uma das soluções apresentam todos reagentes, exceto ureia. A outra solução apresenta alta concentração de ureia. De acordo com o planejamento da Tabela 2, foram dimensionados os reagentes nos 12 *erlenmeyers*; água destilada foi utilizada para completar a quantidade de 70 mL da solução.

Após o preparo das amostras, as mesmas foram colocadas em um agitador orbital por cinco dias a 25°C e 180 rpm. No quinto dia, para fazer a filtração das amostras, 12 filtros foram colocados em uma estufa para secagem, após um hora, esses filtros foram retirados da estufa, e as amostras que se encontravam no agitador orbital foram filtradas a vácuo. Em seguida, os filtros voltaram novamente para a estufa a uma temperatura de 80°C. Nessa etapa foram anotados os valores de pH e pesos de cada amostra líquida de cultura fúngica para que as análises de MBAS sejam determinadas conforme descrito no item 4.6.

4.6. Análise (MBAS)

A curva analítica foi construída para comparação e as pode-se estipular as concentrações em 0,4 mg/L; 0,8 mg/L; 1,2 mg/L; 1,6 mg/L e 2,0 mg/L, sendo que uma amostra de clorofórmio é o branco da curva. Os procedimentos e análises foram retirados do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 1998).

Com a ajuda do clorofórmio pode-se extrair o objeto de estudo, no caso o detergente. Assim um complexo é formado entre o azul de metileno (catiônico) e o surfactante (aniônico), escolha feita por o azul de metileno ser sensível a compostos aniônicos com uma parte hidrofóbica na constituição do mesmo o par surfactante-azul de metileno passa para sua fase orgânica, em consequência da interação, assim pode ser extraído no clorofórmio. A solubilidade do corante não associado em clorofórmio é muito pequena.

Neste presente trabalho para o método de MBAS, as soluções empregadas tiveram seus volumes reduzidos pela metade. Motivo esse por se tratarem de substâncias nocivas aos seres vivos do ambiente (COSTA, 2016). Dados presentes na Tabela 3.

Tabela 3: Quantidade de amostras para análises de MBAS
(Adaptado de COSTA, 2016).

Solução	APHA Volume (mL)	Volume empregado (mL)
Amostra	100	50,0
Azul de metileno	25	12,5
Clorofórmio	30	15,0
Álcool Isopropílico*	5	2,5
Lavagem	50	25,0

*Adicionado caso necessário, para que evite a formação de emulsão.

Após a reação de biodegradação, para a quantificação do surfactante, a amostra foi inserida em um funil de separação com o azul de metileno e o clorofórmio. Para a homogeneização, a mistura foi agitada por 30 vezes. Na sequência retirou-se a mais densa após a separação de fases. Tal procedimento foi realizado por três vezes.

De acordo com Apha (2016), a porção orgânica extraída passou para a última etapa exigida pelo método, depois do processo. O restante da mistura no funil de separação foi armazenada para o devido descarte. Tal porção foi vertida no funil com uma solução de lavagem, agitando novamente a mistura. Tal etapa é realizada para a retirada da fase polar, que por ventura tenha sido extraído juntamente com o solvente. A fase mais densa foi retirada após o repouso e separação das fases, depois levada ao espectrofotômetro “Biospecto” SP-220 em 652 nm. Lembrando que o branco é composto por clorofórmio.

Na metodologia proposta de análise MBAS é utilizado álcool isopropílico, porém o mesmo não foi utilizado para que a formação de efluentes não se tornasse mais tóxico. O solvente utilizado para realizar a extração do surfactante residual é recuperado por rota-evaporação, produzindo menos efluentes, agredindo menos o ambiente. Nesse presente trabalho não houve a recuperação do solvente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Reativação

Os fungos encontravam-se em óleo mineral não havendo crescimento de hifas e nem de esporos, isto porque o óleo mineral além de manter os fungos inativos, há conservação da integridade dos mesmos. Após cinco dias de incubação o fungo *P. chrysogenum* apresentou esporulação com uma coloração verde, podendo ser coletado no quinto dia. Já o fungo *P. crustosum* apresentou esporulação tardia, os esporos foram retirados no oitavo dia, onde apresentou uma coloração verde clara. Os resultados encontram-se na Figura 10.

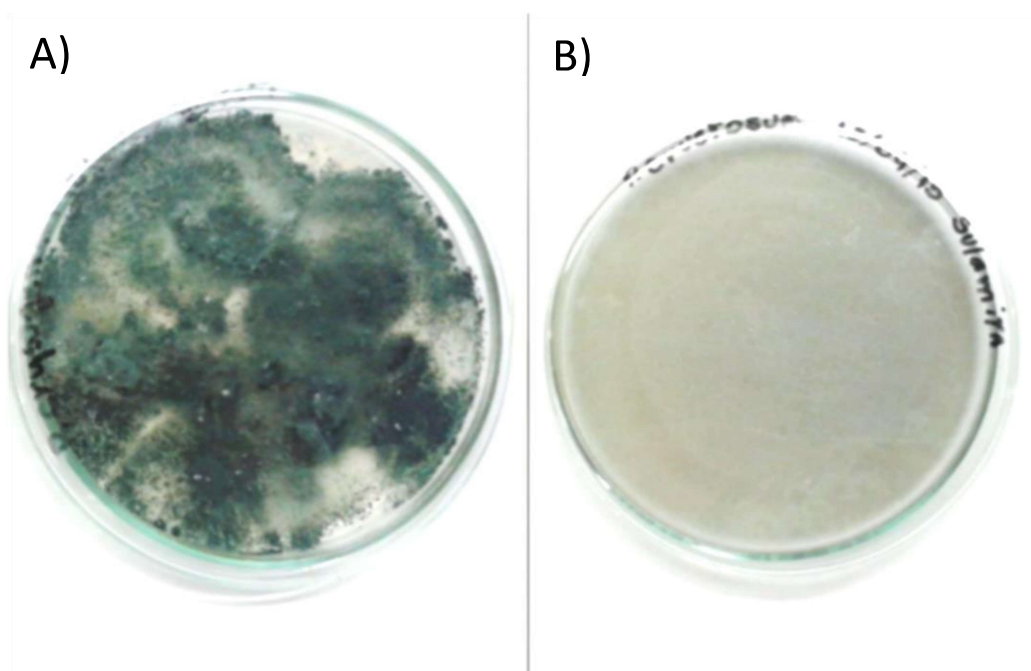


Figura 10: Reativação dos fungos no meio de Batata dextrose ágar.

A) *P. chrysogenum* apresentou esporos dentro do período de cinco dias e

B) *P. crustosum* apresentou esporos após oito dias de incubação.

5.2. Coleta de Esporos

Os esporos foram coletados e armazenados em tubos de centrífugas (Figura 11) contendo solução salina para proteger e evitar o processo de osmose.



Figura 11: Esporos coletados e guardados em um tubo centrífuga:

A) *P. crustosum* e B) *P. chrysogenum*.

5.3. Contagem dos esporos

Foram contados para o fungo *P. chrysogenum* um valor médio de 17,6 esporos em 0,04 mm². A câmara de Neubauer usada nesse projeto tinha aproximadamente uma profundidade de 0,1 mm, e consequentemente o volume da mesma era de 0,004 mm³. A partir dos dados é possível encontrar uma quantidade de esporos presentes por mL da solução.

$$\frac{17,6 \text{ esporos}}{0,004 \text{ mm}^3} = \frac{17,6 \text{ esporos}}{0,004 \times 10^{-9} \text{ m}^3} = \left(\frac{17,6 \times 10^9 \text{ esporos}}{0,004 \text{ m}^3} \right) \times \left(\frac{1 \text{ m}^3}{10^6 \text{ mL}} \right)$$

$$= \frac{4,40 \times 10^6 \text{ esporos}}{\text{mL}}$$

Considerando o fator de diluição tem-se que:

$$\left(\frac{4,40 \times 10^6 \text{ esporos}}{\text{mL}} \right) \times 10 = \frac{4,40 \times 10^7 \text{ esporos}}{\text{mL}}$$

Para o fungo *P. crustosum*, foram feitos os mesmos procedimentos anteriores, mostrados em seguida:

$$\begin{aligned}\frac{12,3 \text{ esporos}}{0,004 \text{ mm}^3} &= \frac{12,3 \text{ esporos}}{0,004 \times 10^{-9} \text{ m}^3} = \left(\frac{12,3 \times 10^9 \text{ esporos}}{0,004 \text{ m}^3} \right) \times \left(\frac{1 \text{ m}^3}{10^6 \text{ mL}} \right) \\ &= \frac{3,07 \times 10^6 \text{ esporos}}{\text{mL}}\end{aligned}$$

Considerando o fator de diluição tem-se que:

$$\left(\frac{3,07 \times 10^6 \text{ esporos}}{\text{mL}} \right) \times 10 = \frac{3,07 \times 10^7 \text{ esporos}}{\text{mL}}$$

5.4. Curva de Crescimento

Para o cálculo da massa seca, durante um período de cinco dias, foram analisados três amostras de cada micro-organismo. As mesmas eram retiradas do agitador orbital, e então medidos os pesos das respectivas amostras. Nota-se através da Figura 12 que nos três primeiros dias os fungos aparecem em uma fase log (exponencial), onde houve um maior crescimento, e após o terceiro dia, os micro-organismos apresentaram-se na fase estacionária, onde o crescimento tornou-se constante.

