



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Escola Politécnica & Escola de Química  
Programa de Engenharia Ambiental

Bianca Ferrazzo Napolini

EMPREGO DE VINHOTO COMO MEIO DE CULTURA PARA  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E ANÁLISE DO MEIO  
RESIDUAL PARA PRODUÇÃO DE METANO

Rio de Janeiro  
2015



UFRJ

Bianca Ferrazzo Naspolini

EMPREGO DE VINHOTO COMO MEIO DE CULTURA PARA  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E ANÁLISE DO MEIO  
RESIDUAL PARA PRODUÇÃO DE METANO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadores: Magali Christe Cammarota  
Walter Barreiro Cravo Junior

Rio de Janeiro  
2015



UFRJ

EMPREGO DE VINHOTO COMO MEIO DE CULTURA PARA  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E ANÁLISE DO MEIO  
RESIDUAL PARA PRODUÇÃO DE METANO

Bianca Ferrazzo Naspolini

Orientadores: Magali Christe Cammarota  
Walter Barreiro Cravo Junior

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovada pela Banca:

---

Prof. Magali Christe Cammarota, D.Sc., DEB/IQ/UFRJ (orientador)

---

Walter Barreiro Cravo Junior, D.Sc., DEB/IQ/UFRJ (orientador)

---

Márcia Teresa Soares Lutterbach, D.Sc., INT

---

Prof. Juacyara Carbonelli Campos, D.Sc., DPI/EQ/UFRJ

---

Prof. Alexandre Lioi Nascentes, D.Sc., UFRRJ

Rio de Janeiro  
2015

À minha grande amiga Gabrielly e ao meu companheiro  
Ricardo, pelo apoio e incentivo em todas as  
etapas desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por toda a luz enviada nos momentos de dificuldades.

Gostaria de agradecer à mãe e às irmãs, que sempre me apoiaram e me ajudaram diante das minhas maiores dificuldades. Agradeço ao meu companheiro Ricardo Summa, pelo imenso apoio e incentivo incondicionais nas horas em que mais precisei. MUITO OBRIGADA.

À minha orientadora Magali Cammarota, por me oferecer esta pesquisa tão interessante e desafiadora. Muito obrigada pela orientação, pela competência, pelas contribuições e por me conceder esta oportunidade de trabalho. Obrigada por ceder a infraestrutura de seu laboratório para a condução dos ensaios de biodegradabilidade e caracterização dos efluentes. Agradeço sua paciência diante das minhas limitações. MUITO OBRIGADA.

Agradeço imensamente à minha chefe Márcia por me conceder a oportunidade de trabalhar e estudar. Obrigada, ainda, por permitir que eu desenvolvesse uma pesquisa que conciliasse nosso trabalho e a minha formação. Muito obrigada de coração, por acreditar em mim!

Ao meu chefe e orientador Walter Cravo, pela orientação e pelos conselhos e exemplos diários de convivência e liderança. Muito obrigada pela ajuda na construção da ética profissional.

À equipe de trabalho (LABIO-INT) pela ajuda em diversas etapas desta pesquisa. Agradeço à Renata e Thais pela ajuda nas etapas de cultivo; Viviane pelo fornecimento de material, sempre que necessário; Aos colegas da biologia molecular (Diogo, Yuri, Luiz André e Hazel), muito obrigada por gerarem dados tão maravilhosos, e pela ajuda na interpretação de tamanha serventia; Agradeço ao Vitor e a Miriam pela desinfecção de toda a vidraria utilizada em todas as etapas da minha pesquisa; Agradeço à Bruna, Sylviane e Luiza pelas conversas e todo apoio. Aos demais colegas, Ana Lúcia, Claudia e Fabíola muito obrigada pelo apoio e pela convivência diária!

À Profa. Denise Maria Guimarães Freire do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) do Instituto de Química/UFRJ, por ceder infraestrutura de seu laboratório para a produção do biossurfactante.

À Antonio Carlos Machado, do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) do Instituto de Química/UFRJ, pela condução das fermentações para produção do biossurfactante, pela ajuda e troca de informações. Muito obrigada!

À minha amiga Gabrielly pelo grande apoio em todas as etapas desta pesquisa.

À minha amiga Cintia pelo apoio e pela ajuda na análise de resultados.

À equipe do laboratório LTA, pelo auxílio nas análises dos efluentes e leitura das seringas.

À Suzana Moraes, pelos ensinamentos no laboratório e apoio durante esta pesquisa.

À minha psicóloga Beatriz, pelo condicionamento, apoio e imensa ajuda na superação de todos os obstáculos ultrapassados durante as etapas desta pesquisa.

*“ You need chaos  
In your soul  
To give birth to  
A dancing star.”*

## RESUMO

NASPOLINI, Bianca Ferrazzo. **Emprego de vinhoto como meio de cultura para produção de biossurfactante e análise do meio residual para produção de metano.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Na produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar (bioetanol de primeira geração – 1G), são geradas grandes quantidades de vinhoto, um resíduo com elevado potencial poluidor que necessita de tratamento e disposição adequados. Como este apresenta alta concentração de matéria orgânica, que pode ser utilizada como matéria-prima de processos biotecnológicos, propõe-se neste trabalho a utilização do vinhoto 1G para produção de biossurfactantes (ramnolipídeos) e avaliação de seu potencial como inibidor da formação de biofilmes, em etapa anterior ao tratamento biológico anaeróbio para produção de metano. Este aproveitamento do vinhoto pode reduzir os custos de produção dos biossurfactantes a níveis competitivos com os similares (obtidos por rotas petroquímicas), gerar energia na forma de metano, e ao mesmo tempo reduzir os impactos ambientais relacionados ao descarte. O vinhoto (1G) apresentava pH ácido (4,1), elevadas concentrações de matéria orgânica biodegradável (DQO 77 g/L e DBO 58 g/L) e sulfato (5,8 g/L). O vinhoto foi utilizado para composição de meios de fermentação com distintas fontes de nitrogênio, com o objetivo de produzir o biossurfactante (BS) do tipo ramnolipídeo por fermentação submersa da cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA1. A utilização do vinhoto como meio de cultivo para produção de ramnolipídeo se mostrou viável em comparação ao meio de cultivo convencional. O BS separado dos meios residuais por precipitação ácida e centrifugação apresentou concentração de ramnolipídeo de 2 g/L, tensão superficial de 26,5 mN/m e concentração micelar crítica de 80,3 mg/L. Nos ensaios de avaliação de seu potencial de inibição do crescimento planctônico e séssil (com corpos de prova de aço API-X60) de bactérias aeróbias totais, ferrobactérias, bactérias anaeróbias totais e bactérias redutoras de sulfato (BRS) contidas em água de produção, verificou-se a redução das populações microbianas com a aplicação deste BS, especialmente das BRS. Análises de DGGE das amostras do grupo das BRS e análises de microscopia confocal comprovaram os resultados observados com os corpos de prova que receberam a dosagem do BS (43,63 µg/mL). Os meios fermentados foram empregados em ensaios de biodegradabilidade anaeróbia, em condições mesofílicas, utilizando o vinhoto bruto como controle. O meio que se mostrou mais adequado foi o que não requer suplementação de nutrientes e apresenta menor tempo de fermentação, apresentando boa remoção de DQO (63,2%) e PEM de 97,6 mL CH<sub>4</sub>/g DQO removida (a 30°C). Conclui-se que a produção de BS não inibiu a digestão anaeróbia e que ainda são necessários estudos para otimização do processo integrado de produção de BS e digestão anaeróbia do vinhoto, como o aumento da remoção de DQO e produção de metano na digestão anaeróbia e a determinação da concentração inibitória mínima para os BS produzidos.

Palavras-chave: Vinhoto, biossurfactante, biofilmes, bactérias redutoras de sulfato, tratamento anaeróbio, metano.

## ABSTRACT

NASPOLINI, Bianca Ferrazzo. **Application of vinasses as culture media for biosurfactant production and wastewater analyses for methane production.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertation (Master's Degree application) – Environmental Engineering Program, Politechnic School of Engineering e Chemistry School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Bioethanol production from sugarcane (first generation bioethanol - 1G), generates large amounts of vinasse, that contains a high pollution potential and has to be well managed for an adequate final disposal. Due to this high concentration of organic matter it can be used as raw material for biotechnological processes, as the application of vinasse 1G to produce biosurfactants (rhamnolipids) and evaluation of its potential to inhibit biofilm formation, prior to the anaerobic biological treatment step to produce methane. This application can reduce production costs at competitive levels with commercial biosurfactants (obtained by petrochemical routes), generate energy (methane), while reducing environmental impacts related to final disposal. The vinasse (1G) had an acidic pH (4.1), high concentrations of biodegradable organic matter (COD 77 g / l and BOD 58 g / l) and sulphate (5.8 g / L). The vinasse was used for the composition of fermentation media with different nitrogen sources in order to produce this biosurfactant (BS), of the type rhamnolipids, by submerged fermentation of the strain *Pseudomonas aeruginosa* PA1. The use of vinasse as a culture media for producing rhamnolipids proved feasible in comparison with conventional cultivation media. The BS was separated from residual media by acid precipitation and the centrifugation process showed rhamnolipids concentration of 2 g / L, surface tension of 26.5 mN / m and critical micelle concentration of 80.3 mg / L. In the assessment of potential growth inhibition of planktonic and sessile (with specimens of API-X60 steel) of total aerobic bacteria, iron bacteria, total anaerobic bacteria, sulfate-reducing bacteria (SRB) within water production, showed diminution of microbial populations after the application of BS, especially the SRB. DGGE analyzes and confocal microscopy of SRB samples confirmed the results obtained with the concentration of BS (43.63 mg / mL). Residual medias were employed in anaerobic biodegradability tests, in mesophilic conditions, using raw vinasse as control. Based on these results, the most suited medium the one that does not require supplementation of nutrients and has a lower fermentation time, with good COD removal (63.2%) and MEP 97.6 mL CH<sub>4</sub> / g COD removed (30 ° C). In conclusion, the BS production did not inhibit anaerobic digestion and further studies are needed to optimize the integrated production process of BS and anaerobic digestion of vinasse, such as increased COD removal and improvements methane production in anaerobic digestion and define the minimum inhibitory concentration for the BS application.

