LUCAS MAKRAKIS POLICARPO

ESTUDO DE EQUILÍBRIO E CINÉTICA DA BIOSSORÇÃO DE COBRE (II) POR
RHIZOPUS MICROSPORUS

São Paulo

2015

LUCAS MAKRAKIS POLICARPO

ESTUDO DE EQUILÍBRIO E CINÉTICA DA BIODISSORÇÃO DE COBRE (II) POR
RHIZOPUS MICROSPORUS

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

São Paulo
2015

LUCAS MAKRAKIS POLICARPO

ESTUDO DE EQUILÍBRIO E CINÉTICA DA BIOSSORÇÃO DE COBRE (II) POR
RHIZOPUS MICROSPORUS

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Dr. Marcelo Martins Seckler

São Paulo

2015

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Policarpo, Lucas

ESTUDO DE EQUILÍBRIO E CINÉTICA DA BIODISSOLUÇÃO DE COBRE (II)
POR RHIZOPUS MICROSPORUS / L. Policarpo -- versão corr. -- São Paulo,
2015.

96 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Tratamento de efluentes 2.Gestão ambiental 3.Cobre (Aspectos
ambientais) I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de
Engenharia Química II.t.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial aos meus pais e a minha avó, pelo incentivo, apoio e amor, sem os quais seria impossível realizar tal trabalho.

A minha querida Katrin, pelo carinho, amor e apoio nos momentos difíceis.

Ao professor Marcelo Martins Seckler pela excelente orientação, apoio incondicional, e paciência ao longo deste período.

Ao professor Claudio Augusto Oller do Nascimento por ter aberto as portas do departamento e me proporcionado a oportunidade de atuar no projeto.

A professora Maria Elena Santos Taqueda por todo o apoio e atenção concedidos nas análises estatísticas do trabalho.

A Mariana de Paula Eduardo pela imprescindível contribuição ao trabalho.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica pelos ensinamentos proporcionados nas disciplinas.

A todos meus amigos do bloco 22 e do semi-industrial que tornaram essa jornada menos difícil e muito mais prazerosa. Em especial o Walter, Yuri, Zé Otavio, Murilo, Fred, Marina, Mari e Flávia.

A todos os colegas de laboratório do projeto Vale.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro dispensado durante o curso de mestrado.

RESUMO

A poluição relacionada a metais pesados tem recebido uma atenção especial devido a sua alta toxicidade, não biodegradabilidade e tendência de acumular-se na cadeia alimentar. Apesar disso, metais pesados também são considerados recursos valiosos, portanto a sua remoção em conjunto com a sua recuperação torna-se ainda mais importante. Este caso aplica-se aos rejeitos de mineração de cobre, os quais oferecem a possibilidade de recuperação do metal e de sua contenção de maneira segura do meio ambiente. Tais rejeitos se caracterizam por ocuparem enormes áreas inundadas e abrigarem soluções diluídas de cobre (II), porém, muitas vezes, acima dos limites seguros. Diversos processos tradicionais de tratamento mostram-se disponíveis para remover o cobre de tais soluções, no entanto, em certas aplicações eles podem ser ineficientes ou muito onerosos. Nesse contexto, a bioissorção é uma alternativa interessante. Nesse processo, certos microrganismos, como fungos, bactérias e algas, ligam-se passivamente ao cobre na forma íons ou outras moléculas em soluções. No presente trabalho foi avaliado o potencial de bioissorção de íons cobre (II) pela biomassa do fungo *Rhizopus microsporus*, coletado e isolado da área de rejeitos da Mina do Sossego, na região norte do Brasil. Isotermas de bioissorção foram determinadas experimentalmente em bateladas sob temperatura de 25°C, agitação de 150 rpm, concentração de biomassa de 2,0 a 2,5 g/L e tempo de contato mínimo de 4 horas. O pH mostrou ser um fator importante no equilíbrio da bioissorção, sendo o valor máximo da capacidade de bioissorção de 33,12 mg de cobre / g biomassa encontrado em pH 6. Valores sucessivamente menores são encontrados pela acidificação da solução, sendo o pH 1 considerado adequado para o processo de dessorção, correspondendo a uma capacidade de bioissorção de 1,95 mg/g. Modelos de adsorção de Langmuir e de Freundlich ajustaram-se adequadamente às isotermas tanto com pH controlado quanto não controlado. Foi constatado que a troca iônica é um dos mecanismos envolvidos na bioissorção do cobre com *Rhizopus microsporus*. Tanto o modelo de pseudo-primeira ordem quanto o de pseudo-segunda ordem ajustaram-se aos dados cinéticos da bioissorção, sendo que o equilíbrio ocorre em aproximadamente 4 horas. A biomassa conservou a capacidade de bioissorção ao operar repetidamente em três ciclos de sorção-dessorção. A biomassa viável e a morta não apresentaram diferença estatisticamente significativa na capacidade de bioissorção.

Palavras chaves: *Rhizopus microsporus*; biossorção; dessorção; cobre; tratamento de efluentes.

ABSTRACT

Heavy metal pollution has been receiving a special attention because of the high toxicity of these metals, by their non-biodegradability and by their tendency to accumulate throughout the food chain. Nevertheless, heavy metals are also considered valuable resources, hence their recovery and recycle assumes even greater significance. This is the case of copper mining tailings, which offer the possibility of metal recovery while it must be safely contained from the environment. These wastes are characterized by occupying huge flooded areas with very dilute copper (II) solutions, however, in many cases above safe limits. Various traditional treatment methods are available to remove copper from such solutions; however, for certain applications they may be either ineffective or too costly. In this context, biosorption becomes an interesting alternative. In this process, certain microorganisms such as fungi, bacteria and algae, passively bind to the copper ion or other molecules in solution. In the present study the biosorption potential of copper (II) by the fungal biomass of *Rhizopus microsporus*, collected and isolated from the tailings area of Sossego mine, located in the northern region of Brazil, has been evaluated. Biosorption isotherms have been experimentally determined by batch experiments at a temperature of 25°C, agitation speed of 150 rpm, biosorbent concentration in the range of 2.0 to 2.5 mg/L, and contact time of at least 4 hours. The pH has been found to be a determining factor for the sorption equilibrium, a maximum sorption capacity of 33.12 mg copper / g biomass being found at pH 6. Successively smaller values have been found by the acidification of the solution. A pH value of 1 has been considered adequate for the desorption process, which correspond to a biosorption capacity of 1,95 mg/g. Both Langmuir and Freundlich adsorption models fitted well to equilibrium data using both pH methodologies, however the determination coefficient is slightly higher for the former model. It has been found that ion exchange is one of the mechanisms involved in copper (II) biosorption by *Rhizopus microsporus*. Both pseudo-first and pseudo-second order models have fitted well to biosorption kinetic data. Equilibrium approaches within approximately 4 hours. The biosorbent has proved to maintain its sorption efficiency after three regeneration cycles. Viable and dead biomasses have not exhibited statistically significant difference in sorption behavior.

Key words: *Rhizopus microsporus*; biosorption; desorption; copper; effluent treatment.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS	23
2.1.	Objetivo geral	23
2.2.	Objetivos específicos	23
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1.	Biossorção	24
3.2.	Mecanismos da biossorção	26
3.2.1.	Adsorção física	27
3.2.2.	Troca iônica	27
3.2.3.	Complexação	28
3.2.4.	Precipitação	28
3.3.	Isotermas de biossorção	28
3.3.1.	Isoterma de Langmuir	31
3.3.2.	Isoterma de Freundlich	32
3.4.	Fatores que afetam a capacidade de biossorção	33
3.5.	Cinética da biossorção	34
3.5.1.	Modelo de pseudo-primeira ordem	34
3.5.2.	Modelo de pseudo-segunda ordem	35
3.6.	Dessorção e regeneração do biossorvente	36
3.7.	Erros experimentais na biossorção e Análise de variância (ANOVA) ...	37
3.8.	Especiação do cobre	39
3.9.	Fungo Rhizopus microsporus	41
3.10.	Experimentos de biossorção	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1.	Preparo da biomassa	45
4.1.1.	Obtenção do microrganismo	45
4.1.2.	Solução de esporos	45
4.1.3.	Produção de biomassa	46
4.1.4.	Pré-tratamento da biomassa morta	46
4.1.5.	Pré-tratamento da biomassa viável	47
4.1.6.	Determinação da umidade da biomassa	47

4.2.	Preparo de soluções	48
4.2.1.	Soluções-padrão de cobre	48
4.2.2.	Soluções de ajuste de pH	48
4.3.	Determinação analítica da concentração de metal	48
4.3.1.	Preparo de amostra líquida para determinação analítica	48
4.3.2.	Curvas de calibração	48
4.3.3.	Equipamento de leitura da concentração	49
4.4.	Resposta de interesse e erros experimentais	49
4.4.1.	Determinação da capacidade de bioabsorção	49
4.4.2.	Fontes de erro experimental	50
4.5.	Experimentos de bioabsorção	50
4.5.1.	Estudo dos componentes da variância	53
4.5.2.	Efeito do pré - tratamento térmico na bioabsorção	53
4.5.3.	Efeito do pH na bioabsorção	54
4.5.4.	Isoterma de bioabsorção	55
4.5.5.	Ciclos de sorção-desorção	57
4.5.6.	Cinética da bioabsorção	59
4.5.7.	Resumo dos experimentos	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1.	Estudo dos componentes da variância	62
5.1.1.	Verificação dos pressupostos da ANOVA	62
5.2.	Resultado dos componentes da variância.	65
5.3.	Efeito do pré-tratamento	67
5.4.	Efeito do pH na bioabsorção	69
5.4.1.	Efeito do pH inicial na bioabsorção	69
5.4.2.	Efeito do pH controlado na bioabsorção	72
5.5.	Isoterma de bioabsorção	74
5.5.1.	Isoterma de bioabsorção sem controle de pH	74
5.5.2.	Isoterma de bioabsorção com controle de pH	77
5.6.	Ciclos de sorção- desorção	83
5.7.	Cinética da bioabsorção	85
6.	CONCLUSÕES	89
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
8.	BIBLIOGRAFIA	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens da Mina do Sossego. A: Imagem aérea (Google Earth). B: Foto da cratera da mina. C: Foto da barragem de rejeitos.	22
Figura 2- Principais mecanismos da bioissorção.	27
Figura 3 - Isotermas de bioissorção (VOLESKY, 2007).	29
Figura 4 - Isotermas de adsorção segundo a classificação de Brunauer, tipo I a III (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011).	30
Figura 5 - Diagrama especiação do cobre (T = 25°C) (WILLIAM et al., 2011).	40
Figura 6 - Diagrama de especiação do cobre em função da temperatura (WILLIAM et al., 2011).	41
Figura 7 - Fungo <i>Rhizopus microsporus</i>	45
Figura 8 - Recipientes de cultivo do fungo <i>Rhizopus Microsporus</i>	46
Figura 9 - Biomassa úmida submetida a pré-tratamento térmico (morta).	47
Figura 10 - Biomassa úmida não submetida a pré-tratamento térmico (viável).....	47
Figura 11 - Procedimento experimental de bioissorção.	51
Figura 12 - Unidades experimentais utilizadas (12 unidades).	52
Figura 13 - Sistema de filtração a vácuo utilizado.	52
Figura 14 - Delineamento experimental para quantificação do erro experimental.....	53
Figura 15 - Delineamento experimental do experimento do efeito do pré-tratamento térmico sobre a capacidade de bioissorção do fungo.	54
Figura 16 - Delineamento experimental do experimento do efeito de pH.....	55
Figura 17 - Delineamento experimental do experimento da isoterma de bioissorção.	56

Figura 18 - Procedimento experimental para um ciclo de sorção-dessorção.....	58
Figura 19 - Delineamento experimental para o experimento de ciclos de sorção-dessorção.....	58
Figura 20 - Delineamento experimental para o experimento da cinética de bio sorção.....	60
Figura 21 - Quadro de experimentos.....	61
Figura 22 - Resultado do teste de normalidade de Anderson-Darling ($\alpha = 5\%$).	63
Figura 23 - Resultado do teste de homocedasticidade para a Leitura EAA ($\alpha = 5\%$).	64
Figura 24 - Dispersão de resíduos da capacidade de bio sorção (mg/g) versus ordem da observação.....	65
Figura 25 - Efeito do pH na capacidade de bio sorção de cobre. $C_o = 100 \text{ mg/L}$, $C_b = 2,5 \text{ g/L}$, $\omega = 150 \text{ rpm}$, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 20 \text{ horas}$	70
Figura 26 - Efeito do pH controlado na capacidade de bio sorção de cobre. $C_o = 100 \text{ mg/L}$, $C_b = 2,5 \text{ g/L}$, $\omega = 150 \text{ rpm}$, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 12 \text{ horas}$ (Após pH constante).....	72
Figura 27 - Isotermas de equilíbrio segundo modelos de Langmuir e Freundlich. $pH=3,15 \text{ a } 4$, $C_b = 2,5 \text{ g/L}$, $\omega = 150 \text{ rpm}$, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 20 \text{ horas}$	75
Figura 28 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Langmuir para pH não controlado.....	75
Figura 29 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Freundlich para pH não controlado.	76
Figura 30 - Isotermas de equilíbrio segundo modelos de Langmuir e Freundlich. $pH 5$ e $pH 1$, $C_b = 2,5 \text{ g/L}$, $\omega = 150 \text{ rpm}$, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 20 \text{ horas}$	78
Figura 31 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Langmuir para pH 1 e 5.	78

Figura 32 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Freundlich para pH 1 e 5.....	79
Figura 33 - Comparação de isothermas de equilíbrio segundo modelo de Langmuir. 81	
Figura 34 - Capacidade de bioissorção na etapa de sorção para 3 ciclos sucessivos.	83
Figura 35 - Capacidade de bioissorção na etapa de dessorção para 3 ciclos sucessivos.....	84
Figura 36 - Resultado da remoção de cobre em função do tempo. $C_0 = 150 \text{ mg/L}$, $pH_{\text{inicial}} = 5$, $C_b = 2,5 \text{ g/L}$, $\omega = 150 \text{ rpm}$, $T = 25^\circ\text{C}$	86
Figura 37 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de pseudo-primeira ordem.	87
Figura 38 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de pseudo-segunda ordem.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens da bio sorção em relação à bioacumulação (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).....	25
Tabela 2 - Resultado ANOVA para a remoção de metal ($\alpha = 5\%$).	66
Tabela 3 - Componentes da variância.....	66
Tabela 4 - Resumo da capacidade de bio sorção em função do pré-tratamento.	68
Tabela 5 - Resultado ANOVA efeito pré-tratamento ($\alpha = 5\%$).....	68
Tabela 6 - Variação do pH entre o início e o equilíbrio da bio sorção.	69
Tabela 7- Resumo da capacidade de bio sorção em função do pH.	70
Tabela 8 - Resultado ANOVA efeito pH ($\alpha = 5\%$).....	70
Tabela 9 - Resultado teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).	71
Tabela 10 - Resumo da capacidade de bio sorção em função do pH controlado.....	73
Tabela 11- Resultado ANOVA efeito pH controlado ($\alpha = 5\%$).....	73
Tabela 12 - Coeficientes de determinação para os modelos de Langmuir e Freundlich.....	76
Tabela 13 - Coeficientes de determinação para os modelos de Langmuir e Freundlich.....	79
Tabela 14 - Coeficientes dos modelos de Langmuir e Freundlich encontrados na literatura para a bio sorção de cobre.	82
Tabela 15 - Perda de massa do bio sorvente na dessorção após três ciclos.	85
Tabela 16 - Coeficientes de determinação para os modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.	88

LISTA DE SÍMBOLOS

V : Volume da solução (L)

C_0 : Concentração inicial de metal na solução (mg metal / L)

m_s : Massa de biomassa em base seca (g)

m_u : Massa de biomassa em base úmida (g)

m_i : Massa seca inicial

m_f : Massa seca final

m_{am} : Massa de amostra (g)

m_{ac} : Massa de solução ácida (g)

FD : Fator de diluição

U: Umidade do sólido (%)

C_b : Concentração de biomassa em base seca (g / L)

C_{Eq} : Concentração final de metal na solução no equilíbrio (mg / L)

Q_{Eq} : Capacidade de bioadsorção no equilíbrio (mg metal / g biomassa)

Q_{Eq}^D : Capacidade de bioadsorção no equilíbrio no ciclo de dessorção (mg metal / g biomassa)

Q_t : Grau de bioadsorção em um tempo qualquer (mg/g)

K_L : Constante de Langmuir (L / g)

q_{max} : Capacidade máxima de adsorção do soluto para ocupar toda a superfície (mg / g)

K_f : Constante adimensional associada a capacidade de adsorção.

n : Constante adimensional associada a intensidade de adsorção.