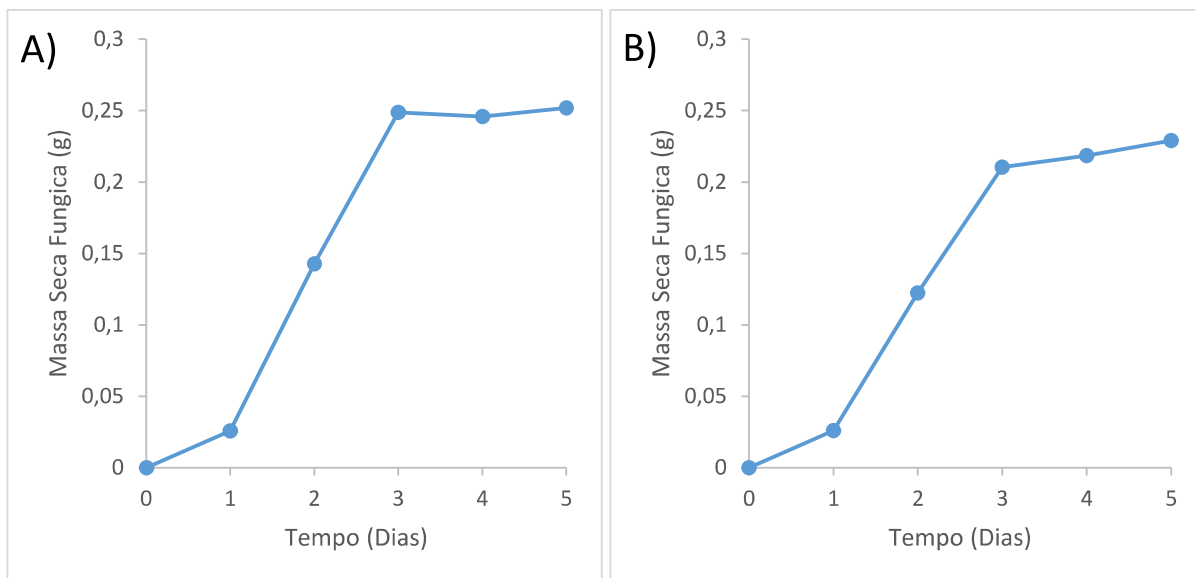


Figura 12: Curva de crescimento dos micro-organismos:

A) *P. chrysogenum* e B) *P. crustosum*.

Observa-se que o micro-organismo *P. chrysogenum* obteve maior crescimento chegando a valores de 0,25 g de massa fúngica, em comparação ao *P. crustosum* tendo como seu maior valor de massa fúngica aproximadamente 0,23 g. Esse resultado pode ter ocorrido devido uma maior adaptação ao meio do fungo *P. chrysogenum* em relação ao *P. crustosum*.

5.5. Curva de Calibração do Método MBAS

A determinação da concentração final do surfactante após os processos de cultivo aeróbio foi comparada com uma curva padrão (Figura 13). Com base na análise gráfica foi possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração. Desta forma, a curva padrão também fornece a equação linear para a realização dos cálculos.

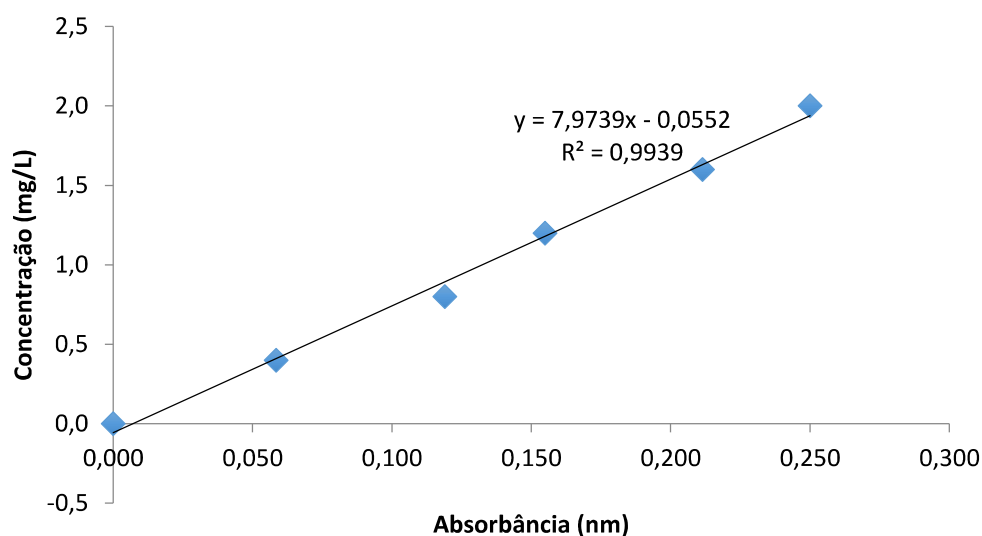


Figura 13: Curva de calibração do método MBAS aplicada na análise da biodegradação de surfactantes.

5.6. Cultivo aeróbio *P. chrysogenum*

Os resultados de pH, absorbância média, massa seca (g) e redução de LAS (%) após 5 dias de cultivo aeróbio do *P. chrysogenum* estão descritos na Tabela 4 e na Figura 14, são mostrados os *erlenmeyers*. Nota-se que os fungos obtiveram um crescimento satisfatório nas 11 amostras (Figura 14), e que esse crescimento variou de acordo com o meio proposto no planejamento experimental. Observa-se que em algumas amostras houve um desenvolvimento maior do que em outras, podendo ser devido a variação de ureia, como por exemplo, na terceira amostra, que obteve um valor de 0,9214 g sendo esta o maior valor obtido de massa seca, seguida da sétima amostra, com uma massa seca de 0,8941 g e na quarta amostra com a massa seca no valor de 0,6704.

Na décima segunda amostra não houve crescimento algum de micro-organismos devido a não inoculação do fungo, sendo a mesma o controle.



Figura 14: Resultado do cultivo aeróbio após 5 dias do *P. chrysogenum*.

Tabela 4: Resultados do cultivo aeróbio do *P. chrysogenum*.

Ensaio	pH	Abs média	Massa seca (g)	Redução (%)
Amostra 1*	7,00	0,109	0,2342	96,0176384
Amostra 2	6,95	0,188	0,2643	92,9355995
Amostra 3*	7,04	0,123	0,9214	81,906503
Amostra 4*	7,34	0,112	0,6704	95,9052803
Amostra 5*	7,04	0,069	0,3790	89,1140583
Amostra 6	6,93	0,141	0,4292	81,1906655
Amostra 7*	7,23	0,052	0,8941	89,4603469
Amostra 8	7,49	0,131	0,5774	75,8243142
Amostra 9	7,17	0,071	0,3333	93,757464
Amostra 10	7,30	0,052	0,3386	93,851869
Amostra 11	7,31	0,051	0,3403	93,9882595

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

Para demonstrar a capacidade de remoção do LAS do meio de cultivo foi verificada através do método MBAS (Figura 15) onde que as concentrações foram estudadas ao final do processo. Através da Tabela 4 pode-se observar os valores de redução para o fungo *P. chrysogenum* variando em torno de 75,82–96,01%.

Os experimentos 1, 2, 4, 9, 10 e 11 alcançaram reduções acima de 90%, tendo destaque para a primeira amostra com 96,01%.

Analizando-se a porcentagem de massa seca os ensaios onde ocorreram maior biodegradação, não coincidiram com uma maior produção de massa seca, como exemplo, a Amostra 1 que obteve uma maior redução em comparação com a Amostra 8 onde a porcentagem de redução foi menor, em contrapartida a porcentagem de massa seca foi maior (0,5774 g) do que a encontrada na Amostra 1 (0,2342 g). No ensaio 3 percebe-se um maior crescimento fúngico com 81% de biodegradação, e concentração maior do LAS.

O mesmo resultado pode ser observado em Costa (2016), onde os valores da máxima biodegradação não coincide com o de maior massa seca. Apenas para um dos fungos estudados percebeu-se uma maior produção de massa que coincidiu com o ensaio de maior porcentagem de remoção do surfactante. Tal fato pode ter ocorrido devido ao *P. chrysogenum* ter produzido enzimas como lacase e xilanase, tendo a mesma a função de biodegradar compostos, como por exemplo, o LAS. Nas amostras onde se obteve maior biodegradação do LAS pode-se ter como hipótese uma maior produção dessas enzimas, logo houve uma maior biodegradação. De acordo com Dashek (1997), as xilanases estão presentes em fungos, principalmente em *Aspergillus* e *Penicillium* que as usam na degradação de matéria vegetal em nutrientes utilizáveis.

Outro fator que pode ter levado a grandes valores de redução do surfactante foi o meio de cultivo em que o fungo foi submetido. De acordo com Costa (2016), Os altos valores de remoção do surfactante do meio podem ser explicados pelas condições que favoreçam à biodegradação pelo fungo.



Figura 15: Análise MBAs feito em três das 12 amostras.

Foi possível analisar as variáveis de entrada LAS e ureia, e como variáveis de saída, massa seca e redução, e em seguida pode-se averiguar se o planejamento proposto é significativo e preditivo. Através do software Statistica pode-se também construir gráficos e tabelas para análises posteriores. As análises feitas pelo Statistica foram feitas utilizando-se 90% do limite de confiança.

Pode-se avaliar através do diagrama de Pareto e da ANOVA (Figura 16, Tabela 5) o comportamento da porcentagem de massa seca do meio em relação a concentração de LAS e de ureia (fonte de nitrogênio). Pode-se notar para a massa seca do *P. chrysogenum* que somente os dois primeiros parâmetros de LAS e ureia apresentaram valores preditivos e significativos ($p < 0,1$), diferentemente dos outros parâmetros apresentados que não possuíram valores estatisticamente significativos nem preditivos ($p < 0,1$) dentro das condições analisadas.