Keywords: Vinasse, biosurfactants, biofilms, sulfate-reducing bacteria, anaerobic treatment, methane.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Diagrama do processo integrado da produção de etanol 1G e eletricidade.....	25
Figura 2.2 – Esquema da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa e descrição das etapas e populações microbianas envolvidas.....	30
Figura 2.3 – Descrições dos tipos de testes de biodegradabilidade anaeróbia.....	32
Figura 2.4 – Desenvolvimento de um biofilme.....	35
Figura 2.5 – Diagrama esquemático de processos de transformação e transporte na corrosão induzida pelas BRS na presença de biofilmes aeróbios/anaeróbios na superfície do metal.....	38
Figura 2.6 – Estrutura do ramnolípido do tipo 1 de <i>Pseudomonasaeruginosa</i> .....	43
Figura 3.1 – Fluxograma das etapas executadas durante o trabalho.....	47
Figura 3.2 – Experimento de digestão anaeróbia.....	53
Figura 3.3 – Fluxograma da aplicação dos biossurfactantes produzidos em testes de crescimento e formação de biofilmes, análises moleculares e de microscopia.....	54
Figura 3.4 – Frascos para micro-organismos aeróbios em condição Controle e com aplicação de BS Meio de Cultura.....	58
Figura 3.5 – Frascos para micro-organismos anaeróbios em condição Controle e com aplicação de BS Meio de Cultura.....	58
Figura 4.1 – Variação de pH dos meios residuais da fermentação submersa após precipitação do biossurfactante e ajuste do pH.....	71
Figura 4.2 – Variação de SSV dos meios residuais da fermentação submersa.....	73
Figura 4.3 – Variação de DBO e relação DBO/DQO dos meios residuais da fermentação submersa.....	74
Figura 4.4 – Variação de DQO total e solúvel dos meios residuais da fermentação submersa.....	76
Figura 4.5 – Variação de N total e P total dos meios residuais da fermentação submersa.....	77
Figura 4.6 – Variação de sulfato e cloreto nos meios residuais da fermentação submersa.....	78
Figura 4.7 – Variação de ácidos voláteis totais (AVT) e alcalinidade (Alc) nos meios residuais da fermentação submersa.....	79

Figura 4.8 – Evolução da produção de biogás (a 30°C) na digestão anaeróbia de vinhoto bruto e nos meios residuais da fermentação submersa.....	80
Figura 4.9 – Efeito do BS do Vinhoto no crescimento e formação de células planctônicas.....	85
Figura 4.10 – Efeito do BS do Vinhoto no crescimento e formação de células sésseis e formação de biofilme.....	86
Figura 4.11 – Efeito do BS Meio de Cultura no crescimento e formação de células planctônicas.....	87
Figura 4.12 – Efeito do BS Meio de Cultura no crescimento e formação de células sésseis e formação de biofilme.....	88
Figura 4.13 – Dendograma das amostras de água de produção, mediante aplicação do BS do Vinhoto.....	89
Figura 4.14 – Imagem do corpo de prova do aço API-X60 na condição controle, sem adição de BS Meio de Cultura. Aumento em objetiva de 10x.....	91
Figura 4.15 – Imagem do corpo de prova do aço API-X60 na condição controle,sem adição de BS Meio de Cultura (Aumento de 40x). As cetaz vermelhs indicam a presença de bactérias no corpo de prova.....	91
Figura 4.16 – Imagem planialtimétrica do biofilme formado pelo consórcio de BRS no corpo de prova do aço API-X60 na condição Controle.....	92
Figura 4.17 – Imagem do corpo de prova do aço API-X60 na condição que recebeu a dosagem de BS Meio de Cultura (Aumento de 10x).....	93
Figura 4.18 – Imagem do biofilme formado pelo consórcio de BRS no corpo de prova do aço API-X60 na condição Controle.....	93



## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	44
Quadro 2.2 – Exemplos da utilização de resíduos da agroindústria na produção de biossurfactantes.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Caracterizações dos vinhotos obtidos a partir de distintas fontes de biomassa..	26
Tabela 2.2 – Especificação do Aço API-5L X60 conforme especificação do <i>American Petroleum Institute</i> (API).....	33
Tabela 2.3 – Propriedades e concentrações usuais de biocidas utilizados em sistemas de águas industriais.....	40
Tabela 3.1 – Métodos empregados na caracterização do vinhoto.....	48
Tabela 3.2 – Meios fermentativos à base de vinhoto com diferentes suplementações.....	51
Tabela 3.3 – Condições dos frascos para os experimentos de crescimento e formação de biofilmes.....	55
Tabela 3.4 – Composição da reação recomendada utilizando a Polimerase TopTaq DNA e a solução – Q.....	61
Tabela 3.5 – Protocolo de Ciclagem do termociclador para reação de PCR.....	61
Tabela 3.6 – Sequências dos <i>primers</i> e do grampo GC utilizados na quantificação microbiana das BRS através da técnica de PCR.....	62
Tabela 4.1 –Caracterização físico-química do vinhoto.....	64
Tabela 4.2 –Caracterização físico-química dos meios residuais da fermentação para produção de biossurfactante.....	70
Tabela 4.3 –Resumo dos resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.....	81
Tabela 4.4 –Médias e desvios padrão dos parâmetros mais relevantes dos quatro ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.....	83
Tabela 4.5 –Caracterização físico-química dos biossurfactantes produzidos na fermentação submersa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1.....	84
Tabela 4.6 – Quantificação da população de bactérias aeróbias e anaeróbias (culturas mistas) existentes na amostra de água de produção da plataforma em operação.....	84

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Alc	Alcalinidade
API	<i>American Petroleum Institute</i>
AVT	Ácidos orgânicos voláteis
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
BS	Biossurfactante
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CMC	Concentração micelar crítica
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
CONAB	Companhia Nacional do Abastecimento
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COT	CarbonoOrgânico Total
COV	Carga orgânica volumétrica
DA	Digestão anaeróbia
DBO	DemandaBioquímica de Oxigênio
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPS	Substâncias exopolissacarídeas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
LABIM	Laboratório de Biotecnologia Microbiana
LABIO-INT-MCTI	Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação do Instituto Nacional de Tecnologia
NMP	Número Mais Provável
NMP/cm <sup>2</sup>	Número Mais Provável por centímetro quadrado
NMP/mL	Número Mais Provável por mililitro
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEM	Produção específica de metano
pH	Potencial hidrogeniônico
PROALCOOL	Programa Nacional do Álcool
RNA	Ácido ribonucléico
SST	Sólidos suspensos totais

UASB

Upflow anaerobic sludge blanket (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Introdução.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Vinhoto: características, volumes produzidos no Brasil, tratamento e disposição final.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Digestão anaeróbia.....</b>	<b>29</b>
2.2.1. Etapas da Digestão anaeróbia.....	29
2.2.2. Condições ambientais para o processo de DA.....	31
2.2.3. Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia.....	32
<b>2.3. O crescimento e a formação de biofilmes em metais e a utilização de biossurfactantes.....</b>	<b>33</b>
2.3.1. Especificações do aço API 5L X60.....	33
2.3.2. Biofilmes.....	34
2.3.3. Microorganismos causadores da biocorrosão.....	36
2.3.4. Corrosão Microbiologicamente Induzida (Biocorrosão).....	38
2.3.4.1. Uso dos biocidas na prevenção e controle da biocorrosão.....	39
2.3.5. Surfactantes.....	41
2.3.5.1. Surfactantes químicos.....	41
2.3.5.2. Biossurfactantes.....	41
<b>2.4. Aproveitamento dos resíduos da agroindústria.....</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Origem e caracterização do vinhoto.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Etapa 1 – Avaliação do vinhoto para composição de meio de fermentação para produção de biossurfactante.....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Micro-organismos e condições de cultivo de pré-inóculo e inóculo.....	49
3.2.2. Produção de biossurfactante a partir de meio de cultivo convencional.....	50
3.2.3. Produção de biossurfactante utilizando o vinhoto como matéria-prima.....	50
<b>3.3. Etapa 2 – Avaliação do meio fermentado residual para produção de metano.....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Origem e caracterização dos meios fermentados e do lodo.....	51
3.3.2. Condução dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.....	52
<b>3.4. Etapa 3 – Avaliação do biossurfactante no crescimento e formação de biofilme.....</b>	<b>53</b>
3.4.1. Caracterização dos biossurfactantes e da água de produção utilizada como inóculo.....	54
3.4.1.1. Tensão superficial e concentração micelar crítica.....	54

