B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Avaliação dos Métodos de Scatchard e Funções de
Equilíbrio Diferenciais no Estudo das Propriedades de
Ligação de Íons de Cu(II) na Superfície de Espécies
Mistas e Liofilizadas de *Spirulina* (Cianobactéria)**

Antonio Cesar Parmeggiani

Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Jorge César Masini

23 de junho de 2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005641

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Parmeggiani, Antonio Cesar

P255a Avaliação dos métodos de Scatchard e funções de equilíbrio
diferenciais no estudo das propriedades de ligação de íons de
Cu(II) na superfície de espécies mistas e liofilizadas de *Spirulina*
(Cianobactéria) / Antonio Cesar Parmeggiani. -- São Paulo,
2003.
77p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Masini, Jorge César

1. Química analítica 2. Química ambiental I. T. II.
Masini, Jorge César, orientador.

543 CDD

**“Avaliação dos métodos de Scatchard e
funções de equilíbrio diferenciais no estudo
das propriedades de ligação de íons de
Cu(II) na superfície de espécies mistas e
liofilizadas de *spirulina* (cianobactéria)”**

ANTONIO CESAR PARMEGGIANI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Química - Área: Química Analítica.

Aprovado por:

Prof. Dr. JORGE CÉSAR MASINI
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. RENATO SANCHES FREIRE
IQ – USP

Prof. Dr. MÁRCIO ANTONIO AUGELLI
IQ – UNESP – Guaratinguetá

SÃO PAULO
25 DE JULHO 2003.

DEDICATÓRIA

À Rose, Alexandre, Marco e Marian, minha família!

A Miguel (*in memoriam*) e Josefina, meus pais!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge César Masini pela orientação, colaboração e apoio.

A todos os amigos do Instituto de química pelo ambiente receptivo.

Aos colegas professores da ETE Júlio de Mesquita, e em especial ao professor Pedro Luiz Rodrigues da Silva, pelo incentivo.

Aos meus familiares, em especial meu irmão Jair, pela presença nas horas boas e, principalmente, nas horas mais difíceis.

À FAPESP E CEETEPS pelo afastamento remunerado concedido.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Bioissorção.....	1
1.2 – Algas em reservatórios de Abastecimento de Água.....	3
1.3 – A capacidade de Troca Catiônica e Propriedades da Superfície Celular.....	6
1.4 – Fatores que influenciam no desempenho das algas como adsorventes.....	7
1.4.1 – Tempo da adsorção.....	7
1.4.2 – Espécie da Alga.....	8
1.4.3 – Espécie do Metal.....	9
1.4.4 – Concentração inicial do metal.....	11
1.4.5 – pH.....	13
1.4.6 – Força Iônica.....	14
1.5 – A microalga <i>Spirulina</i>	14
2 – OBJETIVOS.....	20
3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1 – Equipamentos e materiais.....	21
3.2 – Reagentes, Soluções e amostras.....	21
3.2.2 – Amostras.....	23
3.3 – Tempo de equilíbrio de adsorção.....	24
3.4 – Titulações.....	24
3.4.1 – Titulações ácido-base.....	24
3.4.2 – Titulações da <i>Spirulina</i> com Cu(II).....	25
3.5 – Procedimentos e métodos de cálculo.....	27
3.5.1 Caracterização Ácido-Base.....	27
3.5.1.1 – Calibração de eletrodos em termos de concentração.....	27
3.5.1.2 – Determinação da estequiometria e pKa dos sítios ionizáveis.....	38
3.5.2 – Caracterização das Propriedades de Complexação/Adsorção.....	43
3.5.2.1 – Determinação da Concentração de Cobre Livre e Cobre Ligado.....	43
3.5.2.2 Gráficos de Scatchard e a Capacidade de Complexação/Adsorção.....	44
3.5.2.3 - Funções de Equilíbrio Diferenciais (DEF).....	48
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 – Caracterização ácido-base.....	56
4.2 – Tempo de equilíbrio com Cu(II).....	59
4.3 – Isotermas de adsorção.....	61
4.4 – Método de Scatchard.....	64
4.5 – A função diferencial de equilíbrio.....	67
4.6 – Avaliação dos modelos.....	69
5 – CONCLUSÕES.....	72
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7 – CURRÍCULUM VITAE.....	77

FIGURAS

Figura 1 – Imagens da <i>Spirulina</i>	18.
Figura 2 – Fotos da <i>Spirulina</i> (microscópio eletrônico).....	19.
Figura 3 – Gráfico da Função de Gran X Volume de NaOH.....	31.
Figura 4 – Gráfico de Y ($Y = E - 59,16 [H^+]$) em função da $[H^+]$	32.
Figura 5 – Gráfico de ($Y = E + 59,16 [OH^-]$) em função da $[OH^-]$	35.
Figura 6 – Gráfico da diferença entre o pH experimental e o pH calculado em relação ao número de classes de sítios ionizáveis em função do pH experimental.....	42.
Figura 7 – Resposta do eletrodo seletivo a íons de cobre em meio complexante e não complexante.....	44.
Figura 8 – Gráfico obtido pelo método de Scatchard ($[CuL]/[Cu(II)] \times [CuL]$) para a suspensão da alga total	48.
Figura 9 – Gráfico do $\ln C_{Cu(II)} \times \ln \alpha$	53.
Figura 10 – Gráfico do $\log K_{DEF} \times \log \theta$	54.
Figura 11 – Foto da <i>Spirulina</i> obtida no fotomicroscópio Zeiss.....	55.
Figura 12 – Titulação da Suspensão Total da alga, da suspensão da Fração Insolúvel e da solução da Fração Solúvel com NaOH 0,125 mols.L ⁻¹	57.
Figura 13 – Distribuição e concentração dos sítios ionizáveis dos três materiais estudados.....	58.
Figura 14 – Curva da adsorção de Cu(II)X tempo (min) para a Suspensão Total da alga.....	60.
Figura 15 – Curvas da titulação complexométrica dos três materiais estudados.....	62.
Figura 16 – Isotermas de adsorção do Cu(II) obtida pela titulação potenciométrica dos três materiais estudados.....	63.
Figura 17 – Gráficos obtidos pelo método de Scatchard ($[CuL]/[Cu(II)] \times [CuL]$) para os três matérias estudados.....	65.
Figura 18 – Variação do $\log K_{DEF}$ em função do $\log \theta$, para os três materiais estudados.....	68.

Figura 19 – Modelagem da especiação de cobre nas titulações dos três materiais estudados.....70.

TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de sulfato de Cobre (II) e Cloro letais para vários microorganismos.....	4.
Tabela 2 – Resistência de algas a $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em meio de cultura.....	5.
Tabela 3 – Parâmetros de Freundlich para diferentes espécies de microalgas.....	9.
Tabela 4 – Adsorção de metais pesados em <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	10.
Tabela 5 – Quantidade de metal adsorvida em função de diferentes concentrações iniciais de Cu(II), Ni(II) e Cr(VI).	
Tabela 6 – Parâmetro de Langmuir (Q_{max}) para Pb(II) e Cu(II) para as algas <i>Durvillae potatorum</i> e <i>Ecklonia radiata</i> em diferentes pH.....	13.
Tabela 7 – Comparação entre a produção de <i>Spirulina</i> e grãos.....	16.
Tabela 8 – Aminoácidos presentes na <i>Spirulina</i>	17.
Tabela 9 – Dados da titulação potenciométrica do HCl.....	30.
Tabela 10 – Valores de Y ($Y = E - 59,16 [\text{H}^+]$) em função da $[\text{H}^+]$	32.
Tabela 11 – Valores de Y ($Y = E + 59,16 [\text{OH}^-]$) em função da $[\text{OH}^-]$	34.
Tabela 12 – Dados da titulação da solução da Fração Solúvel por NaOH.....	36.
Tabela 13 – Titulação da solução da Fração Solúvel por Cu(II).....	47.
Tabela 14 – Dados experimentais e resultados de cálculos para a determinação de K_{DEF} em função do grau de ocupação dos sítios de complexação, para a solução da Fração Solúvel.....	52.
Tabela 15 – Resultados obtidos pelo método de Scatchard para a complexação/adsorção de Cu(II) para os três materiais estudados.....	66.
Tabela 16 – Faixa de $\log \theta$, faixa de $\log K_{\text{DEF}}$, $\log K^{\circ}_{\text{DEF}}$ e Γ obtidos pelo método da Função de Equilíbrio Diferencial, para os três materiais estudados.....	69.

GLOSSÁRIO

Me = Íon do metal.

L = Sítio ligante.

Q = Quantidade do metal adsorvida por grama da alga.

C₀ = Concentração do metal na presença da alga.

C₁ = Concentração do metal na ausência da alga.

V = Volume da solução em litros.

C_e = Concentração do metal em solução no equilíbrio.

K_f = Constante empírica de Freundlich que indica a capacidade de adsorção.

1/n = Constante empírica de Freundlich que indica a intensidade de adsorção.

HL = Sítio ionizável.

L⁻¹ = Ligante.

Q_{max} = C_c = Quantidade máxima do metal adsorvida em mmol por grama da alga.

pH = -log [H⁺].

[H⁺] = Concentração do íon H⁺.

γH⁺ = Coeficiente de atividade do íon H⁺.

aH⁺ = Atividade do íon H⁺.

E_j = Potencial de junção líquida.

jH = Parâmetro empírico dependente do meio iônico relativo ao íon H⁺.

jOH = Parâmetro empírico dependente do meio iônico relativo ao íon OH⁻.

[OH⁻] = Concentração do íon OH⁻.

V_e = Volume da base adicionada no ponto de equilíbrio em litros

V_t = Volume do titulante adicionado em litros.

V₀ = Volume inicial na cela de titulação em litros.

C_B = Concentração da base em mols.L⁻¹.

V_{NaOH} = Volume de NaOH adicionado em mL.

F.Gran = Função de Gran.

Y = E - 59,16 log [H⁺] (antes do ponto estequiométrico, na região ácida) .

$Y = E + 59,16 \log [\text{OH}^-]$ (após o ponto estequiométrico, na região básica).

$E^{\circ'}$ = Função de Gran quando o volume adicionado de NaOH = 0 ou quando $V = 0$.

K_w = Constante de dissociação iônica da água.

$E^{\circ''} = E^{\circ'} + 59,16 \log K_w$.

pK_a = O negativo do logaritmo da constante do sítio ionizável.

VHA_o = Volume de equivalência para o ácido forte.

HA_n = Sítio ionizável.

VHA_n = Volume de equivalência para o sítio ionizável HA_n .

K_{HA_n} = Constante de ionização do sítio HA_n .

m = Total de dados (V e $p^{\circ}H$) usado na análise de regressão.

$p^{\circ}H$ (med) = Refere-se ao pH experimental.

$p^{\circ}H$ (calc.) = É o pH calculado.

$[\text{Cu(II)}]$ = Concentração de Cu(II) livre na solução em mol.L^{-1} .

$C_{\text{Cu(II)}}$ = Concentração total de Cu(II) adicionado em mol.L^{-1} .

$V_{\text{Cu(II)}}$ = Volume de solução de Cu(II) adicionado à cela.

$M_{\text{Cu(II)}}$ = Concentração da solução titulante de Cu(II) em mol.L^{-1} .

V_B = Volume da base adicionado à cela de titulação.

$[\text{CuL}]$ = Concentração de cobre complexado em mol.L^{-1} .

$[\text{CuL}_j]$ = Concentração de íons de Cu(II) ligados à classe de sítios j .

$[\text{L}_j]_t$ = Concentração total dos sítios de complexação do tipo j em mmol por litro.

j_v = Grau de ocupação dos sítios complexantes do tipo j .

$\{P\}$ = Concentração do ligante em g.L^{-1} .

K^* = Constante condicional de estabilidade média.

K_{DEF} = Constante de estabilidade em função do grau de ocupação dos sítios complexantes.

θ = Grau de ocupação dos sítios complexantes ($\theta = [\text{CuL}]/[\text{L}_j]_t$).

ΔX_j = Fração quantidade de matéria dos sítios complexantes do tipo j .

$\alpha = C_{\text{Cu(II)}}/[\text{Cu(II)}]$.

K°_{DEF} = Valor de K_{DEF} quando todos os sítios complexantes estão ocupados ($\theta=1$).

Γ = Parâmetro de heterogeneidade.

N = número de classes de sítios ionizáveis determinado na caracterização ácido-base.

C_{HAN} = Concentração total da classe de sítios ionizáveis HAn.

$J = 1 \Rightarrow$ Classe de sítios complexantes do tipo 1.

$J = 2 \Rightarrow$ Classe de sítios complexantes do tipo 2.

Log K^* = Logaritmo da constante condicional de estabilidade média.

Log C = Logaritmo da concentração da espécie de cobre não ligada no equilíbrio, em mol.L⁻¹.

RESUMO

A ligação de Cu(II) à superfície de espécies mistas e liofilizadas da microalga *Spirulina* foi estudada em pH 6.0 por titulação potenciométrica com eletrodo íon-seletivo para Cu(II). Três materiais foram estudados: a suspensão completa da alga (Suspensão Total), a água de lavagem obtida por centrifugação da suspensão total (Fração Solúvel) e a suspensão das células lavadas com água (Fração Insolúvel). Os métodos de Scatchard e de Funções Diferenciais de Equilíbrio (*DEF*) foram usados para tratamento de dados. Os gráficos de Scatchard possibilitaram a determinação de duas classes de sítios de complexação, sendo que os valores de $\log K^*$ para os sítios mais fortes variaram entre 7,3 e 7,9. Para os sítios mais fracos os valores de $\log K^*$ foram determinados entre 3,5 e 3,9. As concentrações totais dos sítios de ionização foram determinadas em pH 6,0 por titulação potenciométrica com solução de NaOH, resultando $1,6 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,5$ e $0,92 \pm 0,08$ mmol g⁻¹ para a Suspensão Total, Fração Solúvel e Fração Insolúvel, respectivamente. O método *DEF* revelou uma variação linear dos valores de $\log K_{DEF}$ em função do $\log \theta$ (θ = grau de ocupação dos sítios de complexação), sendo que os valores de $\log K_{DEF}$ decresceram de 9 para 4 em consequência do aumento de $\log \theta$ de -2,5 para -0,25. Os graus de heterogeneidade determinados por *DEF* ficaram na faixa entre 0,4 e 0,5 para os três materiais estudados.

ABSTRACT

The binding of Cu(II) to the surface of mixed species of lyophilized *Spirulina* was studied at pH 6.0 by potentiometric titration monitored with a copper ion selective electrode. Three materials were studied: the total suspension of alga (Total Suspension), the washing water that resulted from centrifugation of the total suspension (Soluble Fraction), and the water-washed cells (Insoluble Fraction). The Scatchard method and the Differential Equilibrium Functions (*DEF*) were used for the treatment of the titration data. The Scatchard plots determined two classes of binding sites, with log K^* values for stronger sites varying between 7.3 and 7.9. For the weaker sites the log K^* values ranged between 3.5 and 3.9. The total concentration of binding sites at pH 6.0 were determined by potentiometric titration with NaOH solution, resulting 1.6 ± 0.1 , 1.5 ± 0.5 and 0.92 ± 0.08 mmol g⁻¹ for the Total Suspension, Soluble Fraction, and Insoluble Fraction, respectively. The *DEF* approach revealed a linear variation of log K_{DEF} as a function of log θ (θ = degree of site occupation), with log K_{DEF} decreasing from 9 to 4 as a consequence of increasing log θ from -2.5 to -0.25. The degree of site heterogeneity determined by the *DEF* approach was between 0.4 and 0.5 for the three materials studied.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Biossorção

O desenvolvimento humano e o crescimento populacional resultaram em novas atividades e alterações importantes em atividades tradicionais na indústria e na agricultura. Estas atividades, mais os detritos dispostos irregularmente, são responsáveis pela poluição do meio ambiente por metais pesados.

Todos os anos cerca de 5 milhões de toneladas destes metais são lançados na biosfera. Existem aproximadamente 40 tipos de metais que apresentam toxicidade potencial, mesmo em baixas concentrações, para seres humanos, animais, plantas e microorganismos. Os riscos à saúde representados por estes metais, que acabarão integrados à cadeia alimentar, são difíceis de serem previstos, pois contaminam o solo, a água e o ar. Em muitos tipos de detritos os metais pesados se apresentam em concentrações relativamente altas.

Existem vários métodos de remoção de metais pesados de líquidos, principalmente quando os mesmos se encontram em concentrações elevadas, por exemplo: precipitação como hidróxidos, sulfetos, carbonatos, etc; oxidação/redução ; filtração; processos eletroquímicos; adsorção em carvão ativado; resinas de troca iônica, e outros. Entretanto, quando as concentrações de metais pesados são baixas (inferiores a 100 mg L^{-1}) e variáveis, os métodos tradicionais apresentam os seguintes problemas: baixa eficiência, alto custo e, em muitos casos, a necessidade da disposição final do lodo contaminado com os metais removidos. O lodo é um perigo potencial como contaminante de águas (rios, represas, lençóis freáticos, etc.). Por isso existe um crescente interesse na aplicação da tecnologia da biossorção para a remoção de quantidades traços de metais pesados em soluções diluídas [1,2].

A biossorção neste trabalho é definida como a acumulação e concentração de poluentes de soluções aquosas usando materiais biológicos, permitindo assim a recuperação ou disposição aceitável dos poluentes.