K_1 : constante de velocidade de reação de pseudo-primeira ordem (1/min)

K_2 : constante de velocidade de reação de pseudo-segunda ordem

(g / (mg. min))

ω : frequência de agitação (rpm)

T : Temperatura (°C)

t_c : Tempo de contato (horas)

t: Tempo (min)

GL : Graus de Liberdade

SQ: Soma de Quadrados

QM: Quadrados Médios

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e urbano, por estar associado ao aumento progressivo do consumo de recursos naturais, tem originado uma série de problemas ambientais e à saúde do homem devido à emissão de poluentes no ar, solo e água. Um dos maiores desafios da atualidade é, portanto, tornar a industrialização compatível com a preservação da natureza e do homem, buscando, assim, o desenvolvimento sustentável. A elaboração de processos de tratamento de efluentes mais econômicos faz parte desse empenho, uma vez que nem sempre é possível eliminar ou reduzir a formação de poluentes em processos industriais.

De todos os tipos de poluição, aquela relacionada a metais pesados tem recebido uma atenção especial devido à alta toxicidade dos metais, a não biodegradabilidade e tendência de acumular-se na cadeia alimentar. Dentre os metais pesados, o mercúrio, cádmio, chumbo, cromo (VI) são os mais nocivos. O cobre, também considerado um metal pesado, na forma solúvel é prejudicial aos seres vivos, podendo causar danos no fígado e rins e até a morte (REZAEI; KULKARNI; SAPTARSHI, 2011). Apenas dissolvido em baixíssimas concentrações o metal age como um micronutriente essencial para os seres vivos.

Os limites de concentração do cobre tolerados em efluentes são muito restritos no Brasil, a resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011, estabelece que o limite do cobre dissolvido em lançamentos de efluentes seja de no máximo 1mg/L. Enquanto que, por exemplo, na operação de indústrias de galvanoplastia e de processamento de metal, a concentração de íons cobre pode se aproximar a faixa de 100 a 120 mg/L (AKSU; SAG; KUTSAL, 1992)

O cobre metálico possui alto valor agregado, é o terceiro metal mais utilizado no mundo, atrás do ferro e do alumínio. Trata-se de um metal maleável, reciclável, resistente à corrosão e a altas temperaturas. É empregado na geração e na transmissão de energia, em fiações e em praticamente todos os equipamentos eletrônicos. Ao mesmo tempo em que a grande quantidade de rejeitos, provenientes de sua exploração e processamento, gera preocupação em relação ao impacto ambiental, o tratamento destes em conjunto com a recuperação do metal torna-se ainda mais importante.

Atividades mineradoras de cobre incluem-se nesse cenário. Seus rejeitos de mineração são caracterizados por ocuparem enormes áreas e possuírem concentrações muito diluídas do metal, porém, muitas vezes, ainda acima dos limites seguros. Promover a lixiviação do rejeito para a fase líquida e em seguida a remoção do metal, pode ser considerado uma maneira promissora de tornar a contenção dos rejeitos mais segura para o meio ambiente enquanto propicia a recuperação do metal.

A Mina do Sossego em Canaã dos Carajás (ilustrada na figura 1), localizada no estado do Pará, pertencente à mineradora Companhia Vale S.A, da qual o principal metal extraído é o cobre, é um exemplo desta situação. Tal mina tem capacidade de produção estimada em 150 milhões de toneladas de cobre por ano, a partir de minério com 1% de teor médio do metal. Neste local ocorre o processo de beneficiamento do cobre, o qual visa aumentar o teor de concentração até 30% do minério, o qual, então, é encaminhado ao mercado brasileiro e mundial. O rejeito sólido e a água resultante do processo são lançados em uma barragem de 20 milhões de metros cúbicos. Onde foram jogados mais de 90 milhões de toneladas de rejeito com um teor de 0,07% de cobre, conforme divulgado pela empresa em 2012.

Uma série de processos tradicionais mostra-se disponível para tratar e recuperar metais pesados de efluentes, como a precipitação, técnicas eletroquímicas, osmose reversa, evaporação e a troca iônica. A precipitação é um processo simples, de baixo custo, mas requer o uso de agentes químicos para precipitar o metal que levam à formação de grandes quantidades de resíduos sólidos na forma de lamas que tornam difícil a recuperação do metal. Técnicas eletroquímicas e a evaporação exigem alto consumo de energia, tornando o processo bastante oneroso principalmente para baixas concentrações de metal. A osmose reversa é uma técnica muito utilizada na remoção de íons em solução, gerando efluentes muito puros. No entanto, a sua operação exige altas pressões e o uso de membranas de alto custo. A troca iônica apresenta a vantagem de ser eficiente na remoção de íons em baixas concentrações, no entanto, o custo da resina é elevado e também há um alto consumo de reagentes químicos para regeneração desta.

A bioissorção é uma alternativa interessante para tratamento do efluente em questão. Esta pode ser definida como um processo no qual certos microrganismos ligam-se passivamente, mediante processos físico-químicos, com íons ou outras moléculas em soluções. Bioissorventes como algas, fungos e bactérias são exemplos de biomassas utilizadas para a sorção de várias espécies metálicas, entre elas o cobre. Um dos seus principais atrativos é a alta capacidade de retenção de metais na biomassa mesmo para efluentes contendo baixos teores de metal. Outra vantagem é o baixo custo desta, a qual pode ser inclusive procedente de rejeitos industriais de fermentação ou de fonte natural abundante, como algas marinhas (SCHIEWER; VOLESKY, 1996). Outras vantagens da bioissorção incluem: possibilidade de recuperação do metal retido na biomassa e baixo custo operacional, pois o processo ocorre à temperatura e pressão ambiente. Além disso, o processo pode ocorrer no próprio local contaminado (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008). Como em outros métodos de separação, há consumo de reagentes associado à mudança de pH necessária nas etapas de sorção e dessorção, onde a biomassa é regenerada.

Resultados encorajadores mostrando o potencial da bioissorção foram reportados na literatura para diversos microrganismos. Altos valores de sorção de diversos metais, representados pela capacidade de bioissorção (mg de metal sorvido por grama de bioissorvente), foram obtidos experimentalmente. Como, por exemplo, de 185 mg/g na bioissorção de tório por *Rhizopus arrhizus* (TSEZOS; VOLESKY, 1981), de 54 mg/g de cobre por *Sargassum vulgare* (DAVIS; VOLESKY; VIEIRA, 2000) e de 139 mg/g de cádmio por *Laminaria digitata* (DAVIS et al., 2004).

Ao longo de 60 anos de pesquisa sobre o processo da bioissorção, esta adquiriu maturidade em estudos de escala de laboratório e foi extensivamente explorada em artigos científicos. Nesse período, diversas patentes também foram criadas e até bioissorventes comerciais desenvolvidos a partir da imobilização de bioissorventes específicos, sendo os principais o BIO-FIX, o AMT-BIOCLAIM™ e o AlgaSORB™. Apesar de possuir muitas vantagens, até o momento o processo não tem sido largamente aplicado em escala industrial. Segundo Michalak, Chojnacka e Witek-Krowiak (2013), razões que impedem isso são as baixas estabilidade e resistência mecânica da biomassa e de problemas relacionados à regeneração do

biossorvente devido a sua deterioração. Já Volesky e Naja (2005) não atribuem essa falta de sucesso a aspectos técnicos, mas sim a dificuldades envolvidas na comercialização de inovações tecnológicas, como a necessidade de grandes investimentos. Além disso, segundo os autores, o pioneirismo e a propagação de tecnologias ambientais inovadoras ainda não são suficientemente atraentes para grandes empresas.

Diante do exposto, visando contribuir para a resolução da problemática ambiental causada por efluentes contaminados com metais pesados e cooperar para a compreensão do mecanismo da bio sorção, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de bio sorção de íons cobre (II) pela biomassa do fungo *Rhizopus microsporus*. Este fungo foi um dos vários microrganismos coletados e isolados da região de rejeitos da mina do Sossego, e por ter demonstrado maior afinidade ao cobre (II) e maior facilidade de ser cultivado em análises preliminares, foi o escolhido para o presente trabalho. A avaliação do potencial será realizado por meio de ensaios experimentais em regime batelada sob temperatura e agitação constantes para a determinação de isoterms de bio sorção com e sem controle de pH, do efeito de fatores como pH e pré-tratamento térmico na capacidade de bio sorção, da cinética da bio sorção e da capacidade de regeneração do biossorvente para sucessivos ciclos de sorção e dessorção.

Figura 1 - Imagens da Mina do Sossego. A: Imagem aérea (Google Earth). B: Foto da cratera da mina. C: Foto da barragem de rejeitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é o estudo de equilíbrio e cinético da bioissorção de íons de cobre (II) pelo fungo *Rhizopus microsporus*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar e quantificar os componentes da variância da concentração de cobre nos experimentos de bioissorção.
- Analisar o efeito do pré-tratamento térmico na capacidade de bioissorção.
- Analisar o efeito do pH na capacidade de bioissorção.
- Determinar isotermas de bioissorção e verificar o ajuste dos modelos de adsorção aos dados experimentais.
- Verificar a capacidade de regeneração do bioissorvente para sucessivos ciclos de sorção e dessorção.
- Estudo de cinética da bioissorção e verificar o ajuste dos modelos de adsorção aos dados experimentais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biossorção

A interação de microrganismos com metais já é conhecida há algumas décadas, sendo a maior parte dos primeiros estudos associada à toxicologia do metal no microrganismo. No entanto, esforços têm sido realizados com o intuito de atrelá-la a uma técnica capaz de tratar efluentes industriais pela remoção do metal (NAJA; MURPHY; VOLESKY, 2010). Apesar de muitos materiais biológicos serem capazes de interagir com metais pesados, somente aqueles com uma alta capacidade de interação e seletividade com os metais são adequados para processos de grande escala (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

Primeiramente é importante distinguir duas terminologias relacionadas ao processo de remoção de íons metálicos por microrganismos. Segundo Kappor e Viraraghavan (1995), o mecanismo pode ser ativo e, portanto, recorrente em microrganismos vivos, denominado como bioacumulação, ou de interação passiva entre metal e biomassa, conhecida como biossorção. O primeiro é associado à captura de espécies metálicas por meio de mecanismos dependentes do metabolismo celular, os quais estão envolvidos no transporte para o interior da célula e entre componentes intracelulares (VOLESKY, 2007). Pode envolver o mesmo processo de transferência de íons essenciais como potássio, magnésio e sódio por metais pesados de carga e raio iônico similares (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Enquanto que a biossorção compreende a interação de cátions ou ânions com o microrganismo por mecanismos que não envolvem gasto energético, seja metabólico ou de transporte (KAPOOR; VIRARAGHAVAN; CULLIMORE, 1999). Pode ocorrer em células mortas ou vivas. No caso de células vivas, a bioacumulação e biossorção podem inclusive ocorrer simultaneamente (TOBIN; WHITE; GAAD, 1994). Os mecanismos responsáveis pela biossorção podem diferir de acordo com a natureza da biomassa e com a espécie iônica sorvida.

Em geral, processos de biossorção são mais vantajosos que de bioacumulação, suas principais vantagens incluem o menor custo, menor sensibilidade a fatores como o pH e temperatura, e taxa de remoção mais rápida, como mostra a tabela 1. Inclusive, observa-se o uso mais frequente de células

mortas do que vivas em estudos de sorção de metais por microrganismos. No entanto, em alguns casos a bioacumulação apresenta algumas vantagens conforme menciona Malik (2004). O uso de culturas vivas em crescimento poderia eliminar a necessidade do processo de produção de biomassa, exemplo: cultivo, coleta, secagem, processamento e armazenamento. Células vivas podem permitir o desenvolvimento de um processo de um estágio único de remoção da maior parte de poluentes presentes em efluentes industriais, pois possuem a capacidade de degradar complexos orgânico-metálicos e compostos orgânicos, além de também poderem remover íons inorgânicos como amônio, nitrato e fosfato. O conteúdo rico de exopolímeros constituintes de biofilmes, presentes em células vivas, podem também auxiliar o aprisionamento de sólidos dispersos e de metais dissolvidos.

Tabela 1 - Vantagens da bioissorção em relação à bioacumulação (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

	Bioissorção	Bioacumulação
Custo	Geralmente baixo. A maior parte dos bioissorventes usados é proveniente de resíduos industriais e agrícolas.	Geralmente alto. O processo envolve células vivas, exigindo a utilização de nutrientes.
pH	O pH da solução tem forte influencia na captura de metais. No entanto, a faixa de pH de interesse industrial é larga.	Além de influenciar a remoção de metais, as células vivas em geral são negativamente afetadas sob condições extremas de pH.
Temperatura	Como a biomassa é inativa, a temperatura possui pequena influência no processo.	Temperatura possui efeito significativo.
Armazenamento	Fácil de manter.	Energia é necessária para manter a cultura.
Grau de remoção do metal	Tende a ser mais alto do que em células vivas.	Por causa da sensibilidade das células vivas a altas concentrações de agentes tóxicos, tende a

		ser baixo.
Taxa de remoção	Geralmente rápida.	Geralmente mais lenta que a bioissorção, devido à pequena taxa do transporte intracelular
Regeneração e reuso	Possibilidade de regeneração da biomassa, com perspectiva de reuso em vários ciclos.	Como a maior parte dos poluentes é acumulada internamente, as possibilidades são limitadas.
Recuperação do poluente	Utilizando-se um eluente apropriado, a recuperação é possível. Em muitos casos soluções ácidas ou básicas mostram-se eficientes na remoção.	Mesmo se possível, a biomassa não poderá ser utilizada no próximo ciclo.

3.2. Mecanismos da bioissorção

Bioissorventes são capazes de sequestrar íons em solução devido à presença de grupos químicos ativos em sua estrutura. Os principais grupos químicos da biomassa que são capazes de participar da bioissorção são grupos eletronegativos, como hidroxilas e sulfidrilas; grupos aniônicos, como carboxílicos e fosfáticos, e grupos contendo nitrogênio como as aminas (AHLUWALIA; GOYAL, 2007). A parede celular de fungos filamentosos e bactérias demonstra ter um papel importante na bioissorção devido à presença de um grande número dos sítios ativos mencionados.

Por envolver estruturas complexas de microrganismos, o mecanismo da bioissorção de metais ainda não é totalmente conhecido. Pode ser composto de vários processos, os quais podem diferir qualitativamente e quantitativamente de acordo com o tipo de biomassa, sua origem e processamento (DAVIS; VOLESKY; VIEIRA, 2000). Segundo Veglio e Beolchini (1997), a bioissorção que independe do metabolismo envolve os seguintes mecanismos: a precipitação, a adsorção física, a

troca iônica e a complexação. Estes, considerados os principais mecanismos da bioissorção, são mostrados pela figura 2 e discutidos em maiores detalhes a seguir.

Figura 2- Principais mecanismos da bioissorção.

3.2.1. Adsorção física

Nesse processo, átomos ou íons em fase líquida interagem com a superfície de um sólido, no caso da bioissorção, a biomassa. A interação entre o adsorvente e o adsorvato pode ocorrer por forças intermoleculares fracas, como a de van der Waals. O processo pode ser reversível e depende das características e estrutura morfológica do bioissorvente. Segundo Kuyucak e Volesky (1988), a bioissorção de urânio, cádmio, zinco, cobre e cobalto por biomassa morta de alga, fungo e leveduras ocorre através de forças eletrostáticas entre íons metálicos e a parede celular do organismo. Também foi comprovado que tais forças são responsáveis pela bioissorção de cromo pelos fungos *Ganoderma lucidum* e *Aspergillus Níger* (AKSU; SAG; KUTSAL, 1992).

3.2.2. Troca iônica

No processo de troca iônica ocorre uma reação química nas quais íons em solução, de carga positiva ou negativa, substituem íons similares e deslocáveis de mesma carga, contidos em um trocador iônico sólido. A parede celular de microrganismos é composta por polissacarídeos (NOURBAKHS et al., 1994). Estes realizam troca iônica com metais bivalentes. Por exemplo, o alginato, presente em algas marinhas, é geralmente composto por sais naturais de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} . Esses íons metálicos podem ser substituídos por íons como Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} , resultando na bioissorção de metais (KUYUCAK; VOLESKY, 1988). A troca

iônica é também responsável pela bio sorção de cromo e chumbo por *Arribadas algae* (MATOS et al., 2009).

3.2.3. Complexação

Processo de formação de uma espécie poliatômica que consiste em um íon metálico central rodeado por diversos ligantes, sendo considerado ligante um íon ou molécula (SKOOG et al., 2005). A captura de metais em uma solução pode também ocorrer pelo fenômeno de formação de complexos, ou mecanismo de coordenação, na superfície da célula, devido à interação entre o metal e grupos ativos da parede celular. Agentes quelantes podem ser biossurfactantes, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Estes geram atração eletrostática com íons metálicos, esta ligação pode ocorrer sem a transferência de elétrons (PERPETUO; SOUZA; NASCIMENTO, 2011). Aksu, Sag e Kutsal (1992) sugeriram a hipótese de que a bio sorção de cobre por *C. vulgaris* e *Z. ramigera* ocorre por adsorção física e a formação de ligações coordenadas entre metais com grupos amina e carboxílicos dos polissacarídeos constituintes da parede celular.