3.4.1.2.	Caracterização microbiológica da amostra de água de produção utilizada como inóculo.....	55
3.4.2.	Efeito da aplicação dos biossurfactantes sobre micro-organismos planctônicos e sésseis.....	55
3.4.3.	Análises moleculares para caracterização da diversidade microbiana.....	59
3.4.3.1.	Preservação das amostras e extração de DNA.....	59
3.4.3.2.	Amplificação por PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> ).....	60
3.4.3.3.	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).....	62
3.4.3.4.	Análises do biofilme por microscopia confocal em corpos de prova do aço API X-60.....	63
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>4.1.</b>	<b>Origem e caracterização do vinhoto.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.</b>	<b>Etapa 1 – Avaliação do vinhoto para composição de meio de fermentação para produção de biossurfactante.....</b>	<b>68</b>
<b>4.3.</b>	<b>Etapa 2 – Avaliação dos meios fermentados residuais para produção de metano.....</b>	<b>69</b>
<b>4.4.</b>	<b>Etapa 3 – Ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia.....</b>	<b>79</b>
<b>4.5.</b>	<b>Etapa 4 - Avaliação dos biossurfactantes produzidos no crescimento e formação de biofilmes.....</b>	<b>83</b>
4.5.1.	Caracterização dos biossurfactantes produzidos e da água de produção utilizada como inoculo.....	83
4.5.2.	Efeito da aplicação de biossurfactantes sobre micro-organismos planctônicos e sésseis.....	84
4.5.2.1.	Avaliação do efeito do BS do Vinhoto no crescimento e formação de biofilmes.....	85
4.5.2.2.	Efeito do BS Meio de Cultura no crescimento e formação de biofilmes.....	87
4.5.3.	Análises moleculares para caracterização da diversidade microbiana.....	89
4.5.4.	Microscopia confocal dos biofilmes formados por culturas mistas de BRS em corpos de prova do aço API-X60.....	90
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>5.1.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>94</b>
<b>5.2.</b>	<b>Sugestões.....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

---

### 1.1 INTRODUÇÃO

A crise do petróleo em 1970 incentivou a criação de programas, no Brasil e em muitos outros países, que incentivam o uso de fontes alternativas de energia. Em 1975, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) que teve como meta principal a redução da importação de petróleo e incentivou a produção de etanol através da fixação de preços, mistura obrigatória do álcool com gasolina, isenção de impostos, e políticas de ação e financiamento.

Em 2003, iniciou-se uma nova era no setor automobilístico e de consumo de etanol, com a introdução de uma dinâmica distinta, com os veículos *flex-fuel* (que podem ser abastecidos com gasolina, etanol hidratado e mistura de ambos) e *tetra-fuel* (que podem ser abastecidos com etanol hidratado, gasolina pura, gasolina aditivada e gás natural) (RICO *et al.*, 2010). O aumento da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e da frota de veículos *flex-fuel* no mercado automobilístico brasileiro reflete o interesse no uso do etanol como biocombustível (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Em março de 2015, tornou-se obrigatória a adição de etanol anidro combustível à gasolina, nos seguintes percentuais: 27% na gasolina comum e 25% na gasolina *premium* (BRASIL, 2015). Diante destes fatos históricos, mostra-se crescente a demanda de combustíveis renováveis como o etanol.

Na produção de etanol, são geradas grandes quantidades de vinhoto – um subproduto da etapa de destilação – conhecido também como vinhaça e restilo. A composição química deste resíduo é variável e depende principalmente da matéria-prima adotada para a produção de etanol (GAMBOA *et al.*, 2010). As principais características encontradas por Beltran *et al.*, (2005), Jimenez *et al.*, (2006) e Pant e Adholeya (2007) foram: altas concentrações de sólidos solúveis e matéria orgânica (DQO entre 50-150 g/L), pH ácido (3,5- 5,0) e cor elevada.

Diante da necessidade de tratamento e disposição adequada do vinhoto, sua utilização como matéria prima para produção de biossurfactantes (ramnolipídeos) em etapa anterior ao tratamento e descarte, mostra-se como uma alternativa tecnológica interessante, pois permite a redução da concentração de matéria orgânica ao mesmo tempo a obtenção de um produto de alto valor agregado.

Em geral, resíduos agro-industriais que contenham elevados níveis de

carboidratos (como o vinhoto) podem se apresentar como fonte de carbono para produção de biossurfactantes. O estabelecimento de um processo biotecnológico a partir do uso de substratos alternativos apresenta alguns desafios, tais como: dificuldade em encontrar a composição adequada de nutrientes que viabilize a síntese do produto de interesse, padronização do resíduo (devido às variações naturais de composição), bem como os custos inerentes ao processo. Entretanto, este aproveitamento pode reduzir os custos de produção das vias biotecnológicas a níveis competitivos em relação aos biossurfactantes similares (obtidos por rotas petroquímicas) e ao mesmo tempo reduzir os impactos ambientais relacionados ao descarte (NITSCHKE e PASTORE, 2003).

De acordo com Banat *et al.* (2000), os biossurfactantes possuem um vasto potencial de aplicação industrial, e são comumente empregados na biorremediação de solos, na descontaminação marinha, na limpeza de tanques de armazenamento de combustíveis, no aumento de produtividade na exploração de petróleo, no setor farmacêutico e de cosméticos como substância humectante, na agro-indústria como fungicida, e na indústria alimentícia como emulsificante, dentre outros. Araújo (2013) estudou a viabilidade da aplicação de biossurfactante como agente condicionante, com interesse na inibição de biofilmes em superfícies metálicas.

Diante da necessidade de adotar tecnologias disponíveis que apresentem vantagens ambientais e energéticas, a digestão anaeróbia se apresenta como uma tecnologia interessante a ser aplicada ao resíduo da produção de biossurfactantes. Afinal, o efluente residual deste processo ainda apresenta teores elevados de carbono e nutrientes, que precisam ser reduzidos antes de serem dispostos no meio ambiente. A digestão anaeróbia é um dos sistemas mais empregados para o tratamento de vinhoto, porque apresenta baixo custo de operação (não há necessidade de aeradores), produção de lodo reduzida e obtenção de metano, que possui elevado calor de combustão (LAVOV *et al.*, 2001).

Para Cruz (1991), uma opção para estimular a comercialização do biogás é a adoção do subproduto da biodigestão combinado às utilidades elétricas, como ocorre com o bagaço de cana-de-açúcar. No estado de São Paulo foi aprovado o decreto 58.659/2012 que instituiu o Programa Paulista de Biogás, que tem como objetivo principal incentivar e ampliar a participação de energias renováveis na matriz energética do Estado de São Paulo, através das externalidades positivas da geração de gases combustíveis provenientes de biomassa.

Dentre os maiores obstáculos para o uso do biogás no Brasil, apontados por Salomon e Lora (2009), são elencados: elevados custos de investimento, financiamentos insuficientes, pouca pesquisa na área de digestão anaeróbia, uma falha existente no Programa Nacional de Biogás (financiamento específico, incentivos governamentais, dificuldades de comercialização de créditos de carbono para plantas industriais de pequeno porte, dentre outros).

Com o objetivo de aperfeiçoar o potencial energético e a sustentabilidade da produção de bioetanol, os efluentes gerados na produção de etanol não devem ser considerados como resíduos do processo. Por conseguinte, a valorização destas correntes deve ser consolidada de modo que elas se tornem matérias-primas para outros processos. Este conceito é agora inerente ao domínio do tratamento biológico de efluentes industriais, em que os avanços tecnológicos e científicos obtidos nos últimos anos têm impulsionado a criação de novas linhas de pesquisa que visam não só a adequação dos resíduos gerados ao meio ambiente, mas também a recuperação de energia e produtos a partir destes resíduos. Através desta abordagem, a água residual é considerada como matéria-prima para o processo biotecnológico que pode gerar energia e produtos com elevado valor agregado e cumpre, ao mesmo tempo, a função primária de controlar a poluição ambiental (MORAES *et al.*, 2015).

## 1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a utilização de vinhoto como meio de cultivo para a produção de biossurfactante (ramnolipídeo), por fermentação submersa da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* PA1, e o tratamento biológico anaeróbio do meio residual da fermentação com a finalidade de geração de metano.

Para tanto, delinearão-se os seguintes objetivos específicos:

- Realizar a caracterização físico-química do vinhoto bruto empregado no processo de fermentação para produção do biossurfactante;
- Determinar a composição de meio de fermentação adequada, à base de vinhoto, para a produção de biossurfactante, empregando cepa bacteriana previamente selecionada;
- Obter e caracterizar o biossurfactante produzido na fermentação do vinhoto;

- Obter a caracterização físico-química do meio fermentado após separação do biossurfactante para o processo de digestão anaeróbia;
- Obter e comparar dados de remoção de DQO e produção de metano na digestão anaeróbia do vinhoto bruto e do vinhoto após fermentação;
- Avaliar o efeito dos BS (do Vinhoto e Meio de Cultura), no crescimento e formação de biofilmes em corpos de prova de aço API X60;
- Avaliar a diversidade da comunidade microbiana planctônica e sésil na presença e ausência do biossurfactante (Meio de Cultura) para o grupo das BRS.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 VINHOTO: CARACTERÍSTICAS, VOLUMES PRODUZIDOS NO BRASIL, TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO FINAL

No levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), em abril de 2015, referente à safra de cana-de-açúcar 2015/2016 e a produção de etanol, verifica-se que a produção de etanol total está estimada em 29,2 bilhões de litros para a safra 2015/16. Serão produzidos 12,73 bilhões de litros de etanol anidro, utilizado na mistura com a gasolina e 16,47 bilhões de litros para o etanol hidratado, utilizado nos veículos *flex fuel* (CONAB, 2015).

Nas usinas brasileiras, estima-se que para cada litro de etanol produzido são gerados em média de 10 a 15 litros de vinhoto (CAVALLET *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 1992). Se for considerada toda a projeção da safra 2015/2016 de etanol estimado pela CONAB, a produção média de vinhoto será de aproximadamente 372,6 bilhões de litros.