A biossorção ocorre por mecanismos metabólicos ou por vias físico-químicas, apresentando os mecanismos [1,2]:

i – Mecanismo de Sorção Extracelular

- Interação eletrostática entre as cargas positivas dos íons do metal pesado com as cargas negativas dos grupos ligantes das células (adsorção ou troca iônica).
- Microprecipitação.
- Complexação superficial.
- Ligações entre os cátions dos metais pesados e proteínas.
- Ligações com outros polímeros.

ii – Mecanismos de Acumulação Intracelular

- Complexação dos íons dos metais pesados.
- Incorporação dos metais pesados nos vacúolos (desmobilização e concentração).
- Ligações com proteínas, lipídeos, DNA, etc.

Devido a problemas inerentes a manter a população microbiológica ativa nas mais diversas condições em que se apresentam os efluentes aquosos, os sistemas vivos não são, freqüentemente, confiáveis (falta de resistência ao meio, alteração do metabolismo, liberação de substâncias complexantes, etc.). Os microorganismos nas formas não vivas (liofilizados, etc) são confiáveis (para um mesmo microorganismo as propriedades complexantes dependem apenas da temperatura e do meio) e muitos deles são usados nos estudos que visam desenvolver materiais bioissorventes eficientes na remoção de metais pesados de águas doces ou salgadas [3,4].

Os bioissorventes imobilizados podem ser reusados após a regeneração, e recuperação do metal, com o efluente adequado. A regeneração evita problemas com a disposição final da biomassa no depósito de lixo ou nos incineradores.

Mesmo considerando-se a excelência dos trabalhos relacionados ao tema, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que sejam capazes de reduzir as concentrações dos metais pesados a níveis aceitáveis, mas que, ao mesmo tempo, não tornem o processo economicamente inviável.

A adsorção de metais pesados por algas, bactérias, fungos e leveduras vem sendo extensivamente estudada e a aplicação em tratamentos de água tem sido documentada. Nestes estudos as algas têm recebido atenção especial. Estudos

apontam que as algas são capazes de acumular metais pesados em águas que apresentam concentrações dos íons dos metais em torno de ppm e até ppb.

O estudo dos mecanismos envolvidos na adsorção de metais pesados por algas é muito importante, quer seja para a aplicação direta de algas em tratamentos de águas industriais ou para consumo humano, quer seja para o desenvolvimento de materiais sintéticos que possam ser usados com a mesma finalidade [1- 44].

Com base na estrutura e composição química podemos diferenciar três componentes importantes relacionados com as células das algas:

(i) A Membrana Citoplasmática: É muito delgada (aproximadamente 8 nm) mas forma a principal barreira reguladora do fluxo de troca de nutrientes e metabólicos entre a célula e o meio ambiente. É constituída por uma dupla camada de lipídeos contendo também proteínas e glicoproteínas.

(ii) A Parede Celular: É composta principalmente por polissacarídeos neutros (celulose), polissacarídeos ácidos (hemicelulose, ácido poliurônico) e proteínas. O esqueleto da parede é composto por elementos microfibrilares (entre 10 a 30 nm de diâmetro e formada em parte por celulose cristalina). Embora a proporção dos constituintes seja variável, as composições típicas de plantas superiores são: 5% de celulose, 33 % hemicelulose, 2% de proteínas e 60% de água. As algas apresentam quantidades maiores de proteínas. Por exemplo, o grupo *Vaucheria* apresenta de 16% a 27% em massa deste componente. É importante destacar que a análise das proteínas da parede celular é muito difícil e, muitas vezes, seus valores são superestimados.

(iii) A Mucilagem externa: É composta principalmente por polissacarídeos ácidos e apresentam estrutura fibrilar. Desempenha considerável papel na fixação e, particularmente, na troca de elementos traços entre partículas sólidas e o interior da célula.

A estrutura total da parede celular pode ser considerada como um gel permeável com elevada área superficial que se deve, principalmente, à mucilagem e é diretamente proporcional ao grau de hidratação. Áreas superficiais de $1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para materiais completamente secos e em torno de $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para materiais liofilizados têm sido descritas na literatura [45].

1.2 – Algas em reservatórios de Abastecimento de Água

No preparo, manutenção e uso dos reservatórios de água para o consumo humano, o crescimento das algas é um grande problema. Dentre os algicidas utilizados, o sulfato de cobre (II) é o mais eficaz e mais amplo. Segue-se o cloro, seja na forma elementar ou como hipoclorito de cálcio. O mecanismo de atuação dos algicidas é pouco conhecido. No livro *The Microscopy of Drinking Water* [46], Whipple concluiu: "Provavelmente o veneno se combina com o plasma celular e produz compostos que interferem na continuação dos processos biológicos, causando a morte. O modo de agir é similar a um processo de desinfecção e depende do número de células, da concentração do agente químico e do tempo de exposição". Chang [47] demonstrou a penetração do cloro no cisto da *Endamoeba histolytica*. A tese básica de Whipple se manteve na teoria da substância enzimática de Green [48] aplicada ao estudo da ação bactericida do cloro [49], mostrando que a desinfecção envolve a inibição de um processo enzimático, pelo qual a glicose é oxidada na célula bacteriana.

Hale [50] Demonstrou que qualquer que seja a natureza da ação algicida do sulfato de cobre (II) e do cloro, sabe-se que os organismos variam na sua resistência a eles como demonstrado na tabela 1 .

Tabela 01 – Quantidade de Sulfato de cobre (II) e cloro admitidas letais para vários microorganismos.

Microorganismo	Dosagem de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ppm)	Dosagem de Cloro (ppm)
<i>Cianofíceas</i>		
<i>Anabaena</i>	0,12 – 0,48	0,5 – 1,0
<i>Aphanizomenon</i>	0,12 – 0,50	0,5 – 1,0
<i>Clathrocystis</i>	0,12 – 0,25	0,5 – 1,0
<i>Coelosphaerium</i>	0,20 – 0,33	0,5 – 1,0
<i>Gloecapsa</i>	0,12	–
<i>Microsystis</i>	0,24	–
<i>Oscillatoria</i>	0,20	–
<i>Rivularia</i>	0,20 – 0,50	1,1

Fonte: E.F. Hale, *The use of copper sulfate in control of microscopic organisms*, Phelps Dodge Refining Corp., New York, 1942 [50].

Não se pode estabelecer uma dosagem fixa de algicida para um dado manancial ou para um tipo de alga. Fatores como dureza, temperatura e pH da água devem ser levados em consideração. Em meio de cultura, têm sido observados os seguintes graus de resistência ao sulfato de cobre (II) [51], conforme mostrado na Tabela 02.

Tabela 02– Resistência de vários gêneros de algas ao $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em meio de cultura.

	Algas	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
Algas Azuis	<i>Calothrix</i>	até 8,00
	<i>Cylindrospermum</i>	até 0,25
	<i>Microcystis</i>	até 0,25
	<i>Phormidium</i>	até 0,25
	<i>Symploca</i>	até 2,00
Algas verdes	<i>Ankistrodesmus</i>	até 0,50
	<i>Chorella</i>	até 0,50
	<i>Chlorococcum</i>	até 2,00
	<i>Coelastrum</i>	até 1,00
	<i>Gloeocystis</i>	até 0,25
	<i>Oocystis</i>	até 1,00
	<i>Scenedesmus</i>	até 8,00
	<i>Sphaerella</i>	até 0,50
	<i>Stigeoclonium</i>	até 0,25
Diatomáceas		
	<i>Achnanthes</i>	até 1,00
	<i>Gomphonema</i>	até 0,125
	<i>Nitzschia</i>	até 1,00
Flagelados Clorofilados		
	<i>Chlamydomonas</i>	até 1,00

Fonte: S.M. Branco, Hidrologia Aplicada à Engenharia Sanitária, Convênio Cetesb-Ascetesb, 3ª Edição, Cetesb-Ascetesb, São Paulo, 1986 [51].

1.3 – A capacidade de Troca Catiônica e Propriedades da Superfície Celular

A capacidade de troca catiônica (CTC) de mucilagem de alga pode ser estimada a partir do teor de ácido urônico e grupos sulfônicos, tendo-se observado um número entre 0,2 e 1,8 mmol do íon por grama de alga [52].

O transporte e a biodisponibilidade de prótons e cátions metálicos em ambientes aquáticos dependem de processos de complexação e precipitação por íons OH^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-} , HS^- , S^{2-} e por matéria orgânica natural, como algas, bactérias e restos de material vegetal.

Superfícies de parede celular apresentam algumas características comuns:

(i) Polifuncionalidade

Uma única macromolécula pode conter sítios ionizáveis (sítios de ligação) de diferentes naturezas químicas, tais como grupos carboxílicos e fenólicos. Além disso, a força de ligação de um sítio de mesma natureza depende do ambiente eletrônico ao qual este sítio está ligado [45].

(ii) Labilidade Conformacional

A conformação espacial das macromoléculas depende da composição química do meio, sendo influenciada por parâmetros como o pH, que determina a carga sobre a macromolécula, bem como a formação de pontes de hidrogênio, a força iônica (alteração do grau de hidratação) e a concentração do íon sujeito a complexação/adsorção, que determina o grau de ocupação dos sítios ligantes e a formação de pontes metálicas [45].

Os compostos macromoleculares podem comportar-se como um soluto simples, formando uma solução, ou como agregados moleculares, com formação de géis coloidais homogêneos ou mesmo suspensões heterogêneas, como no caso de óxidos hidratados polinucleares de ferro(III) e suspensões de algas.

No caso das suspensões das algas forma-se uma camada hidratada que atua como uma fase de transição entre a fase aquosa e a parte impenetrável (ou penetrável muito lentamente) do material, que seria a fase cristalina no caso dos óxidos hidratados polinucleares de ferro (III) ou a membrana plasmática da parede celular em suspensões de alga [45].

(iii) Propriedades polieletrólíticas

Uma vez que os sítios de adsorção/complexação apresentam propriedades ácido-base e cada macromolécula possui muitos destes sítios, um grande número de cargas elétricas podem ser geradas em função do pH da solução ou do grau de ocupação dos sítios. A presença de cargas elétricas gera um campo elétrico na superfície das macromoléculas, o que influencia diretamente a dissociação de prótons de sítios ionizáveis, alterando as constantes de dissociação, assim como as constantes de estabilidade dos complexos formados com os íons metálicos [45].

O acúmulo de metais pesados por biomassa em ambientes aquáticos é atribuído a processos de complexação e/ou adsorção entre os íons metálicos e os sítios ionizáveis presentes na superfície destes materiais, tais sítios têm diferentes naturezas (-SO₃H, -COOH, -NH₂, Ar-OH) que conferem a heterogeneidade química à superfície [45, 53].

1.4 – Fatores que influenciam no desempenho das algas como adsorventes.

Reconhecidamente fatores como o pH, força iônica, concentração inicial do metal em solução, concentração (população) da alga, cinética de reação, entre outros fatores, interferem no desempenho destes organismos como adsorventes [54, 55-59].

1.4.1 – Tempo da adsorção.

Os mecanismos da adsorção de metais pesados por biomassas são fenômenos que ocorrem envolvendo o equilíbrio químico, geralmente do tipo:

Portanto, o tempo necessário para se atingir este equilíbrio é importante e deve ser considerado em estudos a respeito da adsorção de íons metálicos por algas.

Matheickal e Yu [55] estudando a cinética da adsorção de cobre (II) pela alga *Ecklonia radaia* realizaram o seguinte experimento:

Em frascos contendo em 500 mL de solução de cobre (II) foram adicionados 1 g da alga *Durvillaea potatorum*. A mistura foi mantida sob agitação (200 rpm) a 21 ± 2 °C. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempo determinados usando uma seringa contendo uma membrana filtrante. A concentração dos íons do metal residual foi determinada usando espectrofotometria de absorção atômica em chama. Foram usadas soluções contendo íons de cobre (II) em

concentrações diferentes. Nos casos estudados cerca de 90% do metal foi adsorvido após 30 minutos e após 1 hora não foram observadas mais variações nas quantidades adsorvidas.

1.4.2 – Espécie da Alga

Cada espécie de alga apresenta diferenças na composição e quantidade de sítios ionizáveis que produzem diferenças na capacidade de adsorver íons de metais pesados. Os estudos realizados por Zhou *et al* [57] ilustram o tema:

Massas de 0,1 g da microalga foram colocados em frascos contendo 100 mL de solução de Cd(II) com concentrações variáveis. Paralelamente foram mantidos dois conjuntos para controle, um contendo a microalga em água e outra contendo apenas a solução de cádmio. Todas as misturas foram mantidas sob agitação durante 24 horas. Após este tempo foram tomadas amostras e filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica. A quantidade de cádmio adsorvida foi determinada pela diferença entre a quantidade de metal contida no respectivo frasco de controle e a quantidade de metal em solução após o equilíbrio com a microalga. O frasco contendo apenas a alga e água foi usado para o ensaio em branco. Os resultados estão expostos na Tabela 03.

A quantidade do íon do metal adsorvido foi determinada pela expressão:

$$Q = \frac{(C_0 - C_1) * V}{M} \quad (1)$$

Onde: Q = Quantidade do metal adsorvida por grama da alga.

C₀ = Concentração do metal em ausência da alga.

C₁ = Concentração do metal em equilíbrio na presença da alga.

V = Volume da solução em litros.

M = Massa da alga em gramas.

No estudo da relação entre a quantidade do metal adsorvido e a concentração do íon em solução na condição de equilíbrio utilizou-se o modelo de isoterma de Freundlich. O modelo é empírico, incorporando a heterogeneidade dos sítios de adsorção presentes nos biosorventes como microalgas e macroalgas.

$$Q = K_f C_e^{1/n} \quad (2)$$

Onde: K_f e $1/n$ são constantes empíricas que indicam, respectivamente, a capacidade e a intensidade de adsorção.

Para simplificar a obtenção de K e $1/n$, a equação de Freundlich é linearizada utilizando o recurso de introduzir log em ambos os lados da mesma, ou seja:

$$\log Q = \log K + (1/n) \log C_e \quad (3)$$

Onde:

Q = quantidade do metal adsorvida por grama da alga.

C_e = concentração do metal em solução no equilíbrio.

K_f = parâmetro relativo à capacidade de adsorção.

$1/n$ = parâmetro relativo à intensidade de adsorção.

Tabela 03 – Parâmetros de Freundlich para diferentes espécies de microalgas:

	<i>S. platensis</i>	<i>N. Oculata</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>P. cordifolia</i>	<i>C. minutissimus</i>
K_f	0,39	3,16	2,02	1,48	0,20
$1/n$	1,06	0,88	0,96	0,86	1,31

Fonte: J.L. Zhou, P.L. Huang, R.G. Lin, *Environmental Pollution* **101** (1988) 68-75 [57].

Podemos observar na Tabela 03 que as diferentes algas apresentam diferentes parâmetros relativos à capacidade e intensidade de adsorção, nas mesmas condições experimentais, para o mesmo íon do metal pesado, o que comprova que o tipo de alga influí em tais parâmetros.

1.4.3 – Espécie do Metal

A afinidade entre os sítios ionizáveis e os íons metálicos depende também da espécie do metal. Sandau *et al* [58] realizaram os seguintes experimentos, que comprovam a dependência: Em soluções contendo diferentes concentrações de íons de Cd(II), Zn(II), Cu(II) e Pb(II) foram adicionadas quantidades das algas *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* em concentração de 1,06 g.L⁻¹, com pH 6. Após 60 minutos as suspensões foram filtradas e a quantidade do íon metálico adsorvido foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica de chama após tratamento da alga com água régia, ou determinando a quantidade do íon metálico não adsorvido presente na solução filtrada, calculando-se a quantidade adsorvida por subtração em relação à quantidade inicial. A capacidade de adsorção foi calculada dividindo-se a quantidade adsorvida do metal pela massa da alga e expressa em mg.g⁻¹(mg do metal por grama da alga). Os resultados estão indicados na Tabela 04.

Tabela 04 – Adsorção de metais pesados em *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* .

Concentração Inicial (mg.L ⁻¹)	Metal pesado	Capacidade de adsorção (mg.g ⁻¹)	
		<i>Spirulina Platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
1,0	Cd	0,69	0,79
	Zn	0,65	0,76
	Cu	0,67	0,77
	Pb	0,72	0,76
10,0	Cd	6,89	7,53
	Zn	4,90	5,02
	Cu	6,21	7,59
	Pb	9,33	8,74

Fonte: E. Sandau, P. Sandau, O. Pulz, *Acta Biotechnology* 16 (1996) 227-235 [58].

Os resultados obtidos por Sandau *et al* [58] (Tabela 4) sugerem a seguinte ordem de afinidade dos metais para as duas espécies de alga: Cu> Zn> Cd >Pb. Esta

ordem foi obtida com a conversão da capacidade de adsorção de mg do íon metálico por grama da alga para mol do íon metálico por grama da alga.

1.4.4 – Concentração inicial do metal.

A concentração inicial do íon do metal altera a quantidade de metal adsorvida uma vez que desloca o equilíbrio químico $M + L \rightleftharpoons ML$ para a direita (Efeito do íon comum).

A influência da concentração inicial do íon metálico no equilíbrio da adsorção pode ser observado nos experimentos realizados por Dönmez *et al* [59], com os resultados apontados na Tabela 05.

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados 100 mL de soluções contendo os íons de cobre (II), níquel (II) e cromo (VI) em diversas concentrações iniciais e as algas *C. vulgaris*, *S. Obliquus* e *Synechocystis sp.* em concentração de 1 g L⁻¹. Os frascos foram agitados durante 24 horas a 125 rpm, em temperatura de 25 °C no pH de melhor adsorção para cada íon. Após a filtração a quantidade de metal não adsorvido foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica de chama e, por diferença em relação à quantidade inicial, foi calculada a quantidade adsorvida em mg do íon metálico por grama de alga e, também, a porcentagem adsorvida do metal.