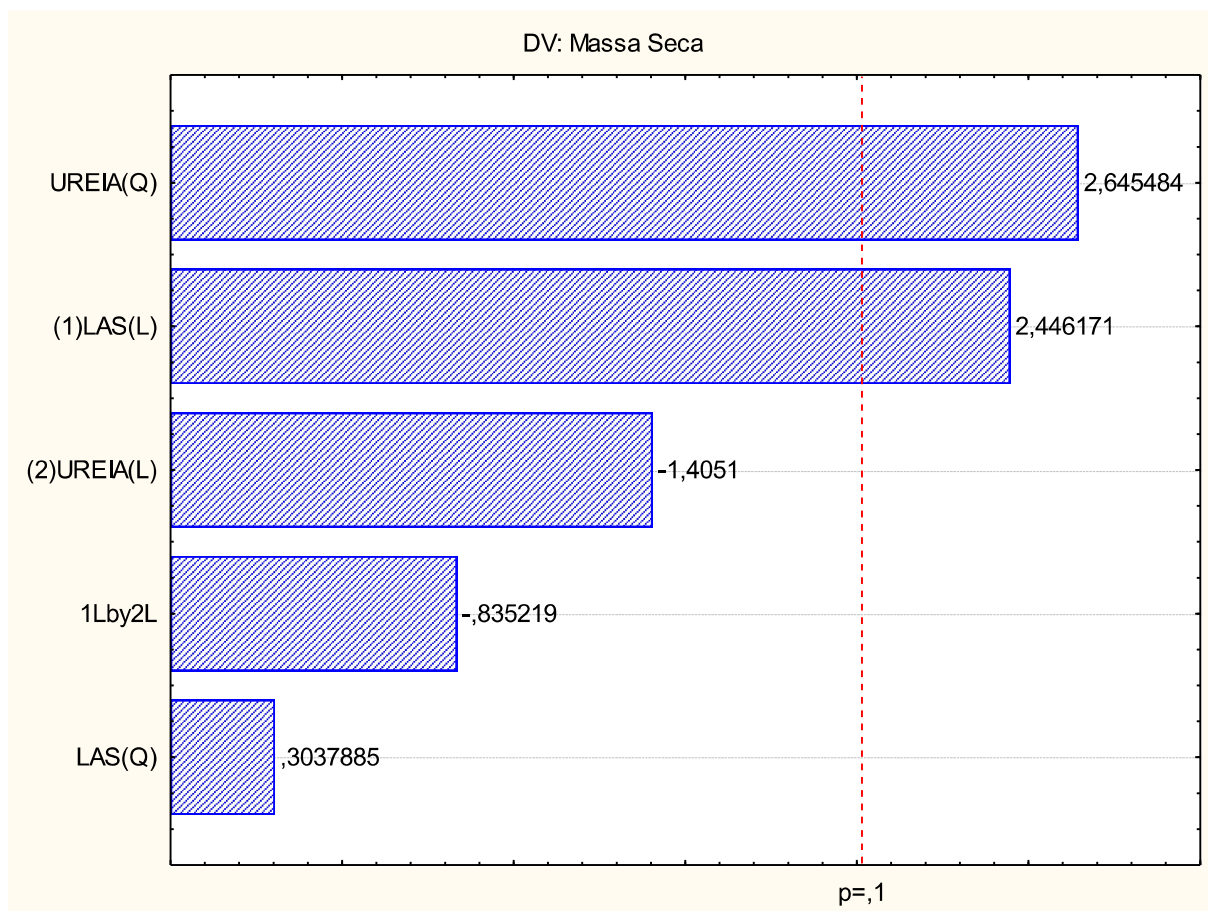


Figura 16: Diagrama de Pareto: Variável massa seca do cultivo aeróbio do *P. chrysogenum*.

De acordo com COSTA (2016), as variáveis analisadas pode não ser interferentes nas condições atuais, entretanto não se pode descartar a possibilidade de interferência no percentual de massa seca fúngica em condições diferentes.

Tabela 5: ANOVA para a variável resposta massa seca no cultivo aeróbio do *P. chrysogenum*.

	SS	GL	QM	F
Regressão	0,450269	3	0,15008967	
Resíduo	0,141590	7	0,02022714	7,42
Total	0,591859	10		

$$F_{\text{cal}} = 7,42; F_{\text{Tab}} = F(3;7;0,1) = 3,07$$

Sabendo-se F_{tabelado} é equivalente a 3,07 e o valor $F_{\text{calculado}}$ é igual a 7,42, desta forma diz-se que o modelo matemático é estatisticamente significativo e preditivo em relação a massa seca indo de encontro com o Diagrama de Pareto. A partir disso, a Equação 1 (mostrada abaixo) gerada pelo software mostra-se condizente com a realidade experimental.

$$\begin{aligned} \text{Massa seca} = & 0,337400 - 0,145537(X_1) + 0,021512(X_1)^2 \\ & - 0,083598(X_2) + 0,187337(X_2)^2 - 0,070275(X_1)(X_2) \end{aligned} \quad (\text{Equação 1})$$

A concentração de detergente é dado por X_1 e concentração de ureia por X_2 . Substituindo os parâmetros normalizados de qualquer ensaio é possível ter a prova da confiabilidade da Equação 1 (utilizando o primeiro ensaio).

$$\begin{aligned} \text{Massa seca} = & 0,337400 - 0,145537(-1) + 0,021512(-1)^2 - 0,083598(-1) \\ & + 0,187337(-1)^2 - 0,070275(-1)(-1) \end{aligned}$$

$$\text{Massa seca} = 0,705 \text{ g}$$

Ao se relacionar com o valor predito (0,705) com o valor observado (0,2342), observou-se uma diferença relativamente mínima (0,4708 g), podendo-se desta forma fazer as análises da curva de contorno como também da superfície de resposta para a produção de massa seca do *P. chrysogenum* (Figura 17).

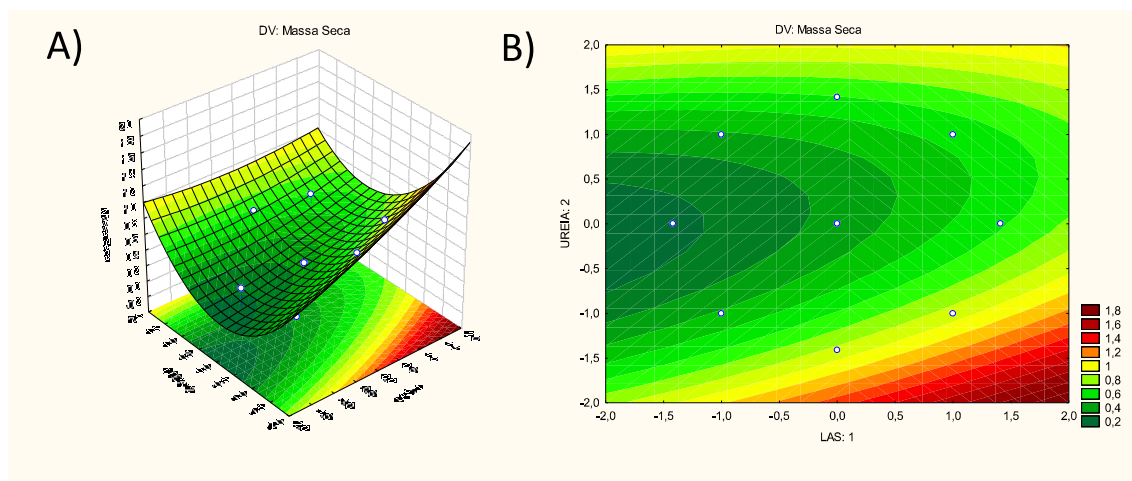


Figura 17: Curva de contorno (A) e Superfície de resposta (B) para a variável de resposta produção de massa seca do fungo *P. chrysogenum*.

Pode-se ser observado na curva de contorno (Figura 17A), que as melhores condições para a produção de massa seca pelo *P. chrysogenum* estão associadas a baixas concentrações de fonte de nitrogênio (ureia) e maior quantidade de detergente (LAS). Pode-se observar que os pontos centrais não apresentam situações que contribuem para bons resultados.

Pode-se fazer a análise através do gráfico de confiabilidade (Figura 18), para confirmação dos resultados já apresentados.

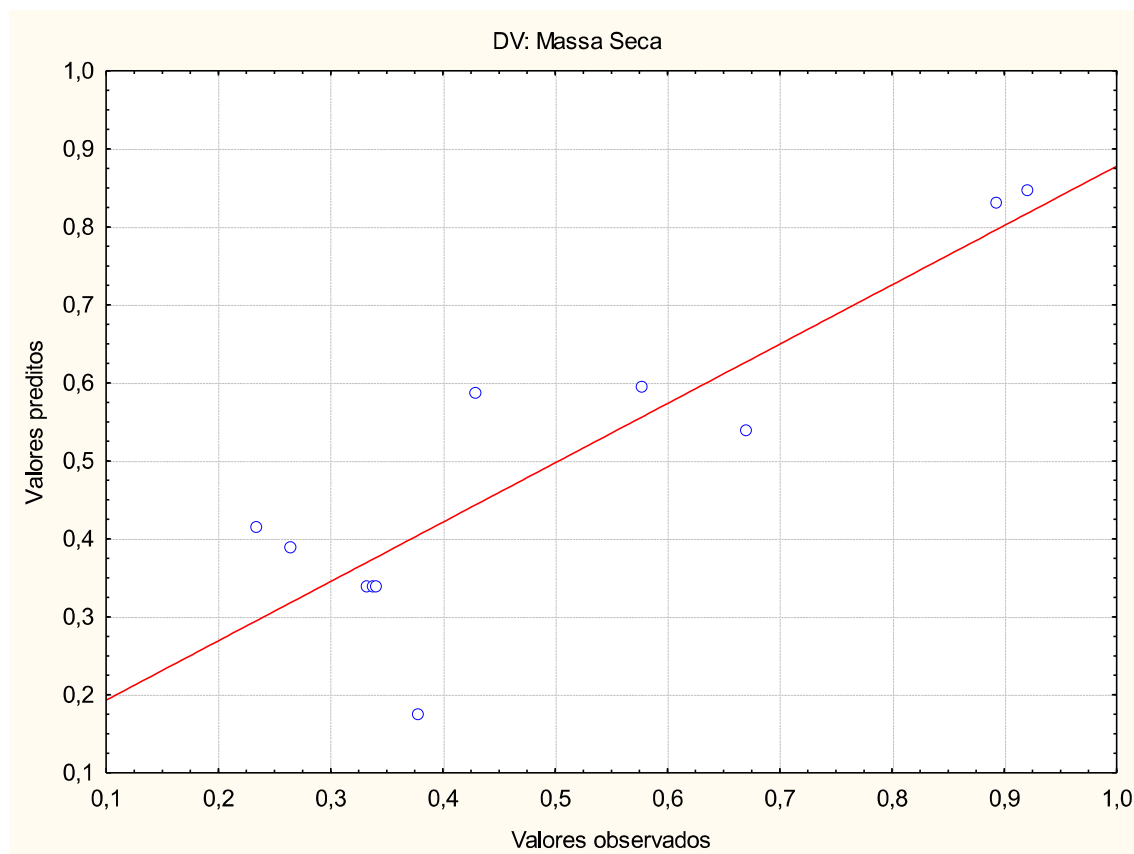


Figura 18: Valor predito versus valor observado para a variável massa seca.

Pode-se notar no gráfico de valor predito versus o valor observado que os pontos encontrados no mesmo não estão tão dispersos da linha, confirmando os resultados das outras análises já feitas. Isso é, os pontos mostrados no gráfico para que o modelo matemático seja estatisticamente preditivo e significativo, os mesmos devem estar próximos a linha em que $y=x$. Como houve esse não houve um grande afastamento diz-se que o modelo condiz com a realidade experimental.