O vinhoto, também conhecido como vinhaça, é um subproduto gerado na etapa de destilação do etanol, subsequente à etapa de fermentação de carboidratos que podem ser obtidos a partir de distintas fontes de materiais sacaríneos (cana-de-açúcar e beterraba), amiláceos (milho, trigo, arroz, mandioca, aveia, etc) ou lignocelulósicos (bagaço de cana, palha, madeira, dentre outros) (WILKIE *et al.*, 2000).

Bonomi *et al.* (2011) apresentam um diagrama das sucessivas etapas que compõem o processo de produção de etanol 1G e eletricidade. A geração do vinhoto está ilustrada na Figura 2.1.

Em geral, o subproduto vinhoto apresenta cor escura e é composto basicamente de água (93%), sólidos orgânicos e minerais (7%). Contém elevados teores de matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos e cátions como K, Ca e Mg, e baixas concentrações de N e P (LAIME *et al.*, 2011).

As composições dos vinhotos gerados a partir de distintas fontes de biomassa foram abordadas na patente por Cammarota *et al.* (2012), e as caracterizações são apresentadas na Tabela 2.1.

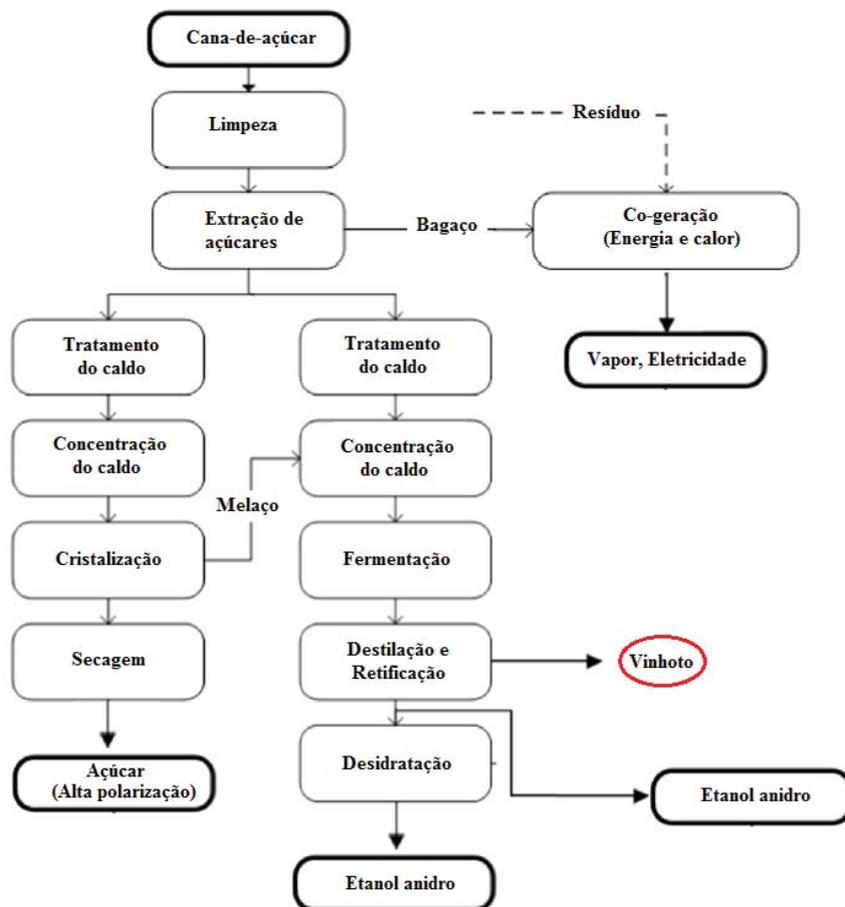


Figura 2.1: Diagrama do processo integrado de produção de etanol 1G e eletricidade.  
Fonte: BONOMI *et al.* (2011).

De acordo com Wilkie *et al.* (2000), as características do vinhoto e seu potencial poluidor (expresso em DQO pode alcançar valores superiores a 100 g/L) estão diretamente relacionados com a matéria-prima adotada para produção de etanol. E cada processo e operação unitária, desde o pré-tratamento, métodos e modo de condução da fermentação e destilação, têm impactos significativos sobre a qualidade e a quantidade de vinhoto gerado. De acordo com os autores, a concentração de açúcares no melão de cana, através da cristalização e evaporação do caldo, aumenta a concentração de açúcares não fermentados que permanecem no vinhoto após a fermentação.

Com relação ao pH do vinhoto, observa-se que os valores variam entre 4 e 5. O artigo 16 da resolução CONAMA n° 430 (2011) dispõe sobre os padrões para lançamento de efluentes em corpos hídricos, e salienta que o pH do efluente a ser lançado deve estar entre 5 e 9 e a temperatura inferior a 40°C. No caso de disposição em solo, a norma da CETESB P4.231 (2005) preconiza o ajuste de pH do vinhoto para valores próximos a 6.

Tabela 2.1: Caracterizações dos vinhotos obtidos a partir de distintas fontes de biomassa.  
Fonte: CAMMAROTA *et al.* (2012).

Parâmetros	Matéria-prima utilizada na fermentação			
	Melaço (1G)	Cana-de- açúcar (1G)	Misto (Melaço + Cana-de- açúcar) (1G)	Lignocelulose (vinhoto 2G)
pH	4,2-5,0	3,7-4,6	4,4-4,6	4,0-4,9
Temperatura (°C)	80-100	80-100	80-100	--
DBO <sub>5</sub> (g O <sub>2</sub> /L)	25	6-16,5	19,8	31,5-87,7
DQO (g O <sub>2</sub> /L)	65	15-33	45	75,6-109,7
Relação DBO <sub>5</sub> /DQO	0,39	0,45	0,44	0,39-0,80
Sólidos Totais (mg/L)	81.500	23.700	52.700	467-5805
Sólidos Voláteis (mg/L)	60.000	20.000	40.000	454-5715
Sólidos Fixos (mg/L)	21.500	3.700	12.700	13-707
Nitrogênio (mg N/L)	450-1610	150-700	480-710	205-462
Fósforo (mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /L)	100-290	10-210	9-200	100,5
Potássio (mg K <sub>2</sub> O/L)	3.740-7.830	1.200-2.100	3.340-4.600	40-88
Cálcio (mg P <sub>2</sub> O/L)	450-5.180	130-1.540	1.330-4.570	8,0-12
Magnésio (mg MgO/L)	420-1.520	200-490	580-700	16-24
Sulfato (mg SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> /L)	6.400	600-760	3.700-3.730	44-366
Carbono (gC/L)	11,2-22,9	5,7-13,4	8,7-12,1	33,7-33,2
COT (g C/L)	--	--	--	22,7-32,6
Relação C/N	16,00-16,27	19,7-21,07	16,40-16,43	49,2-124,9
Substâncias redutoras (mg/L)	9.500	7.900	8.300	9166
Fenóis Totais (mg/L)	--	--	--	0,4-12,4

A presença de melanoidinas e elevado conteúdo orgânico fornecem a este resíduo líquido cor acastanhada escura e baixo pH (SOUZA *et al.*,1992). Além de promover a redução de DQO e nutrientes, a redução da cor do vinhoto pode ser requerida para que seja permitida a disposição deste efluente tratado em corpos hídricos, sem que haja a degradação da sua qualidade. A cor elevada deste efluente pode reduzir a penetração da energia solar, requerida por organismos aquáticos para manutenção dos níveis de oxigênio através da fotossíntese. O lançamento de efluentes com cor elevada em corpos hídricos pode provocar morte ou decaimento de organismos aquáticos, que contribuem para a reaeração do corpo hídrico, e causar eutrofização (WILKIE *et al.*, 2000).

De acordo com estudos realizados nos anos 1980, uma refinaria de etanol de médio porte produzia, em média, 10<sup>6</sup> litros de etanol por ano. O aumento de tamanho e

do número de destilarias criaram problemas associados aos subprodutos formados. Volumes consideráveis de vinhoto foram lançados em corpos hídricos e causaram severos problemas de poluição ambiental. Simultaneamente, com o aumento da produção de vinhoto, alguns usos alternativos foram propostos (SANTOS, 1981 apud DEMATTE, 2004).

Existem muitas propostas para tratamento físico-químico e biológico do vinhoto, nas quais as características poluentes são reduzidas através da degradação de substâncias orgânicas e sua transformação em efluentes biodegradáveis. Para os autores Gamboa *et al.* (2010) o tratamento físico químico geralmente demanda vários reagentes para oxidar os contaminantes orgânicos, enquanto o tratamento biológico, classificado em aeróbio e anaeróbio, é conhecido por ser mais eficiente para o tratamento de diferentes correntes industriais.

O tratamento adequado ao vinhoto deverá estar relacionado à disposição final adotada. A disposição final poderá ser feita em solo ou em corpos hídricos. De acordo com Wilkie (2000), o principal impacto da disposição de vinhoto em corpos hídricos é a degradação da qualidade da água, com aumento da coloração da mesma. Uma remoção significativa da cor do efluente se faz necessária com vista à disposição em corpos hídricos. Enquanto a remoção de cor não é requerida para aplicação de efluentes de cor elevada (como o vinhoto) em solo.

A destinação final mais comum do vinhoto é a aplicação no solo dos canaviais como fertilizante, devido aos elevados teores de matéria orgânica e nutrientes (principalmente potássio, mas também nitrogênio e fósforo). A fertirrigação consiste na utilização do vinhoto na irrigação dos solos dos canaviais. De acordo com Camargo *et al.* (2009), os primeiros estudos de aplicação de vinhoto no solo no Brasil começaram na década de 1950. O uso do vinhoto como fertilizante se tornou comum nas refinarias no começo dos anos 1980 (CORRAZZA, 1996). Em geral, os estudos nesta área são escassos e muitas vezes contraditórios.