Os resultados obtidos para as três algas e diferentes concentrações iniciais dos três íons metálicos demonstram que a concentração inicial do metal influi na quantidade adsorvida do mesmo pela alga. A quantidade adsorvida absoluta do metal aumenta enquanto que a quantidade adsorvida em termos percentuais diminui, sendo que em ambos os casos a relação é exponencial.

Tabela 05 - Quantidade de metal adsorvida em função de diferentes concentrações iniciais dos íons metálicos. Concentrações das Algas = 1 g L⁻¹, temperatura = 25 °C, Agitação = 125 rpm, pH = 2 para os experimentos realizados com Cu(II) e pH = 4,5 para os experimentos realizados com Ni(II) e Cr(VI).

Cobre (II)			Níquel (II)			Cromo (VI)		
<i>C. Vulgaris</i>								
C _o	q _{eq}	% Ad.	C _o	q _{eq}	% Ad	C _o	q _{eq}	% Ad
36,7	31,2	85,0	42,4	30,9	72,9	36,1	6,8	18,8
57,5	35,6	61,9	70,5	38,2	51,3	61,2	11,0	18,0
104,7	40,0	38,2	100,2	42,3	42,2	129,6	23,0	17,7
147,0	43,6	29,7	148,3	47,3	31,9	175,3	26,6	15,2
291,8	46,8	17,9	259,2	55,6	21,5	263,0	33,8	12,9
<i>S. obliquus</i>								
C _o	q _{eq}	% Ad.	C _o	q _{eq}	% Ad	C _o	q _{eq}	% Ad
30,1	10,3	34,2	25,9	9,0	34,7	28,1	6,1	21,7
48,9	13,5	27,6	41,7	12,3	29,5	53,5	10,3	19,2
77,1	17,2	22,3	75,9	16,4	21,6	75,6	13,4	17,7
104,8	20,0	19,0	101,5	18,7	18,4	106,4	15,6	14,7
151,5	23,4	15,4	121,6	20,6	16,9	150,4	20,4	13,6
224,4	26,8	11,9	217,8	24,7	11,3	230,4	30,2	13,0
<i>Synechocystis sp.</i>								
C _o	q _{eq}	% Ad.	C _o	q _{eq}	% Ad	C _o	q _{eq}	% Ad
34,4	14,2	41,3	32,8	5,4	16,5	29,9	6,2	20,7
53,8	16,8	31,3	56,4	8,9	15,8	50,5	10,0	19,8
80,8	20,5	25,4	77,2	11,6	15,0	74,8	13,8	18,5
102,3	24,0	23,4	109,6	15,8	14,4	106,0	19,2	18,0
170,1	28,6	12,3	264,1	30,3	11,5	237,3	39,0	16,4

Onde:

C₀ = Concentração inicial do metal em mg.L⁻¹.

q_{eq} = quantidade adsorvida do metal na alga (em mg g⁻¹) após o equilíbrio.

% Ad. = porcentagem do íon metálico adsorvido.

Fonte: G.C. Dönmez, Z. Aksu, A. Oztürk, T. Kutsal, *Process Biochemistry* **34** (1999) 887 [59].

1.4.5 – pH

A capacidade da alga em adsorver íons de metais pesados depende da protonação ou desprotonação do grupo funcional, que depende do pKa do respectivo sítio ionizável e do pH da solução:

No caso, HL é um sítio ionizável que origina o ligante L^- . O pH tem, portanto, influência direta na quantidade de metal pesado adsorvido. Matheickal e Yu [55] realizaram os seguintes estudos, que elucidam o assunto e cujos resultados se encontram na Tabela 06. Em frascos contendo 100 mL de soluções dos íons de cobre (II) e chumbo (II) com concentração 4,5 mmol L^{-1} foram adicionados, separadamente, 200 mg das algas *Durvillaea potatorum* e *Ecklonia radiata*. O pH foi controlado usando soluções de HNO_3 ou $NaOH$ 0,1 mol L^{-1} . A temperatura foi mantida a 21 ± 2 °C e o conjunto foi mantido sob agitação durante 24 horas. Após o período de equilíbrio a suspensão foi filtrada em membrana de 0,45 μm e a quantidade de metal presente na solução foi determinada por espectrometria de absorção atômica de chama. A quantidade máxima de metal adsorvida foi calculada subtraindo a quantidade não adsorvida da quantidade inicial do íon do metal e dividindo-se pela massa presente da alga. A quantidade máxima de metal adsorvida (Q_{max}) está expressa em mmol g^{-1} (mmol do metal por grama da alga) e os resultados aparecem na Tabela 06.

Tabela 06 – Parâmetro de Langmuir Q_{max} (mmol. g^{-1}) para chumbo e cobre para as algas *Durvillaea potatorum* e *Ecklonia radiata* em diferentes condições de pH.

pH	<i>Durvillaea potatorum</i> Q_{max} (mmol. g^{-1})		<i>Ecklonia radiata</i> Q_{max} (mmol. g^{-1})	
	Chumbo (II)	Cobre (II)	Chumbo(II)	Cobre (II)
1	0,02	0,04	0,05	0,07
2	0,76	0,18	0,42	0,45
3	1,29	0,99	0,99	0,95
4	1,47	1,21	1,17	1,06
5	1,55	1,30	1,26	1,11

Fonte: J.T. Matheickal, Q. Yu, *Bioresource Technology* **69** (1999) 224-229 [55].

O resultados obtidos demonstram que o pH influi na capacidade da alga em adsorver metais pesados. Nos casos estudados a capacidade de adsorção é melhor em $\text{pH} = 5$. Em $\text{pH} = 1$ a adsorção é reduzida indicando que quando os sítios ionizáveis estão protonados não atuam como sítios complexantes.

1.4.6 – Força Iônica

A força iônica (alteração do grau de hidratação) é um dos fatores que altera a conformação espacial das macromoléculas, sendo descrita na propriedade chamada labilidade conformacional. A alteração da conformação espacial das macromoléculas interfere na sua capacidade de realizar reações de complexação/adsorção [45]. Matheickal Yu [55], a respeito do assunto, realizaram os seguintes experimentos: Foram preparados frascos contendo 100 mL soluções de Cu(II) e Pb(II) 1 mM e quantidades de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} para atingir as concentrações 1, 5 e 10 mmol L^{-1} . A temperatura foi mantida a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e o conjunto foi mantido sob agitação durante 24 horas. Após o período de equilíbrio a suspensão foi filtrada em membrana de 0,45 μm e a quantidade de metal presente na solução foi determinada por espectrometria de absorção atômica de chama. A quantidade máxima de metal adsorvida foi calculada subtraindo a quantidade não adsorvida da quantidade inicial do íon do metal e dividindo-se pela massa presente da alga.

O efeito apresentado por Na^+ e K^+ até 10 mmol L^{-1} na adsorção dos metais pesados estudados pode ser considerado desprezível. Íons de Ca^{+2} em concentrações de 5 e 10 mmol L^{-1} reduzem a eficiência da remoção de Cu(II) e Pb(II) entre 10% e 18%, enquanto Mg^{+2} nos mesmos intervalos de concentração reduz a eficiência de remoção entre 5% e 10%. Fica evidenciado o fato de que os íons bivalentes concorrem com a adsorção dos íons dos metais pesados.

1.5 – A microalga *Spirulina*.

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria (fitoplâncton). As *Spirulinas* são seres procariotos, imóveis e não esporulados, que vivem em meios líquidos ricos em sais minerais com pH entre 8 e 11, preferem as regiões tropicais ou subtropicais, quentes e ensolaradas e estão, cada vez mais, sendo utilizadas na dieta popular, sendo um

alimento tradicional em muitas culturas. Estudos científicos indicam que a *Spirulina* é uma das melhores fontes de proteínas disponíveis. O teor de proteínas nas cianobactérias é de cerca de 70% em massa (desidratada) e suas proteínas apresentam todos os aminoácidos essenciais. Por ser fonte de proteínas de alta qualidade e ainda fornecer minerais importantes a *Spirulina* é chamada de “Mina de Ouro” [60].

A *Spirulina* apresenta mais beta-caroteno que a cenoura e 28 vezes mais ferro que o bife de fígado, sendo um alimento completo em termos de vitamina B₁₂ e apresentando altas concentrações de glicogênio (fonte natural de energia).

A NASA considera a *Spirulina* como o alimento indicado para vôos espaciais. As Nações Unidas (ONU) consideram a *Spirulina* como a solução para os problemas de escassez mundial de proteínas. Fazendas de cultivo de *Spirulina* estão sendo construídas em vários países em desenvolvimento. O cultivo da *Spirulina* produz 26,6 vezes mais por acre que a soja e 316,7 vezes mais que a carne de boi (Tabela 07). O corpo humano assimila por volta de 95 % das proteínas da *Spirulina*, enquanto que apenas cerca de 20 % das proteínas provenientes da carne de boi são assimiladas. Estudos sugerem que o consumo destas cianobactérias fortalece o sistema imunológico e aumenta a resistência a infecções. Além de todos estes benefícios à saúde, a *Spirulina* apresenta fitonutrientes, que são compostos especiais produzidos naturalmente por plantas e outros organismos. Os fitonutrientes aumentam e fortalecem a resistência natural do corpo humano a doenças, torna mais saudável o sistema cardiovascular, abaixa o colesterol, ajuda na digestão dos alimentos e atua como antioxidante natural.. Em vista do exposto a *Spirulina* tem sido usada como complemento alimentar, inclusive em bebidas protéicas. Devido ao aumento do consumo de *Spirulina*, tem ocorrido crescimento do número de fazendas produtoras da mesma. As fazendas usam um sistema de lagos com as dimensões de um campo de futebol. Uma das principais preocupações com o crescimento do comércio das cianobactérias é manter o cultivo puro. Para manter o cultivo puro é necessário manter as condições ambientais dos lagos cuidadosamente balanceadas. Os lagos são abastecidos com nutrientes ricos em minerais de alta pureza. As águas dos lagos são aeradas por sistemas de pás mecânicas. Acrescenta-se água carbonatada de modo a garantir quantidades de dióxido de carbono disponível para a fotossíntese. Diferente de outras culturas que são colhidas uma ou duas vezes por ano, a *Spirulina* é colhida 24 horas por dia durante o pico da estação de crescimento. Após a colheita a *Spirulina* é

secada em sistemas de evaporação usando a luz e empacotada para a venda. Bem empacotada e mantida adequadamente, a *Spirulina* pode ter validade de comercialização de cinco anos [60].

A *Spirulina* apresenta muitas vantagens em relação a outras culturas, pois é um microorganismo aquático, não requer solo fértil, não causa erosão nem contaminação de terras ou águas. A Tabela 07 mostra a área de terra requerida para a produção de 1 Kg de outras fontes importantes de alimentos em relação a *Spirulina*. Para ressaltar a eficiência da produção de Cianobactérias destaca-se que a produção de 1 Kg de trigo resulta na perda de 22 Kg de solo fértil. A *Spirulina*, ao contrário, usa baixa quantidade de água para produzir 1 Kg de proteína, em comparação com outras culturas. Deste modo a *Spirulina* requer pouco espaço, solo e água em comparação com formas tradicionais de produção de proteínas [60].

Tabela 07 – Comparação entre a produção da *Spirulina* em fazendas aquáticas e outros produtos importantes da agricultura.

Fonte de Proteína ^a	Área necessária (m ²)	Água necessária (L)	Total de Energia gasta (10 ⁷ KJ)	Total de energia obtida (10 ⁷ KJ)
<i>Spirulina</i>	0,6	2.100	3,5	23,0
Soja	16	9.000	11,7	13,8
Trigo	22	12.500	55,0	16,5
Grãos ^b	190	105.000	456,0	16,0

^a Valores para a produção de 1 Kg de proteína.

^b Produção de 60 kg de grãos para alimentação de bovino que resultará em 1 Kg de proteína animal.

Fonte: I. M. Maier, I.L. Peppes, C. P. Gerba, *Environmental Microbiology*, Academic Press, 2000 [60].

A *Spirulina* liofilizada apresenta entre 60 – 70 % em massa de proteínas. São ricas em vitaminas, especialmente B12, pró-vitamina A (β -caroteno), minerais (principalmente ferro), e é uma das principais fontes de ácido γ -linoleico. Os pigmentos da *Spirulina* pertencem a três classes [61]:

1 - Clorofila: 1,7 % da massa das células.

2 – Carotenóides e Xantofilicos: aproximadamente 0,5 % da massa orgânica.

3 – Dois ficobiliproteínas: c-ficocianina e aloficocianina, compreendendo cerca de 20 % da proteína celular, sendo o pigmento dominante na *Spirulina*.

Os aminoácidos presentes na *Spirulina* aparecem na Tabela 08 [62].

Tabela 08 - Aminoácidos presentes na *Spirulina* (g / 16 g de N):

Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Try	Tyr
6,6	6,6	8,6	0,4	14	4,6	1,7	5,8	7,8	4,8	1,5	4,6	3,8	4,3	4,6	1,3	3,9

Fonte: B. Atkinson, F. Marituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Handbook*, Second Edition, M. Stockton Press (1983, 1991) 1208 [62].

A Figura 01 traz uma série de imagens de *Spirulina sp* nas quais pode-se observar a forma espiralada da alga, formato este que lhe confere o nome.

Spirul1

Spirsp4

Spirsp5

Spirsp6

Spirsp7

Figura 01- Imagens de *Spirulina sp*.

Fonte: <http://www.yanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>

Créditos:**spirul1:**

Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University), and Cyanosite (www.cyanosite.bio.purdue.edu).

spirsp4, spirsp5, spirsp6:

Isao Inouye (University of Tsukuba), Mark Schneegurt (Wichita State University), and Cyanosite (www.cyanosite.bio.purdue.edu).

spirsp7:

Rolf Schauder (University of Frankfurt), Mark Schneegurt (Wichita State University), and Cyanosite (www.cyanosite.bio.purdue.edu).

A figura 02 traz fotos da *Spirulina* liofilizada em suspensões com forças iônicas diferentes. Observa-se que não ocorrem alterações conformações espaciais significativas em ambas as forças iônicas. A alga não apresenta a forma de espiral, mas apenas fragmentos.

A **B**

Figura 02– Fotos da *Spirulina* liofolizada, em meio de NaNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (B). Aumento $3000 \times$ [63] .

Dado o interesse que a *Spirulina* tem despertado, bem como a elevada produtividade e facilidade dos cultivos, procurou-se, nesta dissertação, realizar uma caracterização das propriedades ácido base e de complexação de íons Cu(II) da superfície da alga, bem como da mistura de substâncias solúveis que acompanham o material algal liofilizado. Esta caracterização pode contribuir em estudos que visem a utilização da *Spirulina* no tratamento de águas contaminadas com metais pesados, ou efluentes. Pode também contribuir em estudos de especiação de íons Cu(II) em ambientes aquáticos.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Determinar a estequiometria e o pKa dos sítios ionizáveis de espécies mistas e liofilizadas da microalga *Spirulina* adquirida comercialmente, utilizando-se para isto o modelo de distribuição de sítios discretos para tratamento de dados das titulações potenciométricas ácido-base.

2.2 - Determinar o tempo necessário para a reação de complexação/adsorção entre Cu(II) e a suspensão de *Spirulina* atingir o equilíbrio nas condições de pH $6,0 \pm 0,1$, meio iônico de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ e $25,0 \pm 0,1^\circ \text{ C}$.

2.3 - Determinar as constantes de estabilidade condicionais e as capacidades máximas de complexação/adsorção da *Spirulina* frente a íons Cu(II) utilizando o método de Scatchard para tratamento dos dados de titulação, obtidos com um eletrodo seletivo para Cu(II), nas mesmas condições experimentais do item 2.2.

2.4 – Caracterizar a distribuição das constantes de estabilidade para as interações de Cu(II) com a alga em função do grau de ocupação dos sítios de complexação utilizando o método das Funções de Equilíbrio Diferenciais (DEF). Paralelamente, determinar o grau de heterogeneidade dos sítios de ligação.

2.5 – Repetir as caracterizações dos itens 2.1, 2.3 e 2.4 para a suspensão composta pelas algas lavadas com água destilada, aqui denominada Fração Insolúvel, bem como das substâncias arrastadas na água de lavagem, aqui denominada Fração Solúvel.

2.6 – Comparar os métodos de Scatchard e DEF com relação à modelagem das concentrações das espécies de Cu(II) em solução.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Equipamentos e materiais

- ⇒ Balança analítica eletrônica Mettler – Resolução de 0,0001 g
- ⇒ pH-Metro Methrom B-654 – Resolução de 0,001 unidades de pH (ou 0,1 mV).
- ⇒ Pipeta automática Gilson - com volume variável (até 5000 μ L).
- ⇒ Pipeta automática Gilson - com volume variável (até 1000 μ L).
- ⇒ Pipeta automática Gilson - com volume variável (até 100 μ L).
- ⇒ Mesa agitadora – Nova Técnica - NT 145.
- ⇒ Centrifuga Excelsa Baby - Fanen Ltda. – 208 N.
- ⇒ Tubo de Centrifugação Corning – 15 mL.
- ⇒ Tubo de Centrifugação Corning – 50 mL.
- ⇒ Membrana filtrante Millex 0,45 μ m.
- ⇒ Espectrofotômetro de Absorção Atômica de Chama Perkin Elmer - Modelo 703.
- ⇒ Seringa de injeção de 10 mL.
- ⇒ Bureta automática com capacidade de 5,00 mL do sistema FIALab 3500.
- ⇒ Eletrodo Combinado de Vidro Mettler Toledo HA405-60-88G-S7/120 com referência de Ag/AgCl.
- ⇒ Eletrodo Seletivo para Cu(II) Orion 9429.
- ⇒ Eletrodo de Referência de Ag/AgCl (dupla junção) Mettler Toledo modelo 405NS-S7/80.