Através do diagrama de Pareto e da ANOVA (Figura 19, Tabela 6), foi avaliado a porcentagem de redução do meio em relação a concentração de LAS e a fonte de nitrogênio (ureia). Observa-se que os parâmetros dentro das condições analisadas não possuem valores estatisticamente preditivos e significativos ($p < 0,1$).

Do mesmo modo em relação à massa seca, as variáveis estudadas não são significativas nas condições atuais, mas não pode ser descartada a possibilidade de interferentes no de remoção em outras condições (COSTA 2016).

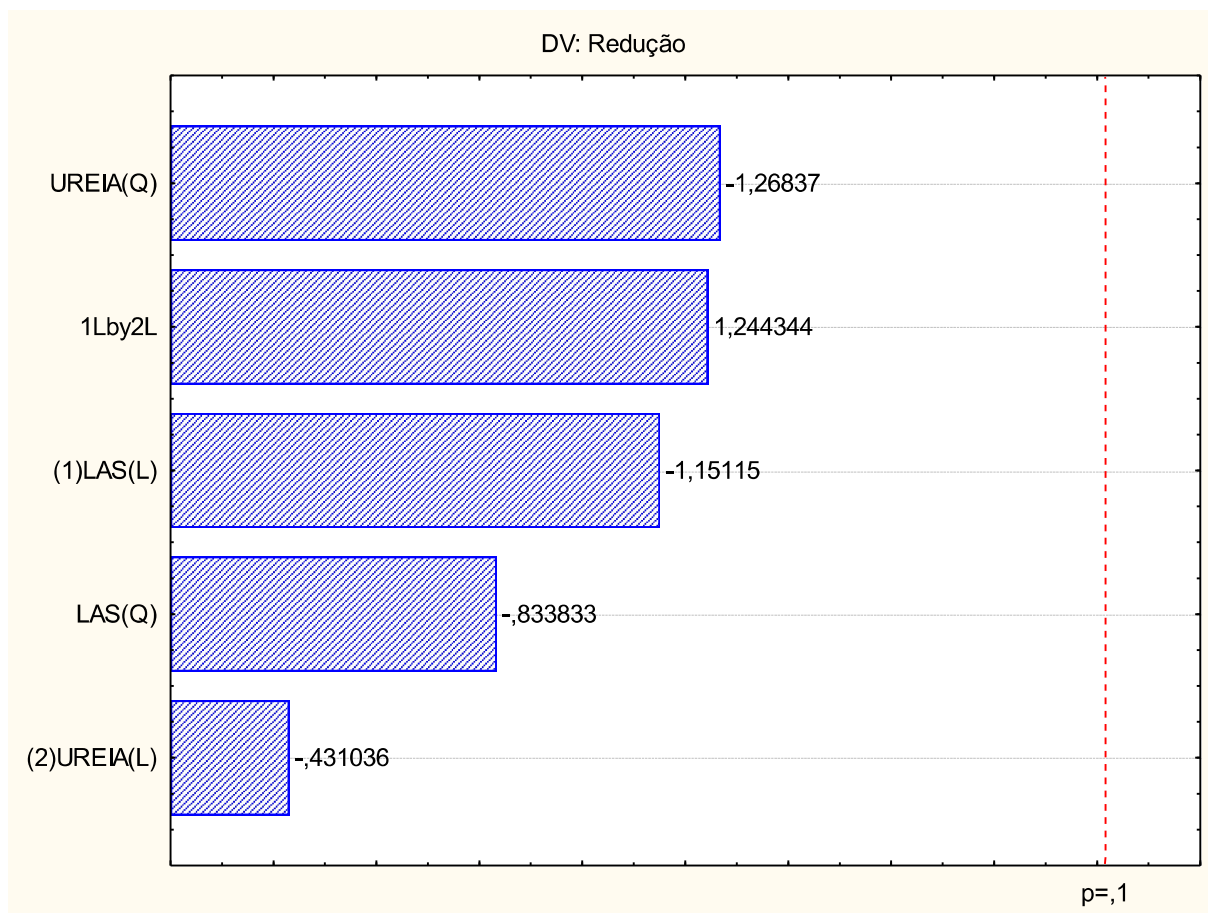


Figura 19: Diagrama de Pareto: Variável redução do cultivo aeróbio do *P. chrysogenum*.

Tabela 6: ANOVA para a variável resposta redução no cultivo aeróbio do *P. chrysogenum*.

	SS	GL	QM	F
Regressão	230,8436	1	230,8436	
Resíduo	235,530	9	26,17	8,82
Total	466,3736	10		

$$F_{\text{cal}} = 8,82; F_{\text{Tab}} = F_{(1;9;0,1)} = 3,36$$

Após a verificação dos resultados através da Tabela 6 tem-se como $F_{\text{calculado}}$ para a redução o valor de 8,82 apresentando-se também um valor superior ao F_{tabelado} 3,36, e assim pode-se dizer que o modelo matemático (Equação 2) é condizente a realidade experimental.

$$\begin{aligned} \% \text{ redução} = & 93,86586 - 2,79257(X_1) - 2,4075(X_1)^2 - 1,04623(X_2) \\ & - 3,6625(X_2)^2 + 4,27(X_1)(X_2) \end{aligned} \quad (\text{Equação 2})$$

Utilizando o primeiro ensaio tem-se que:

$$\begin{aligned} \% \text{ Redução} = & 93,86586 - 2,79257(-1) - 2,4075(-1)^2 - 1,04623(-1) \\ & - 3,6625(-1)^2 + 4,27(-1)(-1) \end{aligned}$$

$$\% \text{ Redução} = 95,90 \%$$

Ao se relacionar com o valor predito (95,90) com o valor observado (96,02), observou-se uma diferença insignificante (0,12%), fazendo-se que a Equação seja condizente com a realidade experimental. Nota-se que o valor encontrado na Equação 2 é um valor inferior ao valor real, isto é o modelo matemático apresentou valores subestimados, e devido a esse bom resultado pode-se analisar as curvas de contorno e superfície de resposta relacionadas a redução do *P. chrysogenum* (Figura 20).

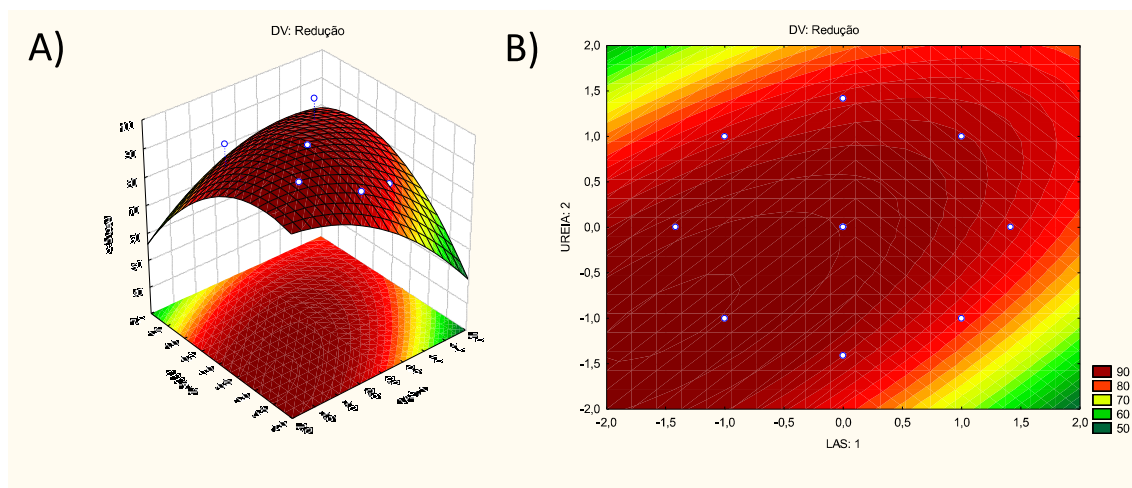


Figura 20: Curva de contorno (A) e Superfície de resposta (B) para a variável de resposta produção de massa seca do fungo *P. chrysogenum*.

Pode-se observar pela superfície de resposta (Figura 20B) que as condições estudadas mostraram-se satisfatórias, se obtendo reduções em torno de 80 e superiores a 90%. A melhor condição apresentada (em torno de 90%), encontra-se em menores quantidades de LAS e ureia. Os pontos centrais mostram-se com um bom resultado superando 90% de remoção. Pode-se mudar alguns parâmetros para que estes pontos centrais cheguem a uma condição melhor de redução. Através do gráfico de confiabilidade (Figura 21), pode-se realizar uma nova análise confirmando os resultados.

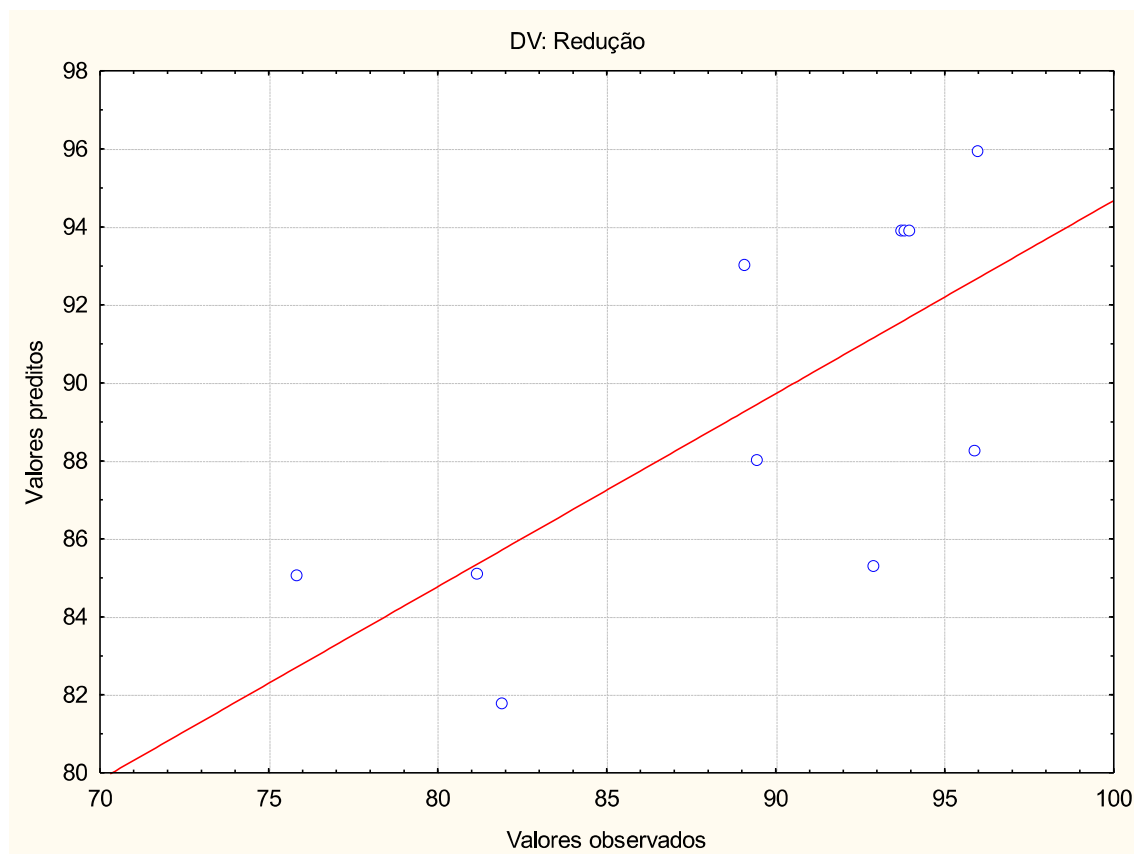


Figura 21: Valor predito versus valor observado para a variável redução do *P. chrysogenum*.