Segundo Camargo *et al.*, (2009), é uma alternativa que foca no uso racional de recursos naturais, de forma a evitar a disposição do vinhoto em rios, enquanto torna férteis os solos agrícolas. É comumente utilizada, pois demanda um custo inicial de investimento pequeno, não apresenta complexidade tecnológica, apresenta baixo custo de manutenção, rápida aplicação e aumenta o rendimento das culturas. De acordo com as perspectivas econômicas, esta alternativa representa a solução mais simples e barata

para a disposição de um efluente tão abundante. No entanto, não é possível afirmar com certeza que esta alternativa não resulta em impactos ambientais, embora permitida por lei.

A intensidade dos impactos ambientais, decorrentes da utilização do vinhoto na fertirrigação, pode ser diferente em função da variabilidade da composição do vinhoto. De acordo com Sheehan and Green-field (1980), as características do vinhoto são dependentes da matéria-prima e, portanto, as práticas agrícolas influenciam na composição da planta. No caso do vinhoto de cana-de-açúcar, a sua composição também varia de acordo com o substrato da fermentação, ou seja, caldo e/ou melaço. Nas plantas autônomas, que produzem apenas etanol, o vinhoto origina-se a partir do caldo fermentado. Em plantas anexas, que produzem açúcar e etanol, o vinhoto deriva de ambos: melaço e caldo. Independentemente de sua origem, os principais compostos orgânicos presentes no vinhoto, relatados na literatura, consistem em ácidos orgânicos (sobretudo láctico e acético), bem como álcoois (principalmente glicerol e etanol), e menor quantidade de hidrocarbonetos (PARNAUDEAU, 2008). O autor também salienta que os possíveis impactos ambientais adversos, tais como a salinização do solo e lixiviação de nitratos, devem ser considerados.

Em diversos lugares, a prática da fertirrigação é realizada no Brasil. Com finalidade de avaliar o impacto do cultivo de cana-de-açúcar com fertirrigação (vinhoto diluído na proporção 6:4, com água de irrigação ou de lavagem) na qualidade da água do rio Ipojuca, localizado em Pernambuco, no Nordeste do Brasil, o monitoramento da qualidade da água a montante e a jusante do corpo hídrico foi conduzido por Gunkel *et al.* (2007) no período de novembro de 2003 a março de 2004. Os autores constataram a jusante do cultivo e da indústria o aumento da temperatura da água, acidificação, aumento da turbidez e depleção das concentrações de O<sub>2</sub> no corpo hídrico no período de safra (outubro a março), período em que a fertirrigação é realizada. Esta prática foi considerada pelos autores uma das principais fontes de contaminação e poluição difusa do rio. Os elevados teores de potássio detectados no monitoramento da qualidade da água revelaram um efeito de carreamento do vinhoto utilizado na fertirrigação para o rio, pois o potássio apresenta baixa solubilidade e normalmente é encontrado em baixas concentrações nos rios (entre 1 e 2 mg/L). Além disso, salientaram que a fertirrigação realizada em longo prazo promove o acúmulo de potássio no solo, o que influencia negativamente o crescimento das plantas, e ainda reduz o teor de açúcar da planta. Os

autores concluíram que métodos de cultivo alternativos de cana-de-açúcar, assim como tecnologias para reduzir a produção e propor o tratamento de vinhoto devem ser desenvolvidos de forma a assegurar o extenso uso do solo e garantir a proteção dos recursos hídricos disponíveis.

Oliveira *et al.* (2010) realizaram um estudo pontual, e em condições específicas, com uma única aplicação de vinhoto no solo e realizou o monitoramento dos gases de efeito estufa durante 15 dias. Não foram detectadas emissões de metano no solo; todavia, a maioria das emissões ocorreu nos canais de distribuição reversos. Adicionalmente, parte da matéria orgânica contida no vinhoto foi provavelmente utilizada como doador de elétrons na desnitrificação heterotrófica no solo, porque emissões de óxido nitroso ( $N_2O$ ), produto intermediário da desnitrificação, foram detectadas. De acordo com o IPCC (2007), o potencial de aquecimento global do  $N_2O$  (óxido nitroso) é 296 vezes maior que o do dióxido de carbono ( $CO_2$ ).

No estado de São Paulo, a norma da CETESB P4.231 preconiza os critérios e procedimentos para aplicação de vinhoto no solo agrícola, limitando apenas o teor de potássio. Esta norma negligencia a elevada concentração de matéria orgânica disponível no vinhoto, e a composição deste efluente não está padronizada para uso no solo, o que é um fator preocupante, pois a caracterização do vinhoto varia significativamente de acordo com cada planta industrial (MORAIS *et al.*, 2013).

A matéria orgânica (contida no vinhoto) quando incorporada ao solo é metabolizada por fungos, que neutralizam a acidez do solo de forma a viabilizar a proliferação de bactérias responsáveis pela mineralização e imobilização do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. Desta forma, há o aumento da população microbiana (micro-organismos participantes dos ciclos biogeoquímicos de outros elementos) e da atividade microbiana no solo (NEVES *et al.*, 1983).

Diante das tecnologias disponíveis atualmente para tratamento de efluentes industriais, a digestão anaeróbia mostra-se interessante para ser aplicada em correntes líquidas de biorrefinarias de cana-de-açúcar, pois apresenta vantagens ambientais e energéticas. O vinhoto após a digestão anaeróbia pode apresentar menor carga orgânica, mas ainda contém nutrientes e minerais e pode ser utilizado na lavoura como fertilizante. No que se refere aos proveitos energéticos, o biogás gerado a partir da digestão anaeróbia do vinhoto se mostra como fonte de energia atrativa devido ao elevado calor de combustão do metano presente no biogás (MORAIS *et al.*, 2015).

Apesar do processo de digestão anaeróbia apresentar todas estas vantagens, ainda restam diversos desafios e obstáculos para que este processo seja implementado completamente, principalmente associado ao entendimento completo do bioprocessos aplicado a resíduos específicos, a carência de uma legislação aplicada à prática da fertirrigação, assim como a não valorização do biogás como combustível alternativo no Brasil. Diante deste cenário, para que essas barreiras possam ser ultrapassadas são indispensáveis os esforços combinados do governo, agências ambientais reguladoras e da comunidade científica (MORAES *et al.*, 2015).

## 2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

O processo biológico anaeróbio também denominado digestão anaeróbia representa um sistema ecológico bastante delicado, onde cada micro-organismo possui uma função essencial. Há um consórcio entre bactérias facultativas ou bactérias estritamente anaeróbias e arqueas metanogênicas, onde é possível a remoção do carbono orgânico do ambiente anaeróbio, o que favorece a participação de bactérias acidogênicas para a fermentação de compostos orgânicos e posterior conversão destes sub-produtos em metano (CHERNICARO, 2007).

### 2.2.1 Etapas da Digestão Anaeróbia (DA)

As preocupações com as mudanças climáticas, e a necessidade de garantia do fornecimento seguro de energia, levaram ao aumento do interesse por tecnologias sustentáveis de produção de energia renovável. A DA se tornou uma tecnologia importante para estabilização de correntes líquidas aliadas à produção de metano (ANGELIDAKI *et al.*, 2003).

A DA é um dos sistemas mais empregados para o tratamento de vinhoto porque apresenta baixo custo de operação (não necessita de aeradores), produção de lodo reduzida e obtenção de subprodutos como o gás metano e hidrogênio (LAVOV *et al.*, 2001).

De acordo com Speece (1983), a DA depende da atividade de, pelo menos, três grupos distintos de micro-organismos, que podem ser facultativos ou anaeróbios

estritos, que realizam a conversão anaeróbia dos compostos orgânicos de acordo com as etapas apresentadas na Figura 2.2.

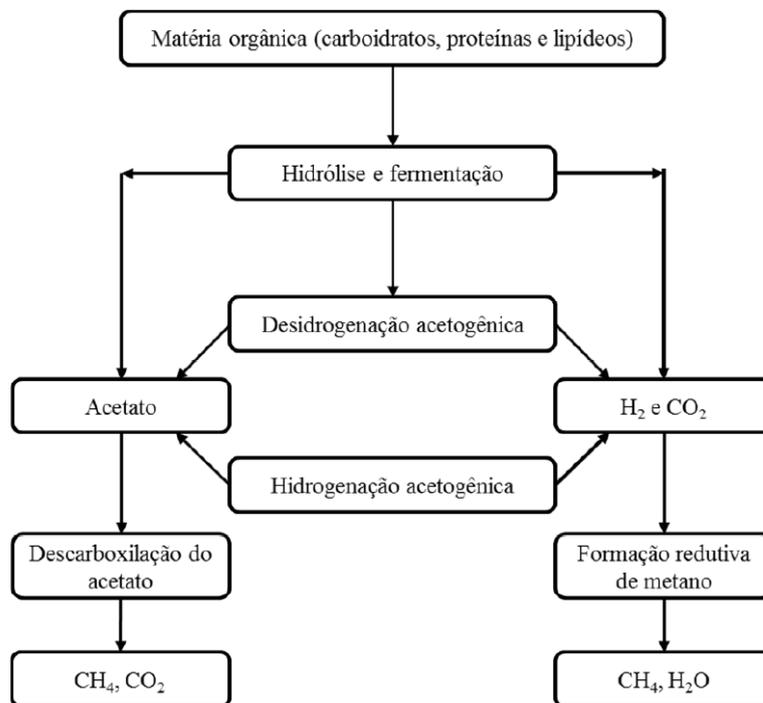


Figura 2.2: Esquema da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa e descrição das etapas e populações microbianas envolvidas.  
Fonte: DAMASCENO (2013).