3.2 – Reagentes, Soluções e amostras.

3.2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico adquiridos junto a Merck, Carlo Erba ou Sigma. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e fervida.

3.2.1.1 – Solução de KNO_3 1 mol L^{-1} .

Foram dissolvidos 101,1 g de nitrato de potássio P. A. Merck para 1,0 L, com água destilada e fervida.

3.2.1.2. – Solução de HNO_3 0,05 mol L^{-1} .

Foram dissolvidos 3,1 mL de ácido nítrico P. A. Merck – 69 % para 1,0 L, com água destilada e fervida.

3.2.1.3. – Solução de HNO_3 1 mol L^{-1} .

Foram dissolvidos 62,5 mL de ácido nítrico P. A. Merck – 69 % para 1,0 L, com água destilada e fervida.

3.2.1.4 – Solução de KOH 0,05 mol L^{-1} .

Foram dissolvidos 2,8 g de hidróxido de potássio P.A. Carlo Erba para 1,0 L, com água destilada e fervida.

3.2.1.5 – Solução de KOH 1,0 mol L^{-1} .

Foram dissolvidos 56,10 gramas de hidróxido de potássio P.A. Carlo Erba para 1,0 L, com água destilada e fervida.

3.2.1.6 – Solução de NaOH 0,1000 mol L^{-1} para caracterização ácido base da alga.

Filtrou-se sob vácuo uma solução de NaOH 50% (m/v) utilizando cadinho com placa de cerâmica porosa como meio filtrante. Nestas condições de concentração o Na_2CO_3 é insolúvel e pode ser separado por filtração. Rapidamente pipetou-se 3,5 mL do filtrado para um balão volumétrico de 500 mL contendo água destilada previamente fervida para eliminação do CO_2 dissolvido. O balão continha também massa de KNO_3 suficiente para gerar um meio com força iônica 0,020 após completar-se o volume. A solução preparada foi rapidamente transferida para um frasco de polietileno de alta densidade, o qual foi imediatamente fechado com uma tampa contendo um sistema de sifão de solução e um tubo de vidro preenchido com cal sodada. Neste sistema a solução de NaOH é transferida do frasco para o interior da bureta automática sem entrar em contato com a atmosfera. O ar que entra no frasco passa pela coluna de cal

sodada, que retém o CO₂ atmosférico. Armazenada nestas condições não se observou contaminação significativa da solução com carbonato por um período de 20 a 30 dias, verificação esta feita pelo teste de precipitação de BaCO₃ com adição de solução de BaCl₂. Logo após o preparo e armazenamento da solução, o sistema de filtração deve ser lavado com solução ácida e exaustivamente com água destilada para eliminar os restos do xarope de NaOH 50%, que atacam a vidraria.

A solução de NaOH foi então padronizada frente a um padrão primário de biftalato de potássio previamente seco em estufa por 2 horas a 120⁰ C, utilizando fenolftaleína como indicador.

3.2.1.7 - Soluções de cobre

Foram preparadas soluções de trabalho de Cu(II) com concentrações 1,00x10⁻³ mol L⁻¹ (solução i) e 5,00 x 10⁻³ mol L⁻¹ (solução ii) por diluição apropriada da solução de cobre (II) padrão para absorção atômica Carlo Erba - 1000 mg L⁻¹. O pH foi ajustado em 6,0 ± 0,1 usando HNO₃ 0,05 mol L⁻¹, antes do correspondente acerto de volume com água destilada e fervida.

3.2.2 – Amostras

3.2.2.1 – Suspensão Total

Espécies mistas da microalga *Spirulina* (lavada e liofilizada) foram adquiridas junto a Sigma (Lote 29F40201). Suspensões da alga em concentração de 6,25 g L⁻¹ foram preparadas com ajuste de pH em 6,0 ± 0,1 com solução de HNO₃ 0,050 mol L⁻¹, antes de completar o volume com água destilada e fervida.

3.2.2.2 – Suspensão da Fração Insolúvel e solução da Fração Solúvel da alga.

Foram pesados 0,3125 g de *Spirulina*, aos quais foram adicionados 20 mL de água destilada e fervida. A suspensão obtida foi dividida em dois tubos de centrifuga de 15 mL que foram mantidos sob agitação constante numa mesa agitadora durante 40 minutos. Em seguida foram centrifugados a 3000 rpm (aproximadamente 1500 x g) durante 20 minutos e filtrados em membrana filtrante Millex® 0,45 µm. O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50,00 mL e o pH foi ajustado em 6,0±0,1, usando HNO₃ 0,05 mol. L⁻¹, antes de acertar o volume com água destilada e fervida,

obtendo-se assim a Solução da Fração Solúvel. Para preparar a Suspensão da Fração Insolúvel, após a centrifugação, a Fração Solúvel foi retirada com o auxílio de uma seringa de injeção e resíduo foi lavado com água destilada previamente fervida e, novamente com o auxílio da seringa de injeção, o líquido foi retirado. A parte sólida foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 50 mL ao qual foram adicionados 20 mL de água destilada e fervida e o pH foi ajustado em $6,0 \pm 0,1$ usando HNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, antes de acertar o volume com água destilada e fervida, resultando aqui a suspensão da Fração Insolúvel.

3.3 – Tempo de equilíbrio de adsorção.

A uma alíquota de 250,00 mL de uma suspensão $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de *Spirulina* preparada em KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ e em pH $6,0 \pm 0,1$, adicionou-se solução de Cu(II) de modo a que concentrações totais de $1,0 \times 10^{-4}$ ou $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ fossem geradas na suspensão. A suspensão foi continuamente homogeneizada em uma mesa agitadora e alíquotas de 10,0 mL foram retiradas em intervalos de 0, 5, 10, 15 e 30 min. As alíquotas foram então centrifugadas a 3.000 r.p.m. (aproximadamente $1.500 \times g$) por 5 min e as soluções sobrenadantes foram filtradas em membranas de acetato de celulose (porosidade de $0,45 \mu\text{m}$) previamente lavadas com água deionizada. As concentrações totais de cobre nestas soluções foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama.

3.4– Titulações

3.4.1 – Titulações ácido-base

Uma alíquota de 50,00 mL de uma suspensão de *Spirulina* $1,0 \text{ g L}^{-1}$ em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ foi transferida para uma cela de titulação provida de jaqueta de vidro externa para circulação de água termostaticada. Em seguida adicionaram-se 2,50 mL de uma solução de HNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (também em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$) para promover a protonação de todos os sítios ionizáveis na superfície da alga. O frasco de titulação foi fechado após a introdução do eletrodo combinado de vidro, da ponteira da bureta e dois pequenos tubos de polietileno que permitem manter um fluxo de N_2 isento de CO_2 no interior do frasco durante a titulação. A temperatura foi mantida a $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ circulando-se água de um banho termostático pela jaqueta externa do

frasco de titulação. A titulação foi realizada adicionando-se pequenos volumes da solução padrão de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (preparada em KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$) de modo a promover aumentos de pH da ordem de 0,1 unidades (cerca de 10 mV). A faixa de pH coberta durante a titulação foi de cerca de 2,5 no início da titulação até cerca de 11 no seu final. As medidas de potencial foram feitas somente quando a variação de potencial foi menor que $0,555 \text{ mV min}^{-1}$, o que é indicado no painel de controle do pH-metro utilizado.

Procedimentos similares foram adotados para a determinação das propriedades ácido-base da Fração Solúvel e Insolúvel da alga.

A calibração dos eletrodos foi realizada em termos de concentração e não de atividades, conforme será detalhado no item 3.5.1.1.

3.4.2– Titulações da Spirulina com Cu(II)

Volumes adequados de uma solução estoque de Cu(II) $0,0050 \text{ mol L}^{-1}$ foram transferidas para doze tubos de centrífuga da Corning® com capacidade de 50 mL de modo a preparar soluções com concentrações totais de Cu(II) entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ após diluição para um volume total de 25,00 mL. Para titulação da suspensão total, alíquotas de 4,00 mL da suspensão homogeneizada de Spirulina $6,25 \text{ g L}^{-1}$ foram transferidas para os tubos de centrífuga com auxílio da pipeta automática Gilson, promovendo suspensões da alga com concentrações de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ após diluição a 25,00 mL. Antes de completar este volume fez-se o ajuste de força iônica para 0,020 com solução de KNO_3 . Em seguida ajustou-se o pH em $6,0 \pm 0,1$ com pequenas adições de KOH ou HNO_3 $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e finalmente completou-se o volume até 25,00 mL. Este procedimento de controle de pH foi adotado pois grande parte dos tampões de pH também agem como complexantes o que aumentaria a complexidade dos cálculos devido à competição entre o tampão e os materiais da *Spirulina* na ligação dos íons Cu(II).

Todos os tubos foram mantidos imersos em um banho termostático controlado a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Após 30 minutos de equilíbrio, o eletrodo seletivo para Cu(II) e o eletrodo de referência foram imersos na suspensão para medida de potencial em cada tubo. Para os tubos contendo concentração total de Cu(II) entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, um tempo adicional de 30 a 60 min foi necessário para estabilização da medida potenciométrica. Este tempo adicional diminui na medida em que a concentração total

de Cu(II) aumentou. As medidas de potencial foram feitas somente quando a variação de potencial foi menor que $0,555 \text{ mV min}^{-1}$, o que é indicado no painel de controle do potenciômetro utilizado.

Para titulação das Frações Solúvel e Insolúvel, um procedimento similar ao descrito para a Suspensão Total foi empregado. Como estas frações foram obtidas a partir de uma suspensão total com concentração $6,25 \text{ g L}^{-1}$ em *Spirulina* e posterior diluição de 4,00 mL, seja da fração solúvel ou insolúvel, para um volume total de 25,00 mL, todos os resultados serão expressos considerando-se a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de material proveniente da suspensão original da alga.

A calibração da cela potenciométrica foi realizada em termos de concentração titulando-se uma solução de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ mantida em $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$ e $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ com solução de Cu(II) na mesma condição de força iônica.

3.5– Procedimentos e métodos de cálculo.

3.5.1 Caracterização Ácido-Base

3.5.1.1 – Calibração de eletrodos em termos de concentração.

O procedimento descrito a seguir foi adotado visando-se contornar fontes de erro na medida da concentração de íons hidrogênio decorrentes das diferenças de força iônica entre as amostras e as soluções tampão comumente utilizadas na calibração de eletrodos de vidro.

O pH é definido como:

$$pH = -\log aH^+ \quad (4)$$

Onde: aH^+ = atividade do íon H^+

A maneira convencional de se calibrar o eletrodo de vidro é através do uso de solução tampão, cuja atividade do íon H^+ (aH^+) é previamente conhecida.

Entretanto:

$$aH^+ = \gamma H^+ [H^+] \quad (5)$$

Na equação 5, γH^+ é o coeficiente de atividade dos íons H^+ .

De acordo com a equação de Debye-Huckel estendida, γH^+ depende da força iônica (I) e outros parâmetros:

$$\log \gamma H^+ = \frac{-A \cdot Z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{(1 + B \cdot a \cdot \sqrt{I})} \quad (6)$$

Onde I é a força iônica da solução, Z_i a carga, a um parâmetro ajustável (em angstroms) correspondendo ao tamanho do íon e A um parâmetro dependente da temperatura (T), de acordo com a equação:

$$A = 1,82 \times 10^{-6} (\varepsilon T)^{-3/2} \quad (7)$$

Onde ε é a constante dielétrica da água.

$$B = 50,3 (\varepsilon T)^{-1/2} \quad (8)$$

Para a água a 298 K (25°C): $A = 0,51$ e $B = 0,33$. A equação de Debye-Huckel é válida para $I < 10^{-1}$.

Mantendo-se constante a temperatura e a força iônica ao longo da titulação, mantém-se constante o coeficiente de atividade γH^+ , de modo que a partir do valor medido de potencial, ou pH, pode-se determinar a $[H^+]$ em cada ponto da titulação.

A resposta de um eletrodo de vidro é dada pela equação de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{nF} \log aH^+ + E_j \quad (9)$$

Onde:

E = potencial medido.

E^0 = potencial padrão.

R = constante dos gases, $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

n = número de elétrons envolvidos.

F = constante de Faraday = 96485 C mol^{-1} .

E_j = potencial de junção líquida.

$$E_j = jH[H^+] + jOH[OH^-] \quad (10)$$

Onde jH e jOH são parâmetros dependentes do meio iônico. À 25 °C pode-se escrever a equação 9 como:

$$E = E^0 + 59,16 \log \gamma H^+ [H^+] + E_j \quad (11)$$

A temperatura constante (25°C) e força iônica constante, γH^+ mantém-se constante, de modo que o termo $59,16 \log \gamma H^+$ pode ser somado a E^0 :

$$E = E^{0'} + 59,16 \log [H^+] + E_j \quad (12)$$

onde $E^{0'} = E^0 + 59,16 \log \gamma H^+$.

Conhecendo-se os parâmetros $E^{0'}$ e E_j pode-se converter os valores de potencial (E) determinados experimentalmente em $[H^+]$. A determinação dos parâmetros $E^{0'}$, jH e jOH é feita a partir dos dados de uma titulação potenciométrica de

calibração, que consiste em titular um ácido forte com uma base forte padrão, conforme descreve-se a seguir.

Antes do ponto estequiométrico de uma titulação de ácido forte com base forte, a $[H^+]$ pode se calculada:

$$[H^+] = \frac{(V_e - V_t) \cdot C_B}{V_o + V_t} \quad (13)$$

Onde: V_e = Volume de base adicionado no ponto estequiométrico.

V_t = Volume de titulante adicionado.

V_o = Volume inicial na cela de titulação.

C_B = Concentração da base.

O volume do ponto estequiométrico, V_e , é obtido por aplicação do método de Gran aos pontos antes e após o ponto estequiométrico:

$$\text{Antes: } (V_o + V_t)10^{E/59,16} = (V_e - V_t)C_B \quad (14)$$

$$\text{Após: } (V_o + V_t)10^{-E/59,16} = (V_t - V_e)C_B \quad (15)$$

A expressão à esquerda nas equações 14 e 15 é a chamada função de Gran, que permite facilmente localizar o ponto estequiométrico. Quando $V=V_e$, a função de Gran se anula, cruzando o eixo das abscissas.

A Tabela 09 traz os dados de uma titulação de ácido clorídrico com hidróxido de sódio padrão que foram utilizados para realizar a calibração do eletrodo combinado de vidro em termos de concentração. O meio iônico foi mantido constante em KNO_3 0,020 mol L⁻¹ por adição do sal tanto no ácido titulado, como na solução de NaOH titulante. A temperatura foi mantida a $25,0 \pm 0,1^\circ C$ circulando-se água termostatizada pelo banho Ética 521 D por uma jaqueta de vidro externa à cela de titulação.

Tabela 09 – Dados de uma titulação potenciométrica de 52,50 mL solução de ácido clorídrico em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ com NaOH $0,1250 \text{ mol L}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A Tabela mostra também os valores numéricos da Função de Gran calculada na região ácida da titulação (equação 14).

V NaOH (mL)	E (mV)	F. Gran
0,0	276,5	2476996,321
0,1	275,2	2359269,185
0,2	273,9	2247129,284
0,3	272,4	2123715,795
0,4	270,8	1999276,429
0,5	269,1	1874810,647
0,6	267,2	1744454,988
0,7	265,3	1623157,207
0,8	263,2	1498577,486
0,9	260,9	1372826,43
1,0	258,3	1243024,082
1,1	255,5	1116763,661
1,2	252,3	987825,3523
1,3	248,6	856931,0903
1,4	244,2	723398,8464
1,5	239	591950,7547
1,6	232,4	458698,3921
1,7	223,7	327544,5787
1,8	210,1	193279,548
1,9	179,5	58849,6104

V NaOH = Volume de NaOH adicionado (mL);

E = Potencial medido (mV);

F. Gran = Função de Gran.

O gráfico da função de Gran colocado contra o volume de NaOH é mostrado na Figura 03, com o ponto estequiométrico sendo determinado no ponto de intersecção da reta com o eixo das abscissas.

Figura 03 – Gráfico da função de Gran em função do volume adicionado de NaOH (mL). Quando $FG = 0$, $V = V_e$. No caso $V_e = 1,964$ mL.

Tendo o volume do ponto estequiométrico da titulação de calibração e admitindo-se que nos pontos anteriores ao estequiométrico o termo $jOH[OH^-]$ é desprezível frente ao termo $jH[H^+]$, a equação 12 pode ser reescrita como:

$$E = E^{\circ'} + 59,16 \log[H^+] + jH[H^+] \quad (16)$$

A equação 16 pode ainda ser escrita como:

$$\underbrace{E - 59,16 \log [H^+]}_Y = \underbrace{E^{\circ'}}_b + \underbrace{jH}_a \underbrace{[H^+]}_x \quad (17)$$

ou seja, plotando-se $E - 59,16 \log [H^+]$ contra $[H^+]$ tem-se uma região linear cujo coeficiente angular fornece jH e o coeficiente linear fornece $E^{\circ'}$. A Tabela 10 apresenta os resultados experimentais da determinação gráfica (Figura 04) destes parâmetros.

Tabela 10 – Valores de $Y(\text{mV})$ ($Y = E - 59,16 \log[H^+]$) em função de $[H^+]$ (mol L^{-1}) calculada a partir da equação 13 para os dados da região ácida de uma titulação de 52,50 mL de uma solução de HCl $4,676 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com NaOH $0,125 \text{ mol L}^{-1}$, ambas em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$.