Sabemos que quanto mais próximos os pontos do modelo matemático mais confiável é o modelo, isto é os pontos deste gráfico devem estar próximos da linha em que $y = x$, indicando que os valores ajustados estão próximos dos valores observados. Analisando a Figura 21, nota-se que o modelo apresentado para a redução não possui uma alta confiabilidade devido os pontos do gráfico estarem muito distantes da linha, confirmando então os dados estatísticos já apresentados nas outras análises, inclusive no diagrama de Pareto tornando-se o modelo não preditivo e significativo.

5.7. Cultivo aeróbio *P. crustosum*

Para o cultivo aeróbio do micro-organismo *P. crustosum* foi empregado o mesmo planejamento experimental do *P. chrysogenum* tendo a Tabela 7 os resultados obtidos para este fungo.

Tabela 7: Resultados do cultivo aeróbio do *P. crustosum*.

Ensaio	pH	Abs média	Massa seca (g)	Redução (%)
Amostra 1*	8,10	0,091	0,1942	96,7198751
Amostra 2	7,59	0,039	0,0954	98,748559
Amostra 3	6,93	0,163	0,1024	75,6715272
Amostra 4	7,48	0,157	0,0967	94,1516934
Amostra 5*	7,48	0,082	0,1545	86,8343686
Amostra 6*	7,26	0,112	0,0758	85,258992
Amostra 7	6,89	0,160	0,1047	64,208621
Amostra 8*	7,57	0,173	0,0878	67,6408845
Amostra 9*	7,40	0,120	0,0974	88,9837967
Amostra 10*	7,12	0,119	0,0737	84,7137059
Amostra 11*	7,21	0,120	0,0889	84,5773154

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

Analisando a Tabela 7 percebe-se que a primeira amostra (0,1942 g) e a quinta amostra (0,1545 g) apresentaram maior crescimento após cultivo aeróbio. Já nas amostras 6 (0,0758 g) e 10 (0,0737 g) não houve um grande crescimento do fungo, em comparação às outras amostras. Nota-se que os pontos centrais o fungo apresentado não obteve crescimentos significativos, como mostrado nos resultados de outros experimentos.

De maneira análoga ao *P. chrysogenum*, o *P. crustosum* que apresentou um maior redução nos ensaios de menor massa seca, com exceção da primeira amostra que obteve uma grande redução (96,72%). A segunda amostra, a qual teve uma maior porcentagem de redução (98,75%) tem-se baixa massa seca (0,0954 g) em

comparação com a Amostra 1, assim como nos experimentos 4 (94,15%), 5 (86,83%) e 9 (88,98%), com massas secas de 0,0967 g, 0,1545 g e 0,0974 g respectivamente. Uma das causas para a biodegradação do LAS pode estar relacionada à produção de enzimas com ação biodegradante. Logo, nas amostras que tiveram uma maior redução, o micro-organismo pode ter produzido uma maior quantidade dessas enzimas.

Pode-se observar no cultivo aeróbio do micro-organismos *P. crustosum* que nos ensaios com maior porcentagem de redução de LAS (Figura 22), havia agregados, sendo estes supostamente agregados proteicos. De acordo com Costa (2014) esse fato pode ter ocorrido devido a massa precipitada ser rica em enzimas, isso porque as proteínas são precipitadas na presença de sais e também solventes orgânicos, no caso do trabalho apresentado utilizou-se o clorofórmio.

Em comparação dos dois micro-organismos estudados nas mesma condições de cultivo neste presente trabalho, o *P. crustosum* é o que apresenta melhores condições para ser analisado e inserido em um tratamento de efluente devido ao valor de redução encontrado chegando a 98%, como também sua menor produção de massa seca em relação ao *P. chrysogenum*. De acordo com GANGHIS (2000) Os fungos não são habitantes frequentes em lodos ativados. Seu desenvolvimento é estimulado sob dadas condições nos aeradores, como pH adequado, presença de boa quantidade de carboidratos e deficiência de nutrientes. Os fungos são tão eficazes quanto as bactérias na estabilização da matéria orgânica mas, por serem filamentosos, podem levar o sistema ao *bulking* quando presentes em grande número. Um dos gêneros que podem aparecer em lodos ativados é o *Penicillium*.



Figura 22: Formação dos aglomerados, supostamente proteicos, podem ser observado nas amostra.

Através do Diagrama de Pareto e da ANOVA (Figura 23, Tabela 8) foram feitas avaliações da produção de massa seca, em relação à concentração de LAS e de ureia (fonte de nitrogênio). No Diagrama de Pareto para a massa seca, apenas o último parâmetro apresentado não obteve valores significativos ($p < 0,1$), tendo os outros parâmetros com valores superiores sendo os mesmo estatisticamente significativos e preditivos nas condições analisadas.

De acordo com Costa (2016), pode não haver interferência nas condições atuais das variáveis analisadas, mas não deve ser descartada a possibilidade de interferências no percentual de produção de massa seca em diferentes condições.

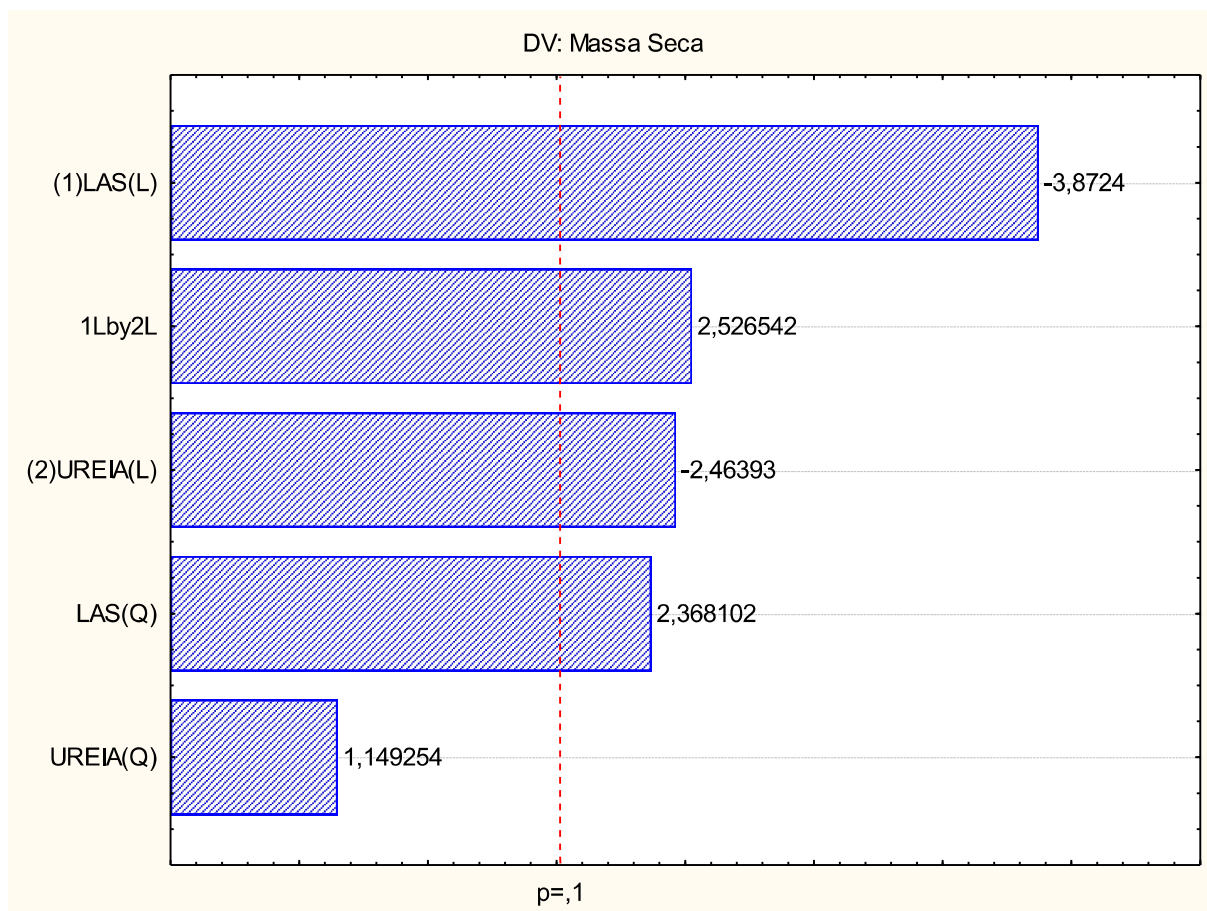


Figura 23: Diagrama de Pareto: Variável massa seca do cultivo aeróbio do *P. crustosum*.

Tabela 8: ANOVA para a variável resposta massa seca no cultivo aeróbio do *P. crustosum*.

	SS	GL	QM	F
Regressão	0,011298	5	0,00226	
Resíduo	0,001697	5	0,0003394	6,657631
Total	0,012995	10		

$$F_{\text{cal}} = 6,657631; F_{\text{Tab}} = F(5;5;0,1) = 5,05$$

Através da Tabela ANOVA foi obtido o valor de $F_{\text{cal}} = 6,657631$, mostrando-se maior que o valor tabelado. Sendo assim, o modelo matemático é estatisticamente preditivo e significativo, desta forma pode-se gerar a Equação 3 pelo software.