3.2.4. Precipitação

A precipitação de metais pode ou não envolver o metabolismo celular (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). No caso onde há a dependência, o acúmulo de metais geralmente está associado ao mecanismo de defesa ativo do microrganismo. Este irá reagir à presença do metal produzindo compostos que favorecem o processo de precipitação (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). No caso da precipitação não dependente do metabolismo celular, esta pode ser uma consequência da interação entre metal e a parede celular.

3.3. Isotermas de bio sorção

O estudo do equilíbrio termodinâmico de sistemas constituídos por soluções em contato com biomassa é fundamental para o projeto de processos de bio sorção. O desempenho do processo é avaliado principalmente pela quantidade de metal que o bio sorvente consegue reter em sua estrutura e pela concentração de metal remanescente na fase líquida.

O sistema em pauta consiste de uma fase sólida (sorvente ou bioissorvente) e uma fase líquida (solvente, normalmente água) contendo espécies dissolvidas a serem sorvidas (sorvato ou íons metálicos). O equilíbrio neste tipo de sistema é usualmente representado por meio de isotermas de bioissorção, conforme mostrada na figura 3. O eixo das coordenadas mostra a capacidade de bioissorção de metal no equilíbrio (Q_{Eq}), definida como a massa de metal bioissorvida por unidade de massa de microrganismo, e no eixo das abscissas, a concentração de metal na solução (C_{Eq}). A isoterma é válida para uma dada temperatura e pH.

Figura 3 - Isotermas de bioissorção (VOLESKY, 2007).

A forma da isoterma é um parâmetro útil para se projetar processos de bioissorção. Existem diversos tipos de isotermas de adsorção, no entanto, a maioria delas se enquadra em umas das cinco categorias propostas por Brunauer para sistemas gás-sólido. A figura 4 ilustra três destas, as quais são consideradas as mais relevantes para sistemas de bioissorção. Nestas figuras, que representam a adsorção física para gases puros, o eixo das abscissas representa a pressão relativa do gás (pressão total/pressão de vapor) e o das ordenadas, a quantidade de gás adsorvido.

Figura 4 - Isothermas de adsorção segundo a classificação de Brunauer, tipo I a III (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011).

A isoterma mais simples é do tipo I, a qual corresponde à adsorção unimolecular por gases acima de sua temperatura crítica. Ela caracteriza-se por um limite máximo na quantidade de soluto adsorvida. Isothermas do tipo II estão associadas à adsorção multimolecular (Método de Brunauer, Emmett, e Teller ou BET) para gases abaixo de sua temperatura crítica. Isothermas do tipo III correspondem à adsorção multimolecular (BET), onde o calor da adsorção da primeira camada é menor do que nas camadas sucessivas (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011).

Isothermas do tipo I e II são designadas como favoráveis a sorção devido a sua concavidade para baixo, enquanto isothermas do tipo III são desfavoráveis. Uma isoterma favorável ao processo de adsorção de adsorbatos é desfavorável à liberação destes (PERRY et al., 1999).

Fazendo-se uma analogia com a biossorção, é desejável uma alta inclinação da curva a partir da origem (WANG; CHEN, 2009; KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998), o que indicaria uma baixa concentração residual do metal no líquido a ser purificado em equilíbrio com uma alta concentração do metal na biomassa. Por outro lado, isothermas com baixa inclinação teriam um papel na remoção do metal sorvido, sendo adequadas para o processo de dessorção. Outro aspecto igualmente importante é a capacidade máxima de biossorção, pois esse indicará o desempenho

teórico da biomassa para altas concentrações de metal (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998). Estas duas propriedades, inclinação e capacidade máxima, são essenciais para a verificação da viabilidade de um processo de sorção.

As isotermas de bioadsorção frequentemente são representadas por equações semi-empíricas de modelos de adsorção (VOLESKY, 2007). As mais utilizadas são as de Langmuir e Freundlich. Apesar de não representarem fisicamente o mecanismo de interação entre o soluto e o sólido, constata-se que ambos os modelos são muito utilizados para descrever os valores experimentais da bioadsorção.

3.3.1. Isoterma de Langmuir

Langmuir desenvolveu um modelo para prever o grau de adsorção de um gás sobre uma superfície como função da pressão do fluido. Nesse modelo há as seguintes considerações (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011).

- A reação é de adsorção química
- Sítios de adsorção possuem energia igualmente distribuída (a entalpia de adsorção, ΔH_{ads} , é constante) e são distribuídos homogeneamente na superfície do adsorvente em monocamadas.
- Cada sítio pode acomodar somente uma molécula de adsorvato.
- Interações desprezíveis entre moléculas adsorvidas.

A expressão da isoterma de Langmuir é representada pela equação 1:

$$Q_{Eq} = \frac{q_{max} K_L C_{Eq}}{1 + K_L C_{Eq}} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

K_L : Constante de Langmuir (razão entre as taxas de adsorção e dessorção) (L / mg)

q_{max} : Capacidade máxima de adsorção do soluto, ocorre quando ele ocupa toda a superfície em uma monocamada (mg / g);

C_{eq} : Concentração de metal na solução no equilíbrio (mg / L);

Q_{eq} : Capacidade de bioadsorção no equilíbrio (mg metal / g biomassa)

O parâmetro K_L determinará a inclinação da curva a partir da origem enquanto o parâmetro q_{max} será a assíntota horizontal da curva. Ambos podem ser determinados transformando a equação de Langmuir para a forma linear. A equação linearizada de Langmuir é expressa na Equação 2.

$$\frac{C_{Eq}}{Q_{Eq}} = \frac{1}{q_{max}K_L} + \frac{C_{Eq}}{q_{max}} \quad \text{Equação 2}$$

Representando C_{eq}/Q_{eq} na ordenada e C_{eq} na abscissa. O termo $1/q_{max}$ é o coeficiente angular e o termo $1/(q_{max}K_L)$ a interseção da reta com o eixo das ordenadas.

3.3.2. Isoterma de Freundlich

Este modelo empírico pode ser aplicado a sistemas não ideais, em superfícies heterogêneas em sorção multicamada (NAJA; MURPHY; VOLESKY, 2010). A expressão matemática da isoterma de Freundlich é dada pela equação 3:

$$Q_{Eq} = K_f C_{Eq}^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

Q_{eq} : Capacidade de bioadsorção no equilíbrio (mg/g).

C_{eq} : Concentração de metal na solução no equilíbrio (mg / L)

K_f : Constante adimensional associada à capacidade de adsorção.

n : Constante adimensional associada à intensidade de adsorção.

As constantes n e K_f podem ser determinadas experimentalmente pela equação linearizada de Freundlich. Esta é expressa na equação 4.

$$\ln Q_{Eq} = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_{Eq} \quad \text{Equação 4}$$

O gráfico de $\ln(Q_{eq})$ em função de $\ln(C_{eq})$ é uma reta com interseção igual a $\ln K_f$ e inclinação igual a $1/n$.

3.4. Fatores que afetam a capacidade de bio sorção

A capacidade de bio sorção de metal pela biomassa pode variar devido a diversos fatores. Por exemplo, a presença de outros íons metálicos na solução pode gerar uma competição pelos sítios ativos da biomassa. Assim como a presença de agentes orgânicos, provenientes ou não do metabolismo celular, podem gerar a precipitação ou a complexação dos metais. Fatores como pH, temperatura, estrutura física da biomassa podem causar efeito significativo na captura de metais, e são os mais estudados. (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; NAJA; MURPHY; VOLESKY, 2010).

Efeito do pH: Muitos estudos descrevem o pH como sendo um dos fatores mais importantes na bio sorção de cátions. Observa-se uma inibição da bio sorção em meios ácidos e um favorecimento do processo em meios básicos. A explicação deste fenômeno, segundo Galli et al (2003), deve-se ao fato do pH determinar a carga superficial da superfície da biomassa. Em soluções ácidas, uma grande quantidade de íons H^+ compete com cátions metálicos pelos sítios de ligação no bio sorvente. O pH também determina a disponibilidade de íons metálicos livres na solução devido ao fenômeno da especiação.

Efeito da temperatura: A maior parte dos estudos do efeito da temperatura da bio sorção restringe-se a uma faixa estreita, em torno de 15 a 50° C. Observam-se diferentes efeitos da temperatura para diferentes metais e microrganismos. Galli et al (2003), demonstra que para a faixa de 20 a 35°C não há efeito significativo na bio sorção de Cu^{2+} por *Auricularia polytricha*. Carmona, Silva e Leite (2005) demonstraram um favorecimento da temperatura na sorção de íons Cr^{6+} por *Sargassum* sp na faixa de 29 a 55°C. Enquanto que Bai e Abraham (2001) verificaram uma redução na sorção de Cr^{6+} por *Rhizopus nigricans* para temperaturas maiores que 45 °C.

Estrutura física da biomassa: Como o potencial de bio sorção depende de vários aspectos da composição química da biomassa, qualquer fator que modifique essa composição poderá causar efeito no processo. Uma característica notável da

bioissorção é o grau de especificidade do bioissorvente por cátions de metais pesados bivalentes e multivalentes (VOLESKY, 1987). A captura de metal pode variar significativamente entre gêneros de bactérias e mesmo para diferentes cepas mutantes dentro de uma espécie. O estado nutricional do organismo, condição fisiológica, idade das células, disponibilidade de micronutrientes (metálicos) durante o crescimento são exemplos de parâmetros que podem afetar o desempenho da bioissorção (VOLESKY, 1987). A capacidade de bioissorção de células mortas pode ser maior, equivalente ou menor do que de células vivas (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

3.5. Cinética da bioissorção

Enquanto na termodinâmica é estudada a direção e extensão de uma transformação química, na cinética estudam-se as mudanças nas propriedades químicas ao longo do tempo. A quantificação dos parâmetros cinéticos é de grande importância para a implantação de processos industriais para a despoluição de efluentes contaminados por metais pesados (AZIZIAN, 2004).

A cinética da bioissorção é representada pela variação do grau de bioissorção (Q_t) ao longo do tempo. Q_t é definido como a massa de metal bioissorvida por unidade de massa de microrganismo. Para um tempo de contato suficientemente longo, o grau de bioissorção se aproxima da capacidade de bioissorção (Q_{Eq}).

Analogamente ao estudo do equilíbrio (termodinâmica), a cinética da bioissorção também pode ser representada por modelos de adsorção. Os dois modelos mais utilizados na literatura para descrever o comportamento da bioissorção ao longo do tempo são de pseudo-primeira ordem e o de pseudo-segunda ordem.

3.5.1. Modelo de pseudo-primeira ordem

O modelo de pseudo-primeira ordem, desenvolvido por Lagergren, é um dos mais utilizados para descrever a cinética de adsorção de um soluto pelo material adsorvente em fase líquida (HO; MCKAY, 1999; AZIZIAN, 2004). Neste modelo considera-se que a taxa de ocupação dos sítios de adsorção é proporcional ao número de sítios desocupados (RAKHSHAEI; KHOSRAVI; GANJI, 2006). O modelo é descrito pela equação 5.

$$\frac{dQ_t}{dt} = K_1(Q_{Eq} - Q_t) \quad \text{Equação 5}$$

Sendo:

Q_t : Grau de bioissorção em um tempo qualquer (mg/g).

Q_{eq} : Capacidade de bioissorção no equilíbrio (mg metal / g biomassa)

K_1 : constante de velocidade de reação de pseudo-primeira ordem (1/min).

Integrando a equação 5 entre os limites de tempo $t=0$ a $t=t$ e grau de bioissorção de $Q_t=0$ a $Q_t=Q_t$ e linearizando a equação resultante, obtém-se a equação 6 de pseudo-primeira ordem linearizada.

$$\ln(Q_{Eq} - Q_t) = \ln(Q_{Eq}) - K_1 t \quad \text{Equação 6}$$

A representação gráfica de $\ln(Q_{Eq} - Q_t)$ em função de t é uma reta com interseção igual a $\ln(Q_{Eq})$ e inclinação igual a $-K_1$.

HO e MCKAY (1999) constataram que o modelo de pseudo-segunda ordem representou melhor os dados da cinética da bioissorção em relação ao modelo de pseudo-primeira de diversos estudos publicados. Neste ultimo observou-se uma limitação para o intervalo completo do tempo de contato da bioissorção e mostrou-se aplicável somente para os primeiros 20 minutos do processo nos casos estudados.

3.5.2. Modelo de pseudo-segunda ordem

O modelo de pseudo-segunda ordem baseia-se na hipótese de que a taxa de ocupação dos sítios de adsorção é proporcional ao quadrado do numero de sítios desocupados (RAKSHAE; KHOSRAVI; GANJI, 2006). Este, ao contrario do anterior, mostra-se aplicável ao intervalo completo da bioissorção para todos os sistemas analisados por Ho e McKay (1999). O modelo é dado pela equação 7.

$$\frac{dQ_t}{dt} = K_2(Q_{Eq} - Q_t)^2 \quad \text{Equação 7}$$

Sendo:

K_2 : constante de velocidade de reação de pseudo-segunda ordem

(g / (mg. min))

A forma linearizada é dada pela equação 8.

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_2 Q_{Eq}^2} + \frac{1}{Q_{Eq}} t \quad \text{Equação 8}$$

A representação gráfica de t/Q em função de t é uma reta com interseção igual a $1/(K_2 Q_{Eq}^2)$ e inclinação igual a $1/Q_{Eq}$.

3.6. Dessorção e regeneração do bioissorvente

Uma das maiores vantagens da bioissorção é da possibilidade de regeneração da biomassa, reduzindo os custos do processo pela redução da necessidade de sua produção ou da dependência de seu fornecimento contínuo.

Quando a biomassa, contendo metal sorvido em sua estrutura, é colocada em uma solução eluente adequada, o metal é transferido para o eluente. O processo descrito é denominado dessorção. Ele se caracteriza por ter o equilíbrio do sistema biomassa-eluente fortemente deslocado no sentido do soluto dissolvido na solução. Este processo pode ocorrer mais facilmente quando o processo é de fisissorção.

Segundo Vijayaraghavan e Yun (2008), um processo de dessorção eficaz envolve a utilização de um eluente adequado, o qual dependerá fortemente do tipo de bioissorvente e o mecanismo envolvido. Além de possibilitar uma expressiva remoção do metal originalmente na biomassa, o eluente deve ser de baixo custo e inofensivo à biomassa e ao meio ambiente. O volume do eluente utilizado deve ser o menor possível para que no final do processo se obtenha uma solução concentrada do metal de interesse, assim bioissorvente e metal podem ser recuperados.

Verificam-se diversos estudos na literatura envolvendo a dessorção com os mais diversos eluentes. Como exemplo, a dessorção de cobre foi analisada por *Spirogyra* usando água e soluções aquosas de HCl, EDTA, H_2SO_4 , NaCl, (GUPTA et al., 2006); *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, e *Polyporus*

squamosus utilizando HNO_3 (0,05 M); *Phanerochaete chrysosporium* utilizando HCl (0,05 M) e *Rhizopus arrhizus*, *Cladosporium resinae* e *Penicillium italicum* por HCl , H_2SO_4 , HNO_3 e sulfatos de Mg, Mn, Zn, Ca, Cd, Fe, Na e K (ROME; GADD, 1987). Apesar de muitos reagentes químicos mostrarem considerável eficácia na dessorção do metal, estes podem ser nocivos à biomassa, como no caso de soluções alcalinas e ácidas fortes, frequentemente usadas nesse tipo de processo. Eluentes podem também modificar a estrutura física da biomassa. Autores como Vijayaraghavan et al (2007) reportaram que apesar da *Corynebacterium glutamicum* ter desempenhado bem na bio sorção de corante, a biomassa foi severamente danificada, apresentando perda de 42% de sua massa, no processo de dessorção por NaOH 0,1 M.

A capacidade de regeneração de um bio sorvente pode ser avaliada sujeitando-o a sucessivos ciclos de sorção e dessorção, e em cada etapa verificando se a capacidade de bio sorção foi mantida.

3.7. Erros experimentais na bio sorção e Análise de variância (ANOVA)

O estudo da bio sorção de metais requerem determinações de concentração de metal com grande precisão, muitos dados encontrados de capacidade de bio sorção na literatura situam-se na faixa de 1 a 20 miligramas de metal por grama de biomassa. No entanto, a natureza complexa de material biológico e métodos analíticos de determinação de concentração de metais podem provocar erros consideráveis, tornando difícil a conclusão de como fatores de interesse afetam a resposta. À vista disso, surge a necessidade de verificação e quantificação de fatores aleatórios (não controlados) existentes nos experimentos com o auxílio do método de análise de variância (ANOVA).

Primeiramente, é importante definir alguns conceitos gerais da experimentação.

Experimento: Também denominado de ensaio, é um procedimento planejado em condições especificadas para obter novos fatos, negar ou confirmar hipóteses ou resultados obtidos anteriormente. Exemplo: Experimento de investigação do efeito do pH.

Fator: Também chamado de variável independente. Trata-se de uma condição imposta que se deseja avaliar em um experimento. Como exemplo pode-se citar, temperatura, pH, concentração de reagentes. Fatores podem ser condições qualitativas ou quantitativas.

Nível: Também denominado de tratamento. São as varias divisões escolhidas para um fator. Exemplos podem ser faixas de valores de pH, temperatura e concentração.

Unidade experimental: É a unidade na qual o tratamento (nível) é aplicado. É na parcela que obtemos os dados que deverão refletir o efeito de cada tratamento nela aplicado. Exemplo: Recipiente contendo solução de metais em contato com bioissorvente sólido.

Repetição: número de vezes que um determinado tratamento é aplicado ou que é repetido.

Variável resposta: Objetivo principal da pesquisa. Também conhecida como variável dependente. São as medidas realizadas (observações) nas unidades experimentais após a aplicação de um ou mais tratamentos. Exemplo: Concentração no equilíbrio, capacidade de bioissorção.

Dados: Valores assumidos pela variável resposta. Exemplo: Valores de capacidade de bioissorção.

Amostra: É uma parte representativa de uma população. Exemplo: Uma porção de biomassa, uma alíquota de solução.

Delineamento experimental: O delineamento trata de regras que associam as unidades experimentais aos tratamentos e determinam os diferentes planos experimentais. A análise de variância é baseada no delineamento experimental utilizado. Exemplo: Delineamento inteiramente casualizado, delineamento hierarquizado.

Em um experimento é de interesse avaliar duas ou mais amostras, testando se existem diferenças significativas entre elas. A Análise de Variância, introduzida por R.A. Fisher, é essencialmente um processo aritmético para decompor a variação total entre as unidades experimentais em partes que podem ser atribuídas a causas

controladas (conhecidas) e em partes a causas não controladas e/ou não controláveis (desconhecidas), o erro ou resíduo (dos ANJOS, 2005).

A análise de variância consiste em um teste de hipótese para um dado nível de significância, na qual a hipótese de nulidade (H_0) que se formula é de que não há diferença entre as médias dos tratamentos (ausência de efeito pelo tratamento na resposta), enquanto a hipótese alternativa (H_1) é de que há diferença entre as médias de pelo menos um par de tratamentos (há efeito pelo tratamento na resposta).

Para que a técnica de análise de variância seja considerada válida, algumas pressuposições devem ser obedecidas (dos ANJOS, 2005).

- Os erros de observação devem ser independentes. Cada observação possui um erro que deve ser independente dos demais, seja das observações referentes ao mesmo tratamento, seja de observações referentes a outros tratamentos. Isso implica que os efeitos de tratamentos devem ser independentes, ou seja, que não ocorra correlação (associação) entre eles.
- Os erros devem ser normalmente distribuídos. Ou seja, devem possuir uma distribuição normal de probabilidade. Para que a análise de variância seja considerada válida, os erros devem ser originários da mesma população. Isso implica que todos os erros referentes às observações possuam a mesma distribuição de probabilidade.
- Os erros devem ter variância comum (homocedasticidade). Os componentes do erro devem ser todos estimados de uma mesma população. Isso implica que cada tratamento deve ter aproximadamente a mesma variância para que os testes da análise de variância tenham validade.

3.8. Especiação do cobre

O termo especiação refere-se à forma química e física de um elemento em solução, tais como associação com outros elementos ou moléculas, estado de

oxidação, estequiometria, coordenação. Essas propriedades comandam o comportamento químico dos elementos (REEDER; SCHOONEN; LANZIROTTI, 2006). Entender esse comportamento para metais multivalentes, como o cobre, tem diversas aplicações, já que esse comportamento define características como a reatividade, toxicidade e a solubilidade. Parâmetros como temperatura, pH e concentração possuem relevância sobre a especiação do cobre em soluções. William et al. (2011) propõem o comportamento da especiação do cobre em função do pH para a temperatura de 25 °C, o qual é mostrado a figura 5.

Figura 5 - Diagrama especiação do cobre (T = 25°C) (WILLIAM et al., 2011).

A figura 5 mostra que para baixas concentrações de cobre, o íon Cu^{2+} é a espécie dominante até o valor de pH 7,5. Para valores de pH entre 7,5 e 12,3, Cu(OH)_2 dissolvido torna-se a espécie dominante. A partir dessa faixa ocorre a formação do complexo Cu(OH)_3^- . Para altas concentrações do metal e elevado pH, Cu(OH)_2 sólido predomina. Nota-se que o domínio da estabilidade deste expande-se com o aumento da concentração de cobre tanto para baixos quanto para altos valores de pH.

William et al. (2011) realizaram também um estudo da especiação do cobre para três faixas de temperatura, 5°C, 25°C e 35°C. Este é mostrado na figura 6.

Figura 6 - Diagrama de especiação do cobre em função da temperatura (WILLIAM et al., 2011).

A figura 6 mostra uma diminuição no domínio de estabilidade de Cu^{2+} com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C, ocasionando a formação de hidróxidos. Contudo, verifica-se que a variação de temperatura, na faixa aplicada, possui pouca influência na especiação do cobre.

3.9. Fungo *Rhizopus microsporus*

Os fungos do gênero *Rhizopus* sp. são classificados segundo reino Fungi, filo Zygomycota, classe dos Zygomycetes, ordem Mucorales, família Mucoraceae, gênero *Rhizopus*, espécie *Microsporus*. Trata-se de um organismo que depende de matéria orgânica em decomposição para se desenvolver, sendo encontrado naturalmente no solo, frutos, alimentos e outros materiais em decomposição. Grande parte dos fungos, como os do gênero *Rhizopus*, desenvolvem-se através de estruturas denominadas hifas, sendo o conjunto emaranhado dessas denominado micélios. As hifas são células cilíndricas que têm como funções a fixação no substrato, a digestão extracelular e a reprodução. Estas células possuem parede celular cuja estrutura é similar à das paredes celulares dos vegetais, porém diferem na composição química. As paredes celulares fúngicas são compostas principalmente de quitina, enquanto que as das plantas têm principalmente celulose (KANAGAWA; NEVES, 2011). A função da quitina e da quitosana, principais

polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos, como agentes de bioabsorção de metais já está bem estabelecida (VOLESKI, 1991). Muitos estudos relacionados ao fungo do gênero *Rhizopus sp.* estão associados a patologia causada em vegetais e a produção de enzimas que possuem valor comercial. Porém, ainda não há registros de estudos avaliando potencial de bioabsorção de metais pesados do fungo em questão.

3.10. Experimentos de bioabsorção

Conforme já discutido, observa-se na literatura uma grande variedade de estudos de bioabsorção envolvendo a interação entre os mais diversos bioabsorventes e cátions ou ânions. Em relação à experimentação, há diversos aspectos que devem ser considerados. O primeiro deles é referente às soluções utilizadas. Verifica-se que a maior parte dos trabalhos utilizam soluções sintéticas, criadas a partir de água destilada ou água Milli-Q com a adição de sais dos metais de interesse, ao invés de efluentes reais. É sabido que estes raramente serão apresentados como soluções puras de um único metal, mas como uma variedade de íons que irão competir pelos mesmos sítios ativos presentes no bioabsorvente (KLEINÜBING et al., 2012). Efluentes reais também podem possuir diversas impurezas, de natureza orgânica ou inorgânica, dissolvidas, coloidais ou suspensas (VOLESKY, 2001). Um estudo envolvendo a interação desses demais componentes na bioabsorção pode tornar-se muito complexo em uma pesquisa cuja etapa ainda é a inicial.

Um segundo aspecto observado é que muitos estudos de bioabsorção são realizados com células mortas. Segundo Kapoor e Viraraghavan (1995), sistemas que usam células vivas tendem a ser mais sensíveis a concentração de íons metálicos (efeitos tóxicos) e condições adversas de operação (pH e temperatura), além de necessitarem fornecimento constante de nutrientes. O uso de células vivas, principalmente de fungos e bactérias, podem também oferecer riscos com relação a normas de Segurança e Saúde no Trabalho, o que poderia inviabilizar uma aplicação prática do processo.

O terceiro aspecto é referente ao processo. Este pode ocorrer em batelada, onde o contato sólido-solução é promovido em recipientes fechados, como erlenmeyers ou frascos de plástico, sob temperatura e agitação constantes. O uso

destes foi identificado em diversos estudos (HASAN; SRIVASTAVA; TALAT, 2009; NOURBAKHSI et al., 1994; ÖZER et al., 2009; VIJAYARAGHAVAN; PALANIVELU; VELAN, 2006; DAVIS et al., 2004). Foi constatado também o uso de reatores de leito fluidizado (PRAKASHAM et al., 1999) e até de reatores tipo *airlift*, (ROSTAMI; JOODAKI, 2002). A bio sorção pode ser também investigada em processos contínuos, como em colunas de leito fixo ou fluidizado (KRATOCHVIL; VOLESKY; DEMOPOULOS, 1997; BORBA et al., 2006; HUANG; HUANG; MOREHART, 1990). Estudo em colunas podem oferecer informações essenciais para o *scale up* de sistemas de sorção. No entanto, há questões que dificultam a realização de tais estudos, como a necessidade de imobilização, granulação ou processamento do bio sorvente para que este possa ser utilizado na coluna. Segundo Volesky (2001), a maior dificuldade de sistemas dinâmicos de sorção decorrem da necessidade de se analisar o equilíbrio de sorção, a transferência de massa e o escoamento do fluido ao mesmo tempo em que a saturação do sorvente progride, não somente em função do tempo, mas também em função da posição na coluna. Por fim, a informação mais importante para prever o desempenho de um sistema de sorção é proveniente do estudo de equilíbrio (VOLESKY, 2007). Essa informação pode ser adquirida de maneira mais simples através de ensaios tipo batelada, que apenas promovam o contato líquido-sólido por um tempo determinado.

O quarto aspecto diz respeito a duas metodologias distintas utilizadas em ensaios tipo batelada. Verificou-se que em diversos estudos, experimentos de bio sorção foram conduzidos ajustando-se apenas o pH inicial, ou seja, sem manter o seu controle ao longo do processo (AKAR; TUNALI; ÇABUK, 2007; GALLI et al., 2003; ÖZER et al., 2009; BAYRAMOGLU; BEKTAS; ARICA, 2003). Constata-se também, possivelmente em função das diferentes metodologias, uma divergência em relação à apresentação dos resultados, sendo parte reportado em função do pH inicial e a outra, em função do pH no equilíbrio. Como o presente trabalho visa a levantar informações referentes ao equilíbrio, os resultados serão apresentados da segunda maneira.

Outra metodologia baseia-se em manter o pH constante ao longo do processo até que o equilíbrio seja estabelecido (HOLAN; VOLESKY; PRASETYO, 1993; ARECO et al., 2012; GUPTA et al., 2006). Apesar do controle do pH ser uma tarefa

complicada, muitas vezes necessitando de automação, há autores que enfatizam a sua importância no processo (VIEIRA; VOLESKY, 2000; NAJA; MURPHY; VOLESKY, 2010). Como experimentos em batelada são projetados para avaliar informações fundamentais a respeito do bioissorvente, situações na qual o pH é controlado fornecerá um cenário real do potencial do bioissorvente e aplicação em modelagem de equilíbrio químico (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008). Por outro lado, aplicações práticas de sistemas de bioissorção podem ser inviáveis a pH constante, e como a variação do parâmetro é um fenômeno espontâneo do processo, pode ser interessante avaliar o potencial bioissorção de maneira natural. São raros os estudos que avaliam a capacidade de bioissorção pelas duas metodologias (FOUREST; CANAL; ROUX, 1994; FOUREST; ROUX, 1992; HOLAN; VOLESKY; PRASETYO, 1993), por conta disso, ambas serão exploradas no presente trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo da biomassa

4.1.1. Obtenção do microrganismo

O bioissorvente utilizado foi o fungo *Rhizopus microsporus*, o qual foi coletado da área de rejeitos da mina do Sossego, localizado na região de Canãa dos Carajás, Pará. O fungo foi isolado, identificado e mantido em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) por pesquisadores do Centro de Pesquisa e Capacitação em Meio Ambiente (CEPEMA-USP) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB - USP). A figura 7 mostra o fungo *Rhizopus microsporus* isolado.

Figura 7 - Fungo *Rhizopus microsporus*.

4.1.2. Solução de esporos

O procedimento abaixo foi realizado por pesquisadores do Departamento de Engenharia Química (Escola Politécnica – USP). O fungo *Rhizopus microsporus* foi cultivado em temperatura de 25°C por 15 dias em erlenmeyers de 500 ml com meio PDA (Potato Dextrose Agar) para a produção de esporos. Foi usada uma solução salina 0,9% para a coleta dos esporos que foram contados em microscópio através da câmara de Neubauer e determinada a concentração de 10^6 esporos/ml. As suspensões de esporos foram então congeladas em frascos de 2 ml em solução de glicerol (20%) para a crioproteção em ultrafreezer (-80°C). A solução foi utilizada como inóculo para a produção de fungo para todos os experimentos.

4.1.3. Produção de biomassa

Biomassa foi produzida pela inoculação de 1 ml de suspensão de esporos de *Rhizopus Microsporus* em 100 ml de solução de meio líquido contendo extrato de malte (10 g/L), glicose (20 g/L) e extrato de levedura (10 g/L) em erlenmeyers de 500ml. Os recipientes foram mantidos sob condições constantes de agitação de 150 rpm e temperatura de 28°C por 20 horas até que os micélios fossem coletados. Foi constatado previamente que o tempo de 20 horas corresponde à fase de crescimento exponencial das células do fungo, sendo assim, espera-se, nesse período, menor síntese de metabólitos secundários que possam interferir no estudo da bioissorção. A figura 8 ilustra os recipientes de cultivo do fungo.

Figura 8 - Recipientes de cultivo do fungo *Rhizopus Microsporus*.

4.1.4. Pré-tratamento da biomassa morta

Para a obtenção de biomassa morta, micélios do fungo recém-produzidos foram submetidos a tratamento térmico a temperatura de 121 °C durante 20 minutos em autoclave. A biomassa foi então transferida para um béquer e lavada com água Milli-Q até que a água de lavagem ficasse límpida, indicando a remoção do meio de cultura. Após a lavagem, os micélios úmidos foram dilacerados em um liquidificador doméstico e congelados até o momento de seu uso. A figura 9 ilustra a biomassa morta.

Figura 9 - Biomassa úmida submetida a pré-tratamento térmico (morta).

4.1.5. Pré-tratamento da biomassa viável

Para a obtenção de biomassa viável, micélios do fungo recém-produzidos foram submetidos diretamente ao mesmo procedimento de lavagem da biomassa morta. Após a lavagem, os micélios úmidos foram dilacerados em um liquidificador doméstico e congelados até o momento de seu uso. A figura 10 ilustra a biomassa viável.

Figura 10 - Biomassa úmida não submetida a pré-tratamento térmico (viável).

4.1.6. Determinação da umidade da biomassa

Amostra de biomassa úmida de massa total conhecida é submetida a secagem em equipamento micro-ondas por 30 minutos em potência de 20%. A umidade do sólido é determinada pela equação 9.

$$U = \frac{m_u - m_s}{m_u} \cdot 100 \quad \text{Equação 9}$$

Sendo:

U : Umidade da biomassa em base úmida (%)

m_s : Massa de biomassa seca (g)

m_u : Massa de biomassa úmida (g)

4.2. Preparo de soluções

4.2.1. Soluções-padrão de cobre

Soluções-padrão de cobre (II) de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 350 mg/L foram obtidas através da diluição de sal de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em água Milli-Q e armazenadas em recipientes de vidro. Antes da realização dos experimentos, foi realizada a determinação analítica da concentração de cada um dos padrões.

4.2.2. Soluções de ajuste de pH

Soluções de NaOH e HCl nas concentrações de 1 M e 0,1 M foram utilizadas para correção do pH das soluções-padrão de cobre.

4.3. Determinação analítica da concentração de metal

4.3.1. Preparo de amostra líquida para determinação analítica

O sobrenadante resultante de cada unidade experimental foi submetido à diluição na faixa de 1 a 5 mg/L de cobre utilizando solução ácida de 3,25% em volume de HNO_3 como diluente. As diluições foram realizadas por gravimetria com balança analítica de precisão de cinco casas decimais.

4.3.2. Curvas de calibração

Soluções-padrão de cobre foram utilizadas na construção das curvas de calibração para a faixa de 1 a 5 mg/L. O coeficiente de determinação (R^2) da curva

de calibração do equipamento foi acima de 0,990. Todas as amostras de um mesmo experimento são lidas com uma única curva de calibração.

4.3.3. Equipamento de leitura da concentração

A concentração das soluções de cobre na faixa de 1 a 5 mg/L foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica pelo equipamento Atomic Absorption Spectrofotometer da Shimadzu modelo GFA-7000^a. As leituras de concentração fornecidas pelo equipamento terão de ser multiplicadas pelo seu respectivo fator de diluição para obtenção da concentração real. O fator de diluição (FD) é dado pela equação 10.

$$FD = \frac{m_{ac} + m_{am}}{m_{am}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

m_{am} : Massa da amostra (mg)

m_{ac} : Massa de solução ácida (mg)

4.4. Resposta de interesse e erros experimentais

4.4.1. Determinação da capacidade de bioadsorção

A resposta de interesse (variável dependente) dos experimentos de bioadsorção é a capacidade de bioadsorção de metal (Q_{Eq}). Esta foi determinada experimentalmente pelo cálculo do balanço de massa de metal em uma unidade experimental. O balanço é representado pela equação 11.

$$Q_{Eq} = \frac{V(C_0 - C_{Eq})}{m_s} \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

Q_{Eq} : Capacidade de bioadsorção no equilíbrio (mg metal / g biomassa)

V : Volume da solução (L)

C_0 : Concentração inicial de metal na solução (mg metal / L)

C_{Eq} : Concentração de metal na solução no equilíbrio (mg metal / L)

m_s : Massa de biomassa em base seca (g)

4.4.2. Fontes de erro experimental

Foram definidas as seguintes causas aleatórias de variação na determinação da concentração de cobre no equilíbrio (C_{eq}).

- Curva de calibração: refere-se a desvios de leituras realizadas em diferentes curvas de calibração. Estas foram construídas com as mesmas soluções-padrão, mesma faixa de concentração e tiveram coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,990.
- Lote da biomassa: mesmo sendo produzido sob as mesmas condições, o microrganismo pode não se desenvolver de maneira idêntica em diversos lotes.
- Amostragem de biomassa: refere-se a variações na coleta de amostras de biomassa devido a possível não homogeneidade do sólido.
- Preparo de amostras: refere-se a variações do processo envolvido no preparo da amostra líquida para análise.
- Leitura EAA: referente a variações na leitura do equipamento de espectrofotometria de absorção atômica

A soma das variações dessas fontes será igual ao erro experimental total. Todo erro existente na resposta Q_{Eq} foi atribuído pela variável C_{Eq} . Os demais erros relacionados às variáveis de volume (V), massa de biomassa seca (m_s) e concentração inicial (C_0) foram desprezados por serem pouco representativos em relação a todos os fatores aleatórios existentes na variável C_{Eq} .

4.5. Experimentos de bioadsorção

Todos os experimentos de bioadsorção em bateladas tiveram o seguinte procedimento em comum: cada unidade experimental consistia de uma suspensão de biomassa em solução de cobre (II) num frasco. Uma porção úmida de biomassa era adicionada a um frasco plástico de 50 ml contendo uma solução de cobre. A quantidade de biomassa empregada foi calculada para se obter uma concentração

de biomassa seca (C_b), a qual variou de 2,0 a 2,5 g/L nos experimentos. Essa concentração foi utilizada em função da quantidade de metal sorvido pela biomassa. A solução de cobre tinha inicialmente uma concentração (C_0) e pH conhecidos, sendo o ultimo ajustado com soluções de NaOH e HCl 0,1 e 1 M. A unidade experimental foi mantida em shaker sob condições constantes de agitação (ω) de 150 rpm e temperatura (T) de 25°C até que o equilíbrio fosse atingido. Após esse período, o sólido foi separado do sobrenadante por filtração a vácuo com membrana de 0,45 μ m. A solução metálica resultante foi, então, submetida à etapa de preparo de amostra para posterior determinação analítica da concentração de metal. As figuras 11, 12 e 13 ilustram o procedimento dos experimentos de bioissorção, as unidades experimentais utilizadas e o sistema de filtração a vácuo, respectivamente.

Figura 11 - Procedimento experimental de bioissorção.

Figura 12 - Unidades experimentais utilizadas (12 unidades).

Figura 13 - Sistema de filtração a vácuo utilizado.

4.5.1. Estudo dos componentes da variância

Para quantificar a variância causada por cada um dos fatores apontados na seção 4.4.2 foi realizado um experimento no qual os fatores controlados não variaram, sendo que as diversas etapas do procedimento experimental foram realizadas com repetições. No início da batelada foi preparada uma mistura de uma alíquota de 30 ml de solução-padrão de 100 mg/L cobre em pH 5 com uma quantidade de biomassa correspondente a uma concentração de aproximadamente 2,5 g/L de massa de biomassa seca por litro de suspensão. O pH variou livremente ao longo do experimento.

Para cada leitura da concentração de cobre foram realizadas duas curvas de calibração. Três lotes de biomassas foram testados, sendo que duas amostragens foram utilizadas de cada lote e colocadas cada uma em uma unidade experimental (um frasco com suspensão). Para cada unidade experimental foram realizadas três repetições de preparo, sendo que para cada uma, duas repetições de leituras de concentração de metal foram realizadas. Totalizando, dessa forma, setenta e duas observações. O delineamento experimental hierarquizado é mostrado na figura 14.

Figura 14 - Delineamento experimental para quantificação do erro experimental.

4.5.2. Efeito do pré - tratamento térmico na bio sorção

Foram utilizados dois níveis de pré-tratamento, um com biomassa pré-tratada termicamente (morta) e outro com biomassa sem pré-tratamento térmico (viável). Cada unidade experimental é constituída de uma alíquota de 30 ml de solução padrão de 100 mg/L cobre em pH 5 com um tipo de biomassa (morta ou viável) de concentração de aproximadamente 2,0 g/L em massa seca. O pH variou livremente ao longo do experimento.

O experimento foi realizado com dois lotes de biomassa para cada nível de pré-tratamento. Duas amostragens foram utilizadas de cada lote de biomassa e

colocadas cada uma em uma unidade experimental. Sendo que para cada unidade experimental foram realizadas três repetições de preparo da amostra, sendo que para cada uma destas, duas repetições de leituras de concentração de metal foram realizadas. Totalizando, dessa forma, vinte e quatro leituras para cada um dos dois níveis de pré-tratamento, conforme ilustra a figura 15.

Figura 15 - Delineamento experimental do experimento do efeito do pré-tratamento térmico sobre a capacidade de bioabsorção do fungo.

4.5.3. Efeito do pH na bioabsorção

O estudo do efeito do pH foi realizado com duas metodologias diferentes. Na primeira, o pH é imposto apenas no início do experimento, ele varia livremente até o equilíbrio ser atingido. Na segunda maneira, o pH é mantido constante ao longo do experimento. Em ambas as metodologias cada unidade experimental é constituída de uma alíquota de 30 ml de solução padrão de 100 mg/L de cobre e de pH conhecido com biomassa morta na concentração de aproximadamente 2,5 g/L de massa seca.

Optou-se pela realização de ensaios com pH 6 e inferiores para a concentração de 100mg/L, pois para soluções mais alcalinas foi observada a precipitação de hidróxido de cobre, conforme ilustra a figura 5. A consequência de realizar ensaios acima desse valor seria a elevação dos valores obtidos de Q_{Eq} sem que a bioabsorção estivesse envolvida.

O estudo foi realizado com um único lote de biomassa para cada metodologia. Para cada nível de pH foram utilizadas duas amostragens do lote de biomassa e cada uma colocada em uma unidade experimental. Para cada unidade experimental foram realizadas três repetições de preparos, sendo que para cada um destes, duas repetições de leituras de concentração de metal foram realizadas. Totalizando, dessa forma, doze observações para cada nível de pH, conforme ilustra figura 16.

Figura 16 - Delineamento experimental do experimento do efeito de pH.

4.5.3.1. Efeito do pH inicial na bioissorção

O pH inicial de cada unidade experimental foi ajustado com NaOH e HCl para valores de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 antes da adição da biomassa. Não foi mantido o controle deste ao longo do processo. As unidades experimentais foram mantidas por 20 horas sob agitação e temperatura constantes.

4.5.3.2. Efeito do pH controlado na bioissorção

Os valores de pH utilizados em cada unidade experimental foram de 1, 2, 3, 4, 5 e 6, sendo estes corrigidos de hora em hora com soluções de NaOH e HCl. Uma vez o pH ter permanecido invariável sem a necessidade de correção, as unidades experimentais foram mantidas por mais 12 horas sob agitação e temperatura constante.

4.5.4. Isoterma de bioissorção

A isoterma de bioissorção foi obtida experimentalmente em temperatura de 25°C medindo-se a capacidade de bioissorção em soluções com diferentes concentrações iniciais de cobre (II). Cada unidade experimental é constituída de 30 ml de uma solução-padrão de pH conhecido com uma dada concentração de cobre em contato com biomassa morta na concentração de aproximadamente 2,5 g/L de massa seca. Para a determinação das isotermas o pH máximo utilizado foi 5 para evitar o fenômeno de precipitação e especiação do cobre para concentrações mais elevadas.

Assim como no estudo do efeito do pH, a isoterma de bioissorção foi obtida por duas metodologias diferentes, uma sem controle pH e a outra com o seu controle.

O estudo foi realizado com um único lote de biomassa para cada metodologia. Para cada nível de concentração inicial de cobre foram utilizadas duas amostragens do lote de biomassa e colocadas cada uma em uma unidade experimental. Para cada unidade experimental foi realizado um único preparo, sendo que para cada um, duas repetições de leituras de concentração de metal foram realizadas. Totalizando, dessa forma, quatro observações para cada nível de concentração, conforme ilustra a figura 17.

Figura 17 - Delineamento experimental do experimento da isoterma de bioissorção.

4.5.4.1. Isotherma de bioissorção sem controle de pH

A isoterma sem controle de pH foi determinada para pH inicial 5. Foram utilizadas unidades experimentais com soluções padrão com concentrações aproximadas de 25, 50, 100, 125, 150, 175 e 200 mg/L de cobre (II). Todas as soluções tiveram o pH inicial corrigido antes da adição da biomassa e não controlado ao longo do experimento. As unidades experimentais foram mantidas por 20 horas sob agitação e temperatura constantes.

4.5.4.2. Isotherma de bioissorção com controle de pH

Duas isotermas foram construídas com pH controlado, uma a pH 1 e outra a pH 5. Para a primeira foram utilizadas unidades experimentais com soluções padrão com concentrações aproximadas de 25, 50, 75, 100, 125, 200 mg/L de cobre, enquanto que para a segunda isoterma, com soluções padrão com concentrações aproximadas de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 350 mg/L de cobre.

Todas as soluções tiveram o pH inicial corrigido para os valores de 1 e 5 antes da adição da biomassa e mantidos nesses valores ao longo do experimento com adições de NaOH e HCl de hora em hora. Uma vez o pH ter permanecido

invariável sem a necessidade de correção, as unidades experimentais foram mantidas por mais 12 horas sob agitação e temperatura constante.

4.5.5. Ciclos de sorção-dessorção

Neste experimento uma unidade experimental submete uma porção de biomassa a repetidos ciclos de sorção-dessorção de cobre para testar a manutenção das propriedades do biossorvente. Um ciclo consiste em uma etapa de sorção seguida de uma de dessorção. Nas etapas de sorção foram usados dois níveis de concentração inicial de cobre, o nível 1 foi de soluções de concentrações de 50 mg/L e o nível 2, de soluções de 100 mg/L de cobre. Cada unidade experimental consiste de uma alíquota de 30 ml de solução padrão de cobre (etapa de sorção) ou de eluente HCl (0,1 M) (etapa de dessorção) com biomassa morta na concentração aproximada de 2,5 g/L em massa seca.

Os valores de pH inicial das soluções de cobre e do eluente foram ajustados para os valores de 5 e 1 respectivamente, os quais variaram livremente ao longo do processo. Finalizado o processo de sorção, a biomassa carregada com cobre foi separada por filtração a vácuo utilizando membrana de 0,45 μ m e suspensa no eluente HCl, iniciando-se, assim, a etapa de dessorção. Finalizado o processo de dessorção, a biomassa foi filtrada da mesma maneira, lavada com água Milli-Q no próprio sistema de filtração até que o pH da água de lavagem atingisse um valor de 4,5 a 5 (indicando a remoção do eluente ácido) e suspensa na solução de cobre para iniciar o próximo ciclo, o qual foi repetido três vezes. A unidade experimental foi mantida por 12 horas na etapa de sorção e por 4 horas na etapa de dessorção sob agitação e temperatura constantes. As concentrações do metal da solução de cobre e do eluente no equilíbrio foram determinadas. A massa seca inicial (m_i) e massa seca final (m_f) de biomassa utilizada em cada unidade experimental foram determinadas para avaliação de possíveis perdas. A figura 18 ilustra um ciclo.

Figura 18 - Procedimento experimental para um ciclo de sorção-dessorção.

O mesmo delineamento experimental foi utilizado para ambas as etapas, sorção e dessorção. Para cada ciclo foram utilizados dois níveis de concentração inicial de cobre (50 e 100 mg/L). Para cada um deles duas amostragens de biomassa de um único lote foram utilizadas e colocadas cada um em uma unidade experimental. Para cada unidade experimental foi realizado um único preparo, sendo que para cada um, duas repetições de leituras de concentração de metal foram realizadas. Totalizando, dessa forma, dezesseis observações para cada ciclo, sendo oito para a etapa de sorção e oito para a de dessorção, conforme ilustra a figura 19.

Figura 19 - Delineamento experimental para o experimento de ciclos de sorção-dessorção.

4.5.5.1. Cobre residual na biomassa após a sorção.

No estudo de regeneração do bioissorvente será necessário determinar a quantidade de metal remanescente no bioissorvente por grama de bioissorvente após a dessorção. Fisicamente, ela pode ser expressa pela capacidade de bioissorção em equilíbrio com o eluente Q_{Eq}^D . Assumiu-se a premissa de que não haveria metal remanescente na biomassa após o procedimento de lavagem com água Milli-Q.

A determinação de Q_{Eq}^D será realizada a partir de um balanço de massa com as informações experimentais da capacidade de bioissorção obtida na etapa de

sorção e da concentração de metal no eluente no equilíbrio. A fórmula é representada pela equação 12.

$$Q_{Eq}^D = \frac{Q_{Eq}m_s - C_{Eq}V}{m_s} \quad \text{Equação 12}$$

Sendo:

Q_{Eq}^D : Capacidade de bioissorção no equilíbrio após a dessorção (mg metal / g biomassa)

Q_{Eq} : Capacidade de bioissorção no equilíbrio após a sorção (mg metal / g biomassa)

V : Volume da solução (L)

C_{Eq} : Concentração de metal no equilíbrio (mg metal / L)

m_s : Massa de biomassa seca (g)

4.5.6. Cinética da bioissorção

O estudo da cinética foi realizado através da obtenção experimental do grau de bioissorção (Q_t) em diferentes intervalos de tempos para uma única etapa de sorção. A unidade experimental consiste de uma alíquota de 40 ml de solução padrão de 150 mg/L cobre com concentração de biomassa de aproximadamente 2,5 g/L em massa seca. Ao longo do processo foram coletadas alíquotas de 0,5 ml de sobrenadante nos intervalos de tempo de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 e 1440 minutos. As alíquotas foram diretamente submetidas ao processo de preparo e determinação analítica da concentração de metal. O volume total removido pelas alíquotas corresponde a 10% do volume total, sendo este considerado adequado e sujeito a não causar grandes imprecisões no experimento.

Todas as soluções tiveram o pH inicial corrigido para 5 antes da adição da biomassa. O experimento da cinética foi realizado sem controle de pH. Para a realização desse experimento em pH constante seria necessário automatizar o seu controle para que as oscilações do parâmetro sejam as mínimas possíveis.

Para cada nível de tempo de contato foram utilizadas duas amostragens de biomassa de um único lote e colocadas cada uma em uma unidade experimental. Para cada unidade experimental foi realizado um único preparo, sendo que para cada um, duas repetições de leituras de concentração de metal foram realizadas. Totalizando, dessa forma, quatro observações para cada nível de tempo de contato, conforme ilustra a figura 20.

Figura 20 - Delineamento experimental para o experimento da cinética de bioabsorção.

4.5.7. Resumo dos experimentos

A figura 21 mostra o quadro resumo dos experimentos do presente trabalho.

Experimentos		Controle de pH	Biomassa	pH inicial	Co (mg/L)
4.5.1	Determinação dos componentes da variância	Não	Morta	5	100
4.5.2	Efeito do pré - tratamento térmico na bioissorção	Não	Morta e Viável	5	100
4.5.3	Efeito do pH na bioissorção	Não Sim	Morta	1 a 6	100
4.5.3.1	- Efeito do pH inicial bioissorção				
4.5.3.2	- Efeito do pH controlado na bioissorção				
4.5.4	Isoterma de bioissorção	Não Sim	Morta	5 1 e 5	25 a 200 25 a 350
4.5.4.1	- Isoterma de bioissorção sem controle de pH				
4.5.4.2	- Isoterma de bioissorção com controle de pH				
4.5.5	Ciclos de sorção e dessorção	Não	Morta	1 e 5	50 e 100
4.5.6	Cinética da bioissorção	Não	Morta	5	150

Figura 21 - Quadro de experimentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo dos componentes da variância

Os ensaios descritos na seção 4.5.1 visaram quantificar os erros envolvidos na experimentação. As fontes de variação devido a causas não controladas, explicadas em detalhes na seção 4.4.2 consideradas foram: a curva de calibração do instrumento de determinação de concentração de cobre (EAA), o lote da biomassa, a amostragem da biomassa, o preparo de amostra e a leitura do EAA. O experimento em questão teve como objetivo verificar a contribuição de cada um desses fatores ao erro experimental total. A informação gerada foi utilizada para a aplicação de melhorias no processo de experimentação, aumentando a reprodutibilidade e a confiabilidade das observações experimentais.

5.1.1. Verificação dos pressupostos da ANOVA

Para aplicar o método de análise de variância foi necessário verificar a validade de seus pressupostos fundamentais, ou seja, confirmar a normalidade dos erros, a homocedasticidade e a independência entre os erros de observação, conforme citado na seção 3.3. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Minitab (versão 16) para setenta e duas observações de capacidade de bioadsorção (Q_{eq}) considerando um coeficiente de confiança de 95% ($\alpha = 5\%$).

Para verificar se os erros possuem distribuição normal, foi aplicado o teste de normalidade de Anderson-Darling. O método baseia-se num teste de hipótese, onde a hipótese nula é dada pela normalidade dos dados e a hipótese alternativa, pela não normalidade. O resultado do teste é mostrado na figura 22. A abscissa do gráfico representa a capacidade de bioadsorção de cada observação e a ordenada, a porcentagem de valores da amostra que são maiores ou menores que a observação. A aderência dos dados de observação a uma reta favorece a hipótese de normalidade dos erros.

Figura 22 - Resultado do teste de normalidade de Anderson-Darling ($\alpha = 5\%$).

O resultado mostra um valor P de 16,0%. Por ser maior que o nível de significância de 5%, não se rejeita a hipótese nula da normalidade dos erros envolvidos no experimento.

Para verificar a igualdade das variâncias (homocedasticidade) dos erros foram aplicados os testes de Levene (teste para dados sem distribuição normal), Bartlette (teste para dados com distribuição normal). O Teste-F substitui o teste de Bartlette para fatores com dois níveis. A igualdade de variâncias é considerada a hipótese nula nestes testes, enquanto a hipótese alternativa, a desigualdade das variâncias. As variáveis independentes testadas foram: Leitura EAA, Preparo de Amostras, Amostragem da Biomassa, Lote da Biomassa e Curva de Calibração. Os resultados dos testes para a Leitura EAA encontram-se na figura 23. Para garantir a igualdade das variâncias é esperado que os desvios variem de forma homogênea, ou seja, que a amplitude dos desvios sejam iguais para cada nível do fator analisado. A amplitude dos desvios é ilustrada pelas barras horizontais nos gráficos da figura 23.

Figura 23 - Resultado do teste de homocedasticidade para a Leitura EAA ($\alpha = 5\%$).

O resultado mostra um valor P maior que 96 % para o teste F e o teste de Levene. Por ser maior que o nível de significância de 5%, não se rejeita a hipótese nula da homocedasticidade dos erros. As demais variáveis apresentaram Valor P maior que 0,05 em todos os testes realizados (não mostrado) e, portanto, a hipótese de igualdade de variância não foi rejeitada para todos os fatores.

Para a verificação do último pressuposto, da independência entre os erros de observação, construiu-se um gráfico de resíduo (valor da média menos da leitura) versus a ordem da observação. Esta última variável corresponde à ordem na qual as leituras foram realizadas pelo equipamento de EAA. O gráfico é ilustrado na figura 24.

Figura 24 - Dispersão de resíduos da capacidade de bioabsorção (mg/g) versus ordem da observação.

Verifica-se que há uma grande dispersão dos pontos residuais em função da ordem da observação. Em outras palavras, não há evidência de qualquer padrão na distribuição dos resíduos, o que implica que cada erro de observação é independente dos demais. Esse comportamento caracteriza a não correlação entre os erros de observação.

Conclui-se que todos os pressupostos da análise de variância foram atendidos e, portanto, o método da ANOVA poderá ser utilizado. Este procedimento de verificação dos pressupostos também foi realizado com as observações (dados de Q_{Eq}) dos demais experimentos que utilizaram método da ANOVA mas não foi mostrado.

5.2. Resultado dos componentes da variância.

As observações de capacidade de bioabsorção descritas na seção 4.5.1 foram analisadas pela técnica de ANOVA seguindo delineamento experimental hierarquizado. As hipóteses de nulidade (H_0) são de que não há efeito dos fatores sobre a resposta “capacidade de bioabsorção, Q_{Eq} ”. Os fatores são a curva de calibração, lote da batelada, a amostragem da biomassa, preparo de amostra e a

Leitura EAA. Enquanto que as hipóteses alternativas são de que há efeito em cada um desses fatores. O tratamento dos dados foi realizado pelo software Minitab para um coeficiente de confiança de 95%. Este é apresentado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultado ANOVA para a remoção de metal ($\alpha = 5\%$).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Valor P
Curva de calibração	1	26,46	26,46	0,95	38,6%
Lote Batelada	4	111,90	27,97	25,84	0,1%
Amostragem biomassa	6	6,49	1,08	3,18	1,9%
Preparo amostras	24	8,17	0,34	2,03	2,7%
Leitura EAA	36	6,04	0,17		
Total	71	159,07			

Tabela 3 - Componentes da variância

Fonte de variação	Variância	% do Total	Desvio padrão
Curva de calibração	0,00*	0,00	0,00
Lote Batelada	2,24	85,57	1,50
Amostragem biomassa	0,12	4,72	0,35
Preparo amostras	0,09	3,30	0,29
Leitura EAA	0,17	6,41	0,41

* Valor negativo. Considerado como sendo igual a 0.

Os resultados da tabela 2 mostram quais fatores estão sujeitos a rejeição da hipótese nula (igualdade das médias dos tratamentos), estes são dados por valor $P < 5\%$. Verifica-se, primeiramente, que a hipótese nula não foi rejeitada para o fator de curva de calibração (valor $P = 38,6\%$). Portanto, esse efeito mostra-se insignificante. Para os demais fatores, lote da biomassa, amostragem da biomassa e preparo de amostras, houve rejeição da hipótese nula (Valor $P < 5\%$), ou seja, há diferença estatística significativa entre as repetições de cada um desses fatores.

A tabela 3 mostra os componentes da variância presentes no experimento de bioissorção devido aos fatores aleatórios. O método determina a contribuição de

cada um dos fatores na variância total nos dados da resposta Q_{eq} . É notável a grande parcela do total da variância atribuída ao lote da biomassa, correspondendo a um percentual de 85,6% do total. Apesar da biomassa ser produzida sob as mesmas condições de meio de cultura, de temperatura, de agitação e de tempo de crescimento, a variância foi gerada por fatores desconhecidos e não controlados durante o crescimento celular do fungo. No entanto, considerou-se que um desvio padrão de 1,5 mg/g gerado na variável resposta (Q_{Eq}) devido a esse fator seja aceitável, considerando que a média de todas as leituras da capacidade de biofixação obtida foi de 8.46 mg/g. Com o intuito de minimizar a interferência desse erro, cada experimento foi realizado com um único lote de biomassa. No entanto, o erro em questão deverá ser considerado em valores da capacidade de biofixação obtidas em experimentos diferentes.

Os demais fatores de Curva de Calibração, Amostragem da Biomassa, Preparo de Amostras e Leitura EAA somados correspondem à parcela de 14,5% da variância total, portanto, pouco significativos em relação ao erro experimental total.

Um aspecto importante é que o erro experimental varia diretamente com a diluição aplicada na amostra, a qual deve ser diluída até a faixa de 1 a 5 mg/L, conforme explicado na seção 4.3.3. A média do fator de diluição de todas as amostras do experimento em questão foi de $50,3 \pm 2,1$. As leituras de concentração foram multiplicadas pelo seu respectivo fator de diluição para se obter a concentração real, conseqüentemente, o desvio padrão destas leituras também será multiplicado pelo mesmo fator. Os componentes da variância apresentados serão aumentados para fatores de diluição mais altos e reduzidos para fatores mais baixos, portanto, a diluição deve ser evitada ou minimizada o quanto possível a fim de diminuir a amplificação do erro. Esta conclusão foi também relatada por Schiewer e Volesky (1995). Entretanto, muitas vezes isso não é possível devido principalmente a limitações operacionais do equipamento de EAA.

5.3. Efeito do pré-tratamento

Verificam-se na literatura diversos estudos analisando o efeito dos mais diversos pré-tratamentos da biomassa na biofixação. Um dos mais investigados consiste em comparar a capacidade de biofixação entre células mortas e viáveis. A

bioissorção de cobre e níquel por biomassa autoclavada de *Pseudomonas aeruginosa* mostrou pequena redução na capacidade de bioissorção em relação à biomassa viável (SAR et al., 1999). Já Salvadori et al (2013) verificou que a bioissorção de cobre por *Hipocrea lixii* por biomassa viável teve a capacidade de bioissorção reduzida na ordem de 1,8 vezes em relação à biomassa submetida a tratamento térmico (morta) para a concentração inicial de 100 mg/L.

No presente trabalho o estudo foi realizado para uma única concentração de solução de cobre, com vinte e quatro leituras para cada nível conforme a metodologia descrita na seção 4.5.2. O resultado obtido da capacidade de bioissorção é apresentado na tabela 4. Foi realizado o teste ANOVA para por ambos os níveis de pré-tratamentos seguindo delineamento completamente causalizado, o resultado é demonstrado na tabela 5.

Tabela 4 - Resumo da capacidade de bioissorção em função do pré-tratamento.

Nível	Contagem	Soma	Média (Q_{eq})	Variância	Desvio padrão
Morta	24	160,24	6,68	1,41	1,19
Viável	24	146,38	6,10	2,40	1,55

Tabela 5 - Resultado ANOVA efeito pré-tratamento ($\alpha = 5\%$).

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F	Valor P
Entre grupos	4,00	1	4,00	2,10	15,43%
Dentro dos grupos	87,76	46	1,91		
Total	91,76	47			

Os valores médios obtidos para a capacidade de bioissorção para a biomassa morta e a viável foi de 6,68 mg/g e 6,10 mg/g respectivamente. O resultado da ANOVA aponta que a hipótese nula não foi rejeitada (Valor P >5%), indicando que o pré-tratamento não causa efeito significativo na variável resposta. Conclui-se, portanto, que o tratamento térmico no fungo *Rhizopus Microsporus* não teve influencia na capacidade de bioissorção para a concentração inicial de cobre de 100 mg/L.

Conclui-se que o efeito do pré-tratamento térmico não altera o numero de sítios ativos presentes na biomassa. Para os demais experimentos optou-se por

utilizar somente a biomassa morta, por apresentar menos riscos a seres humanos, conforme exposto na seção 3.6.

5.4. Efeito do pH na bioissorção

O efeito do pH no processo de bioissorção de metais pesados é um dos fatores mais estudados. Nesta pesquisa foram realizados ensaios experimentais para diferentes valores de pH em unidades experimentais com a mesma concentração inicial de cobre e de biomassa conforme explicado na seção 4.5.3. Esse estudo foi realizado com e sem o controle do pH para verificar se há diferença significativa entre os métodos.

5.4.1. Efeito do pH inicial na bioissorção

A primeira observação importante do experimento foi em relação ao comportamento do pH ao longo do processo da bioissorção. A tabela 6 apresenta a variação após 20 horas decorridas.

Tabela 6 - Variação do pH entre o início e o equilíbrio da bioissorção.

Ensaio	pH inicial	pH final (equilíbrio)
1	1,00	1,00
2	2,00	1,78
3	3,00	2,73
4	4,00	3,65
5	5,00	3,76
6	6,00	3,83

Verifica-se uma redução do pH inicial em todos os ensaios, com exceção do ensaio em pH 1. O fenômeno pode ser explicado pelo processo de troca iônica ocorrida ao longo do processo da bioissorção entre íons Cu^{2+} na solução e íons H^+ constituintes da parede celular do fungo, conforme explicado na seção 3.2.2. O fenômeno de mudança no pH foi relatado em diversos estudos de bioissorção (HAN et al., 2006; FOUREST; ROUX, 1992; RAO; IYENGAR; VENKOBACHAR, 1993).

A figura 25 apresenta a média e os desvios-padrão de todas as observações de capacidade de bioissorção para cada faixa de pH no equilíbrio. Para estudar o efeito do pH para os valores de 1 a 3,8 obtidos no equilíbrio foi utilizada a técnica

ANOVA seguindo o delineamento totalmente casualizado. As tabelas 7 e 8 apresentam o resultado da análise.

Figura 25 - Efeito do pH na capacidade de bioabsorção de cobre. $C_o = 100$ mg/L, $C_b = 2,5$ g/L, $\omega = 150$ rpm, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 20$ horas.

Tabela 7- Resumo da capacidade de bioabsorção em função do pH.

Nível	Contagem	Soma	Média Q_{Eq}	Variância	Desvio Padrão
pH 1,00	12	24,35	2,03	0,31	0,55
pH 1,78	12	49,37	4,11	0,33	0,57
pH 2,73	12	58,14	4,84	0,62	0,79
pH 3,65	12	87,31	7,28	1,02	1,01
pH 3,76	12	91,28	7,61	0,91	0,96
pH 3,83	12	92,90	7,74	0,31	0,56

Tabela 8 - Resultado ANOVA efeito pH ($\alpha = 5\%$).

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F	Valor P
Entre grupos	323,47	5	64,69	111,00	9,6E-29%
Dentro dos grupos	38,47	66	0,58		
Total	361,94	71			

Constata-se que há pelo menos um par de níveis dos quais suas médias diferem significativamente entre si (Valor $P = 9,6E-29\%$). Para verificar quais deles são significativamente diferentes, foi realizado o teste de Tukey para um coeficiente de confiança de 95%. A tabela 9 apresenta o resultado obtido.

Tabela 9 - Resultado teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

<i>Nível</i>	<i>Contagem</i>	<i>Média Q_{Eq}</i>	<i>Agrupamento</i>
pH 1,00	12	2,03	D
pH 1,78	12	4,11	C
pH 2,73	12	4,84	B
pH 3,65	12	7,28	A
pH 3,76	12	7,61	A
pH 3,83	12	7,74	A

Constata-se a partir da tabela 9 que os resultados de pH na faixa de 3,65 a 3,83 são estatisticamente iguais, enquanto que os de pH 1,00 ,1,78 e 2,73 são diferentes entre si e dos demais. O pH ótimo final resultante pertence ao intervalo de 3,65 a 3,83. Uma explicação para o fato de capacidades de bioissorção terem sido estatisticamente iguais para esta faixa deve-se a convergência dos valores finais de pH para valores próximos, conforme demonstrado na tabela 6.

Em relação às capacidades de bioissorção, os resultados demonstram sua elevação com o aumento do pH da solução. O aumento foi mais acentuado na faixa de pH 2,73 para pH 3,65, onde os valores foram de 4,84 mg/g para 7,27 mg/g respectivamente. A baixa capacidade de bioissorção de metais para baixos valores de pH pode ser explicada pela protonação dos constituintes da parede celular, conforme explicado na seção 3.1.3. Comportamentos similares foram observados em outros trabalhos, sendo seus resultados reportados em termos do pH inicial. Por exemplo, para *Bjerkandera* sp em pH inicial de 2,5 a 6 houve um aumento de 2,20 mg/g para 12,08 mg/g na sorção do cobre (LI et al., 2009). Valores ótimos pra a capacidade de bioissorção de cobre pertencentes a faixa de pH inicial de 4 a 6

também foram encontrados para *Phanerochaete chrysosporium* (IQBAL; EDYVEAN, 2004; SAY; DENIZLI; ARICA, 2001), *Hypocrea lixii* (SALVADORI et al., 2013) e *Streptomyces coelicolor* (OZTÜRK; ARTAN; AYAR, 2004).

5.4.2. Efeito do pH controlado na bioissorção

Tendo em vista a constatação da redução do pH no experimento anterior, realizou-se o mesmo estudo anterior com o controle do pH ao longo do experimento. Os resultados obtidos pelo novo método são expostos na figura 26, a qual apresenta a média e o desvio padrão da capacidade de bioissorção de todas as observações.

Figura 26 - Efeito do pH controlado na capacidade de bioissorção de cobre. $C_o = 100$ mg/L, $C_b = 2,5$ g/L, $\omega = 150$ rpm, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 12$ horas (Após pH constante).

Observa-se capacidades de bioissorção semelhantes para pH 1 e 2. Para verificar se há diferença estatística entre as duas, foi utilizada a técnica de análise de variância. As tabelas 10 e 11 apresentam o resultado da análise. O resultado da ANOVA indica que a capacidade de bioissorção para pH 1 e 2 são estatisticamente iguais (Valor $P > 5\%$).

Tabela 10 - Resumo da capacidade de bioissorção em função do pH controlado.

Nível	Contagem	Soma	Média Q_{Eq}	Variância	Desvio Padrão
pH 1	12	23,46	1,95	0,12	0,35
pH 2	10	19,32	1,93	0,34	0,59

Tabela 11- Resultado ANOVA efeito pH controlado ($\alpha = 5\%$).

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F	valor-P
Entre grupos	0,003	1	0,003	0,013	91,06%
Dentro dos grupos	4,453	20	0,223		
Total	4,456	21			

Em relação aos demais fatores, observa-se na figura 26 uma diferença significativa para cada valor de pH das capacidades de bioissorção. Ainda é verificado o favorecimento destas pelo aumento do pH, sendo o valor máximo obtido em pH 6. A explicação para este fenômeno é a mesma discutida na seção 5.4.1 e 3.1.3. Resultados semelhantes utilizando a metodologia de controle de pH foram encontrados em outros trabalhos. A bioissorção de cobre, zinco e cádmio por *Ulva lactuca* demonstrou ser fortemente dependente do pH, sendo os valores máximos da capacidade de bioissorção encontrados em pH 5,5 para todos os metais (ARECO et al., 2012). Say, Denizli e Arica (2001) investigaram a bioissorção de cádmio, chumbo e cobre por *Phanerachaeete chysosporium* e constataram que a sorção máxima ocorreu próximo de pH 6. O experimento com controle de pH reforça o fato deste ser um fator extremamente importante para descrever as condições do equilíbrio da bioissorção.

Comparando-se a capacidade de bioissorção pelos dois métodos, com e sem controle de pH, observa-se uma grande diferença principalmente para a faixa acima de 4. Para pH 5 e pH 6, por exemplo, a biomassa apresentou uma retenção de metal 2,67 vezes e 4,28 vezes maior respectivamente, passando de 7,61 mg/g para 20,38 e de 7,74 mg/g para 33,12 mg/g respectivamente. Este comportamento pode ser explicado pelos menores valores de pH no equilíbrio nos experimentos sem o controle. Apesar do controle de pH exigir gasto de reagente, tais resultados mostram

que pode ser desejável a sua aplicação em um processo de bioissorção de escala industrial.

5.5. Isoterma de bioissorção

O estudo do equilíbrio da bioissorção para várias concentrações, representado por isotermas, é um dos principais indicadores de desempenho de bioissorventes utilizados por pesquisadores. Conforme citado na seção 3.6, há uma inconformidade na literatura em relação ao controle do pH ao longo do processo. Por conseguinte, optou-se por construir as isotermas por ambos os métodos. O procedimento experimental é explicado na seção 4.5.4.

5.5.1. Isoterma de bioissorção sem controle de pH

O experimento em questão foi conduzido para diversas soluções em diferentes concentrações iniciais de cobre em pH inicial 5, onde verificou-se a não ocorrência da precipitação do cobre.

Assim como observado nos experimentos anteriores, houve uma redução do pH em todas as unidades experimentais ao longo do processo. Constatou-se que o pH final de todas as soluções permaneceu na faixa de 3,15 a 4,00 para concentrações iniciais de cobre variando de 200 a 25 mg/L, respectivamente. Esta faixa será considerada o pH de equilíbrio do experimento.

A figura 27 apresenta a média da capacidade de bioissorção e o desvio padrão das observações em conjunto com a isoterma segundo os dois modelos de Langmuir e Freundlich.

Figura 27 - Isothermas de equilíbrio segundo modelos de Langmuir e Freundlich. $pH=3,15$ a 4 , $C_b = 2,5$ g/L, $\omega = 150$ rpm, $T = 25^\circ\text{C}$ e $t_c = 20$ horas.

Para verificar o ajuste dos modelos aos dados experimentais, ambos foram linearizados e representados nas figuras 28 e 29.

Figura 28 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Langmuir para pH não controlado.

Figura 29 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Freundlich para pH não controlado.

A tabela 12 mostra os valores obtidos para as constantes de cada modelo e seus respectivos coeficientes de determinação.

Tabela 12 - Coeficientes de determinação para os modelos de Langmuir e Freundlich.

Langmuir			Freundlich		
K_L (L/mg)	q_{max} (mg/g)	R^2	K_f	n	R^2
0,017	13,41	0,944	0,61	1,77	0,965

Os resultados dos coeficientes de determinação demonstram que o modelo de Freundlich adequou-se ligeiramente melhor aos dados experimentais, $R^2 = 0,96$. Apesar de conseguirem representar adequadamente os dados experimentais da isoterma de bioadsorção, tais modelos dificilmente são capazes de representar fisicamente o mecanismo do processo. Segundo Volesky e Holan (1995), devido à natureza complexa do material sorvente e seus múltiplos e variados sítios ativos, como também à química de solução complexa de alguns compostos metálicos.

Os resultados indicam um aumento na capacidade de bioadsorção de cobre com o aumento da concentração do metal na solução no equilíbrio. O aumento mais

acentuado foi verificado no intervalo de 18,1 a 87,3 mg/L , onde foi verificado os valores de 3,3 mg/g e 8,11 mg/g para a capacidade da bioissorção respectivamente .Em faixas mais concentradas, porém, observa-se um menor incremento na capacidade de bioissorção do metal. Para a concentração de 177,8 mg/L de cobre no equilíbrio, foi sorvido pela biomassa o equivalente a 10,4 mg/g de cobre. Este fenômeno pode ser explicado pela saturação dos sítios ativos presentes na biomassa decorrente da maior presença de metal na solução. O modelo de adsorção de Langmuir, por prever a saturação do sólido pelo sorvato, pode ser utilizado para extrapolar o valor da capacidade de bioissorção máxima de cobre pela biomassa, o $q_{\max}$ obtido é de 13,41 mg/g.

5.5.2. Isoterma de bioissorção com controle de pH

O experimento em questão teve como objetivo a determinação de duas isotermas de equilíbrio, uma em pH 5 e outra em pH 1, com o controle do pH. Ambas foram representadas em conjunto com os modelos de adsorção de Langmuir e Freundlich. A figura 30 apresenta o resultado da isoterma segundo os dois modelos.

Para verificar o ajuste dos modelos aos dados experimentais, estes foram linearizados e representados nas figuras 31 e 32. A tabela 13 mostra os valores obtidos para as constantes de cada modelo e seus respectivos coeficientes de determinação.

Figura 30 - Isothermas de equilíbrio segundo modelos de Langmuir e Freundlich. $pH\ 5$ e $pH\ 1$, $C_b = 2,5$ g/L, $\omega = 150$ rpm, $T = 25^\circ C$ e $t_c = 20$ horas.

Figura 31 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Langmuir para pH 1 e 5.

Figura 32 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de Freundlich para pH 1 e 5.

Tabela 13 - Coeficientes de determinação para os modelos de Langmuir e Freundlich.

	Langmuir			Freundlich		
	K_L (L/mg)	q_{max} (mg/g)	R^2	K_f	n	R^2
pH 5	0,031	32,47	0,966	5,45	3,31	0,923
pH 1	0,008	5,03	0,839	0,24	2,06	0,786

Os resultados dos coeficientes de determinação demonstram que o modelo de Langmuir adequou-se melhor aos dados experimentais para ambas as isotermas de pH 1 e pH 5 com R^2 igual a 0,97 e 0,84 respectivamente. A tabela 14 mostra diversos valores das constantes de Langmuir e Freundlich encontrados em outros trabalhos. Verifica-se que os coeficientes obtidos estão na mesma faixa dos encontrados por outros autores por ambas as metodologias.

Assim como no experimento anterior, constata-se uma elevação da capacidade de bioadsorção com o aumento da concentração de cobre no equilíbrio para ambas as isotermas, sendo esse comportamento mais evidente para o pH 5. Para esse pH observou-se o maior aumento na faixa de concentração de equilíbrio de 9,7 mg/L a 63,2 mg/L, onde a capacidade de bioadsorção variou de 9,1 a 20,8

mg/g. Como já verificado na isoterma anterior, houve uma estabilização na capacidade da bioissorção a concentrações de metal mais elevadas, possivelmente devido a saturação dos sítios ativos. Sendo a saturação estimada pelo modelo de Langmuir, de 32,47 mg/g e 5,03 mg/g para as isotermas de pH 5 e pH 1 respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para a bioissorção de cádmio por *Ascomyces niger*, onde o $q_{\max}$ obtido foi de 215 mg/g e 25 mg/g para pH controlado de 4,9 e 2 respectivamente (HOLAN; VOLESKY; PRASETYO, 1993).

Em relação à isoterma em pH 5, observa-se um perfil favorável à sorção do soluto. Este perfil caracteriza-se por possuir uma alta inclinação na curva (K_L) nos pontos próximos da origem e uma elevada capacidade máxima de bioissorção ($q_{\max}$), conforme discutido na seção 3.1.2. Por outro lado, na isoterma de pH 1 observa-se uma inclinação menor da curva, evidenciado pelo valor de K_L de 0,008 L/mg, enquanto que em pH 5 o K_L obtido foi de 0,031 L/mg. Valores baixos de K_L indicam pouca afinidade de soluto pela biomassa, essa característica pode ter grande utilidade em um processo no qual se deseja remover o metal sorvido pelo sólido, denominado por dessorção. A maior diferença entre as isotermas encontra-se, no entanto, no $q_{\max}$, sendo esse igual a 5,0 e 32,5 mg/L para pH 1 e pH 5 respectivamente. Essa diferença encontrada em ambos os parâmetros, $q_{\max}$ e K_L , pode ser explorada com grande utilidade como proposta para um projeto de operação unitária de bioissorção, envolvendo ciclos de regeneração de biomassa e recuperação do metal, cujo eluente seria uma solução de HCl de pH 1 (0,1 M).

A unidade operaria em ciclos sucessivos de sorção em pH 5 e dessorção em pH 1, similares a processos de troca iônica ou adsorção. Para que esta seja eficaz é importante que haja a maior diferença possível entre as isotermas de sorção e a de dessorção. Dentre as isotermas obtidas, as que apresentariam a melhor configuração é a de pH 1 e pH 5 constantes. Contudo, essa operação exigiria o custo adicional de manter o parâmetro constante. A figura 33 ilustra a diferença entre as três isotermas segundo o modelo de Langmuir.

Figura 33 - Comparação de isotermas de equilíbrio segundo modelo de Langmuir.

Tabela 14 - Coeficientes dos modelos de Langmuir e Freundlich encontrados na literatura para a biossorção de cobre.

Biossorvente	pH inicial	Controle pH	C ₀ (mg/L)	Langmuir		Freundlich		Referência
				K _L	q _{max}	K _f	n	
<i>Rhizopus microsporus</i> (morta autoclave)	5	Não	25-200	0,02	13,41	0,61	1,77	Presente trabalho
<i>Rhizopus microsporus</i> (morta autoclave)	5	Sim	25-350	0,03	32,47	5,45	3,31	Presente trabalho
<i>Rhizopus microsporus</i> (morta autoclave)	1	Sim	25-200	0,01	5,03	0,25	2,06	Presente trabalho
<i>C. cladosporioides</i> (Inativada - formaldeído)	6	N/D	5-100	0,10	9,43	1,67	2,78	(LI et al., 2009)
<i>G.murorum</i> (Inativada - formaldeído)	6	N/D	5-100	0,09	10,90	1,72	2,56	(LI et al., 2009)
<i>Bjerkandera</i> sp. (Inativada - formoldeído)	6	N/D	5-100	0,08	13,20	1,74	2,27	(LI et al., 2009)
<i>A. niger</i> (Pré tratamento NaOH)	6	Não	0-10	0,19	6,35	1,47	2,89	(KAPOOR, VIRARAGHAVAN e CULLIMORE, 1999)
<i>A. niger</i> (Pré tratamento NaOH)	5	Não	0-10	0,30	4,69	1,47	0,79	(KAPOOR, VIRARAGHAVAN e CULLIMORE, 1999)
<i>Hypocrea lixii</i> (viva)	5	Não	50-500	0,01	7,20	0,44	2,27	(SALVADORI et al., 2013)
<i>Hypocrea lixii</i> (seca)	5	Não	50-500	0,03	8,00	0,59	2,56	(SALVADORI et al., 2013)
<i>Hypocrea lixii</i> (morta autoclave)	5	Não	50-500	0,04	19,00	1,37	1,96	(SALVADORI et al., 2013)
<i>A. niger</i> (Pré tratamento Ca(NO ₃) ₂)	4	Não	0,3- 63,5	N/D	N/D	0,87*	0,49*	(MULLEN et al., 1992)
<i>M. rouxii</i> (Pré tratamento Ca(NO ₃) ₂)	4	Não	0,3- 63,5	N/D	N/D	0,74*	0,55*	(MULLEN et al., 1992)
<i>G. lucidum</i> (Sem pré tratamento)	5	Sim	0-200	0,90	28,45	9,97	2,03	(RAO; IYENGAR; VENKOBACHAR, 1993)
<i>G. lucidum</i> (Pré tratamento NaOH)	5	Sim	0-200	0,21	65,50	9,65	1,77	(RAO; IYENGAR; VENKOBACHAR, 1993)
<i>A. Niger</i> (Pré tratamento NaOH)	5	Sim	0-200	0,02	10,11	0,23	1,23	(RAO; IYENGAR; VENKOBACHAR, 1993)
Lodo tratado (Pré tratamento NaOH)	5	Sim	0-200	2,76	16,31	9,44	4,90	(RAO; IYENGAR; VENKOBACHAR, 1993)
<i>P. cryosporium</i> (Autoclavada e Seca)	6	Sim	5-500	N/D	26,55	N/D	N/D	(SAY; DENIZLI; ARICA, 2001)
Levedura de cerveja (Pré tratamento HCL e seca)	5	Não	3-44	0,14	1,45	0,02*	2,11*	(HAN et al., 2006)
<i>Enteromorpha prolifera</i> (Seca)	2	Não	25-300	0,04	42,37	6,39	2,85	(ÖZER et al., 2009)
<i>Enteromorpha prolifera</i> (Seca)	3	Não	25-300	0,03	52,08	6,55	2,32	(ÖZER et al., 2009)
<i>Enteromorpha prolifera</i> (Seca)	4	Não	25-300	0,03	57,14	8,97	2,98	(ÖZER et al., 2009)
<i>Enteromorpha prolifera</i> (Seca)	5	Não	25-300	0,03	52,63	7,11	2,85	(ÖZER et al., 2009)

*Unidade utilizada (MMol)

5.6. Ciclos de sorção - dessorção

A regeneração da biomassa é um parâmetro importante para viabilizar uma aplicação prática do processo de bio sorção. No experimento em questão verificou-se a possibilidade de reuso da biomassa utilizando uma solução pura de HCl (0,1M) como eluente para dois níveis de concentração da solução de cobre (Sorções a 50 mg/L e a 100 mg/L de cobre), conforme descrito na seção 4.5.5. Foram realizados três ciclos, cada um consistindo de uma etapa de sorção e uma de dessorção; avaliadas as capacidades de bio sorção em cada etapa e a possível perda de massa de bio sorvente, devido à ação ácida da solução, ao final do experimento.

A figura 34 apresenta a média e o desvio padrão obtidos para a capacidade de bio sorção para cada etapa de sorção sucessiva nos dois níveis de concentração de solução.

Figura 34 - Capacidade de bio sorção na etapa de sorção para 3 ciclos sucessivos.

Observa-se pela figura 35 que para os três ciclos a capacidade de bio sorção foi mantida praticamente constante para soluções do nível 2. Enquanto que para o nível 1 houve pequenas oscilações na resposta de interesse entre os ciclos. A diferença encontrada foi de 1,7 mg/g entre o primeiro e o segundo ciclo e 0,8 mg/g entre o primeiro e o terceiro ciclo. Esta diferença pode ser atribuída a erros

experimentais, conforme demonstrado na seção 5.1, uma vez que a característica do nível não deveria influenciar na regeneração da biomassa. Resultados semelhantes com o eluente HCl, na concentração de 0,01 a 0,1 M, foram encontrados na bioissorção de cádmio por *Ascophyllum nodosum* (HOLAN; VOLESKY; PRASETYO, 1993), de chumbo por *Aspergillus paraciticus* (AKAR; TUNALI; ÇABUK, 2007), de cobre por *Trametes versicolor* (BAYRAMOGLU; BEKTAS; ARICA, 2003), nos quais a capacidade de bioissorção foi mantida em cinco ciclos de sorção e dessorção.

A quantidade de metal remanescente no bioissorvente, dada pela capacidade de bioissorção em equilíbrio com o eluente (Q_{Eq}^D), foi obtida conforme explicado na seção 4.5.5.1. A figura 35 apresenta a média e o desvio padrão obtido da capacidade de bioissorção para cada ciclo de dessorção e nível.

Figura 35 - Capacidade de bioissorção na etapa de dessorção para 3 ciclos sucessivos.

Verifica-se pela figura 35 que a capacidade de bioissorção ao final da etapa de dessorção os valores estão muito próximos do valor esperado no equilíbrio, conforme demonstrado na isoterma de pH 1, na seção 5.4.2. Essa observação reforça as hipóteses de que a interação do cobre com a biomassa do fungo *Rhizopus Microsporus* seja um processo reversível.

Outro parâmetro utilizado para verificar a possibilidade de reuso do bioissorvente com o eluente proposto foi a verificação da perda de massa no processo de dessorção ao final dos três ciclos.

Tabela 15 - Perda de massa do bioissorvente na dessorção após três ciclos.

Unidade experimental	Amostra	m_i (g)	m_f (g)	Variação ($m_f - m_i$)	Perda (%)
1	Nível 1 R1	$8,23 \cdot 10^{-2}$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$4,18 \cdot 10^{-3}$	5,10%
2	Nível 2 R1	$8,33 \cdot 10^{-2}$	$8,26 \cdot 10^{-2}$	$7,20 \cdot 10^{-4}$	0,90%
3	Nível 1 R2	$8,46 \cdot 10^{-2}$	$8,75 \cdot 10^{-2}$	$-2,86 \cdot 10^{-3}$	-3,40%
4	Nível 2 R2	$8,49 \cdot 10^{-2}$	$8,66 \cdot 10^{-2}$	$-1,68 \cdot 10^{-3}$	-2,00%
				Média	0,10%

A tabela 15 mostra que a média de perda de massa seca nas unidades experimentais foi de $0,1 \pm 3,2\%$. O desvio observado é atribuído aos erros envolvidos na medição da massa seca. Este resultado comprova que a biomassa do fungo *Rhizopus Microsporus* apresenta alta resistência ao ataque ácido do eluente.

Os resultados demonstram que a biomassa de *Rhizopus Microsporus* possui potencial para operar repetidamente em um processo de sorção-dessorção de cobre em pelo menos três ciclos, demonstrando baixa ou nenhuma perda na capacidade de bioissorção ao longo deles e resistência física ao eluente ácido HCl 0,1 M.

5.7. Cinética da bioissorção

O experimento de cinética tem como principal objetivo analisar a variação do grau de bioissorção (Q_t). O procedimento experimental foi o descrito na seção 4.5.6. Os valores obtidos para a média e desvio padrão do grau de bioissorção ao longo do tempo são apresentados na figura 36.

Figura 36 - Resultado da remoção de cobre em função do tempo. $C_0 = 150$ mg/L, pH inicial = 5, $C_b = 2,5$ g/L, $\omega = 150$ rpm, $T = 25^\circ\text{C}$.

Para representar o comportamento da bioissorção ao longo do tempo há dois modelos cinéticos muito utilizados: o de pseudo-primeira e o de pseudo-segunda ordem. O ajuste destes modelos aos dados experimentais é mostrado na Figura 36. Ambos os modelos foram linearizados e verificados a sua adequação com os valores experimentais, conforme mostra a figuras 37 e 38.

Figura 37 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de pseudo-primeira ordem.

Figura 38 - Dados experimentais linearizados segundo modelo de pseudo-segunda ordem.

Os resultados das constantes cinéticas e dos coeficientes de determinação seguem na tabela 16.

Tabela 16 - Coeficientes de determinação para os modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

Pseudo-primeira ordem		Pseudo-segunda ordem	
K_1 (min^{-1})	R^2	K_2 ($\text{g mg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	R^2
1,38.10-2	0,992	4,53E-03	0,999

Verifica-se pelos coeficientes de determinação que ambos os modelos tiveram uma excelente adequação aos valores experimentais, no entanto, o modelo de pseudo-segunda ordem apresentou um ajuste ligeiramente melhor. Constata-se na literatura que diversos estudos de cinética de bioissorção demonstram resultados similares. Li et al. (2009) obtiveram um coeficiente de determinação para os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem de 0,94 e de 0,99 respectivamente para a bioissorção de cobre por *C. cladosporioides*; Benguella e Benaissa (2002) obtiveram coeficientes de 0,93 e 0,99 respectivamente para a bioissorção de cádmio por quitina.

Observa-se um aumento na sorção de metal pela biomassa ao longo do tempo. Verifica-se que o equilíbrio é alcançado em aproximadamente quatro horas para *Rhizopus microsporus* tratado termicamente, onde se verificou que 97% do total da capacidade de bioissorção foram atingidos. Percebe-se na literatura uma grande variedade nos tempos necessários para atingir o equilíbrio da bioissorção de cobre para os mais diversos microrganismos. *Aspergillus niger* atingiu o equilíbrio em seis horas (KAPOOR; VIRARAGHAVAN; CULLIMORE, 1999); *Cladosporium cladosporioides*, *Gliomastix murorum* e *Bjerkandera sp* atingiram ao final de duas horas (LI et al., 2009); *Phanerochaete chrysosporium* imobilizado em uma hora (IQBAL; EDYVEAN, 2004). Esta grande diversidade de comportamento pode ser explicado por diversos parâmetros que influenciam a taxa do processo, como as propriedades do organismo e de seu suporte, propriedades do íon metálico, (BAYRAMOGLU; BEKTAS; ARICA, 2003), assim como a temperatura do sistema.

6. CONCLUSÕES

A biossorção de cobre (II) por *Rhizopus microsporus* foi estudada experimentalmente em escala de laboratório em regime de bateladas a partir de soluções sintéticas de cobre em contato com a biomassa do fungo.

Os modelos de adsorção de Langmuir e Freundlich mostraram boa adequação com as isotermas de biossorção com e sem controle de pH. Foi observada uma grande diferença entre as isotermas de pH 1 e pH 5, sendo obtida as capacidades de biossorção na saturação ($q_{\max}$) de 5,0 mg/g e 32,5 mg/g respectivamente. Essa diferença pode ser explorada como uma possível proposta de aplicação prática de um processo de biossorção envolvendo ciclos de regeneração de biossorvente e a recuperação do metal sorvido.

O estudo cinético mostrou que o tempo de equilíbrio do processo foi em torno de 4 horas e que tanto o modelo de pseudo-primeira ordem quanto o de pseudo-segunda ordem mostraram excelente adequação aos dados experimentais.

Foi observada uma redução do pH ao longo do processo de biossorção, reforçando que a troca iônica pode ser um dos principais mecanismos envolvidos na interação do cobre e a parede celular do fungo *Rhizopus microsporus*. Constatou-se também que a elevação do pH favorece fortemente a capacidade de biossorção de cobre, sendo os valores de 33,1 mg/g e 1,9 mg/g encontrados em valores finais de pH de 6 e 1, respectivamente.

O estudo de ciclos de sorção-dessorção demonstrou que a biossorção é um processo reversível, pois o eluente HCl (0,1 M) foi capaz de dessorver o cobre com valores muito próximos ao predito pela isoterma de pH 1. A biomassa também manteve a capacidade de biossorção praticamente constante. Os ciclos de sorção-dessorção não provocaram perda de biomassa devido ao ataque ácido do eluente. Estes resultados, obtidos após três ciclos de sorção e dessorção, indicam que a biomassa pode ser reutilizada por um número ainda maior de ciclos.

O pré-tratamento térmico na biomassa mostrou ter efeito desprezível sobre a capacidade de biossorção. Conclui-se que uma temperatura de 121 °C não afeta os sítios ativos presentes no biossorvente. Conclui-se que, para aplicação industrial, é

possível aplicar biomassa pré-tratada termicamente (morta), pois ela apresenta menores riscos a seres humanos com um desempenho equivalente à biomassa viável.

A principal fonte de variância da capacidade de bioissorção é a variabilidade não controlável de lotes de biomassa, enquanto os demais fatores – a curva de calibração, a amostragem da biomassa, o preparo de amostras e a leitura EAA – são pouco significativos. Essa informação é útil para a aplicação de melhorias no processo de experimentação.

Em síntese, a biomassa tratada termicamente foi capaz de ser regenerada e apresentou ter uma capacidade de bioissorção de cobre na mesma de ordem de grandeza de diversos outros microrganismos encontrados na literatura, mostrando, portanto, ser um potencial agente de tratamento e recuperação de cobre (II) de efluentes.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterização da biomassa, identificando os sítios e grupos ativos, a estrutura morfológica e as propriedades físico-químicas.
- Avaliar possibilidades de imobilização da biomassa e seus efeitos.
- Realizar ensaios em regime contínuo, como colunas de leito fixo ou fluidizado. As quais podem oferecer informações importantes para o *scale up* de sistemas de sorção.
- Realizar ensaios com soluções contendo outros íons comuns a um efluente real.

8. BIBLIOGRAFIA

AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2243–57, set. 2007.

AKAR, T.; TUNALI, S.; ÇABUK, A. Study on the characterization of lead (II) biosorption by fungus *Aspergillus parasiticus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 3, p. 389–405, 2007.

AKSU, Z.; SAG, Y.; KUTSAL, T. The biosorption of copper(II) by *C. vulgaris* and *Z. ramigera*. **Environmental Technology**, v. 13, n. 6, p. 579–586, jun. 1992.

ARECO, M. M. et al. Biosorption of Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II) by dead biomasses of green alga *Ulva lactuca* and the development of a sustainable matrix for adsorption implementation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 213–214, p. 123–132, 30 abr. 2012.

AZIZIAN, S. Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, n. 1, p. 47–52, 1 ago. 2004.

BAI, S. R.; ABRAHAM, T. E. Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 1, p. 73–81, ago. 2001.

BAYRAMOGLU, G.; BEKTAS, S.; ARICA, M. Y. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 101, n. 3, p. 285–300, 1 ago. 2003.

BENGUELLA, B.; BENAÏSSA, H. Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies. **Water research**, v. 36, n. 10, p. 2463–74, maio 2002.

BORBA, C. E. et al. Removal of nickel(II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. 184–191, jun. 2006.

CARMONA, M. E. R.; SILVA, M. A. P.; LEITE, S. G. F. Biosorption of chromium using factorial experimental design. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 779–788, fev. 2005.

DAVIS, T. A. et al. Cadmium Biosorption by *S. fluitans*: Treatment, resilience and uptake relative to other *Sargassum* spp. and brown algae. **Water Quality Research**, v. 39, n. 3, p. 183–189, 2004.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R. H. S. F. *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4270–4278, 2000.

FOUREST, E.; CANAL, C.; ROUX, J. C. Improvement of Heavy-Metal Biosorption by Mycelial Dead Biomasses (*Rhizopus Arrhizus*, *Mucor Miehei* and *Penicillium*

Chrysogenum) : pH Control and Cationic Activation. **Fems Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 325–332, 1994.

FOUREST, E.; ROUX, J.-C. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 399–403, 1992.

GALLI, E. et al. Copper biosorption by *Auricularia polytricha*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 133–137, 2003.

GUPTA, V. K. et al. Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by *Spirogyra* species. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 296, n. 1, p. 59–63, 1 abr. 2006.

HAN, R. et al. Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 3, p. 1569–76, 11 out. 2006.

HASAN, S. H.; SRIVASTAVA, P.; TALAT, M. Biosorption of Pb(II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: central composite design for optimization of process variables. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 2-3, p. 1155–62, 15 set. 2009.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 451–465, jul. 1999.

HOLAN, Z. R.; VOLESKY, B.; PRASETYO, I. Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 8, p. 819–25, 5 abr. 1993.

HUANG, C.; HUANG, C.; MOREHART, A. L. The removal of Cu(II) from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. **Water Research**, v. 24, n. 4, p. 433–439, 1990.

IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Minerals Engineering**, v. 17, n. 2, p. 217–223, fev. 2004.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v. 8524, n. 95, p. 195–206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 95–104, 1999.

KLEINÜBING, S. J. et al. Copper and nickel competitive biosorption simulation from single and binary systems by *Sargassum filipendula*. **Chemical Engineering Journal**, v. 184, p. 16–22, mar. 2012.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 291–300, 1998.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B.; DEMOPOULOS, G. Optimizing Cu removal / recovery in a biosorption column. **Water Research**, v. 31, n. 9, p. 2327–2339, 1997.

KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 2, p. 137–142, 1988.

LI, X. et al. Equilibrium and kinetic studies of copper(II) removal by three species of dead fungal biomasses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, n. 1-3, p. 469–474, 15 jun. 2009.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 261–78, abr. 2004.

MATOS, M. DAS G. N. et al. Bioadsorption and ion exchange of Cr³⁺ and Pb²⁺ solutions with algae. **Adsorption**, v. 15, n. 5-6, p. 535–535, 24 fev. 2009.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1389–1416, 2013.

MULLEN, M. D. et al. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 129–135, 1992.

NAJA, G. M.; MURPHY, V.; VOLESKY, B. **Biosorption, metals**, 2010. (Nota técnica).

NOURBAKHS, M. et al. A Comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 1–5, 1994.

ÖZER, A. et al. Biosorption of copper(II) ions on *Enteromorpha prolifera*: Application of response surface methodology (RSM). **Chemical Engineering Journal**, v. 146, n. 3, p. 377–387, fev. 2009.

OZTÜRK, A.; ARTAN, T.; AYAR, A. Biosorption of nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 34, n. 2, p. 105–11, 15 mar. 2004.

PERRY, R. H.; GREEN, D.W.; MALONEY, J.O. **Perry's chemical engineers' handbook**, 7ª edição: McGraw-Hill, 16-6p, 1999.

PERPETUO, E. A.; SOUZA, C. B.; NASCIMENTO, C. A. O. Engineering bacteria for bioremediation. **Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications**, v. 11, n. 3, p. 605–632, jun. 2011.

PRAKASHAM, R. S. et al. Biosorption of chromium VI by free and immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Environmental Pollution**, v. 104, n. 3, p. 421–427, mar. 1999.

RAKHSHAEI, R.; KHOSRAVI, M.; GANJI, M. T. Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 134, n. 1-3, p. 120–9, 30 jun. 2006.

RAO, N. C. R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Sorption of copper (II) from aqueous phase by waste biomass. **Journal of Environmental Engineering**, v. 119, n. 2, p. 369–377, 1993.

REEDER, R. J.; SCHOONEN, M. A. A.; LANZIROTTI, A. Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 64, n. 1, p. 59–113, 1 jan. 2006.

REZAEI, H.; KULKARNI, S. D.; SAPTARSHI, P. G. Study of physical chemistry on biosorption of copper by using *Sprulina* sp. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 3, p. 1429–1439, 2011.

ROME, L. DE; GADD, G. M. Copper adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Cladosporium resinae* and *Penicillium italicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 1987, n. 2, p. 84–90, 1987.

ROSTAMI, K.; JOODAKI, M. . Some studies of cadmium adsorption using *Aspergillus niger*, *Penicillium austurianum*, employing an airlift fermenter. **Chemical Engineering Journal**, v. 89, n. 1-3, p. 239–252, out. 2002.

SALVADORI, M. R. et al. Biosynthesis and uptake of copper nanoparticles by dead biomass of *Hypocrea lixii* isolated from the metal mine in the Brazilian Amazon Region. **PLOS one**, v. 8, n. 11, jan. 2013.

SAR, P. et al. Metal adsorption and desorption by lyophilized *Pseudomonas aeruginosa*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 101–110, 1999.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium(II), lead (II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 67–70, jan. 2001.

SCHIEWER, S.; VOLESKY, B. Mathematical evaluation of the experimental and modeling errors in biosorption. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 11, p. 843–848, 1995.

SCHIEWER, S.; VOLESKY, B. Modeling multi-metal ion exchange in biosorption. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 10, p. 2921–2927, 1996.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation process principles : chemical and biochemical operations**. 3. ed. [s.l.] Wiley, 2011.

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GAAD, G. M. Metal accumulation by fungi : applications in environmental biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 126–130, 1994.

TSEZOS, M.; VOLESKY, B. Biosorption of uranium and thorium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 583–604, 1981.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 44, n. 3, p. 301–316, mar. 1997.

VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption : a solution to pollution ? **International Microbiology**, v. 3, p. 17–24, 2000.

VIJAYARAGHAVAN, K. et al. Biosorption of Reactive black 5 by *Corynebacterium glutamicum* biomass immobilized in alginate and polysulfone matrices. **Chemosphere**, v. 68, p. 1838–1845, 2007.

VIJAYARAGHAVAN, K.; PALANIVELU, K.; VELAN, M. Biosorption of copper(II) and cobalt(II) from aqueous solutions by crab shell particles. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1411–1419, 2006.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 3, p. 266–91, 2008.

VOLESKY, B. Biosorbents for metal recovery. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 96–101, abr. 1987.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 203–216, fev. 2001.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4017–29, out. 2007.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 3, p. 235–50, 1995.

VOLESKY, B.; NAJA, G. Biosorption: application strategies. **Proceedings of the 16th Biotechnology Symposium**, p. 531–542, 2005.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.

WILLIAM, T. et al. **Effect of pH , Concentration and Temperature on Copper and Zinc Hydroxide Formation / Precipitation in Solution** SidneyEngineers Australia, , 2011. Disponível em: <<http://arrow.unisa.edu.au:8081/1959.8/123424>>