V NaOH (mL)	E (mV)	$[H^+](\text{mols.L}^{-1})$	Y (mV)
0,0	276,5	4,68E-03	414,3
0,1	275,2	4,43E-03	414,4
0,2	273,9	4,18E-03	414,6
0,3	272,4	3,94E-03	414,7
0,4	270,8	3,70E-03	414,7
0,5	269,1	3,45E-03	414,7
0,6	267,2	3,21E-03	414,7
0,7	265,3	2,97E-03	414,8
0,8	263,2	2,73E-03	414,9
0,9	260,9	2,49E-03	414,9
1,0	258,3	2,25E-03	414,9
1,1	255,5	2,01E-03	415,0
1,2	252,3	1,78E-03	415,0
1,3	248,6	1,54E-03	414,9
1,4	244,2	1,31E-03	414,8
1,5	239,0	1,07E-03	414,6
1,6	232,4	8,41E-04	414,3
1,7	223,7	6,09E-04	413,9
1,8	210,1	3,78E-04	412,6
1,9	179,5	1,47E-04	406,2

Figura 04 - Gráfico de $E - 59,16 \log[H^+]$ em função da $[H^+]$ (mols L^{-1}). Na equação da reta obtida o coeficiente linear fornece $E^{\circ'}$ e o coeficiente angular fornece jH . No caso: $jH = -206,3 \text{ mV L mol}^{-1}$ e $E^{\circ'} = 415,4 \text{ mV}$.

Na região alcalina o termo $jH^+[H^+]$ é muito pequeno. Portanto, a equação 11 pode ser escrita como:

$$E = E^{\circ'} + 59,16 \log [H^+] + jOH [OH^-] \quad (18)$$

Como $[H^+][OH^-] = K_w$, a equação 18 pode ser escrita como:

$$E = E^{\circ'} + 59,16 \log \left(\frac{K_w}{[OH^-]} \right) + jOH [OH^-] \quad (19)$$

ou:

$$E = E^{\circ'} + 59,16 \log K_w - 59,16 \log [OH^-] + jOH^- [OH^-] \quad (20)$$

Como K_w é constante, pode ser somado a $E^{\circ'}$, resultando:

$$E^{\circ''} = E^{\circ'} + 59,16 \log K_w \quad (21)$$

O termo $E^{\circ''}$ engloba também o coeficiente de atividade de OH^- . Pode-se então escrever:

$$E = E^{\circ''} - 59,16 \log [OH^-] + jOH [OH^-] \quad (22)$$

A $[OH^-]$ após o ponto estequiométrico de uma titulação de ácido forte com base forte é calculada a partir da equação:

$$[OH^-] = \frac{(V - V_e).C_B}{(V_0 + V)} \quad (23)$$

Rearranjando a equação 22 :

$$\underbrace{E + 59,16 \log [OH^-]}_Y = \underbrace{E^{\circ''}}_b + \underbrace{jOH}_a \underbrace{[OH^-]}_x \quad (24)$$

ou seja, plotando-se $E + 59,16 \log [OH^-]$ contra $[OH^-]$, tem-se uma região linear cujo coeficiente angular fornece jOH e o coeficiente linear fornece $E^{0'}$.

A Tabela 11 apresenta os dados da região alcalina de uma titulação de calibração para a determinação gráfica (Figura 05) dos parâmetros $E^{0'}$ e jOH .

Tabela 11 – Valores de Y (mV) ($Y = E + 59,16 \log[OH^-]$) em função de $[OH^-]$ (mol L⁻¹) calculada a partir da equação 23 para os dados da região alcalina de uma titulação de 52,50 mL de uma solução de HCl $4,676 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com NaOH 0,125 mol L⁻¹, ambas em meio de KNO₃ 0,020 mol L⁻¹.

V.NaOH(mL)	E (mV)	[OH ⁻] (mols/L)	Y
2,00	159,2	0,000082569	-400,8
2,10	191,8	0,000311355	-399,3
2,20	206,2	0,000539305	-399,5
2,30	215,0	0,000766423	-399,3
2,40	221,5	0,000992714	-399,2
2,50	226,8	0,001218182	-399,2
2,60	230,9	0,001442831	-399,0
2,70	234,7	0,001666667	-399,1
2,80	237,9	0,001889693	-399,0
2,90	240,8	0,002111913	-399,1
3,00	243,4	0,002333333	-399,1
3,10	245,7	0,002553957	-399,1
3,20	247,6	0,002773788	-398,9
3,30	249,4	0,002992832	-398,7
3,40	251,3	0,003211091	-398,8
3,50	253,1	0,003428571	-398,9
3,60	254,6	0,003645276	-398,8
3,70	256,0	0,003861210	-398,8
3,80	257,4	0,004076377	-398,8

Figura 05 - Gráfico de $E + 59,16 \log[OH^-]$ em função da $[OH^-]$ (mols L⁻¹). Na equação da reta obtida o coeficiente linear fornece $E^{\circ'}$ e o coeficiente angular fornece jOH . No caso: $E^{\circ'} = -399,3$ mV e $jOH = 146,6$ mV L mol⁻¹.

A partir da equação 21 pode-se calcular o valor de K_w no meio iônico estudado.

$$\log K_w = \frac{E^{\circ''} - E^{\circ'}}{59,16} \quad (25)$$

No caso ilustrado nas Figuras 4 e 5, determinou-se o valor de K_w como $1,69 \times 10^{-14}$. Com isto, a partir da titulação de ácido forte com uma base forte padrão, pode-se determinar parâmetros de calibração para a titulação da amostra ($E^{\circ'}$, jH , jOH e K_w). Na titulação da amostra desconhecida determina-se E experimentalmente em cada ponto da titulação. A partir dos parâmetros de calibração $E^{\circ'}$, jH , jOH e K_w , determina-se a $[H^+]$ utilizando a equação 26. Os cálculos foram realizados em um programa compilado em Quick Basic.

$$E = E^{\circ'} + 59,16 \log [H^+] + jH [H^+] + jOH \frac{K_w}{[H^+]} \quad (26)$$

Os dados da Tabela 12 ilustram uma titulação de 52,50 mL da Fração Solúvel da alga com solução de NaOH 0,1250 mol L⁻¹ em meio iônico de KNO₃ 0,020 mol L⁻¹ a 25,0±0,1°C. Os valores de *V* e *E* são determinados experimentalmente e os valores de p^oH, ou seja, os valores de pH expressos em termos de concentração de íons H⁺, são obtidos a partir da equação 26 usando os parâmetros obtidos na calibração do eletrodo, realizada no mesmo dia da titulação da amostra

Tabela 12 – Dados de titulação de 50,00 mL de solução resultante da Fração Solúvel da *Spirulina* na presença de 2,50 mL de HCl 0.09820 mol L⁻¹, ambas em meio de KNO₃ 0,020 mol L⁻¹. Os valores de p^oH foram obtidos a partir da equação 26 utilizando-se os parâmetros: E° = 415,4 mV; jH = - 206,3 mV, jOH = 146,6 mV e Kw = 1,69 . 10⁻¹⁴.

Ponto	V(mL)	E(mV)	p ^o H
1	0,000	269,0	2,463
2	0,100	267,4	2,491
3	0,200	265,8	2,518
4	0,300	264,0	2,549
5	0,400	262,0	2,584
6	0,500	260,0	2,619
7	0,600	257,6	2,660
8	0,700	255,3	2,699
9	0,800	252,5	2,747
10	0,900	249,3	2,802
11	0,975	246,8	2,845
12	1,025	244,8	2,879
13	1,075	242,8	2,913
14	1,125	240,6	2,951
15	1,175	238,2	2,992
16	1,225	235,7	3,034
17	1,275	232,9	3,082
18	1,325	229,0	3,148
19	1,350	228,0	3,165
20	1,375	226,3	3,194
21	1,400	224,3	3,228
22	1,425	222,2	3,264
23	1,450	219,9	3,303
24	1,475	217,5	3,344
25	1,500	214,8	3,390
26	1,525	211,9	3,439
27	1,550	208,8	3,491
28	1,560	207,5	3,513
29	1,570	206,1	3,537
30	1,580	204,6	3,562
31	1,590	203,0	3,590
32	1,610	200,0	3,640
33	1,630	196,5	3,700
34	1,650	192,6	3,766
35	1,670	188,6	3,833
36	1,690	193,9	3,913
37	1,710	178,8	3,999
38	1,730	173,2	4,094
39	1,750	167,2	4,195
40	1,770	160,5	4,308

41	1,790	153,2	4,432
42	1,810	144,9	4,572
46	1,820	140,6	4,645
44	1,830	135,9	4,725
45	1,840	130,9	4,805
46	1,850	125,5	4,900
47	1,860	119,9	4,995
48	1,870	113,3	5,107
49	1,880	105,9	5,232
50	1,890	97,8	5,369
51	1,900	88,3	5,529
52	1,910	77,3	5,715
53	1,920	64,5	5,932
54	1,925	58,0	6,041
55	1,930	51,1	6,158
56	1,935	45,2	6,258
57	1,940	38,2	6,376
58	1,945	32,2	6,478
59	1,950	26,2	6,579
60	1,955	20,5	6,675
61	1,960	14,4	6,778
62	1,965	8,8	6,876
63	1,970	3,2	6,968
64	1,975	-2,8	7,069
65	1,980	-8,9	7,172
66	1,985	-15,5	7,284
67	1,990	-22,8	7,407
68	1,995	-30,7	7,541
69	2,000	-39,3	7,686
70	2,005	-48,8	7,847
71	2,010	-58,8	8,016
72	2,015	-69,7	8,200
73	2,020	-80,2	8,377
74	2,025	-89,0	8,526
75	2,030	-97,1	8,663
76	2,035	-103,7	8,775
77	2,040	-110,5	8,891
78	2,045	-116,2	8,986
79	2,050	-116,2	9,076
80	2,055	-121,5	9,153
81	2,060	-126,1	9,228
82	2,065	-130,5	9,294
83	2,070	-134,4	9,351
84	2,080	-137,8	9,464
85	2,090	-144,5	9,564
86	2,100	-150,4	9,649
87	2,110	-155,4	9,728
88	2,120	-160,1	9,794
89	2,130	-164,0	9,858
90	2,140	-167,8	9,913
91	2,150	-171,0	9,963
92	2,160	-176,9	10,012
93	2,185	-183,0	10,116
94	2,210	-188,2	10,204
95	2,235	-192,6	10,278
96	2,260	-196,3	10,341
97	2,285	-199,8	10,400
98	2,310	-202,5	10,446
99	2,360	-207,9	10,537
100	2,410	-212,1	10,609

101	2,460	-215,8	10,672
102	2,510	-219,0	10,726
103	2,560	-221,9	10,775
104	2,610	-224,5	10,819
105	2,685	-228,1	10,881
106	2,760	-231,0	10,930
107	2,835	-233,7	10,976
108	2,935	-237,0	11,032
109	3,035	-239,8	11,080
110	3,135	-242,4	11,125
111	3,235	-244,6	11,162
112	3,335	-246,8	11,200

3.5.1.2 – Determinação da estequiometria e pKa dos sítios ionizáveis.

O cálculo das concentrações e dos pKa dos sítios ionizáveis da alga, da Fração Solúvel e da Fração Insolúvel foram realizados utilizando-se um programa de ajuste multiparamétrico baseado em regressão não-linear. A rotina de minimização de erros por regressão não linear foi proposta por Borato [64] e adaptada para o caso de resolução de misturas de ácidos por Masini et al [53]. O programa de regressão não-linear usa a equação geral que descreve a titulação de uma mistura de um ácido forte, HA_0 , com N ácidos fracos, HA_n , (sítios ligantes):

$$f(V, H^+) = (V - V_{HA_0}) C_B \left\{ [H^+] - \frac{K_W}{[H^+]} \right\} (V_0 + V) - \sum_{n=1}^N \left\{ \left(V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}} \right) A_n C_B \right\} \quad (27)$$

Onde:

V = volume do titulante.

V_0 = volume inicial presente na cela de titulação.

V_{HA_0} = volume de equivalência para o ácido forte.

V_{HA_n} = volume de equivalência para o sítio ionizável HA_n .

$[H^+]$ = concentração do íon H^+ .

K_W = constante de ionização da água nas condições de temperatura e força iônica da análise, obtida na calibração dos eletrodos (equação 25).

C_B = concentração do titulante em mol L^{-1} .

O termo A_n é definido por:

$$A_n = \frac{K_{HAN}}{(K_{HAN} + [H^+])} \quad (28)$$

Onde:

K_{HAN} = constante de ionização do sítio HAN .

O logaritmo negativo de $[H^+]$, $p^{\circ}H$, é adotado como a variável dependente e o volume de titulante, V_t , como a variável independente. V_{HAN} e K_{HAN} são ajustáveis no cálculo, minimizando o erro da soma S :

$$S = \sum_{j=1}^m [p^{\circ}H_j(med) - p^{\circ}H_j(calc)]^2 \quad (29)$$

Onde:

m = total de dados (V e $p^{\circ}H$) usado na análise de regressão.

$p^{\circ}H$ (med) refere-se ao pH experimental.

$p^{\circ}H$ (calc) é o pH calculado.

Os valores de $p^{\circ}H$ (calc) foram obtidos usando uma sub-rotina iterativa baseada no método de Newton-Raphson [53]. Primeiramente os valores de $[H^+](calc)$ são calculados usando os valores iniciais estimados para V_{HAN} e K_{HAN} (fornecidos pelo usuário do programa). Melhores aproximações para os valores de $[H^+](calc)$ no ponto experimental j são obtidos através de sucessivas iterações, K_j , de acordo com a equação:

$$[H^+]_{j,k+1} = [H^+]_{j,k} - \frac{f(V, [H^+]_{j,k})}{f'(V, [H^+]_{j,k})} \quad (30)$$

onde $f'(V, [H^+]_{j,k})$ é a primeira derivada da equação 27, dada pela seguinte expressão:

$$f'(V, H^+) = \left\{ 1 + \left(\frac{K_w}{[H^+]^2} \right) \right\} \cdot (V_0 + V) + \sum_{n=1}^N \left\{ (V_{HAN} - V_{HAN-1}) C_B \frac{K_{HAN}}{(K_{HAN} + [H^+])^2} \right\} \quad (31)$$

A equação 30 é usada repetidamente até que ocorra a convergência a um valor limite, previamente definido por:

$$\left\{ \frac{\{[H^+]_{j,k+1} - [H^+]_{j,k}\}}{[H^+]_{j,k}} \right\} < 0,00001 \quad (32)$$

Quando a condição definida pela equação 32 é atendida o valor de $[H^+]_{j,k+1}$ é enviado para a sub-rotina de minimização para refinar os valores de V_{HAN} e K_{HAN} . Para a realização dos cálculos um comando restringindo $[H^+]_{calc} < 0$ foi introduzido no programa [63].

O programa de regressão não linear é compilado em Turbo-Basic 1.1 (Boarland International, Inc., 1987). Para início dos cálculos digitam-se os dados experimentais, volume de base e p^oH. Em seguida fornecem-se os valores de concentração de base, volume inicial na cela de titulação e produto iônico da água. A partir daí inicia-se o cálculo propriamente dito. O programa solicita o número de dados (número de pares de volume e p^oH), o número de parâmetros que deverão ser ajustados e o número de iterações desejadas (foram usadas 50 por cálculo). A partir deste ponto o programa solicita as estimativas iniciais dos parâmetros a serem ajustados e seus respectivos deltas.

No caso dos experimentos aqui realizados, o primeiro parâmetro corresponde ao volume do ponto estequiométrico para o ácido forte, VHA_0 . Os demais parâmetros correspondem aos volumes estequiométricos e os pKa dos ácidos fracos. Assim, o parâmetro 2 refere-se ao volume do ponto estequiométrico da titulação do

ácido fraco com menor pKa, o qual é definido como parâmetro ajustável 3. Deste modo, para uma mistura de um ácido forte e cinco ácidos fracos tem-se onze parâmetros ajustáveis, sendo que os parâmetros de 2, 4, 6, 8 e 10 são os volumes de ponto estequiométrico dos ácidos fracos, enquanto os parâmetros 3, 5, 7, 9 e 11 referem-se aos respectivos valores de pKa. Associado a cada parâmetro ajustável deve-se fornecer um valor de delta, que corresponde à faixa de variação permitida no cálculo numérico para o parâmetro em questão. No presente trabalho fixou-se em 0,005 o valor de delta tanto para o volume estequiométrico como para o pKa. Valores maiores que 0,005 poderiam agilizar o cálculo, chegando-se mais rapidamente ao valor de convergência. Entretanto observou-se que nestes casos é comum ocorrer divergência.

O número de classes de grupos tituláveis (número de parâmetros ajustáveis) em materiais complexos como os envolvidos na alga *Spirulina* dependerá:

- 1 – da presença de grupos ionizáveis de diferentes naturezas químicas (carboxílicos, fenólicos, amínicos, etc.).
- 2 – de grupos de mesma natureza química que estejam sujeitos a interações intramoleculares (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, proximidade de grupos com alta eletronegatividade, etc.) que têm seus valores de pKa influenciados por tais interações.
- 3 – da capacidade de resolução de misturas através do método numérico empregado. Tem-se demonstrado que quando dois grupos tituláveis com diferença nos valores de pKa menor ou igual a 0,5 unidades estão presentes na mistura ou macromolécula, os métodos estudados determinam os dois grupos como uma única classe HAn cuja concentração corresponde à soma das concentrações individuais destes grupos, enquanto o pKa refere-se a um valor médio.