A confiabilidade da equação pode ser confirmada obtendo os valores preditos pelo modelo matemático apresentado anteriormente. Considerando o ensaio de número 1 do planejamento, tem-se:

$$\begin{aligned} \text{Massa seca} = & 0,086667 - 0,025225(X_1) + 0,018360(X_1)^2 \\ & - 0,016050(X_2) + 0,008910(X_2)^2 + 0,023275(X_1)(X_2) \end{aligned} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\begin{aligned} \text{Massa seca} = & 0,086667 - 0,025225(-1) + 0,018360(-1)^2 - 0,016050(-1) \\ & + 0,008910(-1)^2 + 0,023275(-1)(-1) \end{aligned}$$

$$\text{Massa seca} = 0,1785 \text{ g}$$

Comparando o valor predito (0,1785 g) e o valor observado (0,1942 g), pode-se perceber que a variação entre os resultados (0,016 g) é mínima. Assim, tem-se um modelo estatisticamente confiável. Na Figura 24, são apresentados as curvas de contorno e superfície de respostas para o *P. crustosum*.

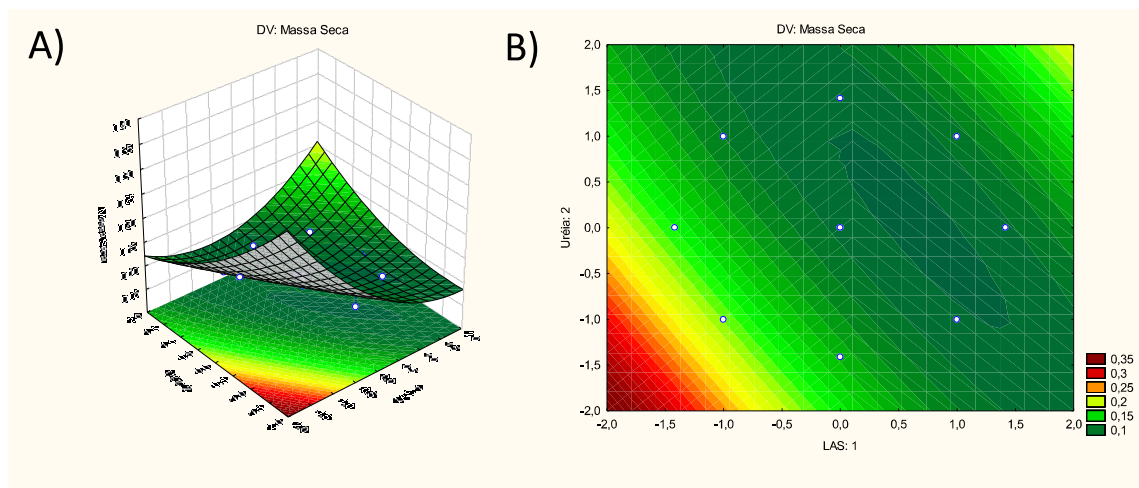


Figura 24: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno para a Massa seca (g) em função das concentrações de ureia (g/L) e LAS (mg/L) para o *P. crustosum*.

Diante da curva de contorno para a massa seca (Figura 24B), pode-se observar que as melhores condições para o crescimento fúngico ocorre em baixas concentrações de LAS e ureia. Analisando os pontos centrais, nota-se que os mesmos não apresentam resultados satisfatórios, com valores de massa seca muito inferiores.

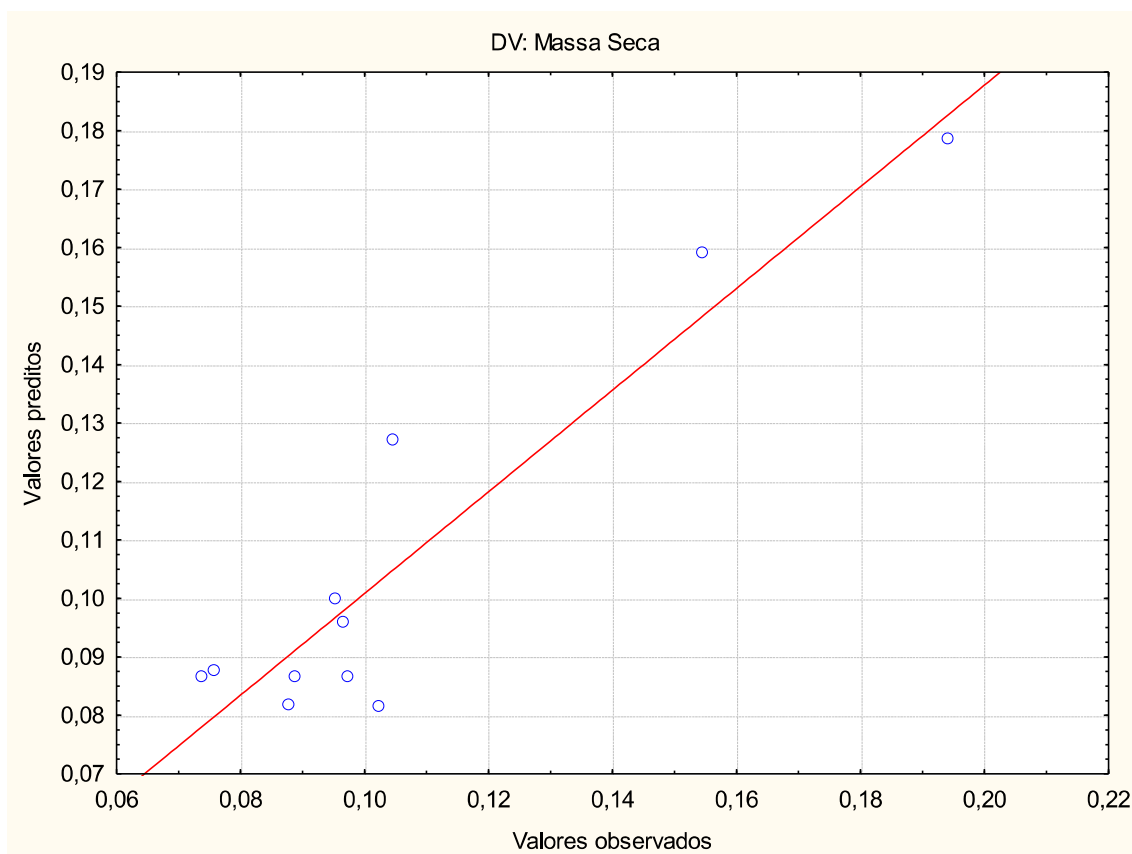


Figura 25: Valor predito versus valor observado para a variável massa seca.

Diferentemente dos outros gráficos analisados de valores preditos versus valores observados pode-se observar no gráfico (Figura 25) que não há grande dispersão dos pontos à curva, como ocorrido nas outras situações, podendo-se dizer que o modelo matemático encontrado é estatisticamente preditivo e significativo, confirmando os resultados já apresentados.

Ao contrário do observado no Diagrama de Pareto referente a massa seca, os parâmetros de redução não possuíram valores estatisticamente significativos e preditivos ($p < 0,1$) dentro das situações analisadas para o fungo *P. crustosum*, como é mostrado pelo Diagrama de Pareto na Figura 26.

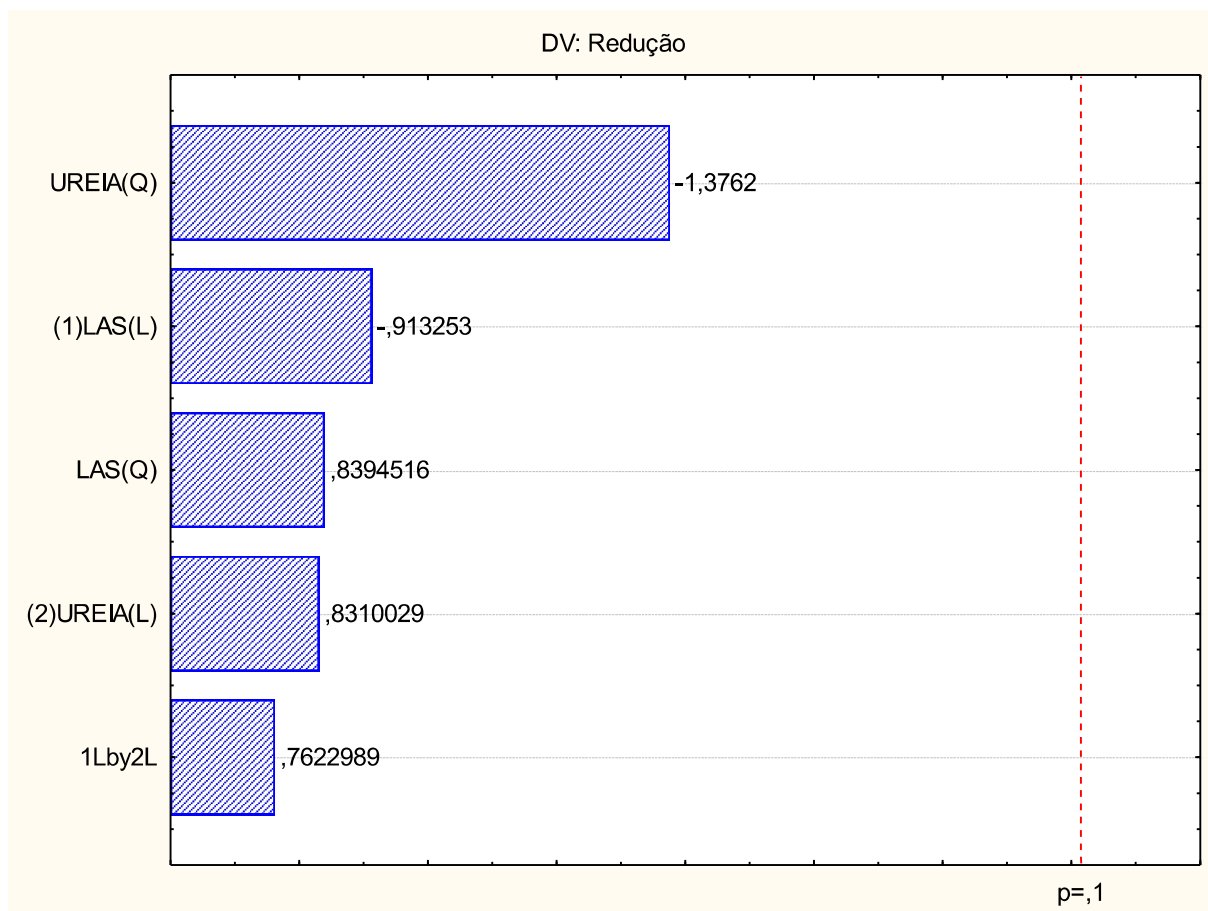


Figura 26: Diagrama de Pareto: Variável redução do cultivo aeróbio do *P. crustosum*.