Na acidogênese, primeira etapa da digestão anaeróbia, as substâncias orgânicas complexas, como carboidratos, são hidrolisadas por bactérias fermentativas hidrolíticas e convertidas a compostos orgânicos mais simples, como ácidos (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (principalmente etanol), cetonas (acetona),  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ .

Na segunda etapa, denominada acidogênese, bactérias acidogênicas convertem os produtos da hidrólise em ácidos voláteis, álcoois (principalmente etanol), cetonas (acetona, principalmente), dióxido de carbono, e hidrogênio.

Na terceira etapa, a acetogênese, bactérias acetogênicas transformam a matéria orgânica simples em ácidos com apenas um ou dois átomos de carbono (formiato e acetato), com concomitante produção de hidrogênio.

E na quarta e última etapa, a metanogênese, realizada pelas arqueas metanogênicas, onde a matéria orgânica sofre maior estabilização, através da

transformação de ácido acético em gás carbônico e metano (biogás), os quais passam a estar presentes dissolvidos no meio líquido. A obtenção do metano se faz a partir da descarboxilação do acetato e/ou da redução do CO<sub>2</sub> com H<sub>2</sub> (SPEECE, 1983).

### 2.2.2 Condições ambientais para o processo de DA

A digestão anaeróbia depende diretamente de um controle rigoroso das condições ambientais, uma vez que este processo necessita de uma interação entre bactérias fermentativas e arqueas metanogênicas, de maneira que seu sucesso é dependente de um equilíbrio delicado no sistema ecológico (CHERNICHARO, 2007).

As características físicas e químicas (principalmente o pH, alcalinidade, ácidos voláteis, nutrientes e temperatura) influenciam o crescimento microbiano e podem atuar ou não como agentes seletivos (CHERNICHARO, 2007).

Neste contexto é importante utilizar um inóculo apropriado que contenha os micro-organismos necessários para o processo de biodegradação anaeróbia (AMARAL *et al.*, 2008). Ribas (2006) utilizou como inóculo em sua pesquisa de tratamento de vinhoto, via digestão anaeróbia, o lodo oriundo de um reator anaeróbio (UASB) que tratava despejos de abatedouro de aves. Este lodo continha em sua composição uma elevada diversidade de micro-organismos, característica fundamental para ser utilizado em reatores anaeróbios para tratamento de diversos efluentes industriais. A autora observou, neste inóculo, morfologias bacterianas como bacilos de distintas formas, cocos agrupados, filamentos longos e delgados agrupados, semelhantes a arqueas dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina*.

Operacionalmente, deseja-se a manutenção de níveis elevados de alcalinidade ao longo do processo, pois elevadas concentrações de ácidos voláteis poderiam ser tamponadas sem ocasionar uma queda substancial do pH. Os efeitos do controle de pH sobre o processo se manifestam de duas formas principais: afetando diretamente a atividade enzimática e indiretamente a toxicidade de alguns compostos, além de as bactérias produtoras de metano possuírem faixa ótima de crescimento entre pH 6,6 e 7,4 (CHERNICHARO, 2007).

Se houver a necessidade de suplementação de alcalinidade, a seleção dos compostos químicos deverá passar por uma avaliação de aplicabilidade e economia. Vários produtos podem ser utilizados para o controle do pH (suplementação de

alcalinidade) nos processos anaeróbios, dentre estes o hidróxido de sódio, o bicarbonato de sódio, e de amônio. A utilização do bicarbonato de sódio apresenta como vantagens: elevada solubilidade e fácil manuseio, não eleva substancialmente o pH quando dosado em excesso e não requer gás carbônico para formar a alcalinidade (CHERNICHARO, 2007).

### 2.2.3 Ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia são baseados no monitoramento da formação de um ou mais produtos envolvidos na reação biológica, como por exemplo, o teste denominado *Biochemical Methane Potential* que se baseia na medição da produção acumulada de metano (Owen et al, 1978 apud AMARAL *et al.*, 2008), ou no monitoramento da depleção do substrato (GUWY, 2004 apud AMARAL *et al.*, 2008). A Figura 2.3 apresenta os diversos procedimentos para determinação da biodegradabilidade de uma amostra sob condições anaeróbias.

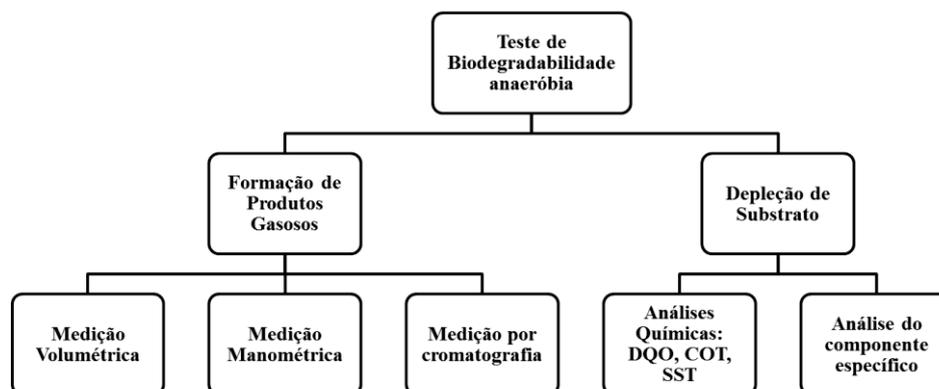


Figura 2.3: Descrições dos tipos de testes de biodegradabilidade anaeróbia.  
Fonte: AMARAL *et al.*, (2008).

Os métodos baseados no monitoramento dos produtos formados geralmente quantificam o biogás produzido. Esta produção pode ser determinada pelo aumento do volume sob pressão constante (método volumétrico), ou pelo aumento da pressão a volume constante (método manométrico), e a concentração de metano no biogás é geralmente determinada por cromatografia (AMARAL *et al.*, 2008).

Com relação aos métodos baseados na depleção do substrato, estes requerem o emprego de análises mais complexas, que empregam parâmetros não específicos, tais como demanda química de oxigênio e carbono orgânico total, ou a quantificação de compostos específicos produzidos ou consumidos, detectados através das técnicas: cromatografia em fase gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (AMARAL *et al.*, 2008).

## 2.3 O CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM METAIS E A UTILIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

### 2.3.1 Especificações do aço API 5L X60

O aço API 5L X60, especificado de acordo com o *American Petroleum Institute*, é adequado à fabricação de tubos a serem usados para a condução de fluidos variados sob pressão, como petróleo e seus derivados, gás natural e minérios. É adequado ao processo de fabricação de tubos soldados longitudinalmente pelo processo de resistência elétrica de alta frequência, fabricação helicoidal ou longitudinalmente pelo processo de arco submerso. Esses aços são elaborados com as melhores práticas para a produção de aços limpos, assegurando sua aplicação em tubulações onde a tenacidade é requisito fundamental.

O número de dois dígitos após o "X" indica a força de rendimento mínimo (em psi 000 's) de tubo produzido nesta série. A composição do aço é apresentada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Especificação do Aço API-5L X60 conforme especificação do *American Petroleum Institute* (API). <http://www.api5lx.com/api5lx-grades/api-5l-x60.php>

Grau	Espessura (mm)	% C máx.	% Mn máx.	P	
				máx.(%)	S máx. (%).
API5LX60	3,17 a 12,7	0,26	1,4	0,03	0,03

### 2.3.2 Biofilmes

Biofilmes são comunidades de micro-organismos imobilizados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), de origem microbiana, com canais intersticiais, por onde ocorre a passagem do fluido circulante. Nestes microsistemas heterogêneos ocorrem processos aeróbios e anaeróbios. O biofilme apresenta pelo menos cinco regiões distintas: material, base e superfície do biofilme, meio líquido e fase gasosa. A interação entre estas regiões ocorre por processos de transferência interfacial ou de transporte (GARRET *et al.*, 2008).

A formação de biofilmes em metais é o resultado de um processo de acumulação, não necessariamente uniforme no tempo ou no espaço (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990), que começa imediatamente após a imersão do metal no ambiente aquoso. Uma película fina (cerca de 20-80 nm de espessura) é formada em um primeiro estágio, devido à deposição de íons inorgânicos e compostos orgânicos de massa molecular relativamente alta. Este filme inicial pode alterar as cargas eletrostáticas e a molhabilidade da superfície do metal, facilitando a sua posterior colonização por bactérias. Em um curto espaço de tempo (minutos ou horas, dependendo do ambiente aquoso no qual o metal está imerso), o crescimento microbiano e de substâncias exopolissacarídeas (EPS) resultam na produção e no desenvolvimento de um biofilme. Este biofilme é um sistema dinâmico, e os diferentes processos de transporte e de reações químicas que ocorrem na interface bio-acumulada (*biofouled*) terão lugar através da espessura do biofilme (CHARACKLIS, 1981 apud VIDELA e HERRERA, 2005).

A Figura 2.4 apresenta as etapas de desenvolvimento de um biofilme:

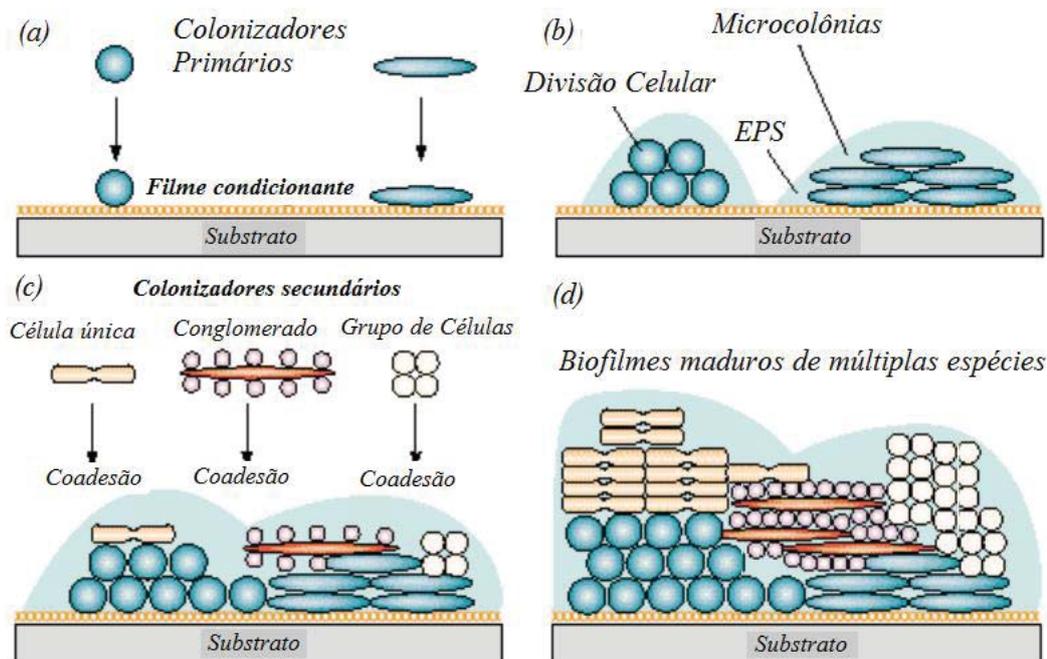


Figura 2.4: Desenvolvimento de um biofilme.

Fonte: <http://cenormagill.com.br/artigos/Biofilmes%20Microbianos.pdf>

As etapas para formação de um biofilme em um determinado substrato se dão conforme a Figura 2.4: (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção de (EPS), com o desenvolvimento de micro-colônias; (c) coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; e (d) maturação e formação de mosaicos no biofilme maduro.

Em ambientes onde as condições são adversas, a formação de biofilmes é uma estratégia de sobrevivência para os micro-organismos, o que resulta em alterações fenotípicas diversas entre as células planctônicas e sésseis. Comumente as mesmas espécies microbianas em fase sésil apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos do que quando estiveram em estado planctônico (MOSTELLER e BISHOP, 1993; CABEÇA, 2006; ARAÚJO, 2011).

Basicamente, os biofilmes são constituídos de materiais orgânicos (carboidratos, proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, vitaminas, etc) e inorgânicos (sais minerais), gerados pelo metabolismo celular ou absorvidos do fluido pelos EPS, e principalmente água, que representa mais de 95% da sua composição (PARIZZI *et al.*, 2004; BEER e STOODLEY, 2006; MACEDO, 2006; ARAÚJO, 2011).

Geralmente, a incrustação biológica (*biofouling*) pode ser definida como a acumulação indesejada de depósitos de natureza biológica sobre uma superfície. Estes depósitos podem conter micro-organismos (*microfouling*) ou macro-organismos (*macrofouling*) (GEESEY, 1982 apud VIDELA, 2002).

A colonização das superfícies metálicas muda drasticamente o conceito de interface elétrica, comumente utilizado na corrosão inorgânica: mudanças importantes nas espécies e concentrações de íons, faixas de pH, e o potencial de oxidação e redução são influenciados pelo biofilme e o comportamento passivo ou ativo do substrato metálico e dos produtos de corrosão formados, assim como as variáveis eletroquímicas usadas para avaliar as taxas de corrosão (VIDELA, 1989).

O fator limitante para o crescimento de qualquer biofilme é a disponibilidade de nutrientes no fluido circulante e principalmente a condição nutricional no interior do biofilme. Além disso, fatores como pH, difusão de oxigênio, e osmolaridade controlam a maturação do biofilme. Há ainda fatores relacionados ao crescimento do biofilme, como a velocidade do fluxo (aquoso) que pode interferir na sua formação e alterar consideravelmente os parâmetros eletroquímicos (DE FRANÇA e CRAVO JR, 2000).

### **2.3.3 Micro-organismos causadores da biocorrosão**

Apesar de praticamente todos os tipos de micro-organismos conhecidos atualmente se relacionarem, em maior ou menor importância, aos processos de biocorrosão e *biofouling*, as bactérias apresentam papel preponderante neste fenômeno. Diferentes grupos bacterianos estão relacionados ao processo de biocorrosão, atuando de várias maneiras. Para este estudo, foram selecionados os quatro principais grupos bacterianos em destaque neste cenário: bactérias aeróbias totais, oxidantes de ferro, anaeróbias totais e BRS.

#### **Bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias cultiváveis**

Diversas estirpes bacterianas são capazes de produzir EPS, como as do gênero *Pseudomonas*, que propicia a colonização de superfícies sólidas, formação de biofilmes e potencializa a biocorrosão. Os gêneros produtores de EPS destacam-se no processo corrosivo de forma a proteger as células contra íons metálicos, inibem a ação de biocidas e contribuem para que outros micro-organismos sejam aprisionados, aumentando a espessura do biofilme (TREVOR e COTTER, 1990). Neste ambiente é

estabelecida a condição de anaerobiose, o que favorece o desenvolvimento das BRS presentes no interior do biofilme e o processo de corrosão por aeração diferencial (BEECH e GAYLARDE, 1989).

### **Bactérias oxidantes de ferro (Ferrobactérias)**

Também conhecido como ferrobactérias, este grupo possui grande diversidade estrutural, e correspondem às bactérias oxidantes do ferro (capazes de oxidar ferro ferroso a férrico). São micro-organismos aeróbios capazes de obter a energia necessária ao seu metabolismo a partir da oxidação ou redução do ferro. Além de participar do processo de corrosão, estas bactérias são capazes de produzir flocos e *fouling* em sistemas de tratamento de efluentes industriais, reduzir a permeabilidade do solo, e causar obstruções (entupimentos) na indústria de exploração de petróleo (VIDELA, 2003).

As principais espécies de bactérias oxidantes de ferro associadas ao processo de corrosão são *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Gallionella ferruginea* e *Leptospirillum ferrooxidans*, e os gêneros *Crenothrix*, *Leptothrix*, *Sideromonas* e *Siderocarpa* (GENTIL, 2007).

### **Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)**

As BRS são bactérias heterotróficas capazes de metabolizar distintas fontes de carbono orgânico a fim de obter energia necessária para redução do íon sulfato a sulfeto. Como resultado dessa redução, ocorre a produção de sulfetos, bissulfetos e hidrogênio sulfetado, assim como produtos metabólicos intermediários (tiosulfato, tetrations, politionatos), que desempenham um papel fundamental na corrosão anaeróbia do ferro (VIDELA, 2003).

As espécies mais estudadas neste grupo microbiano pertencem aos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfomaculum* (RABUS *et al.*, 2006), e outros gêneros como *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desufobulbus*, *Desulfuromonas*, *Desulfosarcina*, *Desulfomicrobium* e *Thermodesulfobacterium* foram isolados de ambientes aquáticos, naturais, industriais e terrestres (MATIAS *et al.*, 2005; ARAÚJO, 2011).

Os micro-organismos influenciam a corrosão pelas alterações nas condições eletroquímicas na interface metal-solução, que pode causar efeitos distintos que variam

desde a indução da corrosão localizada, através de uma alteração na taxa de corrosão geral, à inibição da corrosão (VIDELA, 1996). A Figura 2.5 apresenta o processo de corrosão induzida pelas BRS na presença de biofilmes aeróbios e anaeróbios.

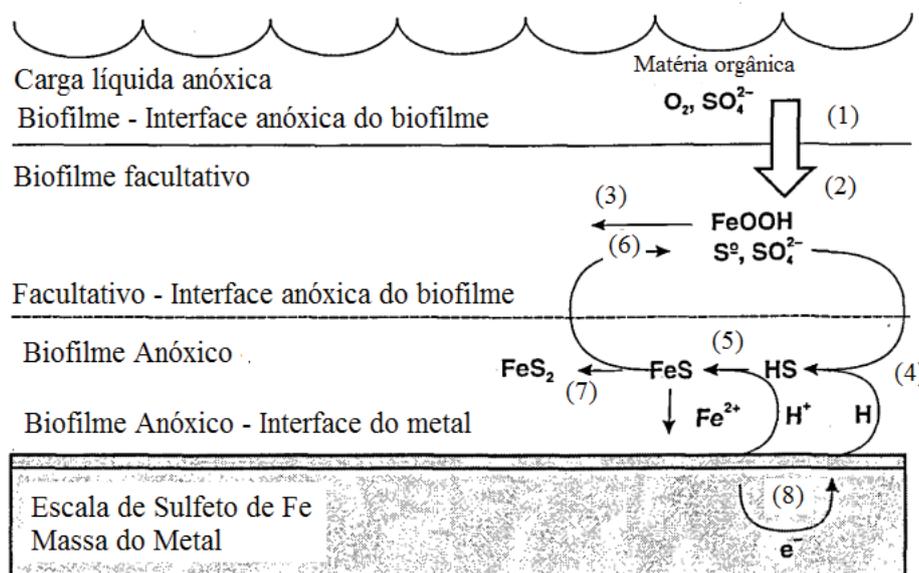


Figura 2.5: Diagrama esquemático de processos de transformação e transporte na corrosão induzida pelas BRS na presença de biofilmes aeróbios/anaeróbios na superfície do metal.

Fonte: Adaptado de Lee *et al.*. (1995) apud Videla (1996).

Este fenômeno acontece conforme as etapas descritas na Figura 2.5: (1) transporte de massa; (2) metabolismo aeróbio; (3) precipitação de hidróxido de ferro; (4) metabolismo anaeróbio + redução de sulfato; (5) precipitação de sulfeto de ferro; (6) oxidação do sulfato; (7) formação de pirita; (8) Corrosão eletroquímica.

### 2.3.4 Corrosão Microbiologicamente Induzida (Biocorrosão)

O processo eletroquímico de dissolução metálica iniciada ou acelerada por micro-organismos é denominado corrosão microbiologicamente induzida ou biocorrosão (VIDELA, 2003).

Em uma planta industrial há diversos sistemas onde a biocorrosão e a bioincrustação podem causar problemas. As partes do sistema mais suscetíveis a tais riscos são: sistemas de resfriamento abertos ou fechados, linhas de água de injeção, tanques de armazenamento; sistemas de tratamento de águas residuais, sistemas de filtração, diferentes tipos de tubulações, membranas de osmose inversa, sistemas de distribuição de água potável (VIDELA, 2002).

De acordo com Videla (2002), os métodos comumente empregados para evitar e controlar a biocorrosão podem ser divididos em diversas categorias: procedimentos de limpeza, revestimentos, proteção catódica e biocidas (tratamento químico).

#### **2.3.4.1 Uso dos biocidas na prevenção e controle da biocorrosão**

A “regra básica”, que deve ser aplicada a sistemas industriais, a fim de prevenir e controlar a biocorrosão e bioincrustação (*biofouling*) é "manter o sistema limpo". Este princípio básico raramente pode ser observado, a não ser quando previamente implementado nas fases iniciais da operação do sistema. Devido ao entendimento escasso dos processos de biocorrosão e bioincrustação, o sistema é diagnosticado adequadamente quando já apresenta problemas graves. Tais problemas abrangem desde a contaminação microbiana intensa, com consequentes perdas de eficiência, a falhas estruturais devido à biocorrosão (VIDELA, 2002).

O uso de estratégias de controle adequadas, complementadas com estudos de campo e técnicas laboratoriais microbiológicas, é necessário para levantamento de um diagnóstico dos efeitos derivados da atividade microbiológica e do papel dos biofilmes na reação de corrosão para mais tarde programar o controle executivo e medidas preventivas. Esta avaliação deve ser feita para cada sistema industrial, considerando as condições operacionais, a composição físico-química do fluido, e o número e identidade de contaminantes microbianos (VIDELA, 2002).

O uso de biocidas são exemplos de tratamentos químicos aplicados à prevenção e controle da CMI. Os biocidas são compostos individuais (ou a mistura de compostos) capazes de inibir o crescimento ou matar os micro-organismos. A efetividade de um biocida depende da natureza dos micro-organismos a serem eliminados e das condições de funcionamento do sistema a ser tratado. Portanto, recomenda-se realizar um ensaio, preferencialmente sob as condições operacionais do sistema, e se isso não for possível, realizá-lo em condições laboratoriais análogas, para determinação da dosagem ótima do composto ativo mais adequado a ser aplicado no sistema (VIDELA e HERRERA, 2005).

Os biocidas podem ser tanto oxidantes quanto não oxidantes tóxicos. O cloro, o ozônio e o bromo são três típicos exemplos de agentes oxidantes de uso industrial. Os biocidas não oxidantes são relatados como mais eficazes do que os biocidas oxidantes

para o controle geral de algas, fungos e bactérias, que são mais persistentes, e muitos deles são independentes do pH. As combinações de biocidas oxidantes e não oxidantes ou de dois biocidas não-oxidantes são utilizadas com frequência para otimizar o controle microbiológico de sistemas de águas industriais. Os biocidas típicos não oxidantes são: formaldeído, glutaraldeído, isotiazolonas, e compostos quaternários de amônio (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Propriedades e concentrações usuais de biocidas utilizados em sistemas de águas industriais. Fonte: VIDELA e HERRERA, (2005).

<b>Biocidas</b>	<b>Propriedades</b>	<b>Concentrações usuais adotadas (mg/L)</b>
Cloro	Eficaz contra bactérias e algas; oxidante; dependente do pH	0,1-0,2 (tratamento contínuo)
Dióxido de cloro	Eficaz contra bactérias, em menor medida contra fungos e algas; oxidante; independente do pH	0,1-1,0
Bromo	Eficaz contra bactérias e algas; oxidante; ampla faixa de pH	0,05-0,1
Ozônio	Eficaz contra bactérias e biofilmes; oxidante; dependente do pH	0,2-0,5
Isotiazolonas	Eficaz contra bactérias, algas e biofilmes; não oxidante; independente do pH	0,9-10
QUATs (Compostos Quaternários de Amônia)	Eficaz contra bactérias e algas; não oxidante; atividade de superfície	8-35
Glutaraldeído	Eficaz contra as bactérias, algas, fungos e biofilmes; não oxidante; ampla faixa de pH	10-70
THPS - TetrakisHidroximetil Fosfônico Sulfato	Eficaz contra bactérias, algas e fungos; baixa toxicidade ambiental; ação específica contra bactérias redutoras de sulfato.	-

O aumento das exigências legislativas e a necessidade de maior aceitabilidade ambiental têm contribuído para restringir o uso de alguns produtos biocidas tradicionais, para o desenvolvimento de novos compostos e para a utilização de dosagens ótimas dos biocidas já existentes (VIDELA e HERRERA, 2005).

### 2.3.5 Surfactantes

#### 2.3.5.1 Surfactantes químicos

Avalia-se que a produção total mundial de surfactantes supera 15 milhões de toneladas por ano, justificada pela demanda da aplicação dos surfactantes químicos em distintos setores industriais, que vão desde limpeza a aplicações em processamento de alimentos (geralmente como emulsificantes), recuperação avançada de petróleo ou mesmo no setor farmacêutico (VAN BOGAERT *et al.*, 2007).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A porção apolar é geralmente uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera. Com a presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (água/óleo e óleo/água). Essas propriedades tornam os tensoativos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões, nas quais os hidrocarbonetos podem solubilizar em água ou a água pode solubilizar em hidrocarbonetos. Estas características conferem a estas moléculas propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Tais propriedades permitem que os surfatantes possam ser aplicados em diversos setores industriais (GREEK, 1991 apud DESAI e BANAT, 1997).

A maioria dos surfactantes usados atualmente é parcial ou lentamente biodegradável, fator que leva a contribuir com a poluição ambiental.

#### 2.3.5.2 Biosurfactantes

Biosurfactantes são moléculas anfipáticas que possuem propriedades surfactantes, geralmente produzidas por micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras). Estes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química, sendo divididos entre os de baixa massa molecular (lipopeptídeos, glicolipídeos e ácidos graxos) e alta massa molecular (polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas) (BANAT *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes podem apresentar "benefícios adicionais", além da função de reduzir a tensão superficial para maior absorção de substratos hidrofóbicos. Estas propriedades benéficas (por exemplo, antibióticas ou propriedades antimicóticas) farão com que a aplicação de biossurfactantes em determinadas áreas (por exemplo, no campo da medicina) seja ainda mais promissora, e pode abrir novas possibilidades de aplicação industrial em comparação com os tensoativos sintéticos. Um grupo promissor dentre as diversas moléculas surfactantes tensoativas são os ramnolipídeos, da classe dos glicolipídeos, produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (HENKEL, 2012).

Nos últimos anos, os biossurfactantes ganharam mais atenção, uma vez que os processos de produção sustentável tornaram-se mais apreciáveis, e mostraram o potencial de substituir surfactantes sintéticos (NITSCHKE e PASTORE, 2003).

Há inúmeras aplicações industriais nas quais os surfactantes químicos poderiam ser substituídos por biossurfactantes. Dentre estas, áreas tão diversas como a agricultura, construção, indústrias de bebidas e alimentos, limpeza industrial, biorremediação de poluentes insolúveis em água, lubrificantes, tratamento do couro, indústrias de papel e metal, indústrias têxteis, cosméticos, indústria farmacêutica, e indústrias de petroquímicos e petróleo (BANAT et al., 2000; DESAI; BANAT, 1997). Dentre os diversos setores anteriormente apresentados, para Nitschke e Pastore (2003) e Araújo (2013), as aplicações comerciais dos biossurfactantes são resumidas no Quadro 2.1.

Existem vários micro-organismos conhecidos capazes de produzir ramnolipídeos. No entanto, atualmente apenas algumas espécies/cepas são relevantes para os processos industriais, devido a grandes diferenças nos rendimentos e na concentração máxima atingível de ramnolipídeo. Com relação à espécie *P. aeruginosa* pode-se destacar: seu cultivo é relativamente fácil e compreendido, a síntese de ramnolipídeos é bastante pesquisada, uma vez que estes são fatores chave envolvidos na virulência de *P. aeruginosa*. Além disso, o genoma da *Pseudomonas aeruginosa* PA1 foi completamente sequenciado e anotado (HENKEL et al., 2012).

Quadro 2.1: Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes. Fonte: NITSCHKE e PASTORE, (2003).

Funções	Campos de aplicação
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Desemulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Dentre os biossurfactantes, os glicolípídeos são os mais conhecidos. São carboidratos em combinação com os ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxi-alifáticos. Dentre os glicolípídeos, os mais conhecidos são ramnolípídeos, trealolípídeos e soforolípídeos (DESAI e BANAT, 1997). A Figura 2.6 apresenta a estrutura de um ramnolípídeo.

Figura 2.6: Estrutura do ramnolípídeo do tipo 1 de *Pseudomonas aeruginosa*.  
Fonte: JARVIS e JOHNSON, (1949 apud DESAI e BANAT, 1997).