A Figura 6 mostra o aperfeiçoamento no ajuste entre os dados experimentais e calculados pelo programa de regressão não linear em função do número de sítios (ou classes) ionizáveis adotados no modelo para cálculo das concentrações e pKas. Esta figura exemplifica o cálculo realizado com os dados da titulação da Fração Solúvel da alga. Pode-se observar claramente na Figura 6 que, adotando-se 3 classes sítios ionizáveis, as diferenças entre o pH experimental e o pH calculado são elevadas e apresentam um perfil sigmoidal, sugerindo que o modelo não descreve apropriadamente os dados experimentais. Adotando-se 4 classes de sítios, as diferenças entre o pH experimental e calculado diminuem significativamente, indicando um ajuste mais adequado. Para 5 classes de sítios ionizados encontrou-se o melhor ajuste, sendo que para a maior parte dos pontos a diferença entre o pH experimental e

ajuste, sendo que para a maior parte dos pontos a diferença entre o pH experimental e calculado foi sempre menor que 0,01 unidades de pH e somente em poucos casos superou uma diferença de 0,02. Para 6 classes de sítios o ajuste estatístico ainda apresenta uma melhora, mas passa-se a obter concentrações ou pKa negativos, o que não teria sentido físico e, portanto, esta condição não foi levada em consideração.

Figura 6 – Diferença entre o pH experimental e o pH calculado pelo programa de regressão não linear em função do número de classes de sítios ionizáveis adotados no modelo para representar a curva de titulação alcalimétrica da Fração Solúvel da alga.

3.5.2 – Caracterização das Propriedades de Complexação/Adsorção

3.5.2.1 – Determinação da Concentração de Cobre Livre e Cobre Ligado.

A concentração de cobre nos meios de titulação foi feita por potenciometria direta usando eletrodo íon seletivo. Neste caso vale a relação:

$$E = A + S \log[Cu(II)] \quad (33)$$

Onde:

E = potencial medido na cela eletroquímica.

A = constante que inclui o potencial do eletrodo de referência, o potencial de junção líquida, o potencial padrão de redução do $Cu(II)$ e o coeficiente de atividade do $Cu(II)$.

$S = 2.303RT / nF$ cujo valor teórico é 29,6 mV a 25°C.

Os termos A e S da equação 33 foram determinados em meio não complexante por titulação de uma solução de KNO_3 0,020 mol L⁻¹ em pH 6,0 ± 0,1 com uma solução padrão de $Cu(II)$ também em meio de KNO_3 0,020 mol L⁻¹. O pH da solução titulada foi mantido em 6,0 ± 0,1 adicionando-se quantidades apropriadas de solução de KOH 0,050 mol L⁻¹. A temperatura foi mantida em 25,0 ± 0,1°C. Nesta titulação de calibração a concentração de cobre livre, $[Cu(II)]$ foi considerada igual à concentração de cobre total adicionado à cela, $C_{Cu(II)}$, calculada em cada ponto da titulação usando-se a equação:

$$[Cu(II)] = [C_{Cu(II)}] = \frac{VxM_{Cu(II)}}{(V_0 + V + V_B)} \quad (34)$$

Onde:

$[Cu(II)]$ = Concentração de $Cu(II)$ livre na solução em mols L⁻¹.

$C_{Cu(II)}$ = Concentração total de $Cu(II)$ adicionado em mols L⁻¹.

V = Volume de solução de $Cu(II)$ adicionado à cela de titulação.

$M_{Cu(II)}$ = Concentração da solução titulante de $Cu(II)$.

V_0 = Volume inicial na cela de titulação.

V_B = Volume de base adicionado à cela de titulação.

Os valores de A e S determinados em meio não complexante são posteriormente utilizados para calcular a concentração de cobre livre na titulação dos materiais provenientes da *Spirulina* a partir da equação 33. O valor de S determinado foi de 28,6 mV por década de variação de $[Cu(II)]$, indicando um comportamento Nernstiano do eletrodo no meio iônico e pH utilizados no estudo. Devido a este comportamento Nernstiano, assumiu-se que a contribuição da hidrólise do $Cu(II)$ seria desprezível para efeito dos cálculos, valendo portanto a equação 34. A Figura 7 mostra um exemplo de curva de titulação de calibração sobreposta à curva de titulação de uma amostra de *Spirulina*.

Figura 7 – Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meio complexante e não complexante, sendo este último composto por KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$, temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$. O meio complexante é o mesmo, mas na presença da suspensão $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de *Spirulina*.

3.5.2.2 Gráficos de Scatchard e a Capacidade de Complexação/Adsorção.

Nas titulações da alga a concentração de cobre complexado, $[CuL]$, foi calculada a partir do balanço de massa:

$$[CuL] = C_{Cu(II)} - [Cu(II)] \quad (35)$$

As algas apresentam polifuncionalidade, ou seja, sua superfície ou suas macromoléculas constituintes contém sítios ionizáveis e de complexação com diferentes naturezas químicas. Os sítios que formam complexos mais estáveis são ocupados em primeiro lugar, o que leva a uma função de distribuição das constantes de equilíbrio que depende do grau de ocupação dos sítios (θ). O grau de ocupação médio dos sítios de complexação/adsorção de uma classe j na superfície da alga, ou dos materiais complexos em solução é dado pela equação:

$$\theta = \frac{[CuL_j]}{[L_j]_t} \quad (36)$$

Onde:

θ = grau de ocupação médio dos sítios de classe j ($\theta = [CuL_j]/[L_j]_t$).

$[CuL_j]$ = Concentração de íons $Cu(II)$ ligados à classe de sítios j .

$[L_j]_t$ = Concentração total dos sítios de complexação do tipo j .

No caso de ligantes de ocorrência natural como a superfície de algas, nos quais a massa molar não é definida por um único valor, mas por uma função de distribuição, e a concentração de sítios de complexação não é conhecida *a priori*, pode-se expressar o grau de ocupação dos sítios do tipo j como:

$$\theta = \frac{[CuL_j]}{\{P\}} = Cc\theta \quad (37)$$

Onde:

$\{P\}$ = Concentração do ligante em $g L^{-1}$.

Cc = Capacidade de complexação/adsorção (quantidade de matéria de $Cu(II)$ que pode ser ligada por grama de alga).

θ = grau de ocupação médio dos sítios complexantes ($\theta = [CuL]/[L]_t$).

A concentração total de sítios de complexação/adsorção do tipo j pode ser obtida a partir da relação:

$$[L_j]_t = Cc\{P\} \quad (38)$$

Assumindo-se que os complexos formados têm estequiometria 1:1 e que o experimento é conduzido em força iônica e temperatura constantes, de modo que a carga elétrica sobre a superfície mantém-se constante, assim como sua conformação espacial, o grau de ocupação médio pode ser expresso de acordo com a isoterma de Langmuir [45].

$$v_j = \frac{[CuL_j]}{\{P\}} = \frac{Cc_j K^*_{j} [Cu(II)]}{1 + K^*_{j} [M]} \quad (39)$$

Onde:

K^*_j = constante de estabilidade condicional média para os sítios do tipo j .

A equação 39 pode ser linearizada, de acordo com a proposta de Scatchard [65] resultando na equação:

$$\frac{[CuL_j]}{[Cu(II)]} = K^*_{j} [L_j]_t - K^*_{j} [CuL_j] \quad (40)$$

A partir da equação 40 conclui-se que um gráfico de $[CuL_j]/[Cu(II)]$ em função de $[CuL_j]$ é linear, sendo que o coeficiente angular fornece o negativo da constante de estabilidade média, enquanto a razão entre o coeficiente angular e coeficiente linear fornece a concentração total dos sítios de complexação/adsorção do tipo j , $[L_j]_t$. [45, 65, 66].

A Tabela 13 fornece um exemplo numérico de um experimento de titulação da Fração Solúvel da microalga *Spirulina*, juntamente com os parâmetros necessários para a construção do gráfico de Scatchard (Figura 8).

Quando $j = 2$ a equação 40 deixa de ser linear, mas se K^*_1 e K^*_2 forem significativamente diferentes, dois segmentos lineares são obtidos, permitindo-se a determinação de K^*_1 e K^*_2 , assim como de Cc_1 e Cc_2 . A Figura 8 ilustra um gráfico de

Sctachard para a titulação da suspensão total da alga *Spirulina* com Cu(II). Os sítios com maior afinidade por íons Cu(II) são titulados primeiro, resultando numa função linear com maior inclinação. À medida que os sítios de maior afinidade são ocupados, os sítios de menor afinidade passam a governar a complexação de Cu(II) na medida em que o cátion vai sendo adicionado. Isto provoca uma gradual mudança de inclinação (Figura 8).

Tabela 13 – Dados experimentais de uma titulação da Fração Solúvel obtida de uma suspensão 1,0 g L⁻¹ de *Spirulina* em meio de KNO₃ 0,020 mol L⁻¹ e pH 6,0 ± 0,1, a 25,0 ± 0,1° C.

Ponto Experimental	C _{Cu(II)} (mol L ⁻¹)	[Cu(II)] (mol L ⁻¹)	[CuL] (mol L ⁻¹)	[CuL]/[Cu(II)]
1	2,00E-06	1,25E-09	2,00E-06	1,60E+03
2	4,00E-06	2,98E-09	4,00E-06	1,34E+03
3	8,00E-06	9,52E-09	7,99E-06	8,40E+02
4	1,00E-05	2,08E-08	9,98E-06	4,79E+02
5	2,00E-05	7,08E-08	1,99E-05	2,81E+02
6	4,00E-05	4,22E-07	3,96E-05	9,39E+01
7	8,00E-05	2,45E-06	7,75E-05	3,16E+01
8	1,00E-04	4,14E-06	9,59E-05	2,32E+01
9	2,00E-04	1,80E-05	1,82E-04	1,01E+01
10	3,92E-04	4,44E-05	3,48E-04	7,83E+00
11	7,84E-04	9,68E-05	6,88E-04	7,10E+00
12	9,80E-04	1,50E-04	8,30E-04	5,52E+00

Figura 8 – Gráfico de Scatchard construído com os dados de uma titulação de suspensão 1,0 g L⁻¹ de *Spirulina* (alga mais Fração Solúvel) com solução de Cu(II) 5,0 mmol L⁻¹ em meio de KNO₃ 0,020 mol L⁻¹ e pH 6,0 ± 0,1, a 25,0 ± 0,1 °C.

3.5.2.3 - Funções de Equilíbrio Diferenciais (DEF)

Devido à heterogeneidade química dos sítios de complexação não há como caracterizar uma constante de equilíbrio K_j para cada sítio j . Os valores de $\log K^*$ determinados pelo método de Scatchard são valores médios e muitas vezes, mistos entre os sítios de maior e menor afinidade pelo cátion metálico. A interpretação dos dados de titulação de um sistema altamente heterogêneo levou à definição do parâmetro de equilíbrio diferencial (K_{DEF}) dado pela média aritmética ponderada das constantes de equilíbrio condicionais K_j para todos os sítios do tipo j envolvidos na complexação [67, 68]

$$K_{DEF} = \frac{\sum_{j=1}^m K_j \theta_j (1-\theta) \Delta x_j}{\sum \theta_j (1-\theta) \Delta x_j} \quad (41)$$

Onde

K_{DEF} = Constante de estabilidade em função do grau de ocupação dos sítios complexantes.

Δx_j = fração molar do sítio complexante do tipo j , $\Delta x_j = [L_j]_t / [L]_t$.

m = número de diferentes tipos de sítios envolvidos na complexação.

O parâmetro K_{DEF} depende da composição do sítio de composição através dos valores de K_j e Δx_j e do fator de ponderação $\theta_j(1-\theta)$. Este fator indica que o valor de K_{DEF} é controlado principalmente pelos sítios j que estão aproximadamente 50% saturados em um certo ponto da titulação. Como K_{DEF} incorpora alguma influencia de todos os sítios presentes na macromolécula ou superfície, também não pode ser associado a um único valor de K . A partir da equação 41, uma expressão baseada em dados experimentais pode ser deduzida para K_{DEF} :

$$K_{DEF} = - \frac{\alpha^2}{C_{Cu(II)}} \left\{ \frac{1 - \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{d \ln [L]_t}{d \ln \alpha} \right)}{1 + (\alpha-1) \left(\frac{d \ln \left(\frac{C_{Cu(II)}}{[L]_t} \right)}{d \ln \alpha} \right)} \right\} \quad (42)$$

Onde:

$$\alpha = C_{Cu(II)} / [Cu(II)]$$

$[L]_t$ = concentração total de sítios ligantes que pode ser expressa em qualquer unidade diretamente relacionada à concentração total de sítios de complexação (mol L^{-1} ou mol g^{-1}).

Em um caso de titulação como o da *Spirulina*, a concentração de ligantes é praticamente constante, assim como o número de sítios de complexação, de modo que a equação 42 pode ser reescrita como:

$$K_{DEF} = -\frac{\alpha^2}{C_{Cu(II)}} \left[\frac{I}{1 + (\alpha - I) \left(\frac{d \ln C_{Cu(II)}}{d \ln \alpha} \right)} \right] \quad (43)$$

Como não existe uma expressão analítica relacionando $C_{Cu(II)}$ com α , o termo derivada $\ln C_{Cu(II)} / \ln \alpha$ é encontrada por ajuste polinomial e então a derivada do polinômio é utilizada na equação 43, conforme mostra a Figura 9.

Os valores de K_{DEF} podem ser relacionados com o grau de ocupação, θ , dos sítios de complexação pela equação:

$$\text{Log } \theta = \Gamma \log K_{DEF}^{\circ} - \Gamma \log K_{DEF} \quad (44)$$

Onde:

K_{DEF}° = valor de K_{DEF} quando todos os sítios complexantes estão ocupados, ou seja, quando $\theta = 1$.

Γ = parâmetro de heterogeneidade (igual a 1 para ligante simples e igual a zero para um ligante totalmente heterogêneo).

Experimentalmente determina-se a concentração do íon livre em solução, $[Cu(II)]$, calcula-se α ($C_{Cu(II)} / [Cu(II)]$). Plotando-se $\ln C_{Cu(II)}$ em função de $\ln \alpha$ obtém-se uma equação polinomial de ordem dois. Substituindo-se a derivada deste polinômio na equação 43 calcula-se os valores de K_{DEF} . Plotando-se $\log K_{DEF}$ em função de $\log \theta$ obtém-se um segmento de reta onde o coeficiente angular é o parâmetro de heterogeneidade (Γ) enquanto de que a divisão do coeficiente linear pelo coeficiente angular fornece o valor de $\log K_{DEF}^{\circ}$, que é o valor de $\log K_{DEF}$ quando todos os sítios complexantes estão ocupados, ou seja $\theta = 1$ e, portanto, $\log \theta = 0$ [67]. A Tabela 14

ilustra um conjunto de dados experimentais de titulação da suspensão completa da alga *Spirulina* com Cu(II) utilizados para determinação dos valores de K_{DEF} . A Figura 10 mostra a variação de $\log K_{DEF}$ em função do $\log \theta$, sendo que para o cálculo de θ utilizou-se como $[L]_t$ a concentração de sítios ionizáveis desprotonados em pH 6,0, o que foi feito utilizando-se a equação:

$$[L]_t = \sum_{n=1}^N \frac{K_{HAN} C_{HAN}}{[H^+] + K_{HAN}} \quad (45)$$

Onde:

N = número de classes de sítios ionizáveis determinados na caracterização ácido-base.

K_{HAN} = constante de ionização da classe HAN de sítios ionizáveis.

C_{HAN} = Concentração total da classe de sítios ionizáveis HAN.

Tabela 14 – Exemplo de conjunto de dados experimentais e de resultados de cálculo para determinação de K_{DEF} em função do grau de ocupação dos sítios de complexação para a Fração Solúvel de uma suspensão de *Spirulina* 1,0 g L⁻¹ em meio de KNO₃ 0,020 mol L⁻¹, pH 6,0 ± 0,1 e 25,0 ± 0,1^o C.

Ponto Experimental	$C_{Cu(II)}$ (mol L ⁻¹)	[Cu(II)] (mol L ⁻¹)	[CuL] (mol L ⁻¹)	[CuL]/[Cu(II)]	$\ln \alpha$	$\ln C_{Cu(II)}$	$\frac{d \ln C_{Cu(II)}}{d \ln \alpha}$	$\log K_{DEF}$	$\log \theta$
1	2,00E-06	1,25E-09	2,00E-06	1,60E+03	7,38	-13,12	-2,05	8,59	-2,76
2	4,00E-06	2,98E-09	4,00E-06	1,34E+03	7,20	-12,43	-1,84	8,26	-2,46
3	8,00E-06	9,52E-09	7,99E-06	8,40E+02	6,73	-11,74	-1,37	7,89	-2,16
4	1,00E-05	2,08E-08	9,98E-06	4,79E+02	6,17	-11,51	-0,93	7,71	-2,06
5	2,00E-05	7,08E-08	1,99E-05	2,81E+02	5,64	-10,82	-0,66	7,34	-1,76
6	4,00E-05	4,22E-07	3,96E-05	9,39E+01	4,55	-10,13	-0,50	6,69	-1,46
7	8,00E-05	2,45E-06	7,75E-05	3,16E+01	3,48	-9,43	-0,89	5,69	-1,17
8	1,00E-04	4,14E-06	9,59E-05	2,32E+01	3,19	-9,21	-1,10	5,38	-1,08
9	2,00E-04	1,80E-05	1,82E-04	1,01E+01	2,41	-8,52	-1,82	4,55	-0,80
10	3,92E-04	4,44E-05	3,48E-04	7,83E+00	2,18	-7,84	-2,09	4,11	-0,52
11	7,84E-04	9,68E-05	6,88E-04	7,10E+00	2,09	-7,15	-2,20	3,76	-0,22
12	9,80E-04	1,50E-04	8,30E-04	5,52E+00	1,88	-6,93	-2,49	3,53	-0,14

Figura 9 – Gráfico de $\ln C_{\text{Cu(II)}}$ em função de $\ln \alpha$ para determinação da função diferencial $d \ln C_{\text{Cu(II)}}/d \ln \alpha$, a qual é obtida derivando-se a função $y = -0,0781x^3 + 1,1242x^2 - 5,8804x + 0,6053$ por ajuste polinomial dos dados experimentais.

