

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

BIODEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE ANIÔNICO EM MEIO LÍQUIDO
UTILIZANDO FUNGO FILAMENTOSO *Penicillium crustosum*

Luiza Maria Amaral Frossard de Paula

Orientador: Prof. Enio Nazaré Oliveira Júnior

Ouro Branco

Junho de 2018

BIODEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE ANIÔNICO EM MEIO LÍQUIDO
UTILIZANDO FUNGO FILAMENTOSO *Penicillium crustosum*

Luiza Maria Amaral Frossard de Paula

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. Enio Nazaré Oliveira Júnior

Ouro Branco

Junho 2018

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

BIODEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE ANIÔNICO EM MEIO LÍQUIDO
UTILIZANDO FUNGO FILAMENTOSO *Penicillium crustosum*

Luiza Maria Amaral Frossard de Paula

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

Enio Nazaré Oliveira Júnior - Orientador

Edson Romano Nucci – Examinador 1

Karine Rocha Xavier– Examinador 2

Ouro Branco, __/__/____

RESUMO

A crescente preocupação com a qualidade da água tem conduzido a pesquisas em relação a biodegradação de surfactantes líquidos utilizados amplamente no sabão lava roupas. Esse produto é fabricado com a adição de surfactantes e princípios ativos que diminuem a tensão superficial de compostos com polaridade. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a biodegradação de surfactante líquido comercial para lavagem de roupas, utilizando fungo filamentoso *Penicillium crustosum*. No estudo, foram utilizados meios sintéticos, os quais foram preparados previamente a partir de delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes: concentração de surfactante e de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. O fungo utilizado, *Penicillium crustosum* foi isolado de um efluente da indústria têxtil. Após a incubação a 25°C, agitação a 180 rpm por 5 dias, os meios foram avaliados analiticamente em termos da quantidade de massa seca de fungo produzida e redução do surfactante. A remoção de surfactante foi determinada pelo método de azul de metileno (MBAS) e variaram de 45 a 96% e a massa seca do fungo foi determinada por gravimetria e variaram de 0,12 a 0,43g. Os resultados deste estudo mostraram que o fungo *Penicillium crustosum* foi eficiente na remoção de surfactantes presentes em sabões líquidos comerciais utilizados na lavagem de roupas.

Palavras chave: água, poluição hídrica, espumas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. Poluição das Águas.....	9
3.2. Composição Química dos Produtos de Limpeza	10
3.3. A Legislação - Água para Consumo Humano	14
3.4. Microrganismos.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1. Reativação dos Fungos.....	16
4.2. Coleta dos Esporos	16
4.3. Contagem dos Esporos.....	17
4.4. Curva de Crescimento.....	17
4.5. Cultivo Submerso dos Fungos	18
4.6. Análise MBAS	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Reativação dos Fungos.....	21
5.2. Coleta dos Esporos	21
5.3. Contagem dos esporos	22
5.4. Curva de Crescimento.....	22
5.5. Curva analítica do método MBAS	23
5.6. Cultivo Submerso dos Fungos	24
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	31

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, microrganismos, sais orgânicos e componentes dos produtos saneantes (CHAVES, 2008).

A contaminação dos recursos ambientais subterrâneos e superficiais por compostos orgânicos tóxicos é um dos maiores impasses enfrentados pela geração atual. Ainda que, há uma grande variedade de produtos químicos e processos físicos de tratamento de resíduos tóxicos, a maior parte destes somente se dilui ou são transferidos para outra fase, não ocorrendo a degradação (SILVA, 2013).

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 microrganismos 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 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, 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).

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

O trabalho tem como objetivo avaliar a biodegradação do surfactante presente em sabão lava roupas utilizando o fungo filamentoso *Penicillium crustosum*.

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).

3.2. Composição Química dos Produtos de Limpeza

Os produtos de limpeza são compostos que reduzem a tensão superficial de outras substâncias, sendo por isso, considerados tensoativos. Nesse contexto, formam substâncias químicas projetadas para terem propriedades de limpeza ou solubilidade (MUNGRAY *et al.*, 2009).

Em sua composição possuem surfactantes, que são substâncias naturais ou sintéticas, que possuem em sua estrutura uma parte lipofílica (ou hidrofóbica) e uma parte hidrofílica, responsáveis pela adsorção de moléculas tensoativas nas interfaces líquido-líquido, líquido-gás ou sólido-líquido de um dado sistema (MELO, 2013).

A parte apolar da molécula é uma cadeia carbônica, enquanto a “cabeça” hidrofílica pode ser uma porção iônica (aniônica e catiônica), não iônica ou também anfótera (COSTA *et al.*, 2007).

Cada parte da estrutura do tensoativo tem diferente solubilidade nos diversos solventes e tende a orientar a interface entre as duas fases, o grupo hidrofílico fica em contato com a parte polar (aquosa) e a porção hidrofóbica interage com a porção gordurosa, também apolar (MELO, 2013).