Tabela 9: ANOVA para a variável resposta a redução no cultivo aeróbio do *P. crustosum*.

	SS	GL	QM	F
Regressão	663,039	1	663,039	
Resíduo	582,196	9	64,688	10,249
Total	1245,235	10		

$$F_{\text{cal}} = 10,249; F_{\text{Tab}} = F(1;9;0,1) = 3,36$$

Visto que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (10,249) é superior ao F_{tabelado} (3,36) (Tabela 9). Portanto, os resultados para a porcentagem de remoção apresentam resultados estatisticamente confiáveis. Logo o modelo matemático demonstrado pela Equação 4 se mostra condizente com a realidade.

$$\begin{aligned} \% \text{ Remoção} = & 86,0916 - 3,48416(X_1) + 3,81349(X_1)^2 + 3,17035(X_2) \\ & - 6,24746(X_2)^2 + 4,11290(X_1)(X_2) \end{aligned} \quad (\text{Equação 4})$$

Considerando o ensaio de número 1 do planejamento, tem-se:

$$\begin{aligned} \% \text{ Remoção} = & 86,0916 - 3,48416(-1) + 3,81349(-1)^2 + 3,17035(-1) \\ & - 6,24746(-1)^2 + 4,11290(-1)(-1) \end{aligned}$$

$$\% \text{ Redução} = 88,08 \%$$

Ao relacionar o valor predito (88,08%) do valor observado (96,72%) pode-se perceber uma diferença significativa mas dentro da faixa de erro aceitável (8,64%). A Equação 4 apresenta valores subestimados em relação ao real. Em seguida é feita a análise (Figura 27) da curva de contorno e superfície de resposta para a remoção do LAS para o micro-organismo *P. crustosum*.

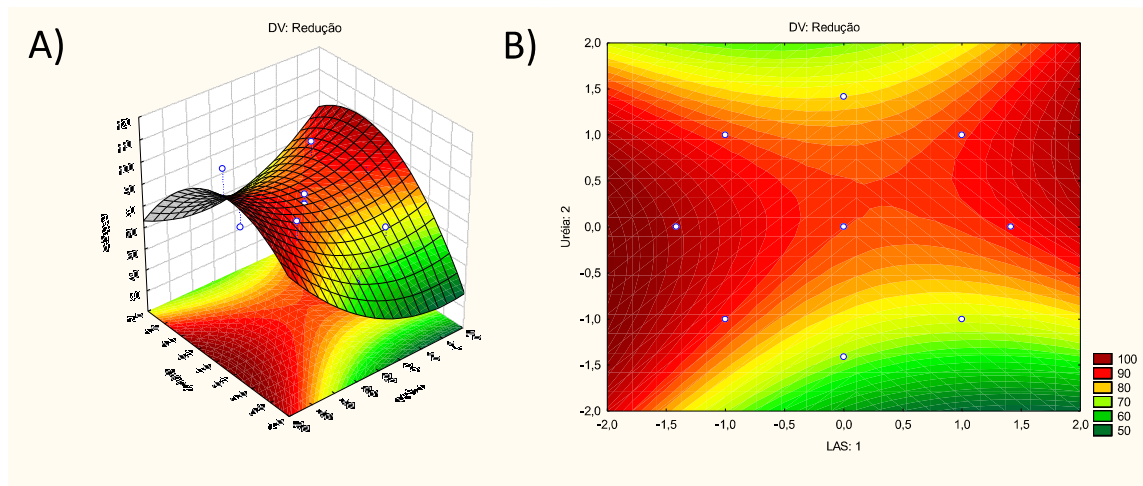


Figura 27: Curva de contorno (A) e Superfície de resposta (B) para a variável de resposta para a porcentagem de remoção do LAS para o fungo *P. crustosum*.

Observa-se na superfície de resposta (Figura 27B) que principalmente em pequenas concentrações de ureia e detergente há uma redução em torno de 95% sendo o resultado satisfatório. Já os pontos centrais também possuíam bons resultados para a redução, sendo os mesmos em torno de 80%. Nota-se que em grandes concentrações de ureia e LAS proporcionaram resultados ótimos de redução em torno de 90%

A análise de redução pode ser vista através do gráfico de confiabilidade (Figura 28).

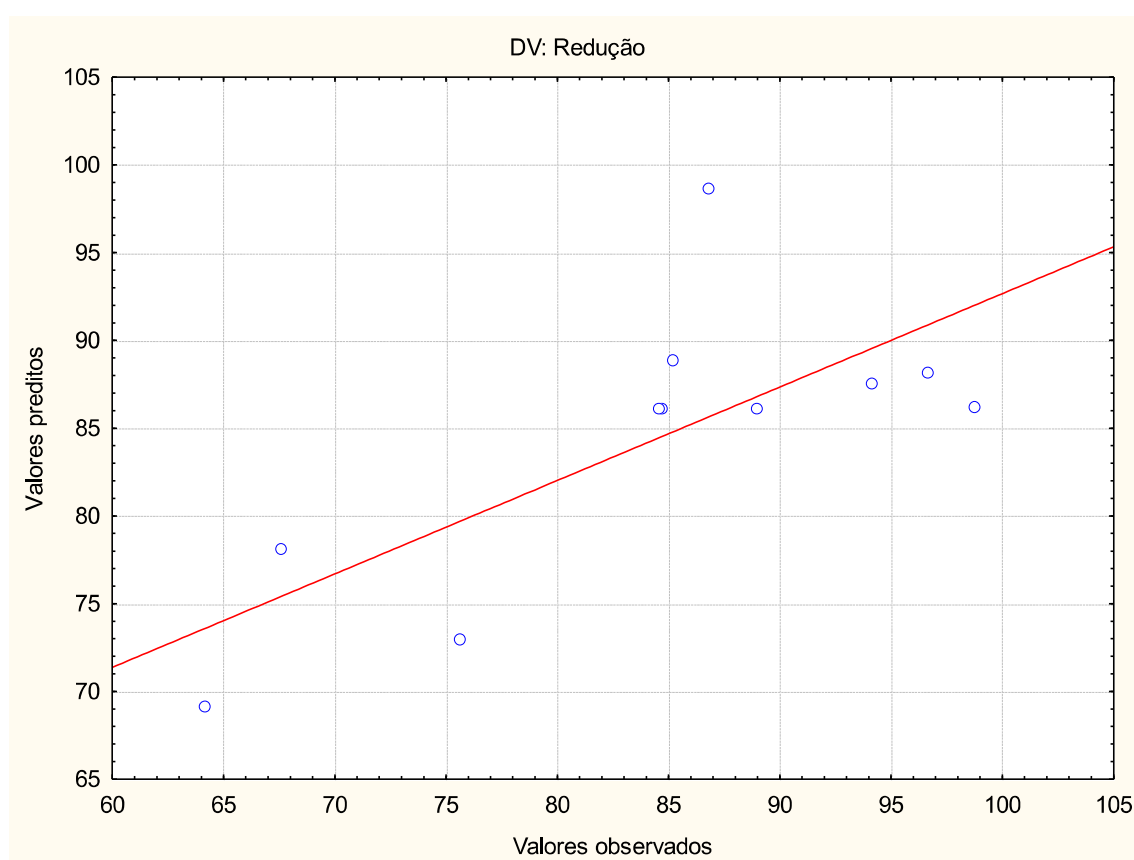


Figura 28: Valor predito versus valor observado para a variável redução do *P. crustosum*.

Pode-se observar o gráfico correspondente a redução (Figura 28) que os pontos encontram-se distantes da linha em que $y=x$, desta forma, o modelo matemático não se torna confiável como é mostrado no diagrama de Pareto em que os parâmetros se encontram abaixo a linha dos 90% de confiança.

Após análise, dos dados e resultados da biodegradação utilizando os micro-organismos *P. chrysogenum* e *P. crustosum*, pode-se perceber que neste trabalho foram obtidas reduções entre 94 a 98%, do detergente do meio e quando comparados com outras literaturas, os valores foram satisfatórios para a redução do LAS.

Costa (2016) observou que os micro-organismos *P. crustosum* e *P. chrysogenum* mostraram-se eficientes na biodegradação do Linear alquibenzeno sulfonato de sódio. Entre os fungos estudados no trabalho, o que mais se mostrou apto para o tratamento do efluente sintético contaminado com o surfactante alquibenzeno sulfonato de sódio foi o *P. chrysogenum*, tendo um alcance de até 99,5% de remoção do LAS.

Estudos feitos por Silva (2014) mostraram que no processo de biodegradação estudado, variando-se a concentração de glicose e LAS, os resultados são satisfatórios por apresentar reduções próximas a 90%, em alguns casos chegando em 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. Tal resultado pode ter ocorrido devido ao micro-organismo *P. crustosum* ter se adaptado melhor em condições com maiores quantidades de glicose em relação ao *P. chrysogenum*, que sua maior redução foi na presença de menores quantidades de glicose no meio.

Nos estudos de Santos (2015), foi observado que o fungo *Penicillium chrysogenum* em cultivo aeróbio submerso a 25°C, 180 rpm durante 5 dias, alcançou alto nível de biodegradação de LAS chegando a 99,4%, enquanto tratamentos convencionais em anaerobiose removem no máximo 70% de surfactantes totais em efluentes domésticos reais.

Para melhores comparações e análises dos resultados encontrados no trabalho apresentando e em outros já estudados tem-se a Tabela 10.

Tabela 10: Resultados encontrados e de outros trabalhos.

Resultados encontrados	Outros trabalhos
<i>P. crustosum</i>	95,36% (Silva, 2014)
98.75%	85,00% (Costa, 2016)
<i>P. chrysogenum</i>	94,64% (Silva, 2014)
96.02%	99.40% (Santos, 2015)
	99,50% (Costa, 2015)

Pode-se afirmar que os fungos filamentosos são eficientes para a biodegradação devido aos elevados valores de redução do LAS, chegando a reduções próximas ou maiores que 90%. De acordo com Silva (2014) se faz necessário levar em consideração a viabilidade de estudos que façam uma avaliação da adaptação e biodegradação dos fungos *P. crustosum* e *P. chrysogenum* em maiores concentrações de LAS. A justificativa vem de estudos como OKADA *et al.* (2009) com reduções significativa do LAS de 50±20%, devido à concentração de surfactante no meio ser considerada alta (14 mg/L).