Figura 10 – Variação do $\log K_{DEF}$ em função do $\log \theta$ para titulação da Fração Solúvel de uma suspensão de Spirulina $1,0 \text{ g L}^{-1}$ em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$ e temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 11 mostra uma fotografia obtida em microscópio óptico da suspensão de espécies mistas de *Spirulina* liofilizada em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,0. Este material foi escolhido devido à sua disponibilidade comercial e fonte bem controlada, sendo portanto, um material adequado para a realização do estudo de avaliação de métodos de cálculo de titulações complexométricas de superfícies de alga. Pode-se observar que as células foram rompidas no processo de liofilização, não apresentando a forma de espiral que caracteriza esta alga (Figura 1), mas apenas fragmentos. Em função deste rompimento estrutural procurou-se então estudar o comportamento da Suspensão Total, da Fração Solúvel e da Fração Insolúvel.

Figura 11 – Fotografia obtida no Fotomicroscópio Zeiss Axioscop 2 Data Back D4MC80DX , Aumento 400 X , usando Filme Fuji, 4ª Camada de cor, 35 mm, ASA 200, da suspensão de *Spirulina* liofilizada em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1 – Caracterização ácido-base.

A heterogeneidade química da superfície da microalga *Spirulina* foi preliminarmente estudada pela caracterização ácido-base. A Figura 12 mostra o perfil da curva de titulação dos três materiais estudados: Suspensão Total da alga, Fração Solúvel e Fração Insolúvel. A Figura 13 apresenta os espectros da distribuição de sítios discretos dos três materiais estudados. Estes espectros mostram o valor do pKa e a respectiva concentração (em mmol por grama da alga) de cada classe de sítios ionizáveis, sendo que os cálculos foram realizados a partir dos dados da titulação potenciométrica utilizando-se um programa de ajuste multiparamétrico baseado em regressão não-linear, descrito no item 3.5.1.2 desta dissertação. As duas classes de sítios ionizáveis que apresentam $pK_a < 7$ são atribuídas aos grupos carboxílicos e correspondem a quase 50% do total dos sítios ionizáveis. Os grupos carboxílicos estão relacionados aos polissacarídeos e hemicelulose, que são os principais constituintes da parede celular. Na Fração Solúvel as classes com $pK_a < 6,5$ podem ser atribuídas aos ácidos carboxílicos, aminoácidos, proteínas e, também, aos polissacarídeos que se apresentam inicialmente aderidos às superfícies ou são liberados do interior das células. Parte destes grupos, particularmente aqueles com pK_a próximo a 3, podem refletir a contribuição de ácido fosfórico proveniente de fosfatos do interior das células, conforme será discutido adiante.

A Suspensão Total e a Fração Solúvel apresentaram classes de sítios ionizáveis caracterizadas com $pK_a(s)$ variando entre 6,4 e 7,5. Estas espécies podem ser atribuídas ao fosfato, levando-se em conta que este ânion foi determinado na Fração Solúvel com concentração de $2,4 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Sabe-se, também, que os fosfolipídios são constituintes da parede celular da microalga [69] e que as cianobactérias acumulam grânulos polimerizados de polifosfato que servem como reserva de fosfato para as células. Quando as células passam por operações de secagem, os grânulos de polifosfato resistem, o que não ocorre com a membrana celular que é demasiadamente sensível para poder resistir) [53, 63]. Quando a *Spirulina* liofilizada é re-suspensa na água em pH 6,0 estes grânulos de polifosfato dissolvem-se,

Figura 12 – Curvas de titulação ácido-base da Suspensão Total, Fração Solúvel e Fração Insolúvel obtidas de uma suspensão 1,0 g L⁻¹ de *Spirulina* liofilizada em meio de KNO₃ 0,02 mol L⁻¹, a 25,0±0,1°C. Todas as titulações foram realizadas com 50,00 mL da suspensão de alga acrescidos de 2,50 mL de solução de HNO₃ 0,10 mol L⁻¹ com solução padrão de NaOH 0,1250 mol L⁻¹.

Figura 13 – Distribuição e concentração dos sítios ionizáveis nos três materiais estudados determinados por tratamento dos dados das titulações potenciométricas pelo modelo de distribuição de sítios discretos. Os resultados correspondem à média de três experimentos realizados a $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$.

explicando a elevada concentração de fosfato encontrada na Fração Solúvel. É interessante notar que os sítios ionizáveis com pK_a entre 6,4 e 7,5 não foram observados na Fração Insolúvel (Figura 13), dando sustentação à hipótese que esta classe de sítios ionizáveis se devem ao fosfato solúvel inorgânico. As classes dos sítios ionizáveis com $pK_a > 8$ são atribuídas aos grupos aminos e fenólicos, em todos os materiais analisados. O método usado para a caracterização ácido-base não permite distinguir as contribuições de ambas as espécies devido à proximidade dos valores de seus $pK_a(s)$ [53, 63].

A partir dos resultados da caracterização ácido-base foi possível calcular as concentrações dos sítios desprotonados em $pH = 6$ utilizando a equação 45, sendo que os valores encontrados foram 1,22, 1,15 e 0,61 $mmol\ g^{-1}$, respectivamente, para a Suspensão da Total alga, para a sua Fração Solúvel e para a sua Fração Insolúvel. A heterogeneidade e as concentrações dos sítios ionizáveis que foram encontrados neste trabalho para a microalga *Spirulina* são da mesma magnitude dos valores relatados para outras espécies de algas [63, 70 -73].

4.2 – Tempo de equilíbrio com Cu(II).

Os experimentos para determinação do tempo de equilíbrio foram realizados com suspensões contendo 1,0 $g\ L^{-1}$ da microalga *Spirulina*, em $pH = 6,0 \pm 0,1$ e força iônica mantida por $KNO_3\ 0,020\ mol\ L^{-1}$ usando concentrações iniciais de Cu(II) 0,1 e 1,2 $mmol\ L^{-1}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 14 apresentando perfil semelhante para as duas concentrações iniciais, com o equilíbrio sendo alcançado após 15 minutos. O perfil íngreme da curva verificado nos primeiros minutos indica que o processo de adsorção ocorre rapidamente, indicando a viabilidade do material estudado para tratar de soluções contendo concentrações reduzidas de metais pesados, da mesma forma que foi observado para outros materiais biossorventes [55, 57]. Nas condições em que os experimentos foram realizados nenhuma evidência de dessorção foi observada em um período de 48 horas. Também, após este período de 48 horas nenhum aumento significativo da adsorção de Cu(II) foi observado. Para assegurar condições experimentais reprodutíveis, foi adotado para os experimentos de adsorção de Cu(II) um tempo de equilíbrio de 40 minutos.

Figura 14 – Adsorção de Cu(II) em suspensão da *Spirulina* total 1.0 g L^{-1} determinada por espectrofotometria de absorção atômica de chama. Os resultados correspondem a media de três experimentos realizados em meio iônico mantido por solução 0.020 mol L^{-1} de KNO_3 a $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 6.0 \pm 0.1$.

4.3 – Isotermas de adsorção.

Os dados experimentais das titulações da Suspensão Total, Fração Solúvel e Fração Insolúvel com íons Cu(II) são representados na Figura 15. As isotermas de adsorção de Cu(II) para a Suspensão Total, Fração Solúvel e Fração Insolúvel em pH = 6 e força iônica mantida por KNO₃ 0,020 mol L⁻¹ são apresentadas na Figura 16. As isotermas de adsorção para a suspensão total da alga são íngremes nas concentrações reduzidas de Cu(II), sugerindo a viabilidade deste material para tratar soluções diluídas de metais pesados. Embora as isotermas de adsorção para a Fração Solúvel sejam similares às isotermas de adsorção para a suspensão total da alga (primeiros pontos da isoterma mostrada na Figura 16), demonstrando que o material retém quantidades significativas de Cu(II), ressalta-se que os componentes da Fração Solúvel mantêm o Cu(II) na solução como um complexo. Esta é uma forma inadequada de retenção do Cu(II), ou de outro cátion de metal pesado, pois o bioissorvente deve imobilizar o íon para evitar que o mesmo seja transportado para fora do local de tratamento [55].

A inclinação da isoterma de adsorção para a Fração Insolúvel é similar à dos outros dois tipos de materiais em relação aos três primeiros pontos (com a concentração total de Cu(II) variando entre 2,0 e 6,0 μmol L⁻¹) conforme mostrado no destaque da Figura 16. Entretanto, para concentrações mais elevadas de Cu(II) a inclinação da isoterma de adsorção é significativamente menor que a observada para a Suspensão Total da alga ou para a Fração Solúvel, demonstrando que existe uma estreita faixa de concentração para as quais a Fração Insolúvel é mais apropriada para remover Cu(II).

Figura 15 - Curvas de titulação complexométrica da Suspensão Total, Fração Solúvel e Fração Insolúvel com solução de $Cu(II)$ $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as titulações foram realizadas em meio de KNO_3 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ em $pH 6,0 \pm 0,1$ e a $25,0 \pm 0,1^\circ C$.

Figura 16 – Isotermas de Adsorção de Cu(II) em materiais da *Spirulina* determinadas por Titulação Potenciométrica monitorada com Eletrodo Seletivo para Cu(II) para concentrações de Cu(II) variando entre 2.0×10^{-6} e 1.0×10^{-3} mol L⁻¹. Na destaque são mostradas as isotermas quando a concentração total de Cu(II) varia entre 2.0×10^{-6} e 4.0×10^{-5} mol L⁻¹. As condições experimentais são as mesmas descritas da legenda da 14.

4.4 – Método de Scatchard.

A Tabela 15 apresenta os valores do logaritmo da constante condicional de estabilidade ($\log K^*$) e da capacidade complexante (concentração total dos sítios de complexação, $[L]_t$) determinados pela regressão linear dos gráficos de Scatchard (Figura 17). Duas classes de sítios ligantes foram determinadas para os três materiais estudados. Os sítios que formam complexos mais estáveis são representados por $j = 1$ na Tabela 15. Estes sítios são formados provavelmente por grupos fosfato e/ou aminos. Os sítios complexantes representados por $j = 2$ formam complexos menos estáveis, e são formados provavelmente por grupos carboxílicos, que são os componentes majoritários dos sítios ionizáveis em superfícies de algas.

Os valores de $\log K^*$ para os complexos mais estáveis formados com os três materiais estudados variaram de 7,3 a 7,9. O teste estatístico ANOVA mostra que as variações observadas nos valores de $\log K^*$ podem ser melhor explicadas por erros experimentais aleatórios do que por efeito de um fator fixo sistemático. Em suma, as diferenças observadas não são estatisticamente significativas [74]. A mesma observação é válida para as classes menos estáveis dos sítios ligantes, com os valores de $\log K^*$ variando entre 3,5 e 3,9 (Tabela 15). A capacidade complexante para a classe de sítios ligantes que formam complexos mais estáveis corresponde somente a 2,4% da capacidade total. Para a Fração Solúvel e para a Fração Insolúvel, a relação entre os sítios complexantes que formam complexos mais estáveis e a concentração total dos sítios complexantes foi praticamente a mesma que a observada para a Suspensão Total da alga. As capacidades de complexação da Suspensão Total e da Fração Solúvel são da mesma ordem de grandeza (Tabela 15), enquanto que para a Fração Insolúvel esta capacidade diminui aproximadamente 41 e 45% em comparação com a capacidade da Fração Solúvel e da Suspensão Total, respectivamente. Isto sugere que na Suspensão Total, parte do material é lavada das células. Este material que foi removido, constituindo o material complexante da Fração Solúvel, obviamente não está disponível para realizar complexação na fase sólida.

Figura 17 – Gráficos obtidos pela aplicação do método de Scatchard aos dados experimentais da titulação dos materiais da microalga *Spirulina* com $Cu(II)$. Os resultados correspondem a media de três experimentos realizados em meio iônico mantido por solução $0.020\ mol\ L^{-1}$ de KNO_3 a $25.0 \pm 0.1^\circ C$ e $pH\ 6.0 \pm 0.1$.

Tabela 15 – Resultados obtidos pelo método de Scatchard para complexação/adsorção entre Cu(II) e os materiais provenientes da suspensão de *Spirulina* em meio de $\text{KNO}_3 0.020 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6.0 ± 0.1 e $25.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados correspondem a média de três experimentos.

Material	j=1		j=2		$\sum_{j=1}^2 [L]_t$ (mmol g ⁻¹)
	log K*	[L] _t (mmol g ⁻¹)	log K*	[L] _t (mmol g ⁻¹)	
Suspensão Total	7,9±0,2	0,039±0,004	3,9±0,2	1,5 ₆ ±0,1 ₀	1,6±0,1
Fração Solúvel	7,6±0,3	0,022±0,002	3,6±0,1	1,4 ₈ ±0,1 ₀	1,5±0,1
Fração Insolúvel	7,3±0,2	0,057±0,009	3,5±0,3	0,86±0,09	0,92±0,08

Os resultados sugerem que parte dos sítios complexantes do material solúvel está fracamente associado à superfície das células, explicando o fato da capacidade complexante da Suspensão Total ser inferior à soma das capacidades complexantes das Frações Solúvel e Insolúvel. Os valores encontrados neste trabalho para capacidade complexante total e para o log K* de cada material estudado são consistentes com os dados relatados na literatura para bioissorventes similares [58, 73, 75-77] .

A diferença do log K* observada entre as classes de sítios complexantes que formam complexos mais estáveis e menos estáveis foi maior que 4 unidades, possibilitando uma ótima diferenciação das classes no gráfico obtido a partir da regressão linear de Scatchard (Figura 17). Esta facilidade de diferenciação dos parâmetros da complexação entre as duas classes de sítios ligantes conduz a valores inequívocos do log K* e [L]_t, em consonância com a aproximação gráfica usada neste trabalho. Deve-se ressaltar que a regressão linear de Scatchard considera o modelo de sítios discretos para os sítios ligantes e que a ocupação dos mesmos ocorre de forma contínua. Desta forma os valores de log K* (Tabela 15) devem ser entendidos como valores médios dos log das constantes de equilíbrio condicionais.

Os parâmetros log K* e [L]_t podem ser inseridos em programas com finalidade de realizar especiação, como o MINEQL+ [78, 79], para calcular [Cu(II)], [CuL₁] e [CuL₂] em função da concentração total de Cu(II) e de L no meio. A

distribuição das espécies de Cu(II), obtida usando o software MINEQL+, é mostrada na Figura 19, na qual os dados experimentais também foram incluídos com a finalidade de realizar a comparação.

4.5 – A função diferencial de equilíbrio.

A variação do $\log \theta$ verificada no presente estudo envolveu mais de 2 ordens de magnitude, variando de -2,8 a -0,25, enquanto os valores de $\log$ de K_{DEF} decresciam de 9,3 para 4 (Figura 18). O decréscimo do $\log$ de K_{DEF} com o aumento do $\log \theta$ pode ser explicado pelo fato de que os sítios ligantes de maior afinidade por Cu(II) são ocupados em primeiro lugar, resultando em valores mais elevados para o $\log K_{DEF}$. A Tabela 16 apresenta os valores de $\log K_{DEF}$ para os três materiais estudados e, também, os valores dos parâmetros de heterogeneidade, que variaram entre 0,4 e 0,5, demonstrando que os materiais estudados apresentam elevado grau de heterogeneidade [67-69, 80, 81]. Como já foi mencionado anteriormente, a heterogeneidade deve-se à presença de grupos aminos, fenólicos, fosfato, e carboxílicos nos materiais estudados. Os dados da literatura em relação a complexação de metais em superfícies de algas usando a função diferencial de equilíbrio são limitados. Geralmente, encontram-se resultados relativos a estudos envolvendo a complexação de metais por materiais orgânicos naturais presentes na água (substâncias húmicas), usando Voltametria de Redissolução Anódica (ASV) para a determinação das concentrações dos cátions metálicos [67, 68, 80, 81]. Rollemberg et al [69] estudaram a termodinâmica da adsorção de íons de cádmio pela alga *Chlorella marina* usando as funções diferenciais de equilíbrio e a técnica de ASV. Apesar das diferenças de materiais e de técnicas experimentais, os valores obtidos do $\log K_{DEF}$ e Γ para a *Spirulina* são da mesma magnitude dos valores encontrados na literatura para outros materiais [67-69, 80, 81].

Figura 18 – Variação de $\log K_{DEF}$ em função do grau de ocupação dos sítios de complexação/adsorção da microalga *Spirulina*. Os resultados correspondem a media de três experimentos realizados em meio iônico mantido por solução 0.020 mol L^{-1} de KNO_3 a $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 6.0 \pm 0.1$.

Tabela 16- Resultados obtidos por aplicação do método das funções de equilíbrio diferenciais aos dados experimentais da titulação dos materiais da microalga *Spirulina* com ions Cu(II). Os resultados correspondem a média de três experimentos.