Dentre os grupos apolares presentes na molécula, destacam-se a cadeia carbônica com mais de 10 átomos de carbono e os anéis aromáticos. Já para o grupo hidrofílico destacam-se os grupos funcionais descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais grupos funcionais hidrofílicos presentes nos surfactantes (SILVA *et al.*, 2005).

Grupos Funcionais	Fórmulas
Hidroxilas	-OH
Aminas	-NH ₂

Carboxilas	-COOH
Sulfônicos	-SO ₃ H
Sulfatos	-OSO ₃
Alcoxilados	-(OCH ₂ CH ₂) _n -OH

Os surfactantes sintéticos são substâncias químicas de grande importância econômica, pois são amplamente utilizados em produtos de limpeza e no setor industrial, sendo que o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) é o surfactante mais utilizado comercialmente quando comparado aos demais surfactantes (MUNGRAY *et al.*, 2009), pelo fato de ser um surfactante com excelente poder como detergente e pelo baixo custo (GARCÍA *et al.*, 2005)

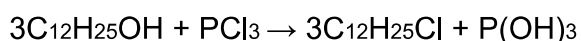
Inicialmente, os detergentes não eram compostos biodegradáveis e permaneciam durante muito tempo no meio ambiente. Os surfactantes utilizados eram de cadeia ramificada, produzidos a partir da sulfonação do propileno tetramérico e do benzeno, dificultando a ação microbiana. Além de possuírem problemas com a degradabilidade, estavam relacionados a grande geração de espumas nas superfícies aquáticas. Com o passar do tempo e com a pressão de ambientalistas e da legislação, os surfactantes passaram a conter uma fórmula estrutural com cadeia carbônica linear, uma estrutura mais fácil de ser biodegradada (COSTA *et al.*, 2007).

Os tensoativos utilizados nos produtos de limpeza podem ser divididos em dois grupos principais, de acordo com a natureza da porção hidrofílica (iônica ou não iônica). Sendo que os iônicos se dividem em catiônicos, aniônicos e anfóteros (MELO, 2013).

Os aniônicos têm como matéria-prima o petróleo e, em sua maioria, são produzidos a partir da reação da síntese de Friedel–Crafts. Numa primeira etapa, ocorre a produção do haleto, a partir de uma reação com um álcool (MEDEIROS *et al.*, 2009). O haleto, por sua vez (etapa 2), irá reagir com o anel benzênico, através da reação de substituição de aromáticos com a utilização de catalisadores, tais como ácido fluorídrico (HF) e cloreto de alumínio (AlCl₃), para a produção do dodecilbenzeno. O AlCl₃ tem sido mais usado com o intuito de aumentar a seletividade da reação, sem perder a atividade catalítica (PENTEADO *et al.*, 2006). O dodecilbenzeno (alquilbenzeno) obtido é então colocado em meio com ácido sulfúrico

fumegante (agente sulfonante), numa etapa 3 (MEDEIROS *et al.*, 2009). O ácido dodecilbenzeno sulfônico produzido, por ser um ácido muito forte, é então neutralizado com hidróxido de sódio gerando o produto final de interesse com propriedades surfactantes (detergentes), na etapa 4 do processo. Abaixo, são mostradas as etapas das reações, reagentes e produtos intermediários até a obtenção do produto final – alquilbenzeno sulfonato de sódio (MEDEIROS *et al.*, 2009).

Etapa 1:



Etapa 2:

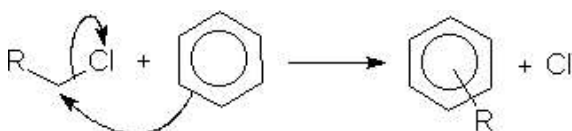


Figura 1: Reação de substituição de aromáticos.

Fonte: <http://alkimia.tripod.com/>, 2018.

Etapa 3:

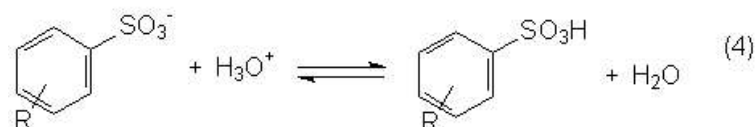
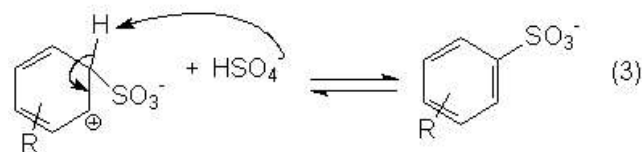
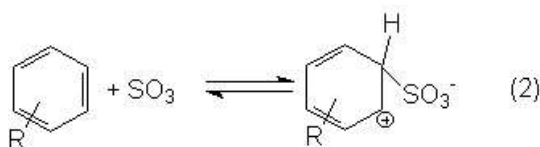
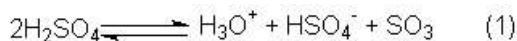


Figura 2: Formação do ácido benzenosulfônico.

Fonte: <http://alkimia.tripod.com/>, 2018.

Etapa 4:



Figura 3: Neutralização do ácido benzenosulfônico a alquilbenzeno sulfonato.

Fonte: <http://alkimia.tripod.com/>, 2018.

Outro tipo de surfactante e muito comercializado no país é NP, vindo da classe dos alquilfenóis etoxilados (APE) – que são produzidos a partir da reação de condensação dos alquilfenóis (AP) com óxido de etileno em presença de um catalisador básico. O NP geralmente é formado pela alquilação do fenol com uma mistura de isômeros do nonano (ou noneno, por exemplo) em presença de catalisador ácido, como mostrado na Figura 4 (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

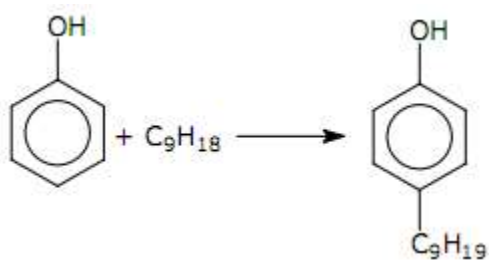


Figura 4: Reação de formação do nonilfenol a partir do noneno.

Fonte: <http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Alquilacao.pdf>, 2018.

Ainda que, os tensoativos figurem entre os mais versáteis produtos da indústria química, a escala daqueles derivados do petróleo deve diminuir devido a vários fatores como, aumento do preço do petróleo, não-biodegradável ou de degradação lenta e a entrada de outros derivados no mercado de fontes renováveis, como os ésteres de sacarose e sorbitol (GALGANO, 2012).

Em relação à toxicidade do LAS, tem sido relatado que mesmo a concentração de 0,2 mg/L pode ter efeito tóxico crônico sobre a biota aquática, influenciando negativamente a homeostase microbiana, já que podem causar a desnaturação de enzimas e o rompimento das membranas celulares, dificultando a excreção de metabólitos tóxicos (FILHO, 2008).

3.3. A Legislação - Água para Consumo Humano

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 microrganismos.

O artigo 16, capítulo IV (Padrão de potabilidade), portaria n° 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 N° 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).

3.4. Microrganismos

Araújo *et al. apud* Silva (2013) afirmam que os microrganismos 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 microrganismos, 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, 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).

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

A espécie do fungo *Penicillium crustosum* foi isolada do efluente de uma indústria têxtil do município de Divinópolis – MG.

Inicialmente, o microrganismo estava imerso em óleo mineral para que o crescimento fosse impossibilitado sem que houvesse perda da integridade celular.

Foi preparado o meio de cultura Batata dextrose ágar 39 g/L. 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, foi preparado uma placa de Petri para o fungo em análise. Pequenos pedaços de ágar contendo os fungos foram retirados dos recipientes de óleo mineral, e inseridos na placa preparada. Posteriormente foi incubada em estufa 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 de 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 5.

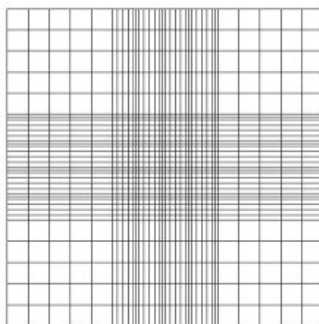


Figura 5: Representação da câmara de Neubauer utilizada para contagem dos esporos

Fonte: <http://www.splabor.com.br/blog/camara-de-contagem-neubauer/aprendendo-mais-saiba-como-realizar-a-limpeza-correta-de-sua-camara-de-contagem-camara-de-neubauer/>

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

4.4. Curva de Crescimento

A cinética de crescimento do fungo foi monitorada durante cinco dias de cultivo submerso em meio líquido denominado meio mínimo líquido (MML) conforme descrito por SILVA, 2013 (Tabela 2).

Cada ponto da cinética foi realizado em triplicata e foi utilizado 10mL de MML e uma quantidade média de 10^8 esporos. Foram utilizados filtros de papel previamente tarados e a quantidade de massa seca fúngica produzida foi retida por filtração à vácuo e em seguida foram secos em estufa até massa constante a uma temperatura de 40 °C.

Tabela 2 – Reagentes e suas respectivas quantidades na preparação do meio mínimo líquido (MML) (FONTE: SILVA, 2013).

Reagente	Concentração (g/L)
Glicose $C_6H_{12}O_6$	6,0
$MgSO_4$	1,1
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
KH_2PO_4	5,44
K_2HPO_4	6,98
Surfactante (LAS)	0,006
$CuSO_4$	0,01

4.5. Cultivo Submerso dos Fungos

Para avaliar as variáveis e condições de biodegradação do surfactante líquido, foi realizado um planejamento estatístico DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) fracionado 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios conforme apresentado na Tabela 3. A metodologia de superfície de resposta foi então utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas, concentração de surfactante líquido comercial para lavagem de roupas (g/L) como fonte de carbono e concentração de $(NH_4)_2SO_4$ (g/L) como fonte de nitrogênio e obter a composição do meio fermentativo. Foi preparada uma solução estoque de surfactante líquido na concentração de 1,8386 g/L.

Tabela 3 – Planejamento experimental variando as concentrações de surfactante líquido como fonte de carbono e sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.

Ensaio	Surfactante líquido (g/L)	Volume da solução estoque (mL)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)
1	-1 (0,0063)	0,34	-1 (1,6)
2	-1 (0, 0063)	0,34	+1 (4,4)
3	+1 (0,0177)	0,96	-1 (1,6)
4	+1 (0,0177)	0,96	+1 (4,4)
5	-1,41 (0,004)	0,21	0 (3,0)
6	+1,41 (0,020)	1,10	0 (3,0)
7	0 (0,012)	0,65	-1,41 (1,0)
8	0 (0,012)	0,65	+1,41 (5,0)
9*	0 (0,012)	0,65	0 (3,0)
10*	0 (0,012)	0,65	0 (3,0)
11*	0 (0,012)	0,65	0 (3,0)

Todos os reagentes e concentrações listados na Tabela 2 foram mantidos nos 11 ensaios, com exceção das concentrações de surfactante líquido e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que variaram conforme descrito na Tabela 3. Vale ressaltar que a glicose presente no meio mínimo é uma fonte de carbono imediata que será consumida pelo fungo que em seguida consumirá a fonte de carbono mais complexa que é o surfactante líquido lava roupas.

4.6. Análise MBAS

A análise de surfactantes totais, foi realizada de acordo com o método de azul de metileno, conhecido como método de MBAS (APHA, 1998)

Para a análise foram necessárias ampolas de decantação cônica de vidro volumétricos para análise, em que três análises eram feitas por vez. Nesta etapa foram utilizados 50 mL de meio, 12,5mL de azul de metileno, 5mL de clorofórmio (3x), e por último a solução de lavagem (tanto a solução de lavagem quanto o azul de metileno foram feitos de acordo com o protocolo). A quantidade de amostras para análise estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade de amostras para análise de MBAS.

Análise MBAS	(mL)
Amostra	50
Azul de metileno	12,5
Clorofórmio	5 (3x)
Lavagem	25

Antes da extração, uma hora antes de tirar as amostras do shaker, 12 filtros foram colocados para secar a 80°C, e depois de uma hora foram pesados e em seguida, depois de filtrado as doze amostras, elas foram colocadas na estufa junto com o filtro, e foram medidos os pHs das respectivas amostras.

Em seguida, foi feita a extração de acordo com a Tabela 4, no passo um é colocado nas ampolas de decantação cônica de vidro volumétricos 50mL da amostra, em seguida, a solução de azul de metileno, em seguida é colocado o clorofórmio, em seguida agitamos por trinta vezes, essa etapa 3 foi repetida por 3 vezes. Posteriormente lavamos a solução com a solução de lavagem, e em seguida mede-se a quantidade retirada medimos em uma proveta, e caso necessite avoluma-se até 15mL com a 10 solução de clorofórmio, desta solução, com uma pipeta retira-se 2mL, e em um outro recipiente completa-se com clorofórmio, e por fim, mede-se a absorbância através do espectrofotômetro, é importante salientar que o branco é o próprio clorofórmio. Caso a absorbância dê acima de 0,200 é necessário fazer diluições. Para a medição de absorbância a leitura é feita em 652nm.

Nessa análise foi avaliado as melhores condições de concentração de surfactante líquido e sulfato de amônio que favorecerão maior biodegradação de surfactante durante o cultivo realizada pelo fungo filamentoso *Penicillium crustosum*.

Após a medição das absorbâncias os dados foram analisados, e através do programa Statistica, foram geradas Figuras e Tabelas para demonstração dos resultados obtidos. Para análise de resultados foi feito uma curva de calibração. Essa curva tem principal importância para a determinação da concentração final do surfactante após os processos de cultivo e extração, isso porque ela fornece a equação linear para realização do cálculo.

A curva analítica para determinação de surfactantes totais foi obtida com as seguintes concentrações de LAS: 0,0 mg/L (considerado como branco); 0,4 mg/L; 0,8 mg/L; 1,2 mg/L; 1,6 mg/L e 2,0 mg/L. Todo procedimento para a realização das análises foram realizadas de acordo com o método de MBAS (APHA, 1998).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Reativação dos Fungos

Os fungos encontravam-se em óleo mineral, o qual conserva a integridade destes microrganismos 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 *Penicillium crustosum* havia esporulado (coloração verde), como mostrado na Figura 6.



Figura 6: Reativação do fungo *Penicillium crustosum* em Batata dextrose ágar.

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.



Figura 7: Esporos armazenados em solução salina.

5.3. Contagem dos esporos

Para o fungo *Penicillium crustosum* foram contados 35,55 esporos em 0,04mm². A câmara possuía profundidade equivalente a 0,1mm, logo seu volume é equivalente a 0,004mm³. 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:

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

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 do fungo. Os valores da massa seca de crescimento obtido para o microrganismos encontram-se na Tabela 5.

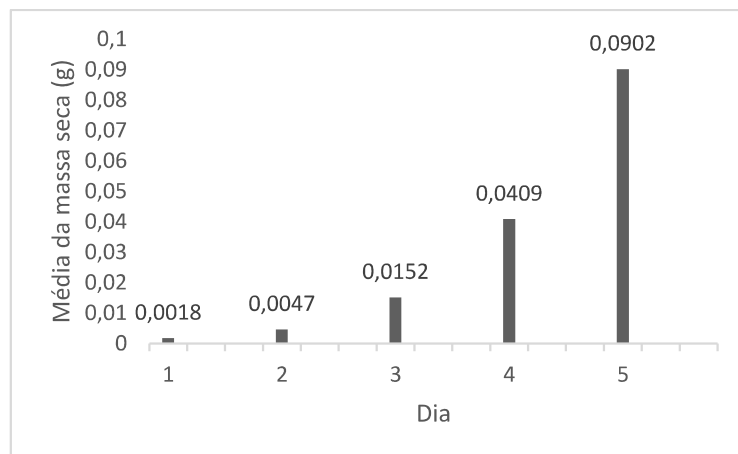


Figura 8: Curva de crescimento do fungo *Penicillium crustosum*.

Analisando a Figura 8, houve crescimento exponencial durante os cinco dias de crescimento, e percebe-se que o maior crescimento foi no quinto dia de incubação.

Não houve a fase estacionária e de declínio como esperado pela cinética microbiana, isso poderia ter sido observado se os fungos tivessem sido cultivados em período de tempo maior.

5.5. Curva Analítica do Método MBAS

A curva padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância (A) e os de concentração, e é fundamental para determinar a concentração final do surfactante após os processos de cultivo e extração, uma vez que ela fornece a equação linear para a realização do cálculo.

Na Figura 9 é mostrada a curva analítica que relaciona concentração de surfactante (g/L) e absorbância, a equação da reta e respectivo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,998$).

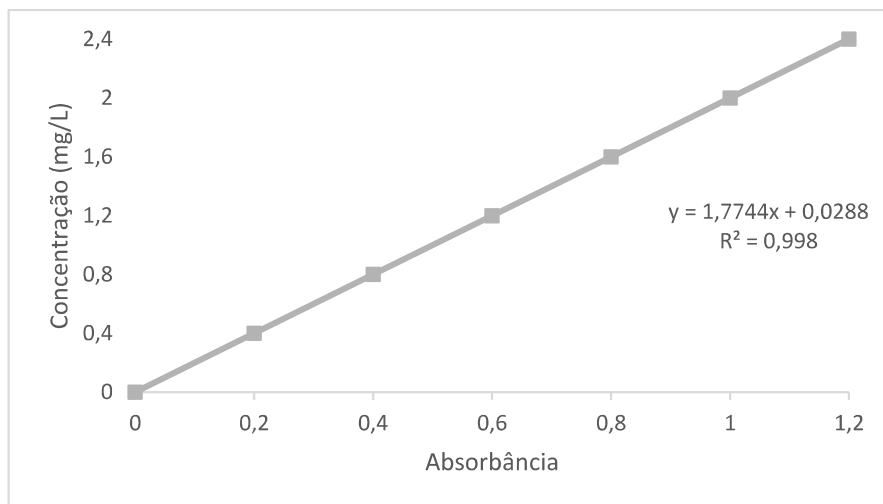


Figura 9: Curva de calibração do método MBAS aplicada na análise da biodegradação de surfactantes.

5.6. Cultivo Submerso dos Fungos

Na Tabela 6, são listados os resultados de pH, absorbância (A), massa seca (g) e remoção do surfactante no meio (%) após 5 dias de cultivo do fungo *Penicillium crustosum*, nas condições descritas no planejamento fatorial, conforme Tabela 3. Na Figura 10, são mostrados os 11 erlenmeyers com os cultivos dos fungos após 05 dias de incubação. Em algumas amostras os fungos obtiveram um maior desenvolvimento do que em outros. Isso pode ser devido a variação de surfactante líquido e sulfato de amônio, que foi adicionada em cada meio de acordo com o planejamento apresentado. Na amostra 12 não houve nenhum crescimento devido não ter sido inoculado o fungo, tendo sido este ensaio um controle abiótico.



Figura 10: Aspecto dos cultivos dos fungos após 5 dias de incubação do *P. crustosum*.

Tabela 6 - Resultados dos cultivos dos fungos após 05 dias de incubação à 25°C e 180rpm.

Experimento	pH	Absorbância (A)	Massa seca (g)	Remoção (%)
1	6,29	0,14	0,22	75,16
2	6,39	0,16	0,20	71,59
3	6,17	0,16	0,20	90,31
4	6,00	0,10	0,19	93,60
5	5,99	0,19	0,17	45,04
6	6,18	0,15	0,11	91,99
7	6,34	0,17	0,20	84,11
8	5,97	0,12	0,18	89,34
9	5,98	0,07	0,17	93,54
10	5,99	0,07	0,43	96,63
11	6,03	0,07	0,15	93,36
Controle	6,41	0,16	-	0

Conforme a Tabela 6, os percentuais de remoção do surfactante líquido variaram de 45,04–96,63% para o fungo. A biodegradação se destacou nos pontos centrais do planejamento (experimentos 9, 10 e 11) alcançando uma média de remoção 94.51% do meio.

Os valores de pH para as diferentes 12 amostras não sofreram grandes variações, no qual variam de 5,97-6,41, sendo o maior pH observado o da amostra controle, sem incubação do fungo. A variação do porcentual de biodegradação não está associada ao pH, no qual é possível observar que no menor porcentual de remoção (45,04%) e o maior (96,63%) possuem o mesmo pH no momento da análise.

Após a pesagem e a medição do pH de cada amostra fora feito a análise de MBAS de cada amostra. Na Figura 11 pode-se ser observar, como exemplo, a análise de três amostras.



Figura 11: Análise de MBAs.

As amostras que continham uma maior quantidade de fungos, apresentou-se uma coloração de azul mais fraca, indicando uma maior redução do surfactante aniônico.

Além da análise visual, foi realizado a análise estatística 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 (surfactante líquido e sulfato de amônio) e duas variáveis de saída (massa seca e redução) para construção dos gráficos e Tabelas e posteriormente realizar análise dos resultados.

É interessante avaliar o modelo matemático estatisticamente, para isto foi 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 7 e Tabela 8, para as variáveis de redução e de massa seca, respectivamente.

Tabela 7 - ANOVA para a variável resposta da redução no cultivo do *P. crustosum*.

	Soma dos	Grau de	Quadrados	F	R²
	Quadrados	Liberdade	Médios		
Regressão	2140,83	5	428,17		
Resíduo	171,85	5	34,37	12,46	0,92569
Total	2312,68	10			

O valor F_{Tabelado} é equivalente a 5,05 e o valor F_{calculado} é igual a 12,46, sendo maior do que o valor Tabelado. Assim pode-se afirmar que o modelo matemático é estatisticamente significativo e preditivo.

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

	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F	R ²
Regressão	0,01	5	0,002		
Resíduo	0,05	5	0,01	0,2	0,21673
Total	0,06	10			

A partir dos dados da Tabela ANOVA o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 0,2, entretanto, este é menor que o valor Tabelado, F_{Tabelado} é 5,05. Desta forma, os dados experimentais adquiridos relativos à porcentagem de remoção não compreendem um resultado estatisticamente significativo nas faixas de valores estudados

Além das Tabelas ANOVA apresentadas, o software utilizado fornece o diagrama de Pareto para as variáveis de entrada analisadas, os quais são apresentados na Figura 12.

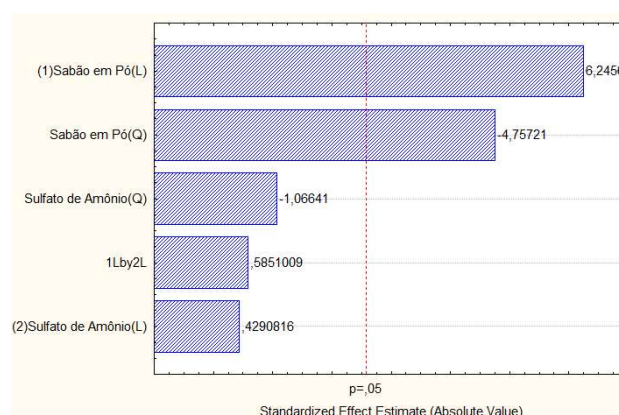


Figura 12: Diagrama de Pareto – remoção de surfactante total pelo fungo *P. crustosum*.

A concentração de surfactante líquido (tanto para parâmetro linear quanto para o quadrático) apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na produção de massa seca do fungo (Figura 12).

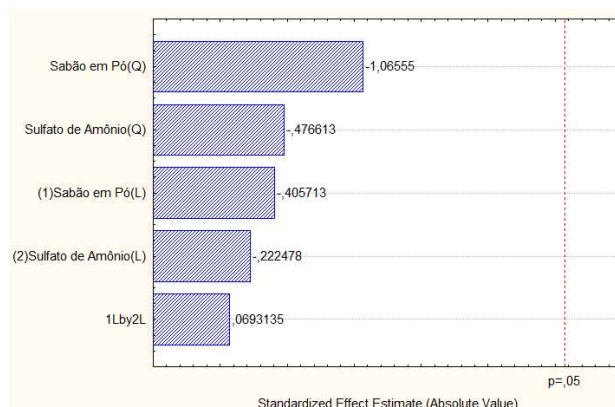


Figura 13: Diagrama de Pareto – variável massa seca do *P. crustosum*.

Como observado nos resultados, por meio do diagrama de Pareto (Figura 13) e da ANOVA (Tabela 8), avaliou-se o comportamento da porcentagem de remoção do meio em relação à concentração de surfactante e de sulfato de amônio o valor de F para a variação de massa seca não é significativo e preditivo. Os parâmetros não possuem valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) dentro das condições estudadas.

As superfícies de resposta e curvas de contorno em relação a variável de saída, redução, obtida após o cultivo do *P. crustosum* podem ser observadas na Figura 14.

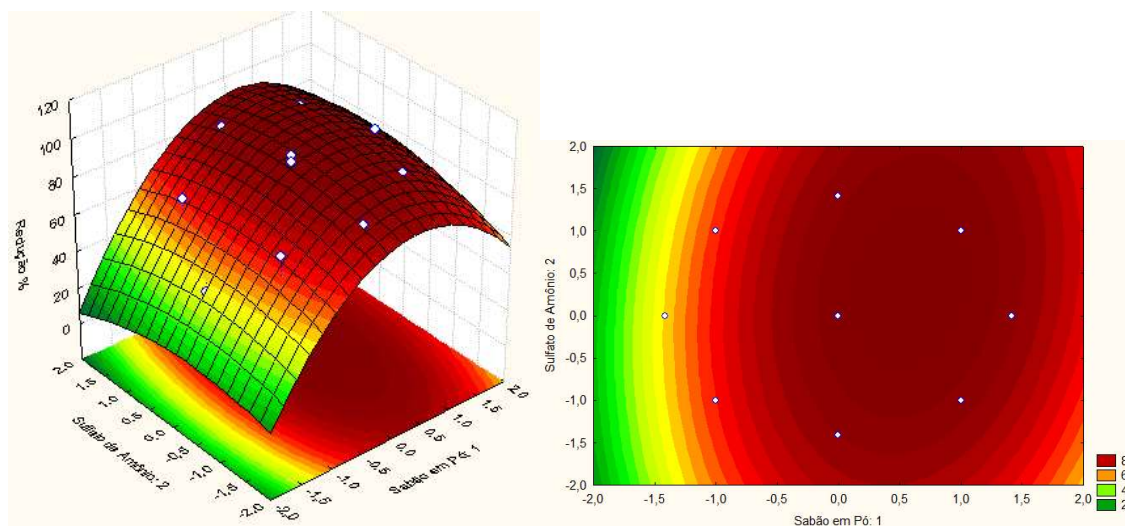


Figura 14: Superfície de resposta (esquerda) e curva de contorno (direita) para a redução (%) em função das concentrações de sulfato de amônio (g/L) e surfactante (mg/L) para o microrganismo *P. crustosum*.

Na Figura 14, pode-se inferir que as condições estudadas propiciaram bons resultados, principalmente em relação aos pontos centrais, sendo os ensaios onde se

obtiveram as maiores porcentagens de remoção do surfactante, estando em acordo com os valores mostrados pela Tabela 6.

A partir da análise da curva de contorno e da superfície de resposta (Figura 14), pode-se afirmar que melhores condições de biodegradação do surfactante são encontradas no ponto central do sulfato de amônio e no ponto central do surfactante (0.0), visto que, coincidindo com os pontos centrais do planejamento da Tabela 3.

É possível também demonstrar a equação matemática com as respectivas variáveis codificadas pela Tabela de estimativas de efeitos gerada pelo Statistica.

$$\% \text{ Remoção} = 94,51 - 12,94(X) - 11,73(X)^2 + 0,88945(Y) - 2,63(Y)^2 - 1,71(Y)$$

(Equação 1)

Onde X é a concentração do sabão lava roupas e Y é a concentração de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (fonte de nitrogênio). A confiabilidade da equação gerada pode ser comprovada obtendo os valores preditos pelo modelo matemático descrito anteriormente. Considerando o ensaio de número 1 do planejamento, tem-se:

$$\begin{aligned} \% \text{ Remoção} &= 94,51 - 12,94(-1) - 11,73(-1)^2 + 0,88945(-1) - 2,63(-1)^2 \\ &\quad - 1,71(-1) \end{aligned}$$

$$\% \text{ Remoção} = 93,40$$

Comparando o valor predito (93,40%) e o valor observado (75,16%) percebe-se que a variação entre os resultados (18,24%) é considerável. No entanto, ao observar a Figura 15, o valor predito e o valor observado estão muito próximos, contradizendo assim a porcentagem de remoção adquirido pela equação 1.

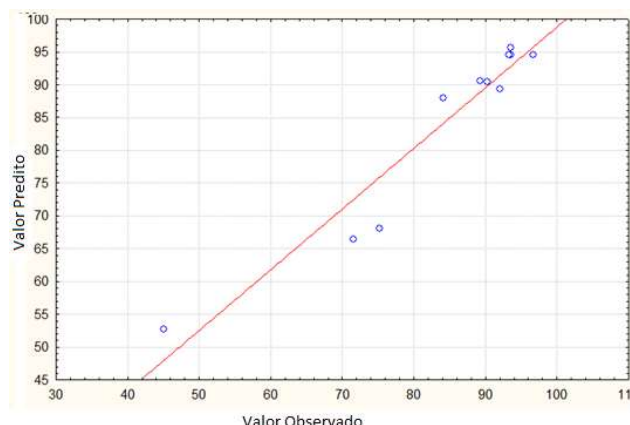


Figura 15: Valor predito versus valor observado para a variável redução do *P. crustosum*.
Gráfico gerado pelo software Statistica.

Quanto mais próximos os valores observados estiverem dos valores preditos (reta vermelha), mais preditivos são eles, mais confiável é o modelo. Logo, observando a Figura 15, vimos que o modelo apresentado confirma os dados estatísticos apresentados, que o modelo apresenta confiabilidade, sendo preditivo e significativo.

6. CONCLUSÃO

A variação na concentração de surfactante líquido para lavar roupas e sulfato de amônio na faixa e condições estabelecidas neste trabalho não influenciaram estatisticamente na produção de massa seca do fungo *Penicillium crustosum*.

Por outro lado, as concentrações de surfactante líquido para lavar roupas e sulfato de amônio influenciaram estatisticamente na remoção de surfactante total que variou 45% a 96%.

Desta maneira, o emprego de fungo filamentosos no tratamento de efluentes se mostra uma alternativa eficiente, se comparado com os métodos convencionais de tratamento biológico anaeróbico de esgoto doméstico, que removem no máximo 60% de surfactantes.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.

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

COSTA 2007

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.

DAUGHTON C.G. **Environmental stewardship and drugs as pollutants**. Lancet, v. 360. p. 1035-1036, 2002.

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.

FILHO, J.D.P. **Degradação de Alquilbenzeno linear Sulfonado em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada em carvão vegetal**, 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

GALGANO, P. D. **Líquidos iônicos tensoativos: correlação entre estrutura molecular e propriedades micelares de cloretos de 1,3-dialquilimidazólio**. Tese de doutorado. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 26 p. 2012.

GARCÍA, M.T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A.; SÁNCHEZ-LEAL, L. **Anaerobic digestion of linear alkylbenzenesulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite analysis**. Chemosphere, v. 60, p. 1636–1643, 2005.

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.

MEDEIROS

MELO, T. N. T. F. **Utilização dos tensoativos na indústria de petróleo.** Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Campus Angicos. UFRSA. Angicos, RN. 49 p. 2013.

MUNGRAY, A.K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 981–987, 2009.

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

OLIVEIRA, D.P.; SILVA, F.V.; RODRIGUES, J.L.; BATISTA, B.L. – **Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental.** Revista Brasileira de Toxicologia, v. 1, p. 1-12, 2007.

PENTEADO, J.C.P.; SEOUD, O.A.; CARVALHO, E.L.R.F - **Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica.** Química Nova, v. 29, No. 5, p. 1038-1046, 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.

SETTI A. A., LIMA J. E. F. W., CHAVES A. G. M., PEREIRA I. C. **Introdução ao Gerenciamento de recursos hídricos.** Disponível em [www.ana.gov.br]; 2001. Acessado em: 20 de março de 2011.

SILVA, A. L. C; PONZETTO, E.; ROSA, F. – **Tensoativos: conceitos gerais e suas aplicações em tintas**. Oxitenó. 2005.

SILVA, K. C. **Estudo do potencial de degradação do corante reativo preto intenso N por fungos filamentosos isolados de efluente industrial têxtil**. 100 p. Tese (Mestre em biotecnologia) – Universidade Federal de São João del Rei, 2013.

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.