6. Conclusão

Os fungos utilizados no presente trabalho obtiveram ótimos resultados na biodegradação do Linear alquilbenzeno sulfonato de sódio. A partir do planejamento proposto, o fungo *P. crustosum* apresentou maiores porcentagens de biodegradação alcançando 98,75%, o micro-organismo *P. chrysogenum* também obteve bons resultados com uma porcentagem de biodegradação máxima de 96,02%, com uma diferença 2,73% de redução entre os fungos estudados. O método utilizando micro-organismo no tratamento de efluentes mostra-se bastante eficaz, além de sustentável e de baixo custo, logo os fungos filamentosos no presente trabalho apresentam-se como uma boa alternativa, juntamente com as bactérias já utilizadas nos tratamentos biológicos. O micro-organismo *P. crustosum* apresentou um ótimo resultado para a redução, e uma pequena produção de massa fúngica em relação ao *P. chrysogenum*, sendo uma boa alternativa para a biodegradação de surfactantes como o LAS. A utilização desses micro-organismos pode levar a diminuição dos efeitos negativos causados por componentes tóxicos como os surfactantes que são responsáveis por muitos problemas ambientais, assim como a saúde dos seres vivos.

É de extrema importância a continuidade dos estudos relacionados a biodegradação do LAS, para que métodos sejam aprimorados ou substituídos por métodos mais eficazes, para que o tratamento de efluentes seja melhorado. A redução de compostos prejudiciais presentes nos recursos hídricos é fundamental para que haja continuidade da qualidade de vida de seres vivos e que a biodiversidade não seja prejudicada.

7. Perspectivas Futuras

A área de biotecnologia é muito ampla e de grande importância no tratamento de efluentes. Estudos ambientais para a descontaminação dos recursos hídricos são de extrema necessidade, para uma melhoria da qualidade de vida da população e do meio ambiente. Algumas atividades podem ser propostas para o engrandecimento e aperfeiçoamento dos processos tecnológicos já empregados do que foi estudados no trabalho apresentado.

- ✓ Fazer a otimização da metodologia de análise (MBAS), reduzindo a quantidade de efluentes produzidos devido a utilização de azul de metileno e clorofórmio;
- ✓ Efetuar estudos e experimentos para adequação de culturas dos micro-organismos classificados no presente trabalho, fazendo com que os valores de reduções sejam maiores em grandes concentrações de LAS;
- ✓ Educar a população dos grandes danos causados ao meio ambiente devido ao grande uso de materiais de limpeza.

8. Referências Bibliográficas

ANA (Agência Nacional de Águas). Cuidando das águas: soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos. Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. 2. ed., Brasília - DF, 2013.

ATWOOD, D.; FLORENCE, A. T. Surfactants Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology. Chapman and Hall, London, 1985.

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

BARBIERI, E.; NGAN, P. V.; GOMES, V. Efeito do LAS-C12 no metabolismo de rotina de tainhas em função da temperatura em três salinidades. In: Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI. Rima Editora: São Carlos, 2000.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. L.; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. Introdução à Engenharia Ambiental. São Paulo: Prentice-Hall, 2002.

BRUNNER, P. H.; CAPRI, S.; MARCOMINI, A.; GIGER, W. Occurrence and behavior of linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. Water Res., v. 22, p. 1465-1472, 1988.

CHAVES, E. S. *Esgotos*. Florianópolis, 2008. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAALp4AL/apostila-esgotos>>. Acesso em: 18 julho 2016.

CJ ALEXOPOLOUS; CHARLES, W.; MIMS, M.; BLACKWELL *et al.*; Introdução à Micologia, 4ª ed. John Wiley and Sons, Hoboken NJ, 2004.

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

COSTA, M. F. Biodegradação do surfactante Linear alquilbenzeno sulfonato de sódio utilizando fungos filamentosos. Dissertação (Mestrado em Tecnologia para Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal de São João del-Rei. Ouro Branco – MG, 2016.

DASHEK, V. WILLIAN. Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology CRC Press . p. 313 "Xylans can be hydrolyzed by beta-xylanase" - 1997

DELFORNO, T. P. Caracterização microbiana e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB, 2011.

DENTEL, S. K., ALLEN, H. E.; SRINIVASARAO, C; DIVINCENZO, J. Effects of surfactants on sludge dewatering and pollutant fate. Relatório de Projeto – Water Resources Center - University of Delaware, 1993.

ECYCLE. Sabões, detergentes e seus impactos ambientais. Disponível em: <<http://www.ecycle.com.br/component/content/article/67/2288-saboes-sabao-detergentes-o-que-sao-impactos-meio-ambiente-tensoativo-sequestrante-quelante-limpeza-saponificacao-sinteticos-cadeia-de-carbono-consequencias-eutrofizacao-poluicao-aves-aquaticas-alternativas-bicarbonato-de-sodio-vinagre.html>>. Acesso em 18 de agosto, 2016 às 16:30.

EICHHORN, P.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; KNEPPER, T. P. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface water and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. Sci. Total Environ., v. 284, p. 123-134, 2002.

FAIA, M. A. Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Faculdade de Lisboa, 2011.

GLOXHUBER, C. Anionic Surfactants: Biochemistry, Toxicology, Dermatology. Surfactant Sciences Series, v. 10. Ed. Dekker, 1980.

GRABIŃSKA-LONIEWSKA, A.; KONILLOWICZ-KOWALSKA, T.; WARDZYŃSKA, G.; BORYN, K. Occurrence of Fungi in Water Distribution System. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 539-547, 2007.

GUILHERMINO, L; LACERDA, M. N.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V. M. In vitro and In vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total Environ.* v.247, p. 137-141, 2000.

HUNTER, R. J. Introduction to Modern Colloid Science. Oxford University Press, New York, 1992.

L. BUENO, R.G. Filamentous fungi preservation in distilled water. *Iberoamericana de Micologia*, 15, 166-168, 1998.

MALAGRINO, W.; PEREIRA, N.; ROCHA, A. A. Estudos preliminares sobre os efeitos de baixas concentrações de detergentes aniônicos na formação do bisso em *Brachidontes solisianus*. *Revista Ambiente*, v. 1, n. 1, p. 37-40, 1987.

MANFIO, P. G. Micro-organismos, capítulo 2. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / CPQBA, Divisão de Recursos Microbianos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. São Paulo – SP, 2003.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Inovações estão em aperfeiçoar o tratamento de águas e efluentes. Propriedade Intelectual. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2007.

MEC; EDEC; MMA.CONSUMO SUSTENTÁVEL: Manual de educação. Brasília-DF, 2005.

MORAES, C.F. Estudos dos Efeitos da Radiação ionizante na toxicidade aguda de efluentes que apresentam surfactantes aniônicos. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. São Paulo -SP, 2004.

NITSCHKE, M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2002.

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; e Lilian R. F. CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica, 2006.

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

RATTNER, H. Meio ambiente, saúde e desenvolvimento sustentável. Ciência & Saúde Coletiva, v.14, n.6, p.1965-1971, 2009.

ROMANELLI, F. M. Avaliação da Toxicidade Aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo - São Paulo- SP, 2004.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. de C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A.M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1-2, p. 73-85, 2006.

SALAMONI, R. H.; PINHEIRO, R. J. B.; NUMMER, A. V. Processo operacional da Central de Tratamento de Resíduos da Caturrita – Santa Maria, RS. Teoria e Prática na Engenharia Civil, n.14, p.43-50, 2009.

SAMSON, R. A.; HADLOK, R.; STOLK, A.C. A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie van Leeuwenhoek* [S.l.: s.n.] 43 (2): 169–175, 1977.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B. *Food and Indoor Fungi*, Vol. 2. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands, 2010.

SANDBACKA, M.; CHRISTIANSON, I.; ISOMAA, B. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish - A comparative study. *Toxicol. Vitro*, v. 14, p. 61-68, 2000.

SANTOS, S. A. A. Otimização do processo de biodegração do surfactante linear Alquilbenzeno sulfonato de sódio utilizando fungos filamentosos. Trabalho de Iniciação científica à Universidade Federal de São João del Rei – UFSJ, Ouro Branco - MG, 2015.

SCHRAMM, L. L. *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. Cambridge University Press, Reino Unido, 2000.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 14, p. 61-68, 2000.

SETTI A. A.; LIMA J. E. F. W.; CHAVES A. G. M.; PEREIRA I. C. Introdução ao Gerenciamento de recursos hídricos. Agência Nacional de Águas (ANA), Agência nacional de Energia Elétrica (ANEEL) e Organização de Metrologia Mundial (OMM), disponível em [www.ana.gov.br], 2001.

SHEN, H. D.; CHOU, H.; TAM, M. F.; CHANG, C. Y.; LAI, H. Y.; WANG, S. R. Molecular and immunological characterization of Pen ch 18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium chrysogenum*, 2003.

SILVA, A. C. A. A. Otimização do processo de biodegração do surfactante linear Alquilbenzeno sulfonato de sódio utilizando fungos filamentosos. Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ, Ouro Branco - MG, 2014.

SILVA, R. R.; COLEHO, G. D. Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo – SP, 2006.

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. Dissertação (Tese de mestrado) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

TAVARES, L. C.; BATALHA, F.N.; MOREIRA, R. F.; VILAR, D.A.N.; BARRA, I. M. M.; FREITAS, C. A. B; MARINHO, V. H. S. Propriedades e aplicações de tensoativos. Trabalho apresentado no 51 Congresso Brasileiro de química. São Luís - MA. 2011.

TEMMINK, H.; KLAPWIJK, B. Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) inactivated sludge plants. Water Res., v. 38, p. 903-912, 2004.

THERAULAZ, F.; DJELLAL, L.; COULOMB, B.; BOUDENNE, J.; INT. J. ENVIRON. Anal. Chem. 2001. IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso 21/07/2016 às 15:56.

VENHUIS, S. H.; MEHRVAR, M. Health effects, environmental impacts, and photochemical degradation of selected surfactants in water. International Journal of Photoenergy, v. 6, n. 3, p.115-125, 2004.