Materiais	Faixa de $\log \theta$	Faixa de $\log K_{DEF}$	$\log K_{DEF}^0$	Γ
Suspensão Total	-2,5 a -0,25	9,3 a 4,3	$3,26 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,01$
Solução da Fração Solúvel	-2,5 a -0,25	8,2 a 4,1	$2,38 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,03$
Suspensão da Fração Insolúvel	-2,2 a -0,5	8,3 a 4,1	$3,07 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,01$

Isto sugere que estes valores dependem do cátion metálico e da natureza química dos sítios ligantes, os quais apresentam similaridade entre as algas e substâncias húmicas.

A partir da função diferencial de equilíbrio, o valor de $\log K$ pode ser calculado para cada valor de $\log \theta$, isto é, para cada $C_{Cu(II)}$ e $[L]_t$ no pH estudo. As concentrações do cobre livre no equilíbrio, $[Cu(II)]$, e do cobre ligado, $[CuL]$, foram determinados pelo software MINEQL+ (Figura 19).

4.6 – Avaliação dos modelos.

Pela Figura 19, fica claro que os valores do $\log K^*$ e $[L]_t$ determinados pelo gráfico de Scatchard são mais apropriados que as funções diferenciais para representar os dados experimentais da adsorção de Cu(II) pela microalga *Spirulina* para baixas concentrações do cátion metálico, situação na qual a $[Cu(II)]$ calculada a partir da função diferencial apresenta desvio considerável (sistematicamente negativo) em relação ao valor determinado experimentalmente.

Nos pontos intermediários da curva de titulação, a concentração simulada de Cu(II) calculado a partir dos parâmetros de Scatchard apresentou uma inflexão que não foi observada nos dados experimentais (Figura 19 A, B e C) na Suspensão Total da alga e na Fração Solúvel. A ausência da inflexão nos dados experimentais sugere a

Figura 19 – Modelagem da especiação de Cu(II) nas titulações da Suspensão total da microalga *Spirulina* (A), na solução da Fração Solúvel (B), e na suspensão da Fração Insolúvel (C). Dados experimentais obtidos por análises realizadas em triplicata em meio iônico mantido por solução $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 6,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

existência de um sistema tampão entre os sítios ligantes e o cobre livre, Cu(II), quando $\log [Cu(II)]_f > -4,5$, que não são detectados no modelo de Scatchard.

É interessante observar que tais sítios complexantes ocorrem provavelmente na fração solúvel do material estudado, pois, tanto os dados obtidos pela simulação, quanto os dados experimentais para a Fração Insolúvel, apresentam a inflexão no gráfico obtido quando se coloca $\log [Cu(II)]$ em função do $\log C_{Cu}$ com o $\log C_{Cu}$ variando entre $-3,5$ e $-4,5$ (Figura 19).

O método das funções diferenciais prevê concentrações subestimadas de Cu(II) livre nas condições de baixas concentrações totais de Cu(II) (primeiros pontos da titulação). Para a Fração Solúvel e para a Suspensão Total da alga, a concentração de Cu(II) livre calculada tende a se aproximar da concentração de Cu(II) livre determinada experimentalmente na medida que a concentração total de Cu(II) aumenta, conforme pode ser observado nas Figuras 19 A, B e C. No caso da Fração Insolúvel, a concentração de Cu(II) livre calculada mostra uma tendência similar, mas não apresenta a inflexão quando a $[Cu(II)]_f$ varia entre $-4,5$ e $-3,5$. Ainda não há uma explicação clara para a falha das funções diferenciais em prever a concentração de Cu(II) livre, mas pode ser devido a forma imprópria de exprimir a concentração total do ligante na simulação computacional. Uma das vantagens atribuídas às funções diferenciais na literatura [45, 68, 80, 81] é que não há a necessidade de se conhecer a concentração do ligante para calcular os valores de $\log K_{DEF}$, uma vez que esta concentração se mantém constante durante a titulação. Os cálculos do parâmetro de heterogeneidade (Γ) e do $\log \theta$ podem ser realizados usando a concentração da alga expressa em $g L^{-1}$ ou $mol L^{-1}$, mas a concentração dos sítios ligantes expressa em $mol L^{-1}$ tem que ser conhecida para uma modelagem apropriada. No presente trabalho foi usada a concentração total dos sítios ionizáveis determinada pela caracterização ácido-base, ou a concentração total dos sítios ionizáveis desprotonados em $pH = 6,0$, que conduziu a valores subestimados de $\log [Cu(II)]$ para baixos $\log C_{Cu(II)}$.

5 – CONCLUSOES

Este estudo mostrou que a superfície das espécies mistas liofilizadas da microalga *Spirulina* apresentam sítios ionizáveis de várias naturezas químicas, isto é, grande heterogeneidade, e forte afinidade para Cu(II) em concentrações baixas do cátion. As isotermas de adsorção e os gráficos referentes ao tempo de equilíbrio apresentam grande inclinação para baixas concentrações de Cu(II), sugerindo a adequação deste material para tratar águas contendo concentrações reduzidas de Cu(II).

O modelo estudado demonstrou que o $\log K^*$ e $[L]_t$ determinado pelo gráfico de Scatchard, ainda que representem valores médios, são apropriados para predizer a concentração de Cu(II) livre em soluções contendo concentrações reduzidas e elevadas do cátion. Na parte intermediária da titulação estes parâmetros não conseguiram modelar o sistema, sugerindo que sítios ligantes adicionais devem ser incluídos para modelar corretamente a curva de titulação na extensão total da faixa do $\log C_{Cu(II)}$ estudado, indicando que um tratamento mais complexo dos dados com isoterma multi-sítios de Langmuir deve ser usado [78]. O método das funções diferenciais, embora atribuindo um valor para $\log K$ para cada grau de ocupação (θ), não conseguiu modelar apropriadamente a curva de titulação com as concentrações dos sítios ionizáveis determinadas pela caracterização ácido-base, subestimando as concentrações de Cu(II) livre em solução.

Para o prosseguimento deste projeto envolvendo a microalga *Spirulina*, ficam as seguintes sugestões:

- A) Tratamento de dados mais complexos, como a inclusão de sítios ligantes adicionais e uso da isoterma multi-sítios de Langmuir.
- B) Determinação da capacidade de adsorção de metais pesados como Pb(II), Hg(II), Cd(II) e Cr(VI).
- C) Estudos envolvendo a dessorção dos metais para reuso ou destinação final adequada dos mesmos.
- D) Estudos envolvendo a imobilização da alga para uso em tratamento de efluentes líquidos contaminados por metais pesados.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – B. Volesky, *Biosorption of Heavy Metals*, CRC Press, Boca Raton, USA, 1990.
- 2 – B. Volesky, *Advances in Biosorption of Metals: Selection of Biomass Types*, FEMS Microbiology Reviews, **14** (1994) 291.
- 3 – J. W. Paterson, *Wastewater Treatment Technology*. USA: An Arbor Science Publisher Inc., 1977.
- 4 – Z. Aksu, *Biosorption of Heavy Metals by microalgae in batch and continuous systems*. In: Y.S. Wong, N.F.Y. Tam , editors. *Algae for Waste Water Treatment*, Germany: Springer – Verlag and Landes Bioscience, 1998, 37-53 (Chapter 3).
- 5 – E.W. Wilde, J. R. Benemann, *Biotech. Adv.*, **11** (1993) 718.
- 6 – N. Kuyucak, B. Volesky, *Biotechnol. & Bioengin.*, **33** (1989) 809 .
- 7 – J. L. Zhou, C. J. Banks, *Environ. Technol.*, **12** (1991) 859
- 8 – J. L. Zhou, R. J. Kiff, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **52** (1991) 317.
- 9 – G. W. Garnham, G. A. Godd, G.M. Gadd, *Environ. Sci. & Technol.*, **26** (1992) 1764.
- 10 – E. Sandau , P. Sandau , O. Pulz, *Acta Biotechnol.*, **16** (1996), 103.
- 11 – T. Sagagughi, T. Tsuki, A Nakajima, T. Horikoshi, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8** (1878) 207.
- 12 – A. C. A. Da Costa, E. M. F. Teles, S.G.F. Leite, *Rev. Micróbio.* (São Paulo), **25** (1994) I , 42.
- 13 – D. Brady, B. Letebele, J. R. Duncan, P. D. Rose, *Water SA*, **20** (1994) 3, 231.
- 14 – E. W. Wilde, J. R. Benemann, *Biotechnol.*, **11** (1993) 718.
- 15 – J. L. Gardea – Torresdey, M. K. Becker – Hapak, J. M. Hosea, D. W. Darwall. *Environ. Sci. Technol.*, **24** (1990) 1372 .
- 16 – H. R. Crist, K. Oberholser, N. Shank, M. Nguyen, *Environ. Sci. Technol.* **15** (1981) 1212.
- 17 – P. O. Harris, G.J. Ramelow, *Environ. Sci. Technol.* **24** (1990) 220 .
- 18 – Y. P. Ting, F. Lawson, I. G. Prince, *Biotechnol. Bioeng*, **34** (1989) 990.
- 19 – Z. R. Holan, B. Voleski, I. Prasetyo, *Biotechnol. Bioeng*, **41** (1993) 819.
- 20 – Z. Aksu, T. Kutsal, *Environ. Technol.*, **11** (1990) 979.

- 21 – B. Wehrheim, M. Wettern, ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, **41** (1994) 725.
- 22 – Z. Aksu, D. Özer, H. I. Ekis, ***Environ. Technol.***, **17** (1996) 215.
- 23 – Z. R. Holan, B. Voleski, ***Biotechnol. Bioeng.***, **43** (1994) 1001.
- 24 – E. Fourest, J. Roux, ***Environ. Appl. Microbiol. Biotechnol.***, **37** (1992) 399.
- 25 – M. H. Cheng, J. W. W. Patterson, R. A. Minear, ***JWCPCF***, **47** (1975) 262.
- 26 – D. P. Higam, P. J. Sadler, M. D. Scawim, ***J. Gen. Microbiol.***, **131** (1985) 2539.
- 27 – D. W. Darnall, B. Greene, M. Hosea, R. A. Macpherson, M. Henzl, M.D. Alexander, *Recovery of Heavy Metals by Immobilized Algae*, In: R. Thonson (Ed.), *Trace Metal Removal From Aqueous Solutions, The Removal From Aqueous Solutions*, The Royal Society of Chemistry, London, 1986.
- 28 – C. P. Huang, D. Westman, K. Quirk, J. P. Huang, ***Part. Sci. Technol.***, **6** (1988) 405.
- 29 – H. B. Xue, W. Stumn, L. Sigg, ***Wat. Res.***, **22** (1988) 917.
- 30 – B. Volesky, ***Trends in Biotechnol.***, **5** (1987) 96.
- 31 – H. Niu, X. S. Xu, J. H. Wang, B. Voleski, ***Biotechnol. Bioeng.***, **42** (1993) 785 .
- 32 – T. R. Muraleedharam, L. Iyengar, C.. Venkobachar, ***Appl. Environ. Microbiol.***, **61** (1995) 3507 .
- 33 – J. T. Matheickal, Q. Yu, ***Wat. Sci. Technol.***, **34** (1996) 1.
- 34 – Z. R. Holan, B. Voleski, ***Biotechnol. Bioeng.***, **41** (1993) 819.
- 35 – G. M. Gadd, *Accumulation of Metals By Microorganisms and Algae*, J. K. Rehm Ed., *Biotechnology Handbook*, 6B. Special Microbial Processes, Verlagsgesellschaft, (1990) 401.
- 36 – R. H. Crist, R. J. Martin, P. W. Guptill, J. M. Eslinger, ***Environ. Sci. Technol.***, **24** (1990) 3, 337.
- 37 – N. Kuyucak, B. Volesky, *Biosorption of Algal Biomasss*, B. Volesky Ed., *Biosorption of Heavy Metals*, CRC Press (1990) 174.
- 38 – L. F. De Filippis, ***Z. Pflanzenphysiol.***, **92** (1979) 39.
- 39 – W. Gekeler, E. Grill, E.L. Winacker, M. H. Zenk, ***Arch. Microbiol.***, **150** (1988) 197.
- 40 – R. S. Walsh, K. A. Hunter, ***Limnol. Oceanogr.***, **37** (1992) 7, 1361.
- 41 – J. W. Rachlin, T. E. Jensen, B. Warkentine, ***Arch. Environ. Contam. Toxicol.***, **13** (1984) 143.
- 42 – F. Hashemi, G.G. Leppard, D. J. Kuhner, ***Microb. Ecol.***, **27** (1994) 159.
- 43 – A. B. Tomsett, D. A. Thurman, ***Plant, Cell & Environ.***, **1** (1988) 383.

- 44 – J. C. Steffens, *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41** (1990) 553.
- 45 – J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems. An Analytical Approach*. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, Chichester, 1990.
- 46 – G. C. Whipple, G. M. Fair, M. C. Whipple, *The Microscopy of Drinking Water*, John Wiley & Sons, New York (4^a Ed.), 1927.
- 47 – S. L. Chang, *Destruction of Microorganisms*, A.W.W.A. Jour, **36** (1944) 1192 .
- 48 – D. E. Green, *Advances in Enzimology*, Vol I. Interscience Publishers, Inc., New York, 1940.
- 49 – D. E. Green, P. K. Stumpf, The Mode of Action of Chlorine. Jour. A.W.W.A., **38** (1946) 1301.
- 50 – E. F. Hale, *The use of Cooper Sulfate in Control of Microscopic Organisms*, Phelps Dodge Refining Corp., New York, 1942.
- 51 - S. M. Branco, *Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária*, Convênio Cetesb-Ascetesb, 3^a Edição, Cetesb-Ascetesb, São Paulo, 1986.
- 52 – J.J. O'Donnell and E. Percival, *J. Chem. Soc.*, (1959) 2168.
- 53 – J. C. Masini, G. Abate, E. C. Lima, L. C. Hahn, M. S. Nakamura, J. Lichtig, H. R. Nagatomy, *Anal. Chim. Acta*, **364** (1998) 223.
- 54– J. C. Masini, *Estudo das propriedades ácido base de constituintes da matéria orgânica natural de ocorrência em solos e ambientes aquáticos através do modelo de distribuição de sítios discretos*, Tese de Livre Docência, Instituto de Química, USP, 1999.
- 55 – J. T. Matheickal, Q. Yu , *Bioreso. Technol.*, **69** (1999) 223.
- 56 – D. W. Darnall, B. Greene, M. Hosea, R. A. McPherson, M. Hennzl, M. D. Alexander, *Recovery of Heavy Metals by Immobilized Algae*, Department of Chemistry, New Mexico State University, New Mexico, 1988.
- 57 – J. L. Zhou, P. L. Huang, R. G. Lin, *Environ. Poll.*, **101** (1998) 67.
- 58 – E. Sandau , P. Sandau , O. Pulz, *Acta Biotechnol.*, **16** (1996) 4, 227.
- 59 – G. C. Dönmez, Z. Aksu, A. Öztürk, T. Kutsal, *Proc. Biochem.*, **34** (1999) 885.
- 60 – I. M. Maier, I. L. Peppes, C. P. Gerba, *Environmental Microbiology*, Academic Press, 2000.
- 61 – I. S. Chronakis, A. N. Galatanu, T. Nylander, B. Lindman, *Coll. & Surf.*, **173** (2000) 181.
- 62 – B. Atkinson, F. Marituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Handbook*, Second Edition, M. Stockton Press (1983, 1991) 1208.

- 63 – E. C. de Lima; J. C. Masini, **Quím. Nova**, **22** (5) (1999) 679.
- 64 – G. Boratto, *Basic para Cientistas e Engenheiros*, Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1984.
- 65 – G. Scatchard; Ann. N.Y. Acad. Sci. , **51** (1949) 660.
- 66 – G. Abate; J. C. Masini, *Quím. Nova*, **5** (1999) 22, 661.
- 67 – J. P. Pinheiro; M. Mota; M.L. Simões Gonçalves, **Anal. Chim. Acta**, **284** (1994) 525.
- 68 – J. Buffle, R.S. Altman, M. Filella e A Tessier, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **54** (1990) 1535.
- 69 – M.C Rollemberg; M.L.S, Simões Gonçalves; M.M.Correia dos Santos; M.J. Botelho, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48** (1999) 61.
- 70 – E. Fourest; B. Volesky, *Environ. Sci. Technol.* **30** (1996) 277.
- 71 – E. Kiefer; L. Sigg ; P. Schosseler , *Environ. Sci. Technol.* **31** (1997) 759.
- 72 – J.S. Cox; D.S. Smith; L.A. Warren; F.G. Ferris, *Environ. Sci. Technol.* **33** (1999) 4514.
- 73 – M. Gonzalez-Davilla; J. M. Santana-Casiano; L. M. Laglera, *Mar. Chem.* **70** (2000) 161.
- 74 – J. C. Miller; J. N. Miller ; *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed., Ellis Horwood Limited: Chichester, 1988.
- 75 – M. N. Akthar; K.S. Sastry; P. M. Mohan, *Biometals* **9** (1996) 21.
- 76 – E. R. Martinez; F. Grant Ferris,; **J. Coll. Inter. Sci.** **243** (2001) 73.
- 77 – C. Sing; J.Yu; *Water Res.* **32** (1998) 2746.
- 78 – W. D. Schecher, *MINEQL+: A Chemical Equilibrium Model for Personal Computers*; User Manual Version 2.22, Environmental Research Software, Inc.: Hallowell, ME, 1991.
- 79 – S. Shiewer; B. Volesky, *Environ. Sci. Technol.* **29** (1995) 3049.
- 80 – R. S. Altmann; J. Buffle, *Geochim. Cosmochim. Acta* **52** (1988) 1505.
- 81 – M. Fillela; R.M. Town; **Fresenius J. Anal. Chem.** **370** (2001) 413.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO