

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

KAMILA DOS SANTOS MAGUERROSKI

**Estudo voltamétrico da adsorção de Cd(II) e Zn(II)  
na microalga marinha *Tetraselmis gracilis***

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**26/02/2014**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Programa de Pós-graduação em Química

KAMILA DOS SANTOS MAGUERROSKI

Estudo voltamétrico da adsorção de Cd(II) e Zn(II) na microalga  
marinha *Tetraselmis gracilis*

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

Maguerroski, Kamila dos Santos  
M213c Estudo voltamétrico da adsorção de Cd(II) e Zn(II) na microalga  
marinha *Tetraselmis gracilis* / Kamila dos Santos Maguerroski. -  
São Paulo, 2014.  
91p.

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

1. Análise instrumental : Química 2. Eletroquímica. I. T. II.  
Masini, Jorge Cesar, orientador.

543.08 CDD

KAMILA DOS SANTOS MAGUERROSKI

**Estudo voltamétrico da adsorção de Cd(II) e Zn(II)  
na microalga marinha *Tetraselmis gracilis***

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade  
de São Paulo para obtenção do Título  
de Mestre em Química*

*Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini*

São Paulo

2014

Dedico esta dissertação a:

À minha família Dalvir (pai), Sandra (mãe) e Kevin (irmão) que sempre me apoiaram  
nesta caminhada em São Paulo.

Prof. Dr. Jorge Cesar Masini e Dra. Marilda Rigobello-Masini pela paciência e  
dedicação a mim concedida.

## Agradecimentos:

- ✓ A Deus, por ter me ajudado a chegar até aqui;
- ✓ A minha família;
- ✓ Aos colegas de laboratório;
- ✓ Aos professores do Instituto de Química da USP que contribuíram para minha formação científica neste Mestrado;
- ✓ Ao amigo de todas as horas Adalberto Alício Jr (Mirassol) pelos conselhos, companheirismo e força nesta jornada, Obrigada por tudo!
- ✓ Aos Amigos Mário Jorge, Patrícia Rafaela, Vânia Maria, Bruno (Carioca), Ricardo, Silvio (Punk), Juliana, Nathália (Naty), Maria Cecília e Adalberto (Pai) por momentos inesquecíveis que fizeram esta caminhada mais leve e cuja companhia tornou a distância de casa menos sofrida. Vocês estarão sempre em meu coração!
- ✓ A todos aqueles que de alguma forma contribuíram em minha caminhada.

## RESUMO

dos Santos Maguerroski, K.. **Estudo voltamétrico da adsorção de Cd(II) e Zn(II) na microalga marinha *Tetraselmis gracilis***

A capacidade de ligação de prótons e metais por células vivas da microalga *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) butcher foi estudada por titulação potenciométrica e voltametria de redissolução anódica, respectivamente. Dados da titulação alcalimétrica obtidos com uma suspensão de microalga suspensa em NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup> a 25,0 ± 0,1 °C foram tratados por um modelo de distribuição discreta de sítios baseado na linearização das curvas de titulação por funções de Gran modificadas. A concentração total de sítios ionizáveis foi 3,4 x 10<sup>-3</sup> mmol g<sup>-1</sup>, divididos em quatro classes de grupos com pKa 4,4; 5,2; 7,0 e 9,3, cujas abundâncias relativas foram 13, 5,8, 8,2 e 73%, respectivamente. Ligação de Cd(II) e Zn(II) foi estudada em água do mar (pH 8,2) por adições de soluções dos cátion metálicos em soluções simples ou misturas binárias. O cálculo das concentrações dos metais a partir dos dados voltamétricos considerou o agregado célula-metal tendo difusão muito menor do que a do íon livre. Capacidades de adsorção e o logaritmo das constantes de equilíbrio condicionais foram 7,9 ± 0,9 μmol g<sup>-1</sup> e 6,9 ± 0,3 L g<sup>-1</sup> para Cd(II) e 18,1 ± 0,4 μmol g<sup>-1</sup> e 8,8 ± 0,2 L g<sup>-1</sup> para Zn(II). Nas titulações com misturas binárias as capacidades de adsorção foram 0,129 ± 0,008 e 18,1 ± 0,4 μmol g<sup>-1</sup> de Cd(II) e Zn(II), respectivamente, sugerindo que a ligação de Zn(II) inibe a de Cd(II). Entretanto, mesmo na presença de Zn(II) a superfície de alga possui sítios minoritários que se ligam a Cd(II) (log K<sub>ads</sub> = 7,7 ± 0,2), o que pode causar a bioacumulação desse íon metálico tóxico.

Palavras chave: Biossorção, especiação dinâmica, microalga marinha, voltametria de redissolução



## ABSTRACT

dos Santos Maguerroski, K.. **A voltammetric study on the adsorption of Cd(II) e Zn(II) on marine microalgae *Tetraselmis gracilis***

Proton and metal binding capacities of living cells of the microalgae *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) butcher were determined by potentiometric titration and anodic stripping voltammetry, respectively. Data of alkalimetric titration of the microalgae suspension obtained in 0.60 mol L<sup>-1</sup> NaCl at 25.0 ± 0.1°C was treated by a discrete site distribution model based on the linearization of the titration curve by modified Gran functions. A total of 3.4 x 10<sup>-3</sup> mmol g<sup>-1</sup> ionizable sites were determined, divided in four classes of groups with pKa 4.4, 5.2, 7.0 and 9.3, whose relative abundances were 13, 5.8, 8.2 and 73%, respectively. Binding of Cd(II) and Zn(II) was studied in seawater (pH 8.2) by additions of either single metallic species or binary mixtures. Computation of free metal concentrations from the voltammetric data considered the cell-metal aggregates with diffusion coefficient significantly lower than that of free metal ions. Adsorption capacities and the logarithm of the conditional equilibrium constants were 7.9 ± 0.9 μmol g<sup>-1</sup> and 6.9 ± 0.3 L g<sup>-1</sup> for Cd(II) and 18.1 ± 0.4 μmol g<sup>-1</sup> and 8.8 ± 0.2 L g<sup>-1</sup> for Zn(II). For titrations with binary mixtures of Cd(II) and Zn(II) the adsorption capacity of Cd(II) were 0.129 ± 0.008 μmol g<sup>-1</sup> and 18.1 ± 0.4 μmol g<sup>-1</sup>, respectively. The results suggest that binding of Zn(II) inhibits that of Cd(II). However, even in the presence of Zn(II), the alga surface has some minor sites that can bind Cd(II) (log K<sub>ads</sub> = 7.7 ± 0.2), a process that can lead to bioaccumulation of this toxic metal ion.

Keywords: Biosorption, dynamic speciation, marine microalgae, stripping voltammetry

# Índice

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Biossorção .....	12
1.2 Biossorventes .....	15
1.3 Isotermas de adsorção .....	17
1.3.1. Isoterma de Langmuir .....	17
1.3.2 Isoterma de Freundlich.....	19
1.3.3 Funções diferenciais de equilíbrio.....	20
1.4 Métodos eletroanalíticos .....	21
1.4.1 Voltametria de Redissolução Anódica .....	22
1.4.2 Eletrodo de filme de mercúrio:.....	23
1.5 Técnicas eletroanalíticas em estudos de biossorção.....	24
1.6. Cd(II) e Zn(II) em água do mar e interação com microalgas .....	25
2. OBJETIVOS .....	27
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Equipamentos e Materiais: .....	28
3.2 Reagentes, Soluções e Amostras:.....	28
3.2.1 Reagentes e Soluções: .....	28
3.2.2 Cultivo da microalga: .....	30
3.3 Métodos para caracterização da superfície da microalga <i>T. gracilis</i> .....	32
3.3.1 Titulação ácido-base:.....	32
3.3.2 Análise de superfície por Infra Vermelho (IV) .....	39
3.4 Estudo da adsorção de Cd(II) e Zn(II) pela microalga <i>T. gracilis</i> .....	40
3.4.1 Limpeza do Material e Vidrarias.....	40
3.4.2 Preparação do Eletrodo de Trabalho .....	40
3.4.3 Titulação voltamétrica da <i>T. gracilis</i> com Cd(II) e Zn(II) .....	41
3.4.4 Procedimento da medida voltamétrica .....	42
3.5 Tratamento de dados .....	44
3.5.1 Cálculo de concentração.....	44
3.5.2 Cálculo dos parâmetros de adsorção .....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1. Sítios ionizáveis .....	48
4.2. Biossorção de Cd(II) e Zn(II).....	61
4.2.1. Determinação voltamétrica .....	61
4.2.2. Especificação de Cd(II) e Zn(II).....	63
4.2.3 Biossorção .....	65



5. CONCLUSÃO .....	81
6. PERSPECTIVAS .....	81
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
8. SÚMULA CURRICULAR .....	90

## Índice de Figuras:

<b>Figura 1:</b> Aspecto da câmara incubadora mostrando em detalhe o balão contendo o cultivo de <i>T. gracilis</i> .....	30
<b>Figura 2:</b> Instrumentação utilizada da titulação potenciométrica ácido-base. ....	33
<b>Figura 3:</b> Funções de Gran aplicadas na determinação de $V_e$ de uma titulação de 2,00 mL de HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> com NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> , a 25,0 ± 0,5°C em meio de NaCl 0,60 mol L <sup>-1</sup> (25,00 mL). ....	35
<b>Figura 4:</b> Determinação dos parâmetros $E_a^0$ e $J_H$ sob as mesmas condições experimentais descritas na Figura 3. ....	36
<b>Figura 5:</b> Determinação dos parâmetros $E_b^0$ e $J_{OH}$ sob as mesmas condições experimentais da Figura 3. ....	37
<b>Figura 6:</b> Instrumentação utilizada para medidas voltamétricas: E.A.-Eletrodo Auxiliar, E.R.-Eletrodo de Referência e E.T.-Eletrodo de trabalho. ....	42
<b>Figura 7:</b> Típica curva de titulação de 25,0 mL de suspensão de <i>T. gracilis</i> protonada com 2,0 mL de HCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> com solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> linearizada pelas funções de Gran modificadas. A suspensão de microalgas e as soluções de NaOH e HCl forma preparadas em NaCl 0,60 mol L <sup>-1</sup> para controle da força iônica em valor similar ao tipicamente encontrado em água do mar. ....	56
<b>Figura 8:</b> Distribuição discreta de sítios ionizáveis na microalga <i>T. gracilis</i> . Condições experimentais conforme o título da Figura 7. ....	57
<b>Figura 9:</b> Espectros de absorvância na região do infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier de suspensão da microalga marinha <i>T. gracilis</i> em diferentes valores de pH. ....	60
<b>Figura 10:</b> Voltamogramas de onda quadrada para Cd(II) e Zn(II) em água do mar. Os números sobre os picos são as concentrações em $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições experimentais: Potencial de deposição = 1,2 V vs Ag/AgCl, KCl saturado; tempo de deposição = 120 .....	61
<b>Figura 11:</b> Curvas analíticas para Cd(II) (a) e Zn(II) (b) obtidas dos voltamogramas mostrados na Figura 4.5. As equações de regressão linear foram $i_p = (28,7 \pm 0,9)C_{Cd,T} + (0,08 \pm 0,06)$ , com $r = 0,995$ e $i_p = (6,7 \pm 0,2)C_{Zn,T} + (0,07 \pm 0,06)$ , com $r = 0,996$ . ....	62

<b>Figura 12:</b> Gráficos de distribuição de espécies de Cd(II)(a) e Zn(II) (b), ambos com concentração 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em NaCl 0,60 $\text{mol L}^{-1}$ , alcalinidade total de 2,0 $\text{mmol L}^{-1}$ e pH 8,2, simulando condições de água do mar. ....	64
<b>Figura 13:</b> Voltamogramas para Zn(II) (a) e Cd(II) (b) em água do mar (a→e para Zn(II) e a→f para Cd(II)) e em suspensão de <i>T. gracilis</i> (f→n para Zn(II) e g→o para Cd(II)). As concentrações analíticas ( $C_{M,T}$ ) para Zn(II) foram: (a) 0,051, (b) 0,10, (c) 0,19, (d) 0,38, (e) 0,70, (f) 2,66, (g) 3,01, (h) 3,69, (i) 4,32, (j) 4,92, (k) 5,49, (l) 6,02, (m) 6,53 e (n) 7,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para Cd(II), as concentrações foram: (a) 0,010, (b) 0,020, (c) 0,039, (d) 0,076, (e) 0,10, (f) 0,12, (g) 0,010, (h) 0,030, (i) 0,058, (j) 0,093, (k) 0,125, (l) 0,183, (m) 0,305, (n) 0,450 e (o) 0,600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . ....	66
<b>Figura 14:</b> Correntes de pico em função de $C_{M,T}$ para titulações de <i>T. gracilis</i> em água do mar (pH 8,2) com Cd(II) (a,c) e Zn(II) (b,d) em soluções separadas (a e b) e misturas binárias (c e d). ....	68
<b>Figura 15:</b> Isotermas de adsorção de Cd(II) (a) e Zn(II) (b) em <i>T. gracilis</i> em soluções simples (a e b) ou em misturas binárias de Cd(II) e Zn(II) (c e d) ajustadas com as equações de Freundlich e Langmuir. ....	73
<b>Figura 16:</b> Funções polinomial e linear ajustadas para o cálculo dos termos diferenciais da equação 3.20. ....	79
<b>Figura 17:</b> Funções de equilíbrio diferenciais em função de $\log \theta$ para bioadsorção de Cd(II) e Zn(II) por <i>T. gracilis</i> . ....	80

## Índice de Tabelas:

<b>Tabela 1.</b> Principais grupos funcionais envolvidos em biossorção .....	16
<b>Tabela 2:</b> Composição do meio f/2 de Guillard em água do mar filtrada usada para cultivo de <i>Tetraselmis gracilis</i> (Guillard and Ryther 1962) .....	31
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros utilizados nas medidas voltamétricas. ....	43
<b>Tabela 4:</b> Exemplo de planilha de dados de titulação potenciométrica de 25,0 mL de suspensão de microalga <i>T. gracilis</i> com NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> em NaCl 0,60 mol L <sup>-1</sup> a 25,0 ± 0,1°C .....	49
<b>Tabela 5:</b> Resultados típicos de um cálculo de linearização de uma curva de titulação potenciométrica de uma suspensão de microalga <i>T. gracilis</i> em NaCl 0,60 mol L <sup>-1</sup> com NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> . As funções de Gran foram calculadas para os dados de titulação mostrados na Tabela 4.1. ....	53
<b>Tabela 6:</b> Exemplo de dados experimentais e cálculos de $C_M$ para a titulação de <i>T. gracilis</i> com Cd(II) em água do mar .....	69
<b>Tabela 7:</b> Exemplo de dados experimentais e cálculos de $C_M$ para a titulação de <i>T. gracilis</i> com Zn(II) em água do mar.....	70
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros de adsorção obtidos por ajuste de regressão não linear dos dados experimentais de biossorção de Cd(II) e Zn(II) às equações de Freundlich e Lagmuir. Os dados foram obtidos a 25 ± 1 °C e os resultados correspondem à media de três experimentos de adsorção para cada caso. ....	74
<b>Tabela 9:</b> Exemplo de planilha usada para o cálculo de $K_{DEF}$ para ligação de Zn(II) na superfície da microalga <i>T. gracilis</i> .....	78
<b>Tabela 10:</b> Parâmetros de adsorção obtidos pelas funções de equilíbrio diferenciais...	80

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Biossorção

Em ambientes aquáticos a ligação de íons de metais potencialmente tóxicos à superfície de microrganismos, assim como a outros materiais orgânicos e inorgânicos, é um processo que tem forte influência no transporte desses íons no meio ambiente. O fenômeno de adsorção de íons ou moléculas a microrganismos é conhecido como biossorção e tem sido usado para o tratamento de águas naturais e residuais, bem como para remediação de águas poluídas (Volesky and Holan 1995; Schiewer and Volesky 1997; Parmeggiani and Masini 2003).

Os primeiros estudos envolvendo os biossorbentes para a captação de metais potencialmente tóxicos de soluções aquosas tiveram seu início na década de 1980. As primeiras pesquisas apresentaram uma grande variedade de materiais biológicos que poderiam ser utilizados para a remoção de metais potencialmente tóxicos, baseados na capacidade de captação das biomassas ou seus derivados a um baixo custo e até mesmo em baixas concentrações (Matheickal and Yu 1999; Naja and Volesky 2006).

Dentre as várias definições para a biossorção, uma das mais utilizadas é a que a biossorção é um processo pelo qual certos tipos de microrganismos, vivos ou mortos, podem sequestrar ou concentrar metais potencialmente tóxicos a partir de soluções aquosas (Naja and Volesky 2006).

As interações entre os materiais biológicos e os íons das espécies metálicas podem ser divididas em duas principais categorias: biossorção e bioacumulação. No caso da bioacumulação a interação entre o metal e o microrganismo se dá através do seu metabolismo. Na biossorção a captura dos íons metálicos pela biomassa é um processo que se dá por interações físico-químicas entre os íons e os grupos funcionais que se encontram na superfície do biossorvente (Kiefer, Sigg et al. 1997).

O processo de biossorção envolve uma fase sólida (adsorvente) e uma fase líquida (solvente) que contém as espécies dissolvidas (íons metálicos) que serão adsorvidas. As características físicas e químicas da estrutura do adsorvente e as propriedades do adsorbato são responsáveis pela intensidade e pela capacidade de biossorção (Volesky 2007).

Alguns dos principais processos que ocorrem com maior frequência na bioissorção são (Volesky 1990):

- ✓ **Complexação:** Interação de íons metálicos com centros ligantes (sítios de ligação) na superfície do bioissorvente. Tais centros ligantes caracterizam-se pela presença de um ou mais átomos com pares de elétrons livres. Em biopolímeros, ou bioissorventes, esses átomos são usualmente átomos de nitrogênio trivalentes neutros ou átomos de oxigênio ou enxofre divalentes neutros. A complexação pode ocorrer por interação eletrostática (interação entre o íon metálico carregado positivamente e ânions ou dipolos orientados com a carga negativa em direção ao metal). Entretanto para muitos metais de transição a formação de complexos não pode ser explicada apenas por interações eletrostáticas. Uma vez que os íons metálicos apresentam orbitais de valência vazios, eles agem como ácidos de Lewis (aceptores de pares de elétrons) e como os ligantes contêm átomos com pares de elétrons livres, eles podem atuar como bases de Lewis (doadores de par de elétrons), levando ao compartilhamento de elétrons e formação de ligação covalente. De acordo com a classificação de Pearson de ácidos e bases duros e moles, ácidos duros como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , geralmente nutrientes para o crescimento celular, interagem preferencialmente com bases duras contendo oxigênio, tais como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{R-COO}^-$  e  $=\text{C}=\text{O}$ . Íons de metais nobres, considerados ácidos moles, são ligados covalentemente às paredes celulares por sítios constituídos por bases moles contendo átomos de nitrogênio e enxofre. Íons metálicos de comportamento intermediário ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) exibem uma afinidade significativamente alta por ligantes contendo átomos de enxofre e nitrogênio. Nos casos mais simples de complexação há a formação dos complexos com ligantes monodentados, nos quais o átomo de metal coordena-se a um único átomo do ligante. Quando o íon metálico coordena-se a mais de um átomo do ligante, formando anéis, ocorre o processo chamado de quelatação, que gera complexos de maior estabilidade em comparação com os ligantes monodentados.
- ✓ **Troca iônica:** intercâmbio de íons positivos em solução por íons ligados eletrostaticamente a grupos carregados negativamente presentes na superfície do

biomaterial é a base da chamada troca catiônica. Assim, grupos carboxílicos, sulfonatos ou fosfatos orgânicos em biomateriais têm suas cargas negativas neutralizadas por prótons,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , que podem ser trocados por íons de metais potencialmente tóxicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , etc). Troca aniônica pode ocorrer em biopolímeros, principalmente em grupos contendo átomos de nitrogênio protonados. Em proteínas, grupos amino, imidazol e guanidino contribuem com cargas positivas, dependendo do pH.

- ✓ Precipitação: Refere-se em muitos casos a formação de precipitados inorgânicos de baixa solubilidade mediante alteração das condições ambientais, tais como aumento de pH, presença de carbonatos e sulfeto. No caso de biossorção, a formação de precipitados orgânicos também pode ocorrer, especialmente quando os íons metálicos são ligados a substâncias poliméricas excretadas pelos organismos aquáticos, sendo a quitina, um polissacarídeo insolúvel com alta afinidade por íons metálicos, um exemplo típico desses materiais.

Algumas vantagens do uso da biossorção para remoção de metais são o baixo custo da biomassa, alta eficiência, minimização do uso de produtos químicos e de geração de lodo biológico, não havendo exigência adicional de nutrientes no meio. Porém apresenta algumas desvantagens como a necessidade de controle do crescimento populacional de alguns organismos na forma viva e também problemas no gerenciamento dos resíduos provenientes do processo de biossorção (Feng and Aldrich 2004; Volesky 2007).

O processo de biossorção é afetado por diferentes fatores físico-químicos como: pH, força iônica, concentração da biomassa, temperatura, tamanho de partícula, presença de outros íons na solução, etc (Volesky 1990; Tarley and Arruda 2004).

A seletividade e eficiência de alguns biossorbentes em concentrar e imobilizar alguns metais depende de fatores como (Volesky 2001):

- ✓ Tipo de biomassa
- ✓ A natureza do efluente
- ✓ Tipo de preparação e tratamento da biomassa
- ✓ Ambiente físico-químico do processo
- ✓ Presença de outros íons na solução

## 1.2 Biossorventes

Os materiais de origem biológica possuem uma grande capacidade de adsorver íons metálicos dissolvidos, dentre eles podemos mencionar os mais citados na literatura como (Volesky 1990):

- Partes ou tecidos específicos de vegetais: cascas, bagaço ou sementes.
- Microorganismos: bactérias, microalgas e fungos.
- Vegetais macroscópicos: algas, gramíneas, plantas aquáticas.

As plantas aquáticas possuem grande área superficial e grupos funcionais na superfície das células, devido ao fato das mesmas necessitarem absorver os nutrientes essenciais para a sua sobrevivência; porém, quando seca, a biomassa continua com essas propriedades favoráveis para a adsorção de metais potencialmente tóxicos e outros compostos tóxicos. Biomassas mortas podem aumentar a capacidade de biossorção proporcionando uma remoção rápida e eficiente dos íons metálicos, fazendo com que o biossorvente se comporte como uma resina de complexação ou troca-iônica, de modo que os metais podem ser dessorvidos rapidamente e recuperados (Sheng, Ting et al. 2004).

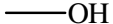

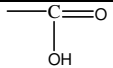


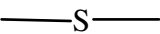
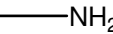
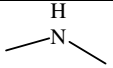
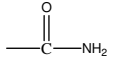

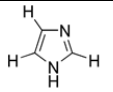
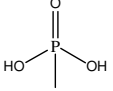
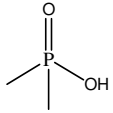
Os mecanismos de biossorção dos metais diferem de um biossorvente para outro devido ao fato dos mesmos estarem diretamente relacionados aos grupos funcionais existentes em suas estruturas. Esses grupos normalmente estão presentes nas estruturas contidas na parede celular da biomassa (Demirbas 2008), englobando macromoléculas de celulose organizadas na forma de microfibrilas cercadas por lignina, pectina, hemiceluloses e pequenas porções de proteínas vegetais (Demirbas 2008). As macromoléculas presentes nas estruturas das biomassas de biossorventes, normalmente possuem grupos funcionais característicos de alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, fenóis e éteres, aminos, fosfatos, sulfatos e tiois. Esses grupos têm átomos capazes de doar elétrons para o cátion metálico realizando dessa forma a ligação covalente entre o íon metálico e o biossorvente (Demirbas 2008). Na biossorção, quando a remoção dos íons metálicos se dá por troca iônica, geralmente o radical envolvido é o grupo carboxila ou grupos sulfônicos (Volesky 1990).

A afinidade e especificidade de cada biossorvente em relação aos íons metálicos dependem dos grupos funcionais presentes na superfície da estrutura da biomassa.



Geralmente, esses grupamentos são os grupos carboxílicos, aminos, fosfatos e sulfatos (Tabela 1) (Volesky 2007).

**Tabela 1.** Principais grupos funcionais envolvidos em bio sorção

Grupo	Formula Estrutural	pKa	Classificação Ácido Base Duro/Mole	Átomo ligante	Ocorrência em Biomoléculas
Hidroxil		9,5 – 13	Duro	O	PS, UA, SPS, AA
Carbonila (Cetona)		-	Duro	O	PB
Carboxílico		1,7 – 4,7	Duro	O	UA, AA
Sulfidril		8,3 – 10,8	Mole	S	AA
Sulfonato		1,3	Duro	O	SPS
Tioeter		-	Mole	S	AA
Amina		8 – 11	Intermediário	N	Cto, AA
Amina Secundária		13	Intermediário	N	Cti, PG, PB
Amida		-	Intermediário	N	AA
Imina		11,6 – 12,6	Intermediário	N	AA
Imidazol		6,0 -7,0	Mole	N	AA
Fosfonato		0,9 – 2,1 6,1 – 6,8	Duro	O	PL
Fosfodiester		1,5	Duro	O	LPS

PS= polissacarídeos, UA = ácido urônico, SPS = PS sulfatado, Cto = quitosana, PB = ligação pepetídica, PG = pepitídeo glican, AA = amino ácidos, PL= fosfolipídeos, LPS = lipo PS

Estudos de sorção e dessorção fornecem informações sobre o mecanismo de bio sorção de metal. Conhecer a interação que existe entre o metal e o bio sorvente é

crucial para a compreensão do processo de biossorção e pode ser útil para as considerações estequiométricas quantitativas que são utilizadas para a modelagem matemática do processo.

### 1.3 Isotermas de adsorção

A adsorção pode ser estudada quantitativamente através das isotermas de adsorção. Elas expressam a relação entre a quantidade do metal que é sorvido por unidade de massa do biossorvente e a concentração do metal em solução no equilíbrio a uma determinada temperatura constante. O cálculo da quantidade de metal adsorvido baseia-se em um balanço de massa do sistema de sorção. A expressão gráfica da isoterma é geralmente uma hipérbole com o valor da quantidade de matéria adsorvida aproximando-se do valor da completa saturação dos sítios de adsorção para as concentrações mais altas de adsorbato (Volesky 2003).

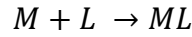
As isotermas derivadas teórica ou empiricamente podem, frequentemente, ser representadas por equações simples que relacionam diretamente a capacidade de adsorção e a concentração final do adsorbato na solução. As mais utilizadas são as isotermas de Langmuir e Freundlich.

#### 1.3.1. Isoterma de Langmuir

O modelo de Langmuir é o mais utilizado para descrever processos de biossorção (Volesky 1994). Considera-se implicitamente que:

- As moléculas/íons são adsorvidas à superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados, com adsorção em monocamada em superfície homogênea.
- Cada sítio pode acomodar uma, e somente uma molécula (ou íon) adsorvida.
- A energia de adsorção é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras espécies adsorvidas nos sítios vizinhos, ou seja, apresenta interação desprezível entre as moléculas adsorvidas.

Se considerarmos a reação de adsorção de um íon metálico (M) na superfície de um biossorvente (L):



O termo energético relacionado com a constante de adsorção ( $K_{ads}$ ) pode ser escrito como:

$$K_{ads} = \frac{C_{ML}}{C_M C_L} \quad (1.1)$$

Onde a concentração de metal ligado ( $C_{ML}$ ) é dada pelo balanço de massa:

$$C_{ML} = C_{M,T} - C_M \quad (1.2)$$

$C_{M,T}$  é a concentração total de  $M$  em mol L<sup>-1</sup> ou g L<sup>-1</sup>, e  $C_M$  é a concentração em equilíbrio (ou após um tempo de contato pré-definido) determinada por alguma técnica analítica qualquer, também em mol L<sup>-1</sup> ou g L<sup>-1</sup>. O grau de ocupação de sítios ( $\theta$ ) de um ligante macromolecular é definido como:

$$\theta = \frac{C_{ML}}{C_{L,T}} \quad (1.3)$$

Onde  $C_{L,T}$  é a concentração total de sítios de adsorção. Considerando-se o balanço de massa para os sítios de ligação:

$$C_{L,T} = C_L + C_{ML} \quad (1.4)$$

Combinando-se com as equações anteriores, chega-se à expressão:

$$\theta = \frac{C_{ML}}{C_{L,T}} = \frac{K_{ads} C_M}{1 + K_{ads} C_M} \quad (1.5)$$

Se os valores de  $C_{ML}$  e  $C_{L,T}$  (em mol L<sup>-1</sup>) são divididos pela concentração de adsorvente (em g L<sup>-1</sup>) obtém-se a quantidade de matéria adsorvida ( $q$ ) e a capacidade máxima de adsorção ( $q_{max}$ ), respectivamente, em unidades de mol g<sup>-1</sup>. Também é possível expressar esses valores em termos de massa de adsorbato por massa de adsorvente (Buffle 1988).

A equação resultante é a equação de Langmuir:

$$q = \frac{q_{\max} K_{ads} C_M}{1 + K_{ads} C_M} \quad (1.6)$$

Os valores de  $K_{ads}$  e  $q_{\max}$  podem ser determinados por regressão não linear, ou graficamente após linearização da Equação 6, na forma:

$$\frac{C_M}{q} = \frac{1}{q_{\max} K_{ads}} + \frac{C_M}{q_{\max}} \quad (1.7)$$

A representação gráfica de  $C_M/q$  contra  $C_M$  é uma função linear, cuja inclinação é igual a  $1/q_{\max}$  e a interseção com o eixo das ordenadas é igual a  $1/(q_{\max} K_{ads})$ . Portanto, através do coeficiente angular da reta podemos calcular  $q_{\max}$  que é a capacidade de adsorção máxima considerando-se a cobertura de uma monocamada e a partir deste valor, através do coeficiente linear, podemos calcular o valor da constante de adsorção  $K_{ads}$  (Volesky 1994; Esposito, Pagnanelli et al. 2001), que devido à heterogeneidade química dos sítios de adsorção, refere-se a um valor médio para todos os sítios que melhor descreve os dados experimentais.

### 1.3.2 Isoterma de Freundlich

Em 1907, Freundlich apresentou sua equação para o cálculo de isotermas de adsorção. Este modelo empírico pode ser aplicado a sistemas não ideais, em superfícies heterogêneas em sorção multicamada (Esposito, Pagnanelli et al. 2001). A expressão matemática da isoterma de Freundlich é:

$$q = K_f C_M^{1/n} \quad (1.8)$$

Onde:

$q$  é a quantidade de adsorbato (metal) retido no sólido no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$  ou  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).

$C_M$  é a concentração do adsorbato no equilíbrio (ou após o tempo de contato).

$K_f$  e  $n$  são constantes.

A Equação 8 é normalmente utilizada na forma linear, aplicando logaritmos a ambos lados da equação:

$$\log q = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_M \quad (1.9)$$

A representação gráfica de  $\log q$  contra  $\log C_M$  é uma função linear, cuja inclinação é igual a  $1/n$  e a intersecção com o eixo  $\log q$  é igual ao  $\log K_f$ . Portanto, através do coeficiente angular da reta podemos calcular  $n$  e através do coeficiente linear podemos calcular o valor de  $K_f$ .

### 1.3.3 Funções diferenciais de equilíbrio

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  $K_{ads}$  determinados pela equação de Langmuir 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 (Buffle 1988; Pinheiro, Mota et al. 1994; Chakraborty, Fafous et al. 2007).

$$K_{DEF} = \frac{\sum_{j=1}^m K_j \theta_j (1 - \theta) \Delta x_j}{\sum \theta_j (1 - \theta_j) \Delta x_j} \quad (1.10)$$

Onde

$\Delta x_j$  = fração molar do sítio complexante do tipo  $j$ ,  $\Delta x_j = C_{L_j} / C_{L,T}$ .

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

O parâmetro  $K_{DEF}$  depende da composição do sítio de complexação através dos valores de  $K_j$  e  $\Delta x_j$  e do fator de ponderação  $\theta_j(1-\theta_j)$ . Este fator indica que o valor de  $K_{DEF}$  é controlado principalmente pelos sítios  $j$  que estão aproximadamente 50%

saturados. 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  $K$ , mas fornece uma clara informação sobre como a afinidade dos sítios de adsorção para um dado íon metálico varia em função do grau de ocupação de sítios.

Os valores de  $K_{DEF}$  podem ser relacionados com o grau de ocupação dos sítios de complexação pela equação (Pinheiro, Mota et al. 1994):

$$\text{Log } \theta = \Gamma \log K_{DEF}^o - \Gamma \log K_{DEF} \quad (1.11)$$

Onde:

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

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

#### 1.4 Métodos eletroanalíticos

Várias técnicas instrumentais têm sido propostas para a determinação das concentrações totais de metais traço em águas e meio biológico. Entre essas técnicas destacam-se a espectrometria de massa em plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Lee, Oshima et al. 2002), espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (Cheng, Akagi et al. 1987), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (Chiu, Sung et al. 2003) e voltametria de redissolução anódica (Chakraborty, Fafous et al. 2007) utilizando eletrodo de gota estática de mercúrio (SMDE). Entretanto, a concentração total de um elemento não é um parâmetro adequado para avaliação da sua reatividade, biodisponibilidade e toxicidade no meio ambiente ou em meios biológicos. Com isso existe uma conscientização crescente da importância da análise de especiação química de metais traço como Cu(II), Pb(II), Cd(II), Zn(II), Hg(II), As(III), As(V), etc., em amostras de ambientes aquáticos, solos e sedimentos. A atividade de metais-traço em tais amostras é controlada pela presença de ligantes homogêneos e heterogêneos, os quais exercem um papel importante na manutenção da vida (Berbel, Diaz-Cruz et al. 2001; Van Leeuwen and Town 2003).

A eletroanalítica compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de uma solução do analito quando ele está tomando

parte de uma célula eletroquímica. As técnicas eletroanalíticas, especialmente as voltamétricas, podem atingir limites de detecção excepcionalmente baixos e fornecer informações sobre estequiometria, velocidade de transferência de carga interfacial e de massa, entre outras, que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas (Bard and Faulkner 2001).

A voltametria abrange um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir de medidas de corrente em função de uma faixa de potencial aplicado. Acontece em condições que estimulam a polarização de um eletrodo indicador ou de trabalho, feita durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica. Esta possui três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. O potencial é aplicado entre os eletrodos de trabalho e de referência em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante, fluindo entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de um voltamograma (Christian 2004; Skoog 2012).

#### **1.4.1 Voltametria de Redissolução Anódica**

A utilização dos métodos de redissolução anódica está cada vez mais difundida como alternativa às técnicas baseadas em espectrometria atômica na determinação de metais devido à capacidade de avaliar concentrações em nível traço usando uma instrumentação de menor custo. Outra vantagem do seu uso é a possibilidade de realizar especiação com mínima manipulação da amostra, dependendo da complexidade do sistema, uma vez que o sinal de corrente voltamétrica é proporcional à fração de metal livre mais a fração lábil que se dissocia na camada de difusão na escala de tempo do experimento (Sanna, Pilo et al. 2000).

Com a redissolução anódica pode-se chegar a limite de detecção (LD) na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  para vários metais, o que é possível graças à sua etapa de pré-concentração, em que as espécies metálicas são acumuladas na superfície do eletrodo de trabalho. Nesta etapa, aplicam-se potenciais suficientemente catódicos para provocar a redução dos íons em estudo, tanto a fração livre, como a fração lábil, no eletrodo de trabalho. A seguir a espécie pré-concentrada é redissolvida para a solução pela aplicação de uma

varredura anódica de potencial, que provoca a reoxidação das espécies pré-concentradas. A corrente elétrica medida no máximo de pico é o sinal analítico utilizado para se quantificar a espécie de interesse, sendo que sua grandeza é proporcional à concentração da espécie estudada. Ganho significativo de sensibilidade é obtido por uma discriminação adequada entre a corrente capacitiva (carregamento da dupla camada elétrica) e a corrente faradaica (devido a reações de transferência de carga entre o eletrodo e a solução) (Bard and Faulkner 2001). Para isso se usam técnicas de pulso como a voltametria de pulso diferencial ou a voltametria de onda quadrada (de Souza, Machado et al. 2003), sendo essa última a que foi empregada na presente dissertação.

A voltametria de redissolução anódica é uma técnica bastante sensível para muitos metais e análise multielementar de baixo custo, dentre os quais podemos destacar os metais zinco, cádmio, chumbo e cobre, podendo ser utilizada para determinar traços de metais em água potável (Locatelli and Torsi 2001).

#### **1.4.2 Eletrodo de filme de mercúrio:**

Um dos eletrodos de trabalho mais utilizados nas análises envolvendo métodos voltamétricos é o eletrodo de gota pendente de mercúrio. Este eletrodo apresenta vantagens tais como superfície renovável e reprodutível, alto sobrepotencial com relação a evolução de hidrogênio e habilidade para dissolver muitos metais. Sua ampla utilização pode ser explicada por uma série de propriedades físico-químicas favoráveis, dentre as quais podem ser citadas, a uniformidade da área da gota; a área geométrica igual à área superficial; facilidade na renovação da gota de mercúrio; um maior intervalo de potencial de redução; maior estabilidade das espécies reduzidas na superfície da gota, formando amálgamas com o mercúrio, dentre outras. Entretanto, algumas desvantagens do eletrodo de gota pendente podem ser citadas, como a toxicidade deste metal para o ser humano; uma baixa relação área superficial/volume; instabilidade da gota em relação ao fluxo de solução e a pequenas variações de temperatura. Tais desvantagens têm impulsionado o desenvolvimento de eletrodos alternativos ao gotejador de mercúrio para análises voltamétricas (Serafim and Stradiotto 2008).

Nos últimos anos vários trabalhos sugeriram a substituição de mercúrio por outros materiais tais como, ouro, platina, irídio, bismuto, diferentes modificações de



carbono e outros (Palchetti, Laschi et al. 2005; Sherigara, Shivaraj et al. 2007; Svancara, Prior et al. 2010). Mas nenhum destes materiais ainda é tão eficaz analiticamente como o eletrodo de mercúrio. No entanto, o eletrodo de gota pendente vem sendo substituído pelo eletrodo de filme de mercúrio em análises voltamétricas (Palchetti, Laschi et al. 2005; Sherigara, Shivaraj et al. 2007; Zhu, Bing et al. 2007).

O eletrodo filme de mercúrio consiste em uma camada muito fina de gotículas de mercúrio eletrodepositado em um eletrodo de carbono vítreo e é também conhecido como eletrodo de Florence, por ter sido proposto em 1970 por T.M. Florence (Florence 1970). Este tipo de eletrodo possui algumas vantagens em relação ao eletrodo de filme de mercúrio como uma elevada relação área superficial/volume, propiciando uma maior concentração de metal no amálgama durante a etapa de deposição, levando a uma elevada sensibilidade. Adicionalmente, este tipo de eletrodo pode estar imerso em soluções sob agitação vigorosa ou ser acoplado a sistemas em fluxo, ampliando sua aplicabilidade em análises de traços. Aplicações deste tipo de eletrodo *in situ* ou *ex situ* produzidos em carbono vítreo ou prata para quantificar traços de metais potencialmente tóxicos utilizando voltametria de redissolução anódica são bastante difundidos, seja para análise de solo, água, combustíveis ou análise de sulfito em alimentos (da Silva and Masini 2000; Zhu, Bing et al. 2007; Piech, Bas et al. 2008).

O procedimento usual para a preparação do filme de mercúrio é feito através da redução da espécie Hg(II) para Hg em um substrato condutor. Neste trabalho foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo como substrato, devido a sua inércia química e baixa porosidade. Os eletrodos de filme de mercúrio são geralmente usados somente para voltametria de redissolução anódica, pois potenciais mais positivos promovem a dissolução do filme. Estes eletrodos são úteis quando uma sensibilidade maior é desejada, pois uma quantidade de mercúrio extremamente pequena é incorporada ao filme resultando na formação de um amálgama muito concentrado durante a etapa de deposição.

## 1.5 Técnicas eletroanalíticas em estudos de bioissorção

Parâmetros de bioissorção ( $q_{max}$  e  $K_{ads}$ ) são usualmente avaliados por determinação da concentração de metal livre por espectrometria atômica após a remoção das células por centrifugação e/ou filtração (Savvaïdis, Hughes et al. 2003).

Esses processos de separação podem causar artefatos por ruptura das células, dificultando a avaliação da existência de fluxos do adsorbato da superfície da célula para o meio adjacente, um processo que é representativo do que ocorre na interface adsorvente/água ou adsorvente/biota que ocorre em ambientes aquáticos (Waller and Pickering 1990; Agraz, Vanderwal et al. 1994). Como já mencionado as vantagens das técnicas eletroanalíticas, particularmente a voltametria de redissolução anódica, são sua alta sensibilidade e a capacidade de determinar as concentrações livres de metal na presença das algas, o que permite ainda avaliar a existência de fração lábil e a existência de fluxos do adsorbato na interface membrana celular/solução, ou mais especificamente, na interface membrana celular/eletrodo de trabalho (Rollemberg, Goncalves et al. 1999; Andrade, Rollemberg et al. 2005; Kong, Tang et al. 2009). Em experimentos de biossorção de Cd(II) e Cu(II) em *Pseudomonas aeruginosa*, Kong e colaboradores (2009) encontraram concentrações de metal maiores em suspensões analisadas por voltametria do que em soluções filtradas analisadas por absorção atômica. A explicação para isso foi que nas medidas voltamétricas a fração lábil foi determinada em consequência do estímulo promovido pela aplicação do potencial de deposição, enquanto nas determinações por absorção atômica tal fração não foi determinada, pois foi retida com as células nas etapas de filtração e centrifugação (Kong, Tang et al. 2009).

## **1.6. Cd(II) e Zn(II) em água do mar e interação com microalgas**

Concentrações de muitos metais traço como o Zn(II) podem ser significativamente diminuídas em águas superficiais em comparação com águas profundas, presumivelmente como consequência da assimilação desse micronutriente pela biota na superfície e regeneração nas profundezas. Zinco é considerado um micronutriente para o fitoplâncton marinho, mas Cd(II), que é considerado um metal tóxico não essencial, também exibe diminuição de concentração em águas superficiais em relação a concentrações em águas profundas, especialmente quando as concentrações de Zn(II) se tornam tão baixas que passam a ser limitantes para o crescimento planctônico. Essas observações sugeriram que Cd(II) pode substituir nutricionalmente Zn(II) em algumas espécies de algas (Price and Morel 1990; Sunda and Huntsman 1998). Como as espécies metálicas podem ser assimiladas e acumuladas

por células de microalgas, podem ser transferidas para níveis mais elevados da cadeia alimentar. Com isso o entendimento sobre os processos de acumulação de Cd(II) e Zn(II) pelo fitoplâncton, bem como do papel que o fitoplâncton exerce no controle das concentrações livres em ambientes aquáticos, pode ser obtido a partir da determinação de parâmetros de bioacumulação em sistemas simples e misturas binárias desses íons.

Como modelo de microalga, na presente dissertação estudou-se a *Tetraselmis gracilis*, uma microalga verde isolada de estuários e cultivada em batelada no laboratório. *Tetraselmis gracilis* apresenta atividade da enzima anidrase carbônica, tanto extracelular quanto intracelular (Rigobello-Masini, Aidar et al. 2003). A anidrase carbônica é uma enzima encontrada nos mais variados organismos, desde bactérias e microalgas, até os mais evoluídos, como animais e plantas superiores. Esta enzima apresenta o íon zinco como cofator em seu sítio ativo (Dudev and Lim 2014) e catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono em diversas fases da fisiologia da microalga. Em condições limitantes de disponibilidade de Zn(II), algumas microalgas podem utilizar Cd(II) como cofator na atividade da anidrase carbônica (Alterio, Langella et al. 2012). Assim, a *T. gracilis* foi adotada como um modelo para o estudo de interação com Cd(II) e Zn(II).

## 2. OBJETIVOS

Essa dissertação teve por objetivo principal avaliar as propriedades de biossorção de Zn(II) e Cd(II) pela microalga marinha *T. gracilis* explorando técnicas eletroquímicas para efetuar a determinação da concentração de íon livre e lábil diretamente em uma suspensão das algas em meio de água do mar, ou seja, sob condições representativas do ambiente natural. As técnicas eletroquímicas, em princípio, permitem essa avaliação sem separar o adsorvente na etapa de determinação analítica, muito embora tal estratégia venha sendo pouco descrita na literatura, especialmente em se tratando de adsorventes constituídos por microalgas. Utilizando voltametria de redissolução anódica em eletrodo de trabalho de filme de Hg e voltametria de onda quadrada como forma de aplicação de potencial e medida de corrente, objetivou-se determinar os parâmetros de adsorção  $q_{max}$ ,  $K_{ads}$ ,  $K_f$ ,  $1/n$ ,  $K_{DEF}$ ,  $K_{DEF}^0$  e  $\Gamma$ . Para atingir esse objetivo geral algumas etapas foram realizadas:

- ✓ Realizar a caracterização ácido-base dos sítios ionizáveis na superfície da microalga por titulação potenciométrica com solução padrão de NaOH e tratamento de dados por método de linearização com funções de Gran modificadas. Complementar a caracterização por experimentos de espectrometria de absorção na região do infravermelho em diferentes condições de pH.
- ✓ Construir isotermas de adsorção de suspensões da microalga em água do mar (pH 8,2) utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica em amplas faixas de concentrações totais de Cd(II) e Zn(II).
- ✓ Tratar os dados experimentais com as equações de Langmuir, Freundlich e de distribuição diferencial de constantes em função do grau de ocupação dos sítios ( $K_{DEF}$ ).
- ✓ Avaliar comparativamente os parâmetros de adsorção em soluções contendo apenas um dos íons, bem como com a presença simultânea de Cd(II) e Zn(II) simulando condições de competição.

## 3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Equipamentos e Materiais:

- Câmara de cultivo termostatzada Marconi MA-415
- Balança Analítica eletrônica Mettler AB135-S/FACT– resolução de 0,00001 g;
- pH-Metro Methron B-654 – resolução de 0,001 unidade de pH (ou 0,1 mV);
- Pipeta automática Gilson – com volume variável (até 100 µL);
- Pipeta automática Gilson – com volume variável (até 1000 µL);
- Pipeta automática Gilson – com volume variável (até 5000 µL);
- Membrana Filtrante Millex em acetato de celulose 0,45 mm, 47 mm (Millipore);
- Microscópio (Bioval);
- Câmara de Neubauer (hemocitômetro);
- Sistema de Filtração;
- Centrifuga Excelsa Baby – Fanen Ltda. – 206BL;
- Tubo de centrifugação Corning – 15 mL;
- Bomba de seringa Cavro XP-3000 com capacidade de 5,00 mL;
- Banho termostático Etica 521 D;
- Eletrodo combinado de vidro Mettler Toledo HA405-60-88G-S7/120 com referência de Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>);
- Potenciostato Princeton Applied Research 263A;
- Eletrodo de Carbono Vítreo (MF2012 da Bioanalytical Systems);
- Eletrodo Auxiliar de Pt;
- Eletrodo de Referência Ag/AgCl (KCl saturado) RE-5B da Bioanalytical Systems;
- Desionizador de água Simplicity 185 da Millipore acoplado à lâmpada UV;
- Banho ultra-som Branson 2510 com frequência de 40 kHz;
- Espectrofotômetro de Infra Vermelho FTIR Bomem MB100

### 3.2 Reagentes, Soluções e Amostras:

#### 3.2.1 Reagentes e Soluções:

- Todos os reagentes empregados neste trabalho foram de grau analítico das marcas Merck, Aldrich, Sigma, J.T. Baker ou Carlo Erba;
- As soluções foram preparadas com água desionizada, fervida quando necessário, ou água do mar fornecida pelo Instituto de Oceanográfico da Universidade de São Paulo – IO-USP. Os experimentos de cultivo, construção de curvas analíticas e estudos de adsorção foram realizados com amostras de água do mar coletadas sempre na mesma data e no mesmo ponto de amostragem.
- Gás N<sub>2</sub> – Air Liquide.

#### **3.2.1.1 Solução de NaOH para titulação ácido base da microalga *Tetraselmis gracilis*:**

A solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi preparada através da diluição de uma solução NaOH 50% (m/v), sendo utilizada como solvente água desionizada fervida para eliminação de CO<sub>2</sub>. Este conteúdo foi transferido rapidamente para um frasco de polietileno de alta densidade e fechado com um sistema de sifão de solução e de um tubo de vidro preenchido com cal sodada. Com estes cuidados evita-se o contato de solução de NaOH com CO<sub>2</sub>, evitando problema de confiabilidade de dados adquiridos na titulação de caracterização ácido base da microalga.

A padronização da solução de NaOH para uso como titulante foi realizada com padrão primário de biftalato de potássio previamente seco a 110°C durante 2 horas e fenolftaleína como indicador (Skoog, West et al. 1996).

#### **3.2.1.2 Soluções de Cd(II) e Zn(II):**

Foram preparadas as soluções titulantes de Cd(II) e Zn(II), a partir da diluição de um volume apropriado da solução padrão para absorção atômica Merck 1000 mg L<sup>-1</sup>, com as concentrações seguintes:

- Solução titulante de Cd(II): 1 e 5 μmol L<sup>-1</sup>;
- Soluções titulantes de Zn(II): 5 e 25 μmol L<sup>-1</sup>;
- Soluções titulantes de Cd/Zn : 1/5 e 5/25 μmol L<sup>-1</sup>.

As soluções foram preparadas em balões volumétricos e completadas com água do mar como solvente.

### 3.2.2 Cultivo da microalga:

A microalga *Tetraselmis gracilis* foi obtida da coleção de cultura de algas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, sendo cultivada em uma câmara incubadora Marconi MA-415 termostata a 20°C em balões de 6L usando água do mar filtrada e esterilizada (Figura 1), com adição de meio f/2 de Guillard (Tabela 1) (Guillard and Ryther 1962). O cultivo foi feito sem aeração forçada com um foto período 12/12 claro/escuro e uma densidade de fluxo de fótons de  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A microalga foi manuseada no 6º dia de cultivo a partir de sua inoculação, havendo uma contagem de suas células em microscópio óptico com auxílio de câmara Neubauer (hemocitômetro). Essa contagem foi necessária para se controlar o número de células do cultivo a serem utilizadas nos experimentos (realizados em triplicata).



**Figura 1:** Aspecto da câmara incubadora mostrando em detalhe o balão contendo o cultivo de *T. gracilis*

**Tabela 2:** Composição do meio f/2 de Guillard em água do mar filtrada usada para cultivo de *Tetraselmis gracilis* (Guillard and Ryther 1962)

Componente	Concentração no meio (mol L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	8,81 x 10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3,62 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	1,06 x 10 <sup>-4</sup>
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,17 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	1,17 x 10 <sup>-5</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3,93 x 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,60 x 10 <sup>-8</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,65 x 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,20 x 10 <sup>-8</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	9,10 x 10 <sup>-7</sup>
Cloridrato de tiamina (Vitamina B1)	2,96 x 10 <sup>-7</sup>
Biotina (Vitamina H)	2,05 x 10 <sup>-9</sup>
Cianocobalamina (Vitamina B12)	3,69 x 10 <sup>-10</sup>

### 3.2.2.1 Processo de lavagem e concentração da microalga:

Foram retirados do meio de cultivo 300 mL da suspensão da microalga *T. gracilis*, distribuídos em tubos de polietileno de 15 mL e submetidos à centrifugação a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante resultante foi removido, sendo adicionado em seguida água do mar filtrada ou solução de NaCl 0,6 mol L<sup>-1</sup> para efetuar a lavagem da microalga do meio de cultivo anterior. Este procedimento de lavagem foi realizado em triplicata, utilizando solução de NaCl 0,6 mol L<sup>-1</sup> para experimentos de caracterização de superfície de membrana e água do mar filtrada para experimentos voltamétricos. A solução de meio f/2 contém sais e metais potencialmente tóxicos (Tabela 2) que podem interferir tanto nos experimentos de titulação potenciométrica como na voltamétrica, portanto a remoção desta solução presente no meio de cultivo da microalga deve ser realizada de modo bastante efetivo.

Após a lavagem, o aglomerado de microalga sedimentado no fundo do tubo de polipropileno foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com as soluções adequadas para cada experimento (água do mar filtrada ou NaCl 0,6 mol L<sup>-1</sup>), obtendo a suspensão da microalga *T. gracilis*.



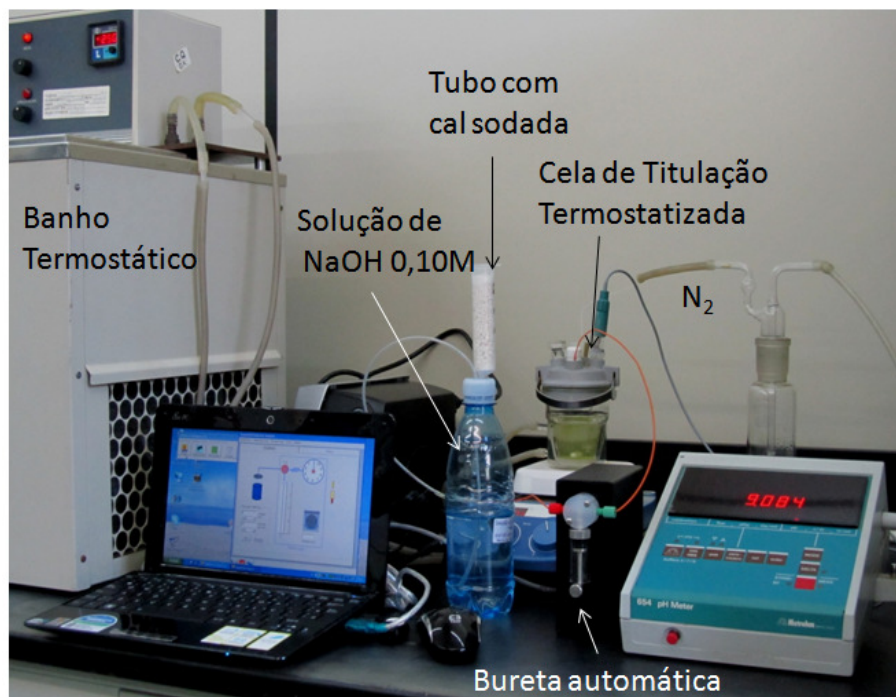
### **3.2.2.2 Determinação da massa de microalga por células:**

Alíquotas de 10 mL da suspensão do concentrado de microalga previamente homogeneizadas foram filtradas com o uso do filtro de membrana de acetato de celulose de 0,45 mm de porosidade, previamente pesado. O filtrado foi colocado em uma estufa até 100°C, seguido de resfriamento no dessecador, até obter-se uma massa constante. O experimento foi realizado em triplicata. Conhecendo-se o número de células presentes na alíquota de 10 mL (contagem no hemocitômetro) e a massa resultante após a filtração, pode-se calcular a massa de alga por célula.

## **3.3 Métodos para caracterização da superfície da microalga *T. gracilis***

### **3.3.1 Titulação ácido-base:**

As titulações de caracterização ácido-base foram realizadas em uma cela de vidro termostaticada ( $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ) e esquematizada conforme a instrumentação da Figura 2. A cela foi adaptada com aberturas que permitem a entrada do eletrodo combinado de vidro e dois tubos de polietileno pequenos. Um destes tubos de polietileno é responsável pela entrada do fluxo de  $\text{N}_2$  para manter o sistema isento de  $\text{CO}_2$ . Outro tubo está acoplado à bureta automática computadorizada que transfere a solução titulante para a suspensão.



**Figura 2:** Instrumentação utilizada da titulação potenciométrica ácido-base.

### 3.3.1.1 Procedimento de calibração dos eletrodos de vidro

A calibração dos eletrodos foi realizada em termos de concentração e não de atividade, de acordo com a proposta de Pehrson e colaboradores (Pehrsson, Ingman et al. 1976). Este procedimento de calibração é realizado através de uma titulação de uma solução de ácido forte com solução de base forte padronizada no mesmo meio iônico e temperatura que a amostra. Segundo a teoria de Debye-Hückel os coeficientes de atividade dos íons  $H^+$  mantêm-se constantes quando a temperatura e o meio iônico são mantidos constantes durante a titulação. Nesse caso a concentração de íons hidrogênio é determinada a 25°C pela equação:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + E_j \quad (3.1)$$

onde  $E$  é o valor de potencial medido,  $E_a^0$  é um termo que engloba o potencial padrão do eletrodo e o coeficiente de atividade dos íons  $H^+$  e  $E_j$  é o potencial de junção, que é dado pela equação:

$$E_j = J_H[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (3.2)$$

Onde  $J_H$  e  $J_{OH}$  são constantes de características do meio iônico, referindo-se às regiões ácidas e alcalinas da titulação, respectivamente. Os valores  $E^0$ ,  $J_H$  e  $J_{OH}$  são determinados nesta calibração. Na região ácida o termo  $J_{OH}[OH^-]$  pode ser desprezado na equação 5. Portanto, substituindo o termo  $E_j$  na equação 3.1 com esta consideração, o potencial da cela na região ácida pode ser expressada por:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + J_H [H^+] \quad (3.3)$$

Rearranjando a equação 3.3 e representando-se graficamente o termo  $E - 59,16 \log[H^+]$  em função de  $[H^+]$ , obtém-se uma região linear cujo coeficiente linear corresponde ao valor de  $E_a^0$  e o coeficiente angular ao valor de  $J_H$ .

Para região alcalina, o termo  $J_H[H^+]$  da equação 3.2 pode ser desprezado pelo baixo valor de  $[H^+]$ , assim pode-se obter:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (3.4)$$

Considerando-se que  $[H^+] = K_w/[OH^-]$ , onde  $K_w$  é o produto iônico da água, a equação 3.4 pode ser reescrita como:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log K_w - 59,16 \log[OH^-] + J_{OH}[OH^-] \quad (3.5)$$

Ou

$$E = E_b^0 - 59,16 \log[OH^-] + J_{OH}[OH^-] \quad (3.6)$$

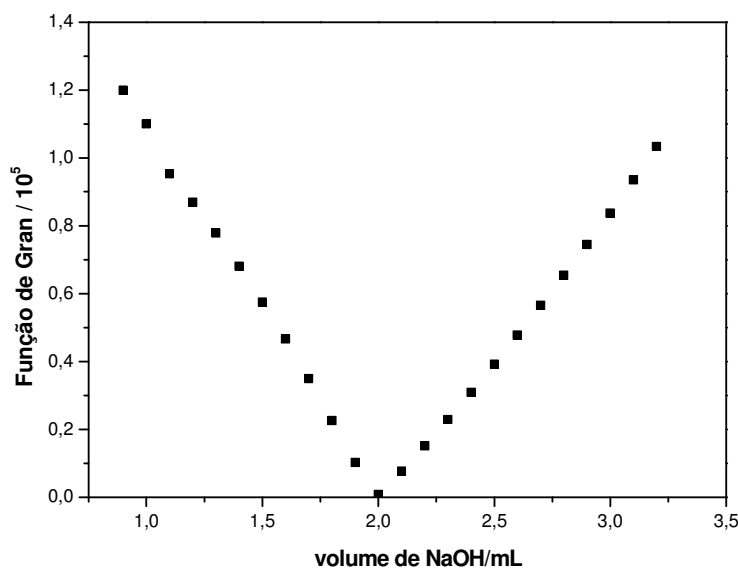
$$\text{Onde } E_b^0 = E_a^0 + 59,16 \log K_w$$

A partir do gráfico de  $E + 59,16 \log[OH^-]$  em função de  $[OH^-]$ , obtém-se do coeficiente linear o valor de  $E_b^0$  e do coeficiente angular o valor de  $J_{OH}$ . O termo  $E_b^0$  engloba o potencial padrão do eletrodo para região alcalina, o coeficiente de atividade dos íons  $OH^-$  e  $K_w$ , que nas condições experimentais usadas, pode ser determinado a partir da equação (Pehrsson, Ingman et al. 1976):

$$\log K_w = \frac{E_a^0 - E_b^0}{59,16} \quad (3.7)$$

A titulação de calibração é realizada em um volume de 2 mL de solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em 25,0 mL de solução de NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup> em cela fechada e em condições experimentais já mencionadas no item 3.1.1. Foram adicionados pequenos volumes da solução titulante de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> obtendo 19 pontos antes e após o volume do ponto estequiométrico.

Para determinação do volume do ponto estequiométrico,  $V_e$ , utiliza-se o método de Gran (Gran 1952). O volume do ponto estequiométrico é obtido através da intersecção das funções  $F_1 = (V_0 + V)10^{(E/59,16)}$  (região ácida) e  $F_2 = (V_0 + V)10^{(-E/59,16)}$  (região alcalina), com o eixo do volume de titulante adicionado (Figura 3), onde  $V_0$  é o volume inicial,  $V$  é o volume adicionado e  $E$  (mV) o valor de potencial obtido na titulação.



**Figura 3:** Funções de Gran aplicadas na determinação de  $V_e$  de uma titulação de 2,00 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a 25,0 ± 0,5°C em meio de NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup> (25,00 mL).

Obtendo o valor do volume estequiométrico, é possível obter os valores de  $[H^+]$  e  $[OH^-]$  através das equações 3.8 e 3.9, respectivamente:

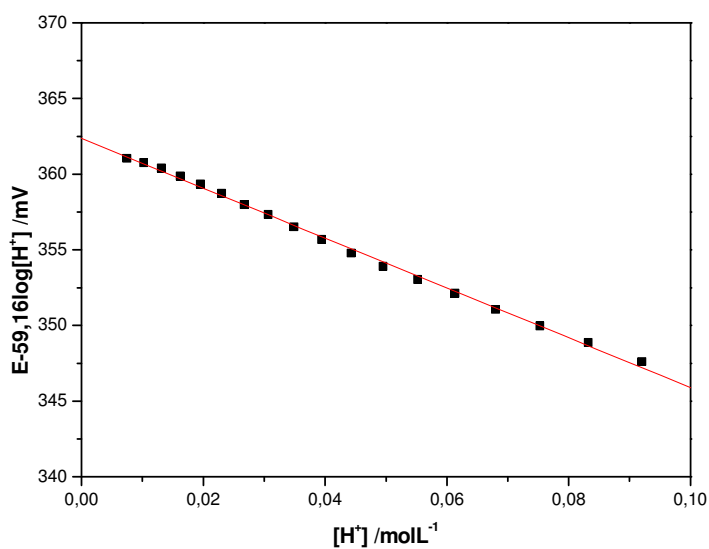
$$[H^+] = \frac{(V_e - V)C_B}{(V_0 + V)} \quad (3.8)$$

e

$$[OH^-] = \frac{(V - V_e)C_B}{(V_0 + V)} \quad (3.9)$$

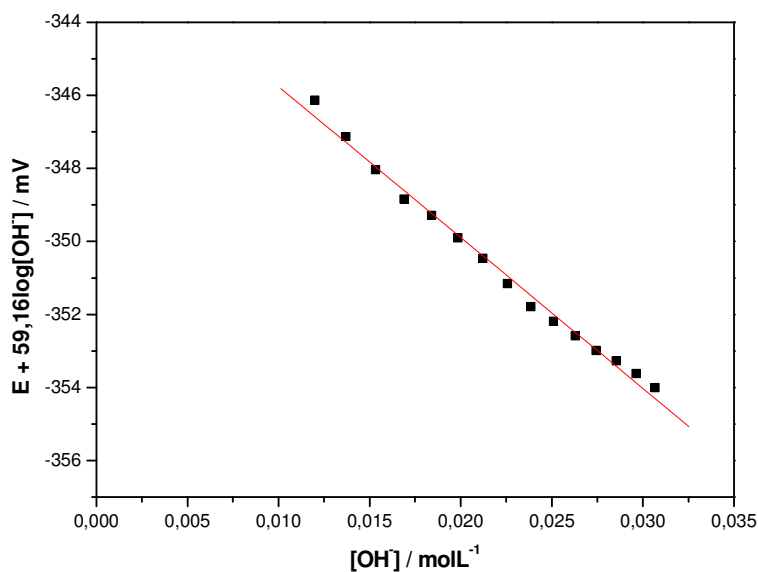
onde  $C_B$  é a concentração da solução titulante.

Substituindo os valores de concentração de íons hidrogênio na equação 6 possibilita o cálculo dos valores de  $E_a^0$  e  $J_H$ , conforme a Figura 4:



**Figura 4:** Determinação dos parâmetros  $E_a^0$  e  $J_H$  sob as mesmas condições experimentais descritas na Figura 3.

Da mesma forma, os valores obtidos de  $[OH^-]$  serão substituídos na equação 3.6, permitindo o cálculo dos valores de  $E_b^0$  e  $J_{OH}$ , conforme a Figura 5.



**Figura 5:** Determinação dos parâmetros  $E_b^0$  e  $J_{OH}$  sob as mesmas condições experimentais da Figura 3.

### 3.3.1.2 Titulação da amostra

Uma alíquota de 25,00 mL da suspensão de *T. gracilis* em NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup> foi transferida para uma cela de titulação termostatizada (25,0±0,1°C). O esquema e as condições experimentais utilizadas nesta etapa foram de acordo com a descrição mencionada no item 3.3.1. Adicionou-se na cela, com a suspensão da amostra, um volume de 3 mL de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> para promover a protonação da superfície na microalga *Tetraselmis gracilis*. Após a adição do ácido, pequenos volumes da solução titulante de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> isento de carbonato foram adicionados na cela, promovendo o aumento do pH do sistema. Os valores de potencial foram coletados a cada adição de volume da solução titulante. O intervalo de pH estudado durante a titulação foi na faixa de 2,2 (início) até 10,5 (final).

Os valores de potencial obtidos na titulação da amostra e os dados da calibração do eletrodo foram computadas em um programa para converter os valores de potencial em pH. Os valores de pH foram compilados em QBasic, fundamentados na segmentação e linearização da curva que utiliza funções Gran modificadas.

### 3.3.1.3 Método das Funções de Gran modificadas

Neste trabalho foi utilizado o método linear baseado em funções de Gran modificadas, que é aplicável a titulações potenciométricas de misturas de ácido forte e ácidos fracos. Seymour e col. (Seymour, Clayton et al. 1977) apresentaram este trabalho mostrando as deduções sobre a obtenção das funções de Gran modificadas. O método foi posteriormente adaptado e aplicado por Godinho, Aleixo e colaboradores (Godinho and Aleixo 1981; Aleixo, Godinho et al. 1992; Masini, Godinho et al. 1998) na determinação das concentrações das espécies ionizáveis em proteínas e ácidos húmicos. O método permite também a determinação simultânea das constantes de dissociação dos ácidos fracos presentes.

Para uma titulação potenciométrica com base forte de uma mistura de  $HA_n$  ácidos com  $n$  variando de 0 a  $N$ , sendo  $HA_0$  o ácido forte e  $HA_1, HA_2, \dots, HA_N$  os ácidos fracos; a partir das equações de balanceamento de massa e condições de eletroneutralidade, chega-se á seguinte função de Gran modificada  $F_{HA_0}$  para ácido forte  $HA_0$ :

$$F_{HA_0} = V_{HA_0} C_B - V_B C_B = ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V) - \sum_{n=1}^N (V_{HA_n} - V_{HA_{(n-1)}}) C_B A_n \quad (3.10)$$

e as funções  $F_{HA_n}$  para ácidos fracos  $HA_n$ , com  $n$  variando de 1 até  $n$ , são dadas por:

$$F_{HA_n} = V_{HA_n} K_{HA_n} - V K_{HA_n} = \left\{ ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)(K_{HA_n} + [H^+]) \right\} / C_B + (V - V_{HA_0}) [H^+] + (V_{HA_{n-1}} - V_{HA_0}) K_{HA_n} - \left[ \sum_{j=1, n>1}^{n-1} (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}}) A_j + \sum_{j=n+1}^n (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}}) A_j \right] (K_{HA_n} + [H^+]) \quad (3.11)$$

Os termos que aparecem nas equações 3.10 e 3.11,  $V_{HA_0}$  e  $V_{HA_n}$ , representam o volume total de base forte para a neutralização de cada componente ácido presente. Assim, os volumes de solução padrão de base forte necessários para neutralizar cada um dos componentes ácidos presentes são:  $V_{HA_0}$ ,  $(V_{HA_1} - V_{HA_0})$ ,  $(V_{HA_2} - V_{HA_1})$ , ...,

$(V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})$ . E os termos  $C_B$  e  $V$  são respectivamente a concentração e o volume de base adicionada.  $K_{HA_n}$  é a constante de dissociação do ácido fraco  $HA_n$ , dada por:

$$K_{HA_n} = \frac{[H^+][A_n^-]}{[HA_n]} \quad (3.12)$$

e o termo  $A_n$  é expresso por:

$$A_n = \frac{K_{HA_n}}{(K_{HA_n} + [H^+])} \quad (3.13)$$

$V_0$  é o volume inicial da titulação,  $[H^+]$  e  $[OH^-]$  são as concentrações dos íons hidrogênio e hidroxila, respectivamente. Os termos  $V_{HA_j}$ ,  $K_{HA_j}$  e  $A_j$ , que aparecem na equação 3.11, têm significado análogo aos termos  $V_{HA_n}$ ,  $K_{HA_n}$  e  $A_n$ .

Os sistemas onde essas equações são aplicáveis não necessitam tratar-se de amostras que tenham um ácido forte junto com os ácidos fracos. Se uma amostra for constituída apenas de ácidos fracos o ácido forte poderá ser adicionado, como é o caso deste trabalho. Isso assegurará a protonação completa de todos os ácidos fracos, e o excesso de ácido forte será determinado pela equação 3.10.

### 3.3.2 Análise de superfície por Infra Vermelho (IV)

Vários métodos espectroscópicos podem dar informações sobre os sítios ionizáveis na superfície de algas marinhas, sendo que a espectroscopia por IV é um método muito utilizado para caracterização dos grupos funcionais de biomassas (Kiefer, Sigg et al. 1997).

Para realização desta análise foram retiradas 4 alíquotas de 10 mL da alga em suspensão. Esses volumes de suspensão foram ajustados para os pHs 3,0, 5,0, 7,0 e 8,0 com auxílio de um pHmetro, adicionando pequenos volumes de soluções de HCl ou NaOH 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, sob contínua agitação. Após o ajuste do pH selecionado as alíquotas foram agitadas e centrifugadas para remoção do solvente do meio. A suspensão obtida foi submetida à análise por IV, realizada na Central Analítica do Instituto de Química-USP, utilizando a técnica de filme em pastilha de KRS-5



(Thallium Bromoiodide), no qual é feita uma deposição do material, que por espalhamento forma um filme. Este filme foi analisado por IV no intervalo de 400-4000 nm, utilizando o detector DTGS (Triglycine sulfato).

### **3.4 Estudo da adsorção de Cd(II) e Zn(II) pela microalga *T. gracilis***

#### **3.4.1 Limpeza do Material e Vidrarias**

Todo o material utilizado nas medidas eletroquímicas, com exceção do eletrodo de trabalho, foi lavado com ácido nítrico (P.A. Merck) 10% e a seguir enxaguado com água destilada e desionizada. Para as medidas voltamétricas, a célula foi mantida em solução de ácido nítrico por um período de pelo menos 24 horas antes do uso.

#### **3.4.2 Preparação do Eletrodo de Trabalho**

##### ***3.4.2.1. Pré-tratamento da superfície do eletrodo de carbono vítreo***

Para obtenção de superfície limpa, o eletrodo de carbono vítreo foi submetido a um polimento manual, em suspensão de diamante (1,0  $\mu\text{m}$ ) sobre pano auto-adesivo para polimento metalográfico (Arotec S/A, São Paulo, SP). Em seguida o eletrodo foi lavado com água desionizada e, logo após, submetido ao banho ultra-som durante 10 minutos, para remoção de possíveis partículas de diamante da superfície do eletrodo. O procedimento foi repetido com polimento em suspensão de diamante com diâmetro médio de 0,25  $\mu\text{m}$  e tratamento em banho de ultra-som por 5 min em etanol.

##### ***3.4.2.2 Preparação do eletrodo de filme de mercúrio***

A deposição eletroquímica do filme de mercúrio foi realizada em meio obtido adicionando 100  $\mu\text{L}$  de solução padrão de  $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  5  $\text{mmol L}^{-1}$  (em  $\text{HNO}_3$  1,0  $\times 10^{-2}$   $\text{mol L}^{-1}$ ) a 4,9 mL de tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  pH 4,5 em uma célula eletroquímica (Florence 1970; Florence 1980). Os eletrodos de referência e auxiliar utilizados nesta etapa foram, respectivamente, eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) e eletrodo de platina.

Após esta etapa a solução foi desaerada com nitrogênio durante 4 minutos para remoção do oxigênio molecular e em seguida um potencial de deposição de  $-900$  mV foi aplicado ao sistema por 6 minutos. Em seguida, o eletrodo foi deixado em  $+100$  mV durante 5 minutos para que possíveis impurezas metálicas contidas no eletrodo de filme de mercúrio (EFM) pudessem ser difundidas para a solução.

Após formação do filme, o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água desionizada e imediatamente usado em outra célula contendo soluções de referência para construção de curva analítica, ou amostra. A cada análise, o eletrodo de filme de mercúrio foi reparado após remoção do filme anterior e nova curva analítica foi construída.

### 3.4.3 Titulação voltamétrica da *T. gracilis* com Cd(II) e Zn(II)

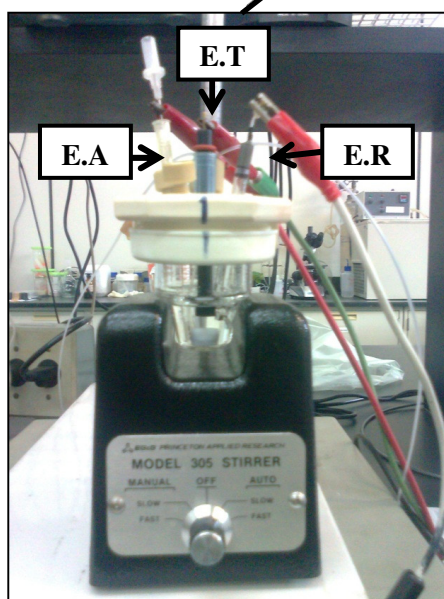
As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Princeton Applied Research modelo 263A interfaceado a um computador utilizando o software eletroquímico M250/270 para controle do instrumento, aquisição e tratamento de dados.

Estudos de biossorção de Cd(II) e Zn(II) individual e conjuntamente na suspensão de microalgas em pH e força iônica típicos de ambiente marinho foram avaliados afim determinar as capacidades de adsorção da microalga verde *T. gracilis*, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada para determinação dos metais em estudo.

Em uma cela foram colocados 4,9 mL de suspensão da microalga *T. gracilis* em água do mar, sendo esta cela adaptada com aberturas para entrada dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. Outras aberturas foram utilizadas para a entrada de um tubo de polietileno com fluxo de  $N_2$  e a adição de volumes das soluções de metais em estudo. Os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar utilizados nesta etapa foram, respectivamente, o eletrodo de filme de Hg, eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) e eletrodo de platina.

A Figura 6 ilustra a instrumentação utilizada nas medidas voltamétricas. O tempo de purga com  $N_2$  e de agitação foi controlado pelo programa vinculado ao potenciostato. A determinação da fração livre e lábil de Cd(II) e Zn(II) foi feita por

voltametria de redissolução anódica com varredura do potencial e a leitura dos valores de corrente feitas por voltametria de onda quadrada.



**Figura 6:** Instrumentação utilizada para medidas voltamétricas: E.A.-Eletrodo Auxiliar, E.R.-Eletrodo de Referência e E.T.-Eletrodo de trabalho.

#### 3.4.4 Procedimento da medida voltamétrica

Neste procedimento, primeiramente, 4,9 mL de água do mar foi desaerada por 2 minutos. Após isto, foi aplicado um potencial de condicionamento de -200 mV por 30 s ao eletrodo de filme de mercúrio sob agitação magnética. Em seguida foi aplicado o potencial de deposição de -1,2 V durante 2 minutos para promover a redução dos analitos, promovendo sua concentração pela formação de amálgama com o Hg. Em seguida a amostra ficou em repouso por 15 segundos e finalmente, foi realizada a etapa de varredura no sentido anódico (-1,2 a -0,4 V), para obtenção dos voltamogramas.

A Tabela 3 mostra os valores dos parâmetros voltamétricos utilizados nas análises experimentais:

**Tabela 3:** Parâmetros utilizados nas medidas voltamétricas.

<b>Parâmetros Experimentais</b>	
<b>Tempo de Condicionamento</b>	30 s
<b>Potencial de Condicionamento</b>	-200 mV
<b>Tempo de Deposição</b>	120 s
<b>Tempo de Equilíbrio</b>	15 s
<b>Altura de Pulso</b>	25 mV
<b>Frequência</b>	100 Hz
<b>Incremento de potencial</b>	2,0 mV
<b>Potencial Inicial</b>	-1200 mV
<b>Potencial Final</b>	-400 mV

Nos experimentos de bioissorção uma alíquota de 4,9 mL da suspensão de microalgas contendo cerca de 5 mg de microalgas (previamente lavadas do meio de cultivo com água do mar após procedimento de contagem de células), correspondente a massa seca de aproximadamente  $10^8$  células, foi transferida para a cela eletroquímica. A cela foi fechada e o O<sub>2</sub> dissolvido foi removido purgando-se a suspensão com N<sub>2</sub> por 2 min. A determinação voltamétrica da fração livre e lábil de Cd(II) e Zn(II) foi feita de

acordo com os parâmetros da Tabela 3 A titulação das suspensões foi feita adicionando pequenos volumes de titulante contendo apenas Cd(II) ou Zn(II), ou uma mistura das duas espécies de modo que a concentração total variasse de 0.010 a 2.50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Cd(II) e de 0,050 a 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Zn(II). Após cada adição de titulante a suspensão foi purgada com  $\text{N}_2$  por 30 s. Os voltamogramas obtidos foram subtraídos do voltamograma do branco (água do mar) e a quantificação da fração livre e lábil foi feita por calibração externa em água do mar usando curvas analíticas construídas para cada novo filme de Hg nas faixas de concentração de 0,050 a 0,70  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Zn(II) e de 0,010 a 0,12  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Cd(II). As curvas analíticas construídas em água do mar usada para o cultivo permitiram compatibilizar o meio de calibração com o meio da amostra minimizando efeitos de matriz.

### 3.5 Tratamento de dados

#### 3.5.1 Cálculo de concentração

Na construção das curvas analíticas em meio de água do mar o pico de corrente ( $i_p$ ) obtido por voltametria de onda quadrada é dado pela equação:

$$i_p = BD_M^r C_{M,T} \quad (3.14)$$

Onde  $D_M$  = coeficiente de difusão de  $M$  (Cd(II) ou Zn(II)), estimado como  $7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para ambos os íons (Pinheiro, Mota et al. 1994; Sunda and Huntsman 1998); = constante empírica cujo valor varia de  $1/2$  a  $2/3$  (Pinheiro, Mota et al. 1994);  $C_{M,T}$  = concentração total (analítica) de Cd(II) ou Zn(II);  $B$  = constante dependente do número de elétrons envolvidos na reação de eletrodo, espessura da camada de difusão, área de eletrodo, e tempo de deposição. O produto  $BD_M^r$  é uma constante que foi determinada a partir do coeficiente angular da curva analítica em água do mar sem a presença de microalga.

No meio de bioadsorção o coeficiente de difusão deve ser substituído por um valor médio para cada valor de  $C_M$  porque não apenas a fração livre pode ser reduzida

no eletrodo, mas também a fração lábil de metais adsorvidos (Pinheiro, Mota et al. 1994).

$$\frac{i_p^L}{i_p} = \left( \frac{\bar{D}}{D_M} \right)^{1/2} \quad (3.15)$$

Onde  $i_p^L$  é a corrente de pico na presença de microalga e  $i_p$  é um valor de corrente de pico calculado a partir do valor conhecido de  $C_{M,T}$  e do termo  $BD_M^r$  obtido do coeficiente angular da curva analítica. O valor de  $\bar{D}$  é ponderado de acordo com sua proporção relativa à  $C_M$ , de acordo com a equação:

$$\bar{D} = \frac{D_M C_M + D_{ML} C_{ML}}{C_{M,T}} \quad (3.16)$$

Onde  $C_{ML}$  = concentração de  $M$  adsorvida nas condições de tempo de contato e  $D_{ML}$  = coeficiente de difusão de  $ML$ . O valor de  $C_M$  foi calculado como  $C_{M,T} \bar{D} / D_M$ , pois  $D_M C_M \gg D_{ML} C_{ML}$  é assumido em experimentos de biossorção, ou seja, que o coeficiente de difusão da espécie adsorvida é muito menor do que da espécie livre (Agraz, Vanderwal et al. 1994).

Nas titulações voltamétricas da suspensão da microalga *T. gracilis*, as concentrações dos metais em estudo complexados,  $C_{ML}$ , foram calculadas de acordo com o balanço de massa mostrado pelas equações 3.17 e 3.18:

$$C_{ML} + C_M = C_{M,T} \quad (3.17)$$

$$C_{ML} = C_{M,T} - C_M \quad (3.18)$$

### 3.5.2 Cálculo dos parâmetros de adsorção

Com base nos valores de  $C_M$  e de  $C_{ML}$  foi possível a construção de gráficos baseados nos modelos de isotermas de adsorção, avaliando a capacidade que o adsorvente tem de reter os íons metálicos em um meio aquático.

Para isso foi empregado o modelo de isoterma de Langmuir (Langmuir 1916), conforme a equação:

$$q = \frac{q_{\max} K_{ads} C_M}{(1 + K_{ads} C_M)} \quad (3.19)$$

Onde  $q_{\max}$  é a máxima quantidade dos íons do metal por unidade de massa de adsorvente para formar uma monocamada na superfície (expressa em  $\text{mg g}^{-1}$  ou  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ), e  $K_{ads}$  é a constante relativa à afinidade dos sítios de adsorção disponíveis na superfície com os íons do metal, expressa em  $\text{L g}^{-1}$ .

O modelo de Freundlich (Buffle 1988), por sua vez, considera que a sorção se dá em superfícies heterogêneas, conforme a equação:

$$q = K_f C^{1/n} \quad (3.20)$$

Onde  $K_f$  é um indicador da capacidade de adsorção ( $\text{L/g}$ ) e  $n$  representa a intensidade de adsorção (adimensional).

A partir dos dados obtidos experimentalmente foram construídas isotermas de adsorção, plotando-se a concentração do metal adsorvido ( $C_{ML}$ ) nas microalgas na ordenada e a concentração do íon livre ( $C_M$ ) na abscissa. Com base na análise de regressão não linear do programa Origin®7.0 com a equação de Langmuir e Freundlich foram obtidos os parâmetros de  $q_{\max}$ ,  $K_{ads}$ ,  $K_f$  e  $1/n$ .

As funções de equilíbrio diferencial,  $K_{DEF}$ , foram calculadas como descrito por Altmann and Buffle usando a equação 3.21 (Altmann and Buffle 1988).

$$K_{DEF} = -\frac{\alpha^2}{C_{M,T}} \left[ \frac{1 - \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{d \ln C_{alg}}{d \ln \alpha} \right)}{1 + (\alpha-1) \left( \frac{d \ln \left( \frac{C_{M,T}}{C_{alg}} \right)}{d \ln \alpha} \right)} \right] \quad (3.21)$$

onde  $\alpha = C_{M,T} / C_M$ , e  $C_{alg}$  é a concentração de microalgas em  $g L^{-1}$ . Os termos diferenciais da equação 3.21 foram obtidos por ajuste de funções polinomiais dos dados colocados em gráfico como  $\ln C_{M,T}$  ou  $\ln C_{alg}$  em função de  $\ln \alpha$ .

O grau de ocupação de sítios foi calculado como a razão  $\theta = C_{ML} / C_{HL,T}$ , onde  $C_{HL,T}$  é a concentração total de sítios ionizáveis determinada com os dados de titulação potenciométrica ácido base (Masini, Abate et al. 1998; Rigobello-Masini and Masini 2001). De acordo com a equação 3.22, um gráfico de  $\log \theta$  em função de  $\log K_{DEF}$  fornece o parâmetro de heteogeneidade,  $\Gamma$ , que tem significado similar ao termo  $n$  da equação empírica de Freundlich, e  $K_{DEF}^0$ , que é o valor de  $K_{DEF}$  para  $\theta = 1$ , ou seja, quando todos os sítios de adsorção estão ocupados (Altmann and Buffle 1988).

$$\log \theta = \Gamma \log K_{DEF}^0 - \Gamma \log K_{DEF} \quad (3.22)$$



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Sítios ionizáveis

A primeira etapa para determinação da capacidade de adsorção de íons metálicos de um material biológico, orgânico ou inorgânico é a caracterização da abundância e natureza química dos sítios ionizáveis (que atuam também como sítios de adsorção) (Buffle 1988). Para isso foram realizadas titulações ácido base da suspensão de microalgas conforme descrito em Materiais e Métodos. A Tabela 4 apresenta os dados experimentais de uma dessas titulações. O tratamento dos dados de titulação potenciométrica ácido base foi feito pelo método de linearização com funções de Gran modificadas para determinação de misturas de ácidos fracos na presença ou não de ácido forte (equações 3.10 e 3.11 do capítulo Material e Métodos) (Seymour, Clayton et al. 1977). Quando se adota esse método para tratar dados de titulações potenciométricas de polieletrólitos ou suspensões assume-se o modelo de distribuição discreta de sítios ionizáveis, no qual a influência da acumulação de cargas sobre a macromolécula ou superfície é refletida no pKa aparente determinado para cada sítio, bem como na abundância de sítios ionizáveis com esse pKa (Godinho, Masini et al. 1992; Masini 1993; Masini, Abate et al. 1998). Em meios com alta força iônica como a água do mar o efeito de interação eletrostática entre os sítios ionizáveis é minimizado pela alta concentração salina.

Uma curva de titulação potenciométrica segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas é mostrada na Figura 7. Adotando-se esse modelo foi determinado um total de  $3,4 \times 10^{-3}$  mol de sítios ionizáveis por grama de microalga (massa seca) distribuídos em espécies de grupos com pKas de 4,43, 5,26, 7,04 e 0,32, conforme mostrado na Figura 8.

**Tabela 4:** Exemplo de planilha de dados de titulação potenciométrica de 25,0 mL de suspensão de microalga *T. gracilis* com NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup> a 25,0 ± 0,1°C

Ponto Experimental	Volume de NaOH (mL)	E (mV)	pH <sup>a</sup>
1	0,000	251,0	2,776
2	0,100	245,2	2,873
3	0,200	238,2	2,991
4	0,300	228,5	3,155
5	0,350	222,0	3,265
6	0,400	214,0	3,400
7	0,425	208,4	3,494
8	0,445	201,7	3,607
9	0,460	197,0	3,687
10	0,470	193,6	3,744
11	0,480	190,0	3,805
12	0,490	185,8	3,876
13	0,495	184,1	3,994
14	0,505	178,8	4,032
15	0,510	176,6	4,070
16	0,515	174,3	4,123
17	0,520	171,2	4,167
18	0,530	168,6	4,221
19	0,535	165,4	4,273
20	0,540	162,3	4,317
21	0,545	159,7	4,376
22	0,550	156,2	4,408
23	0,555	154,3	4,474
24	0,560	150,4	4,520
25	0,565	147,7	4,593
26	0,570	143,4	4,660
27	0,575	139,4	4,694

28	0,580	137,4	4,782
29	0,585	132,2	4,858
30	0,590	123,0	4,939
31	0,595	116,0	5,056
32	0,600	107,9	5,193
33	0,605	100,6	5,316
34	0,610	91,20	5,475
35	0,615	83,40	5,607
36	0,620	75,00	5,749
37	0,625	61,30	5,980
38	0,630	47,50	6,214
39	0,635	33,70	6,447
40	0,640	21,90	6,646
41	0,645	11,90	6,815
42	0,650	-0,300	7,022
43	0,655	-11,60	7,213
44	0,660	-23,00	7,405
45	0,665	-32,00	7,557
46	0,670	-41,00	7,710
47	0,675	-48,30	7,833
48	0,680	-56,20	7,967
49	0,685	-61,50	8,056
50	0,690	-66,30	8,137
51	0,695	-71,10	8,218
52	0,700	-75,40	8,291
53	0,705	-78,60	8,345
54	0,710	-81,40	8,393
55	0,715	-83,80	8,433
56	0,720	-86,40	8,477
57	0,730	-89,00	8,548
58	0,740	-90,60	8,631
59	0,750	-95,50	8,710
60	0,760	-100,2	8,786

61	0,770	-104,7	8,874
62	0,780	-109,9	8,940
63	0,790	-117,7	9,006
64	0,800	-121,5	9,070
65	0,810	-124,9	9,128
66	0,820	-128,0	9,180
67	0,830	-131,1	9,233
68	0,840	-134,0	9,282
69	0,850	-136,9	9,331
70	0,860	-139,5	9,375
71	0,875	-143,3	9,439
72	0,890	-146,9	9,500
73	0,905	-150,3	9,557
74	0,920	-153,7	9,615
75	0,935	-156,8	9,667
76	0,950	-160,2	9,725
77	0,970	-164,0	9,789
78	0,990	-167,6	9,850
79	1,110	-171,6	9,918
80	1,130	-174,5	9,967
81	1,150	-177,7	10,021
82	1,200	-185,4	10,151
83	1,230	-191,7	10,258
84	1,330	-201,4	10,423
85	1,430	-208,1	10,537
86	1,530	-211,1	10,588
87	1,630	-215,7	10,666
88	1,780	-217,6	10,698
89	1,880	-219,8	10,736
90	1,980	-222,4	10,780
91	2,080	-224,6	10,818

<sup>a</sup> valores pH expressos em termos de concentração de íons hidrogênio calculados usando as equações 3.1 e 3.2 com os valores  $E_a^0 = 417,7 \text{ mV}$ ,  $J_H = 0 \text{ mV L mol}^{-1}$ ,  $E_b^0 = -$

398,4 mV,  $J_{OH} = 164,9 \text{ mV L mol}^{-1}$  e  $K_w = 1,60 \times 10^{-14}$  obtidos da titulação de calibração do eletrodo combinado de vidro em NaCl  $0,60 \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$

**Tabela 5:** Resultados típicos de um cálculo de linearização de uma curva de titulação potenciométrica de uma suspensão de microalga *T. gracilis* em NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup> com NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup>. As funções de Gran foram calculadas para os dados de titulação mostrados na Tabela 4.1.

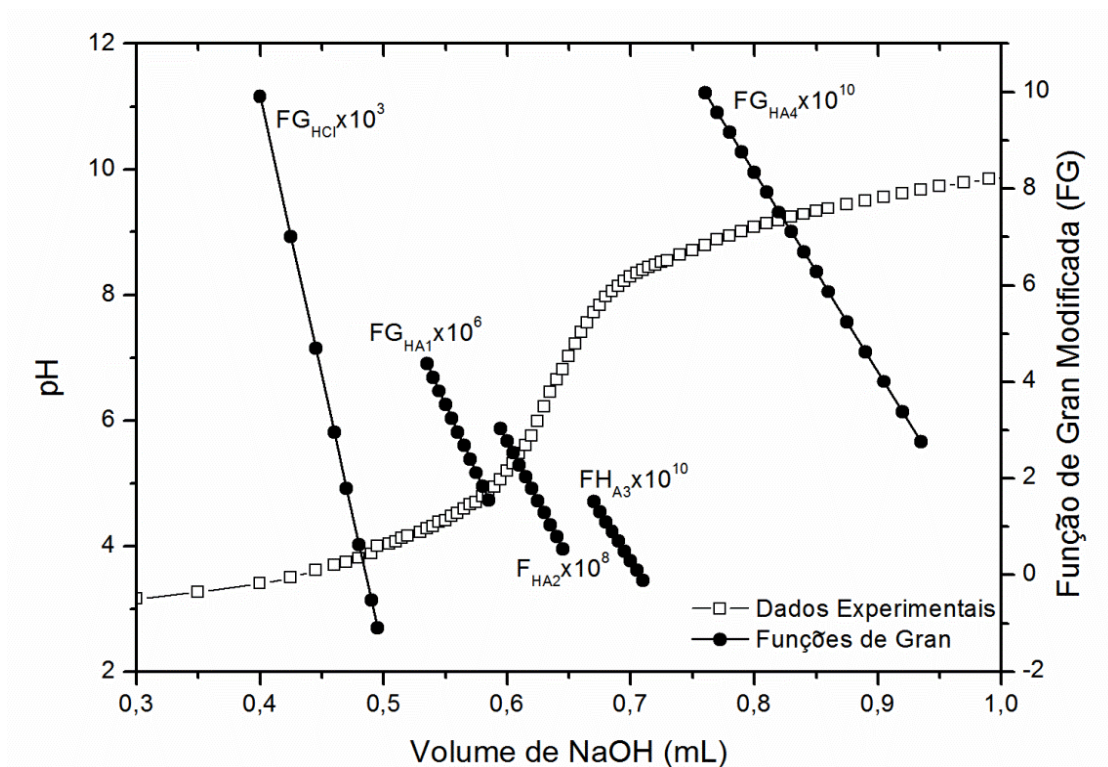
Volume de NaOH (mL)	pH	Função de Gran Modificada	Função de Gran Ajustada	Desvio <sup>a</sup>
Para HCl				
0,40	3,400	9,484e-3	9,700e-03	-2,227e+00
0,425	3,494	7,076e-3	6,975e-03	1,448e+00
0,445	3,607	4,651e-3	4,795e-03	-3,003e+00
0,460	3,687	3,174e-3	3,160e-03	4,430e-01
0,470	3,774	2,218e-3	2,070e-03	7,150e+00
0,480	3,805	1,266e-3	9,800e-04	2,918e+01
0,490	3,876	2,388e-4	-1,100e-04	-3,171e+02
0,495	3,994	-1,318e-3	-6,550e-04	1,012e+02
0,505	4,032	-2,030e-3	-1,745e-03	1,633e+01
0,510	7,070	-2,238e-3	-2,290e-03	-2,271e+00
0,515	4,123	2,848e-3	-2,835e-03	4,586e-01
V <sub>HCl</sub> = 0,485 mL		C <sub>HCl</sub> = 1,618e <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>		R = 0,998
Para HA <sub>1</sub>				
Volume de NaOH (mL)	pH	Função de Gran Modificada	Função de Gran Ajustada	Desvio
0,535	4,273	4,389e-6	4,369e-6	4,423e-1
0,540	4,317	4,125e-6	4,087e-6	9,097e-1
0,545	4,376	3,723e-6	3,805e-6	-2,171e+0
0,550	4,408	3,613e-6	3,523e-6	2,525 e+0
0,555	4,474	3,202e-6	3,241e-6	-1,218e+0
0,560	4,520	2,990e-6	2,959e-6	1,042e+0
0,565	4,593	2,602e-6	2,677e-6	-2,817e+0
0,570	4,660	2,298e-6	2,395e-6	-4,091e+0
0,575	4,694	2,250e-6	2,114e-6	4,344e+0
0,580	4,782	1,837e-6	1,832e-6	2,918e+0
0,585	4,858	1,572e-6	1,550e-6	1,425e+0
V <sub>HA1</sub> = 0,1271 mL C <sub>HA1</sub> = 4,235e-4 mol L <sup>-1</sup> pK <sub>HA1</sub> = 4,25 K <sub>HA1</sub> = 5,64e-5 R = 0,997				

Para HA <sub>2</sub>				
Volume de NaOH (mL)	pH	Função de Gran Modificada	Função de Gran Ajustada	Desvio
0,615	5,607	2,389e-8	2,032 e-8	-7,361e-01
0,620	5,749	2,308e-8	1,784 e-8	1,757e+01
0,625	5,980	1,668e-8	1,536 e-8	2,933e+01
0,630	6,124	1,498e-8	1,288 e-8	8,556e+00
0,635	6,447	8,023e-9	1,041 e-8	1,625e+01
0,640	6,646	5,572e-9	7,929 e-9	-2,291e+01
0,645	6,815	3,832e-9	5,449 e-9	-2,972e+01
V <sub>HA2</sub> =0,0435mL C <sub>HA2</sub> =1,45e-4 mol L <sup>-1</sup> pK <sub>HA2</sub> =6,00 K <sub>HA2</sub> = 1,0e-6 R=0,982				
Para HA <sub>3</sub>				
Volume de NaOH (mL)	pH	Função de Gran Modificada	Função de Gran Ajustada	Desvio
0,670	7,710	1,617e-10	1,514e-10	6,819e+00
0,675	7,833	1,445e-10	1,310e-10	1,022e+01
0,680	7,967	1,034e-10	1,107e-10	-6,615e+00
0,685	8,056	8,614e-11	9,049e-11	-4,808e+00
0,690	8,137	6,663e-11	7,019e-11	-5,070e+00
0,695	8,218	4,101e-11	4,988e-11	-1,778e+01
0,700	8,291	1,641e-11	2,958e-11	-4,450e+01
0,705	8,345	1,566e-12	9,279e-12	-8,312e+01
0,710	8,393	-1,210e-11	-1,102e-11	9,768e+00
0,715	8,433	-2,249e-11	-3,133e-11	-2,821e+01
0,720	8,477	-3,814e-11	-5,163e-11	-2,613e+01
V <sub>HA3</sub> =0,0513mL C <sub>HA3</sub> =1,71e-4mol L <sup>-1</sup> pK <sub>HA3</sub> = 7,39 K <sub>HA3</sub> =4,07e-8 R=0,989				
Para HA <sub>4</sub>				
Volume de NaOH (mL)	pH	Função de Gran Modificada	Função de Gran Ajustada	Desvio
0,760	8,786	1,091 e-10	9,990 e-11	9,177e+00
0,770	8,874	9,818 e-11	9,576 e-11	2,515 e+00
0,780	8,940	9,290 e-11	9,164 e-11	1,376 e+00
0,790	9,006	8,696 e-11	8,752 e-11	-6,272 e+00

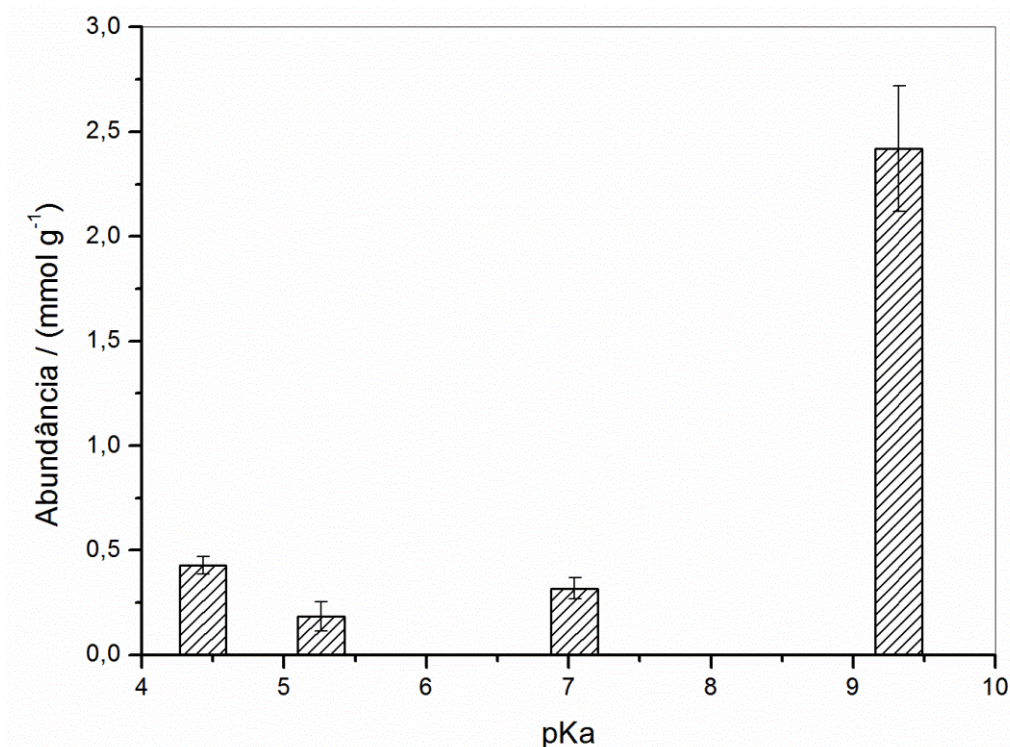
0,800	9,070	8,106 e-11	8,339 e-11	-2,782 e-01
0,810	9,128	7,617 e-11	7,926 e-11	-3,904 e+00
0,820	9,180	7,219 e-11	7,53 e-11	-3,915 e+00
0,830	9,233	6,770 e-11	7,100 e-11	-4,651 e+00
0,840	9,282	6,376 e-11	6,688 e-11	-4,659 e+00
0,850	9,331	5,962 e-11	6,275 e-11	-4,992 e+00
0,860	9,375	5,621 e-11	5,863 e-11	-4,131 e+00
0,875	9,439	5,111 e-11	5,244 e-11	-2,522 e+00
0,890	9,500	4,621 e-11	4,624 e-11	-7,246 e-02
0,905	9,557	4,168 e-11	4,005 e-11	4,057 e+00
0,920	9,615	3,676 e-11	3,387 e-11	8,571 e+00
0,935	9,667	3,254 e-11	2,768 e-11	1,759 e+01
V <sub>HA4</sub> =0,294mL C <sub>HA4</sub> =9,826e-4 mol L <sup>-1</sup> pK <sub>HA4</sub> =9,38 K <sub>HA4</sub> = 4,13e-10 R= 0,988				

<sup>a</sup> Desvio calculado como  $\left( \frac{FG_{mod} - FG_{ajust}}{FG_{ajust}} \right) 100$ , onde  $FG_{mod}$  e  $FG_{ajust}$  são os valores das Funções de Gran modificadas e ajustadas, respectivamente.





**Figura 7:** Típica curva de titulação de 25,0 mL de suspensão de *T. gracilis* protonada com 2,0 mL de HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com solução de NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  linearizada pelas funções de Gran modificadas. A suspensão de microalgas e as soluções de NaOH e HCl forma preparadas em NaCl  $0,60 \text{ mol L}^{-1}$  para controle da força iônica em valor similar ao tipicamente encontrado em água do mar.



**Figura 8:** Distribuição discreta de sítios ionizáveis na microalga *T. gracilis*. Condições experimentais conforme o título da Figura 7.

Não são conhecidos outros trabalhos de caracterização ácido base da superfície da microalga *T. gracilis* e os resultados aqui obtidos sugerem que essa microalga tem uma alta concentração de sítios ionizáveis em comparação com outras espécies. Por exemplo, um total de  $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol g}^{-1}$  foi determinado para a alga verde de água doce *Caetophora elegans* em NaCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (Andrade, Rollemberg et al. 2005). Concentrações totais de sítios de  $9,7 \times 10^{-4}$  e  $9,1 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$  foram determinadas para as microalgas *Cyclotella crytica* (diatomácea) e *Chlamydomonas reinhardtii* (alga verde), respectivamente (Kiefer, Sigg et al. 1997). Para *Chlorella miliata* foi encontrada uma capacidade de ligação protônica de  $1,28 \times 10^{-3} \text{ mol g}^{-1}$  (Han, Wong et al. 2006). Para *Ulva lactuca* os sítios ionizáveis foram determinados pelo modelo de distribuição de sítios discretos, obtendo-se uma distribuição do total de sítios em três classes com abundâncias similares, próximas a  $5 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$  (Schijf and Ebling 2010). As capacidades de ligação de prótons de quatro espécies de macroalgas marinhas variaram de  $1,1 \times 10^{-3}$  (*Ulva fascia*) a  $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol g}^{-1}$  (*Petalonia fascia*) (Schiewer and Wong 2000).

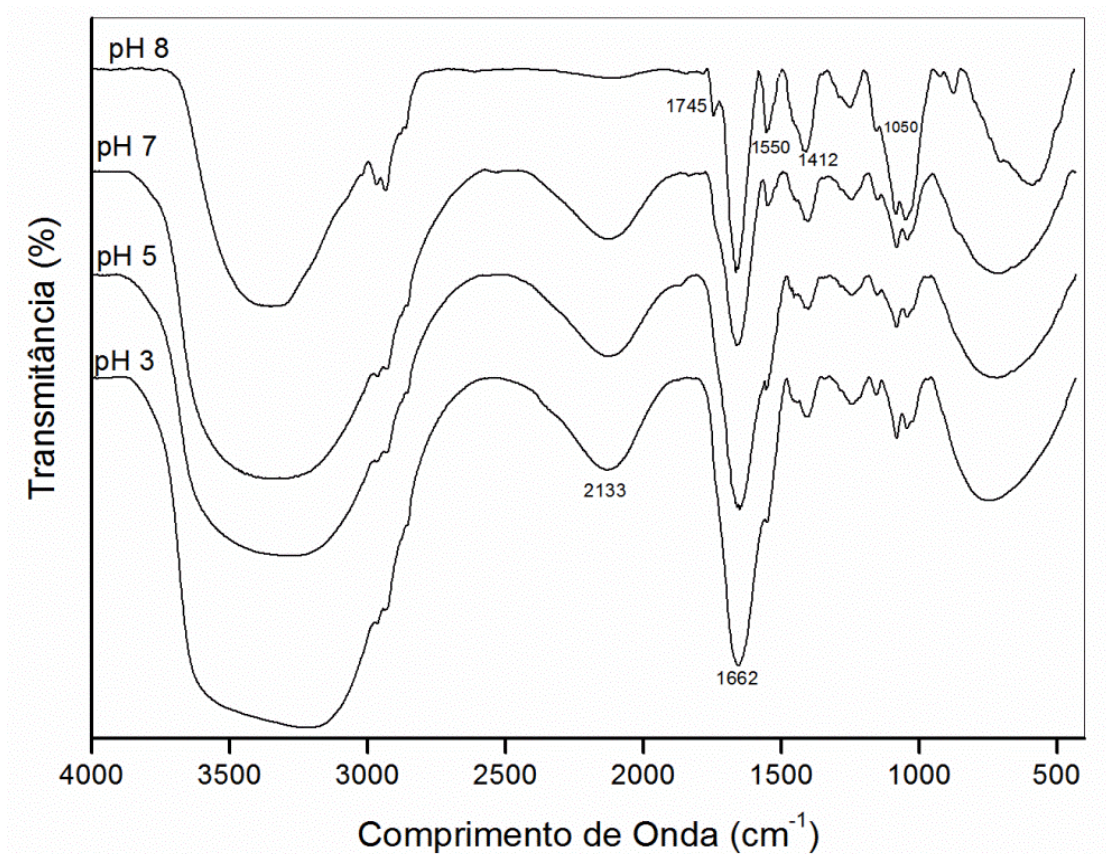
A maior parte dos estudos de caracterização ácido base de espécies de algas pelo modelo de distribuição de sítios discretos descrevem que as curvas de titulação podem

ser ajustadas por duas (Kiefer, Sigg et al. 1997; Vilar, Botelho et al. 2009), três (Han, Wong et al. 2006), ou quatro (Parmeggiani and Masini 2003; Andrade, Rollemberg et al. 2005) classes de sítios ionizáveis. A concentração total de sítios ionizáveis na microalga *T. gracilis* foi dividida em quatro classes com pKa distintos (Figura 4.2). Como as titulações foram realizadas em meio de alta força iônica (NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup>), os efeitos de interação eletrostática são minimizados. Com isso a divisão de grupos carboxílicos em duas classes pode ser atribuída predominantemente à heterogeneidade química da superfície da microalga e minoritariamente à influência de acumulação de cargas negativas resultantes da desprotonação desses grupos ao longo da titulação alcalimétrica afetando a ionização de sítios vizinhos.

A espécie com pKa 7.0 pode ser atribuída aos grupos imidazóis de histidina, ou a grupos fosfato e fosfonato (Han, Wong et al. 2006; Schijf and Ebling 2010). A espécie com pKa 9,3 é devido principalmente a grupos amino, como já descrito por outros autores para diferentes tipos de alga (Kiefer, Sigg et al. 1997; Schiewer and Volesky 1997; Gonzalez-Davila, Santana-Casiano et al. 2000; Schiewer and Wong 2000; Parmeggiani and Masini 2003; Andrade, Rollemberg et al. 2005; Han, Wong et al. 2006; Vilar, Botelho et al. 2009; Schijf and Ebling 2010). Deve ser mencionado ainda que o método de linearização de curvas de titulação potenciométrica por funções de Gran modificadas não distingue espécies com  $\Delta pK_a < 1$  (Aleixo, Godinho et al. 1987), a região da curva de titulação ajustada com o pKa 9,3 pode ter a contribuição de alguns grupos minoritários como grupos fenólicos ou sulfidrílicos. Esse grupo com pKa 9,3 corresponde a 73% do total de sítios ionizáveis (Figura 8). Em comparação com outras espécies de algas, a predominância de grupos com pKa > 9 foi encontrada apenas para a *C. elegans* com contribuições de 54 a 63% (Andrade, Rollemberg et al. 2005), dependendo do meio iônico. Para outros estudos foi observada uma distribuição homogênea da abundância dos sítios (Schijf and Ebling 2010), ou a predominância de grupos carboxílicos (Gonzalez-Davila, Santana-Casiano et al. 2000; Parmeggiani and Masini 2003; Han, Wong et al. 2006).

A natureza dos sítios ionizáveis foi investigada também por espectrometria de absorção na região do infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier (Figura 9) em diferentes pHs. A banda larga na região de 3200 a 3500 cm<sup>-1</sup> é devida ao estiramento de ligações O-H e aumenta de intensidade com a diminuição do pH, o que é consistente com a protonação de grupos carboxílicos. Essa banda, entretanto, é de pouca utilidade na caracterização dos grupos, pois é pouco específica, podendo se

referir a qualquer grupo O-H, bem como a outros grupos funcionais. A banda na região de  $2130\text{ cm}^{-1}$  aumentou de intensidade com o abaixamento de pH de 8 para 7, mas a atribuição dessa banda não foi possível consultando as tabelas de absorção de grupos funcionais na região do infravermelho. As bandas de amida I (estiramento C=O) e amida II (flexão N-H e estiramento C-N) são bem definidas em  $1662$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (pH 8). Em  $1745\text{ cm}^{-1}$  em pH 8 a banda de baixa intensidade pode ser atribuída ao estiramento de grupo carboxila, cuja intensidade aumenta com a diminuição do pH em função da protonação dos carboxilatos (Jiang, Saxena et al. 2004). Esse aumento de intensidade não é facilmente detectável por causa da sobreposição da banda de amida I, que provoca seu alargamento conforme o pH é diminuído. A banda em  $1412\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração dos carboxilatos, cuja intensidade diminui com a diminuição do pH, o que é coerente com a protonação desses grupos. A banda larga em  $1233\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações das ligações C-O-C em ésteres ou estiramento P=O, enquanto as bandas na região de  $1000$  a  $1150\text{ cm}^{-1}$  são relacionados com estiramento assimétrico e simétrico de  $\text{PO}_2^-$  e  $\text{P(OH)}_2$  em fosfato, bem como a vibrações de ligações C-OH e C-C de polissacarídeos e alcoóis. Os resultados obtidos na caracterização por infravermelho são consistentes com a predominância de grupos ionizáveis contendo grupos nitrogenados, seguido por carboxílicos e pela presença de grupos fosfato, determinados por titulação potenciométrica.

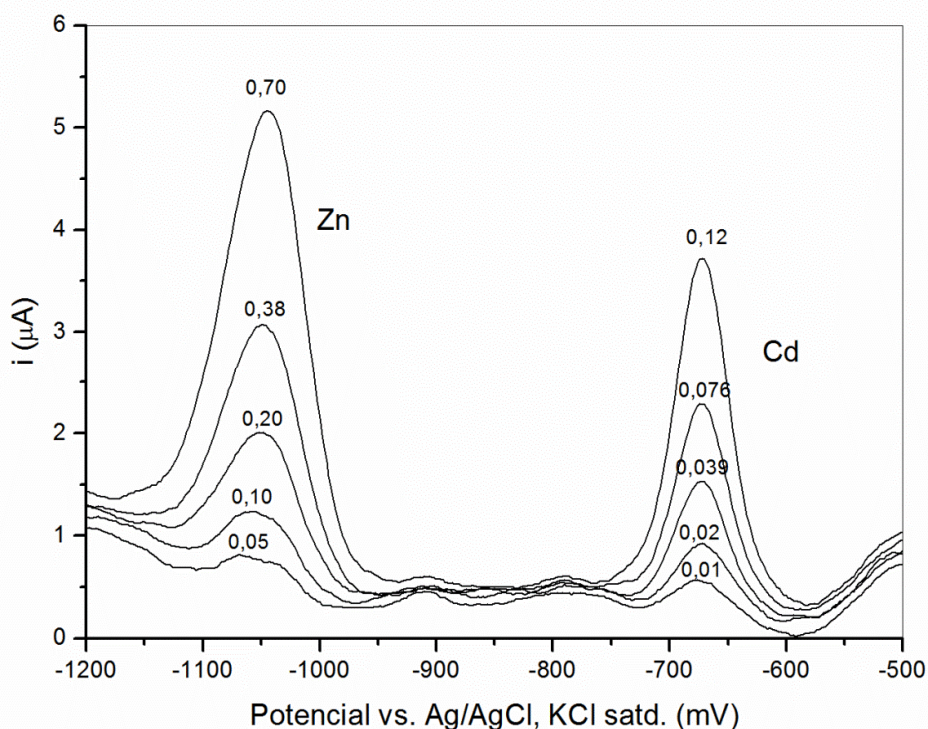


**Figura 9:** Espectros de absorvância na região do infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier de suspensão da microalga marinha *T. gracilis* em diferentes valores de pH.

## 4.2. Biossorção de Cd(II) e Zn(II)

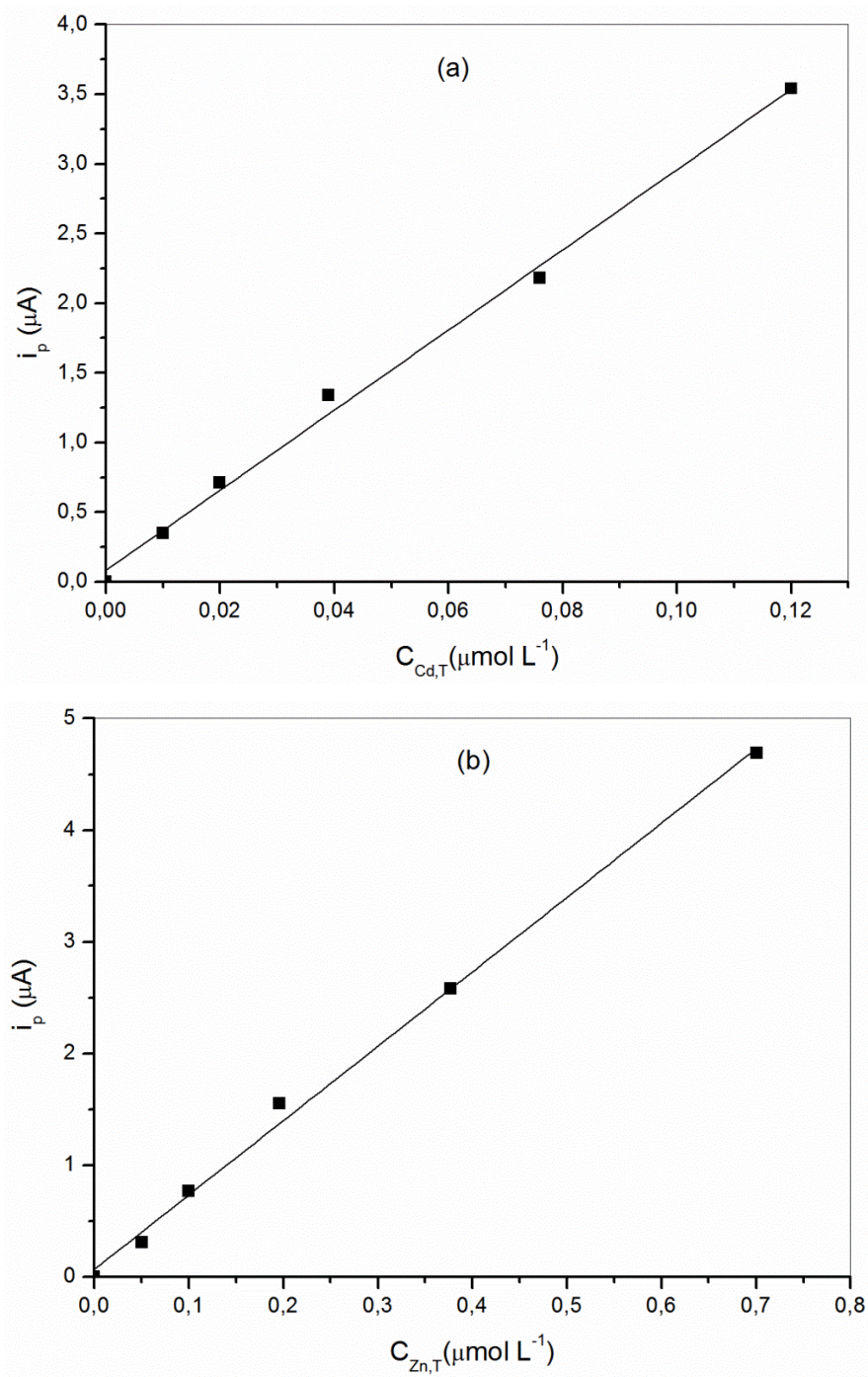
### 4.2.1. Determinação voltamétrica

Conforme descrito em Material e Métodos, a determinação da fração livre e lábil de Cd(II) e Zn(II) foi feita por voltametria de redissolução anódica usando eletrodo de filme de Hg como eletrodo de trabalho e voltametria de onda quadrada como forma de aplicação de varredura de potencial e leitura de corrente na etapa de redissolução. Nas condições experimentais adotadas, especialmente com relação ao tempo de deposição de 2 min, as concentrações de Cd(II) e Zn(II) na água do mar usada como eletrólito suporte não foram detectáveis, não interferindo de maneira significativa nos estudos de biossorção. Voltamogramas para Cd(II) e Zn(II) em água do mar são mostrados na Figura 10. Curvas analíticas obtidas desses voltamogramas são apresentadas na Figura 11, na qual se verifica a relação linear entre corrente de pico e concentração analítica de Cd(II) e Zn(II).



**Figura 10:** Voltamogramas de onda quadrada para Cd(II) e Zn(II) em água do mar. Os número sobre os picos são as concentrações em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições experimentais: Potencial de deposição = 1,2 V vs Ag/AgCl, KCl saturado; tempo de deposição = 120

s; tempo de equilíbrio = 10 s; Altura de pulso = 25 mV; Frequência de Onda Quadrada = 100 Hz; Incremento de potencial = 2mV.



**Figura 11:** Curvas analíticas para Cd(II) (a) e Zn(II) (b) obtidas dos voltamogramas mostrados na Figura 4.5. As equações de regressão linear foram  $i_p = (28,7 \pm 0,9)C_{Cd,T} + (0,08 \pm 0,06)$ , com  $r = 0,995$  e  $i_p = (6,7 \pm 0,2)C_{Zn,T} + (0,07 \pm 0,06)$ , com  $r = 0,996$ .

Os limites de detecção para Cd(II) e Pb(II) foram estimados em 3 e 18 nmol L<sup>-1</sup> (0,3 e 1,2 µg L<sup>-1</sup>), (respectivamente. Esses valores foram calculados pela expressão  $LD = \frac{3s_{y/x}}{m}$  onde  $s_{y/x}$  é o desvio padrão dos resíduos das correntes de pico na regressão linear das curvas analíticas e  $m$  é o respectivo coeficiente angular (Miller and Miller 1988). Os valores de limite de detecção obtidos são coerentes com outros valores descritos na literatura para tempos de deposição similares (Poldoski and Glass 1978; da Silva and Masini 2000), e são dependentes, além dos parâmetros voltamétricos, da espessura do filme de Hg formado, o que leva a pequenas variações de um eletrodo para outro, de modo que os valores aqui mencionados foram válidos para as curvas obtidas a partir dos voltamogramas mostrados na Figura 10. O desvio padrão relativo da corrente de pico de dez medidas em sequência com um mesmo eletrodo em soluções de Cd(II) e Pb(II) com concentrações intermediárias (dentre aquelas usadas na construção da curva analítica) não excederam 5%.

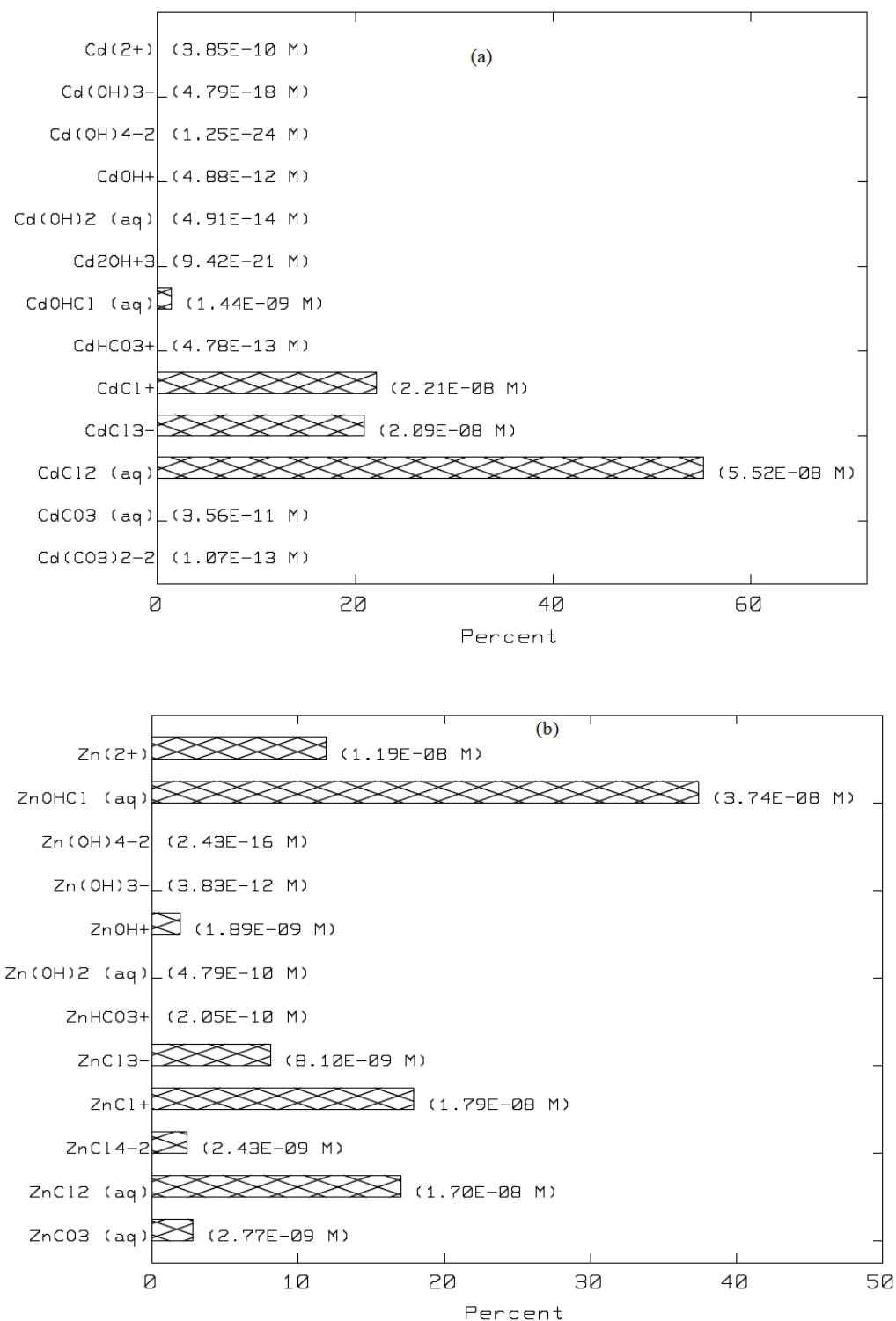
Para minimizar efeitos de memória entre uma medida voltamétrica e outra sem realizar troca de meio efetuou-se, antes da etapa de redução, uma etapa de condicionamento do eletrodo. Para isso o potencial de -0,20 V vs. Ag/AgCl, KCl saturado, foi aplicado à cela eletroquímica por 30 s, forçando a oxidação de qualquer Cd e Zn remanescentes no filme de Hg. Nesse potencial o filme de Hg não é afetado eletroquimicamente, sendo que sua deterioração se dá em consequência da agitação da suspensão. Cerca de 30 a 50 medidas sequenciais puderam ser feitas sem perda significativa de desempenho do filme, que pode ocorrer por processos de adsorção e perda de aderência das gotículas de Hg à superfície do carbono vítreo (Lund and Salberg 1975).

#### 4.2.2. Especificação de Cd(II) e Zn(II)

A especificação de Cd(II) e Zn(II) foi calculada pelo software MINEQL+, versão 4.6 para Windows, considerando um meio similar à água do mar, contendo NaCl 0,60 mol L<sup>-1</sup>, alcalinidade total de 2 mmol L<sup>-1</sup> e pH 8,2. De acordo com os cálculos realizados a forma predominante de Cd(II) é CdCl<sub>2</sub> (aq), correspondendo a 55,2% da concentração analítica de Cd(II) (considerada como 0,10 µmol L<sup>-1</sup>). Para Zn(II) a



principal espécie é  $\text{ZnOHCl (aq)}$ , correspondendo a 34,9% da concentração total. As demais espécies e suas concentrações são apresentadas na Figura 12.

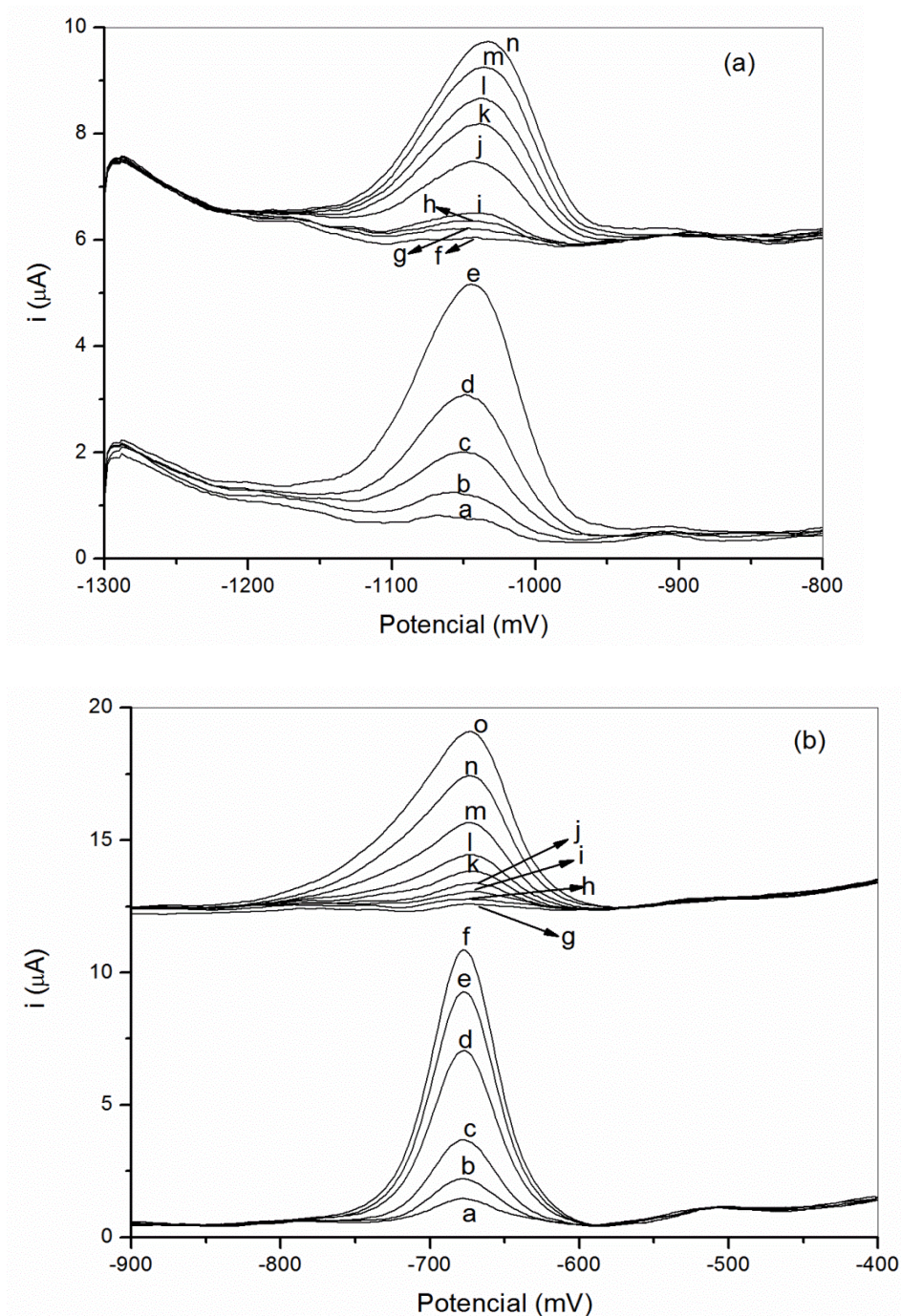


**Figura 12:** Gráficos de distribuição de espécies de  $\text{Cd(II)}$ (a) e  $\text{Zn(II)}$  (b), ambos com concentração  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{NaCl } 0,60 \text{ mol L}^{-1}$ , alcalinidade total de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e pH 8,2, simulando condições de água do mar.

### 4.2.3 Biossorção

A cinética de adsorção foi inicialmente avaliada variando-se o tempo de contato de Cd(II) e Zn(II) com a suspensão de microalga antes de se aplicar o potencial de deposição. Essa condição experimental foi estabelecida variando-se o tempo de purga do sistema do potenciostato, sabendo-se que essa etapa é feita sem aplicação de potencial e mantendo-se a agitação magnética. Não havendo aplicação de potencial, não existe estímulo que provoque a redução de Cd(II) ou Zn(II), livres ou dissociáveis na escala de tempo do experimento. Tempos de purga entre 30 e 240 s foram estudados e, conforme o tempo foi sendo aumentado, não se observou diminuição significativa das correntes de pico voltamétrico. Esse comportamento permitiu inferir que o equilíbrio de interação com os grupos superficiais da membrana celular se estabeleceram rapidamente, permitindo que as titulações fossem realizadas por adições sequenciais de titulante em um único frasco de titulação (a própria cela eletroquímica). Essa estratégia tem sido usada por outros autores (Rollemberg, Goncalves et al. 1999) porque a interação dos íons metálicos com os grupos funcionais é usualmente rápida, muito embora mecanismos metabólicos em células vivas possam levar à bioacumulação, um processo lento (> 24h) envolvendo transporte através de membrana e ligação com macromoléculas de DNA, polipeptídeos, fitoquelatinas e proteínas (Rollemberg, Goncalves et al. 1999; Perez-Rama, Alonso et al. 2002; Cruz, Diaz-Cruz et al. 2005; Perez-Rama, Torres et al. 2010).

A partir de medidas voltamétricas, os parâmetros relacionados com a energia livre de adsorção (constante de estabilidade dos complexos superficiais) podem ser obtidos a partir do deslocamento de potencial de pico na presença do ligante (ou adsorvente) em relação aos potenciais de pico na ausência do ligante usando a equação de DeFord-Hume (Buffle, Chalmers et al. 1988; Pinheiro, Mota et al. 1994). Entretanto, nos experimentos aqui realizados, os potenciais de pico para Cd(II) e Zn(II) em água do mar não foram significativamente diferentes daqueles na suspensão de microalga para qualquer um dos valores de  $C_{M,T}$  (Figura 13), de modo que os parâmetros de adsorção só poderiam ser obtidos a partir das diferenças de corrente de pico. Esse comportamento de corrente e potencial de pico sugere que os agregados célula-metal são não lábeis ou quase-lábeis, mas com um coeficiente de difusão infinitamente menor do que do íon metálico livre ( $D_{ML} \lll D_M$ ) (Van Leeuwen, Cleven et al. 1989).

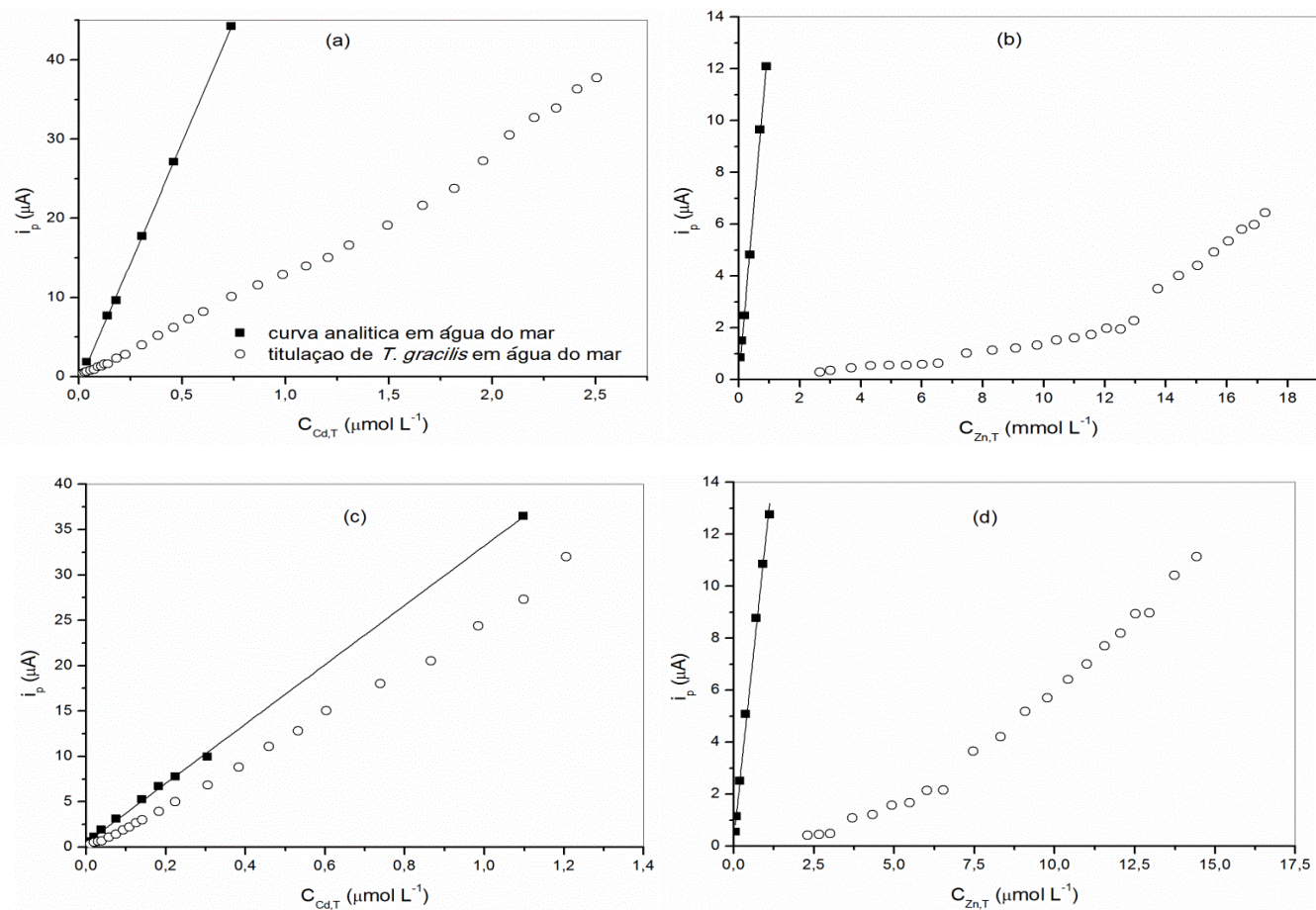


**Figura 13:** Voltamogramas para Zn(II) (a) e Cd(II) (b) em água do mar (a→e para Zn(II) e a→f para Cd(II)) e em suspensão de *T. gracilis* (f→n para Zn(II) e g→o para Cd(II)). As concentrações analíticas ( $C_{M,T}$ ) para Zn(II) foram: (a) 0,051, (b) 0,10, (c) 0,19, (d) 0,38, (e) 0,70, (f) 2,66, (g) 3,01, (h) 3,69, (i) 4,32, (j) 4,92, (k) 5,49, (l) 6,02, (m) 6,53 e (n) 7,46  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para Cd(II), as concentrações foram: (a) 0,010, (b) 0,020, (c) 0,039, (d) 0,076, (e) 0,10, (f) 0,12, (g) 0,010, (h) 0,030, (i) 0,058, (j) 0,093, (k) 0,125, (l) 0,183, (m) 0,305, (n) 0,450 e (o) 0,600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

A variação das correntes de pico em função de  $C_{M,T}$  na presença e na ausência de alga é mostrada na Figura 14. A ligação de Cd(II) e Zn(II) à superfície da microalga diminuiu significativamente, para a maior parte dos casos, as correntes de pico em relação às correntes obtidas na água do mar (menor quantidade de matéria do íon metálico é reduzida no eletrodo). A adsorção de Zn(II) se mostrou mais intensa do que a de Cd(II), como se pode observar nas Figuras 14 a e 14 b. A quantificação de  $C_{Cd}$  foi possível para todos os valores de  $C_{Cd,T}$  estudados (0,01 a 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) uma vez que correntes de pico mensuráveis foram obtidos para todos os pontos experimentais (Figura 14 a). Por outro lado, não foram obtidos picos de corrente mensuráveis para  $C_{Zn,T}$  entre 0,05 e 2,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em consequência da forte adsorção de Zn(II), ou formação de agregados inertes para baixos valores de  $C_{Zn,T}$ .

À medida que os valores de  $C_{M,T}$  aumentaram além de um certo valor, um significativo aumento na inclinação dos gráficos de  $i_p$  vs.  $C_{M,T}$  foi observado (Figura 14), indicando a saturação dos sítios de adsorção de maior afinidade. Entretanto, com exceção da titulação com Cd(II) na presença de Zn(II) (Figura 14 c), essas curvas de titulação em presença da alga não se tornaram paralelas às curvas obtidas apenas em água do mar, apesar da matriz ser a mesma nos dois casos (Figuras 14 a, b e d). Tal comportamento sugere que sítios de ligação com menor energia de adsorção ainda estão sendo ocupados na região de maiores valores de  $C_{M,T}$ . Uma comparação entre os perfis das Figuras 14 a e 14 c indica que a maior afinidade da superfície da alga por Zn(II) inibe a adsorção de Cd(II) quando os dois íons coexistem em solução, fazendo com que no sistema contendo a presença simultânea de Cd(II) e Zn(II), as correntes de pico para Cd(II) se aproximem mais das correntes observadas na curva analítica.

Para aplicação dos modelos de isotermas e cálculo das distribuições de constantes de estabilidade em função do grau de ocupação dos sítios o cálculo das concentrações livre e lábil foi feita de acordo com as equações 3.14 a 3.18 descritas no capítulo de Material e Métodos. As Tabelas 6 e 7 ilustram os dados obtidos para titulações de *T. gracilis* com Cd(II) e Zn(II), respectivamente, bem como o cálculo de  $C_M$ .



**Figura 14:** Correntes de pico em função de  $C_{M,T}$  para titulações de *T. gracilis* em água do mar (pH 8,2) com Cd(II) (a,c) e Zn(II) (b,d) em soluções separadas (a e b) e misturas binárias (c e d).

**Tabela 6:** Exemplo de dados experimentais e cálculos de  $C_M$  para a titulação de *T. gracilis* com Cd(II) em água do mar

$C_{ca,r}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$i_p$ experimental ( $\mu\text{A}$ )	$i_p$ calc. ( $\mu\text{A}$ ) <sup>a</sup>	$D_{\text{médio}}^b /$ ( $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ )	$C_{ca}^c /$ ( $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )	$C_{cal}^d /$ ( $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )
0,020	0,848	1,049	4,580	0,013	0,007
0,030	0,894	1,495	2,506	0,011	0,019
0,039	0,881	1,932	1,458	0,008	0,031
0,058	0,957	2,782	0,830	0,007	0,051
0,075	0,996	3,599	0,536	0,006	0,070
0,093	1,105	4,387	0,444	0,006	0,087
0,109	1,195	5,145	0,378	0,006	0,103
0,125	1,195	5,877	0,289	0,005	0,120
0,140	1,195	6,583	0,231	0,005	0,136
0,183	1,349	8,526	0,175	0,005	0,178
0,224	1,586	10,436	0,162	0,005	0,219
0,305	2,108	14,158	0,155	0,007	0,298
0,383	2,616	17,756	0,152	0,008	0,375
0,459	3,219	21,237	0,161	0,011	0,448
0,532	3,813	24,605	0,168	0,013	0,519
0,603	4,083	27,866	0,150	0,013	0,590
0,738	5,155	34,087	0,160	0,017	0,722
0,866	5,974	39,937	0,157	0,019	0,846
0,986	7,128	45,447	0,172	0,024	0,961
1,099	8,438	50,647	0,194	0,030	1,068
1,205	9,271	55,563	0,195	0,034	1,172
1,307	9,749	60,216	0,183	0,034	1,272
1,494	11,59	68,815	0,199	0,042	1,451
1,663	13,96	76,586	0,233	0,055	1,607
1,816	15,38	83,642	0,237	0,061	1,755
1,956	18,22	90,077	0,286	0,080	1,876
2,084	20,45	95,971	0,318	0,095	1,990
2,202	24,09	101,389	0,395	0,124	2,078

<sup>a</sup> calculado com a equação 3.14, usando o coeficiente angular da curva analítica como  $BD_M^r$

<sup>b</sup> calculado usando a equação 3.15 ( $\bar{D} = \left( \frac{i_p \text{ experimental}}{i_p \text{ calculado}} \right)^2 D_M$ )

<sup>c</sup> calculado usando a equação 3.16 admitindo  $C_M D_M \gg \gg D_{ML} C_{ML}$

<sup>d</sup> calculado com a equação 3.18

**Tabela 7:** Exemplo de dados experimentais e cálculos de  $C_M$  para a titulação de *T. gracilis* com Zn(II) em água do mar

$C_{Zn,T}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$i_p$ experimental ( $\mu\text{A}$ )	$i_p$ calc. ( $\mu\text{A}$ ) <sup>a</sup>	$D_{\text{médio}}^{b/}$ ( $10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ )	$C_{Zn}^c/$ ( $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ )	$C_{ZnL}^d/$ ( $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )
2,66	0,272	35,9	4,21	0,15	2,66
3,02	0,340	40,7	5,11	0,21	3,02
3,69	0,447	49,8	5,91	0,30	3,69
4,33	0,535	58,3	6,15	0,36	4,33
4,93	0,550	66,4	5,01	0,34	4,93
5,49	0,547	74,0	3,99	0,30	5,49
6,03	0,583	81,2	3,76	0,31	6,03
6,53	0,625	88,1	3,68	0,33	6,53
7,47	1,011	100,7	7,35	0,75	7,47
8,31	1,136	112,0	7,50	0,85	8,31
9,08	1,214	122,4	7,18	0,89	9,08
9,78	1,321	131,8	7,33	0,98	9,78
10,42	1,521	140,5	8,56	1,22	10,42
11,01	1,593	148,4	8,41	1,27	11,01
11,55	1,725	155,7	8,96	1,42	11,55
12,06	1,967	162,5	10,70	1,77	12,05
12,52	1,938	168,8	9,62	1,65	12,52
12,96	2,269	174,6	12,32	2,19	12,95
13,74	3,499	185,2	26,06	4,91	13,73
14,43	4,003	194,5	30,94	6,11	14,42
15,04	4,401	202,7	34,41	7,09	15,03
15,58	4,928	210,0	40,22	8,58	15,57
16,06	5,346	216,5	44,51	9,79	16,05
16,50	5,793	222,4	49,52	11,19	16,49
16,90	5,980	227,8	50,31	11,65	16,89
17,26	6,439	232,7	55,91	13,22	17,25

<sup>a</sup> calculado com a equação 3.14, usando o coeficiente angular da curva analítica como  $BD_M^r$

<sup>b</sup> calculado usando a equação 3.15 ( $\bar{D} = \left( \frac{i_p \text{ experimental}}{i_p \text{ calculado}} \right)^2 D_M$ )

<sup>c</sup> calculado usando a equação 3.168 admitindo  $C_M D_M \gg \gg D_{ML} C_{ML}$

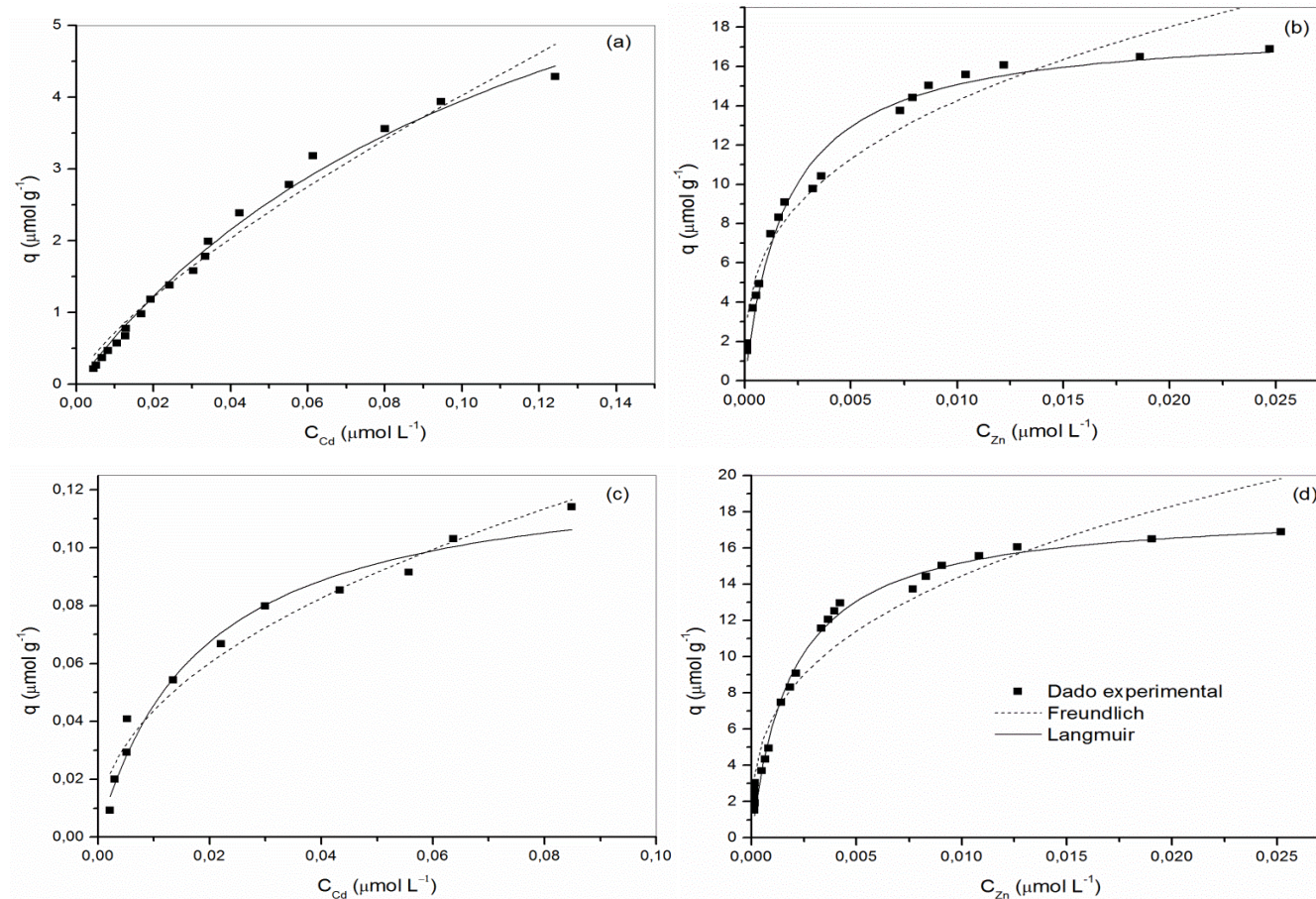
<sup>d</sup> calculado com a equação 3.18

Dividindo-se o valor de  $C_{ML}$  (em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pela massa de alga na cela de titulação (g) obtém-se o valor de  $q$ , que ao ser colocado em gráfico em função de  $C_M$  permite estimar os parâmetros de adsorção com as equações de Langmuir e Freundlich (Tabela 8). A maior afinidade da superfície da microalga para ligação com Zn(II) em relação a Cd(II) é confirmada quantitativamente com esses cálculos. A capacidade máxima de adsorção de Zn(II) é cerca de duas a três vezes maior do que para Cd(II). Os parâmetros relacionados à força de ligação ( $K_{ads}$  e  $1/n$ ) também apontam uma maior afinidade por Zn(II). O termo  $1/n$  da equação de Freundlich para Zn(II) ( $0,34 \pm 0,03$ ) sugere ainda uma elevada heterogeneidade energética para o processo de adsorção, ou seja, sítios de diferentes naturezas são disponíveis para a biossorção de Zn(II). Por outro lado, os valores capacidade máxima de adsorção ( $q_{max}$ ) para Cd(II) e Zn(II) correspondem a cerca de apenas 0,26 e 0,54% do total de sítios ionizáveis ( $C_{HL,T} = 3,4 \text{ mmol g}^{-1}$ ), respectivamente. O baixo grau de ocupação de sítios foi observado também por outros autores para diferentes tipos de microalgas (Kiefer, Sigg et al. 1997; Andrade, Rollemberg et al. 2005). Esse comportamento pode ser explicado pelos baixos valores da razão  $C_{M,T}/C_{HL,T}$  usados nesses experimentos e que somente os sítios ionizáveis de maior afinidade pelos metais afetam a fração livre dessas espécies que pode ser reduzida no eletrodo de trabalho. Aumentos ainda maiores da concentração de metais na cela de titulação não causaram o efeito esperado de se chegar a total saturação dos sítios, mas sim uma diminuição da inclinação da curva de  $i_p$  em função de  $C_{M,T}$  (não mostrada), o que pode ser explicado pela saturação do filme de Hg com Cd e Zn.

Ambos  $C_{M,T}$  e  $C_{HL,T}$  usados nesse trabalho são muito maiores do que as concentrações tipicamente encontradas em águas oceânicas, mas as razões  $C_{M,T}/C_{HL,T}$  podem ser representativas de condições ambientais de regiões costeiras impactadas por atividades antrópicas e sujeitas a eutrofização.



Nos experimentos em que Zn(II) e Cd(II) foram adicionados individualmente ao frasco de titulação, ambos os íons foram adsorvidos, mas Zn(II) o foi em muito maior extensão, um fato que pode estar relacionado com o papel de nutriente que esse metal exerce no metabolismo da microalga e a existência de sítios de ligação específicos. Foi verificada, por exemplo, a atividade intra e extra-celular da enzima anidrase carbônica em *T. gracilis* cultivada em laboratório (Rigobello-Masini, Aidar et al. 2003). Anidrase carbônica é uma enzima encontrada nos mais variados organismos, desde bactérias e microalgas, até os mais evoluídos, como animais e plantas superiores.



**Figura 15:** Isothermas de adsorção de Cd(II) (a) e Zn(II) (b) em *T. gracilis* em soluções simples (a e b) ou em misturas binárias de Cd(II) e Zn(II) (c e d) ajustadas com as equações de Freundlich e Langmuir.

**Tabela 8:** Parâmetros de adsorção obtidos por ajuste de regressão não linear dos dados experimentais de biossorção de Cd(II) e Zn(II) às equações de Freundlich e Langmuir. Os dados foram obtidos a  $25 \pm 1$  °C e os resultados correspondem à média de três experimentos de adsorção para cada caso.

Adsorbato	Modelo					
	Freundlich			Langmuir		
	$K_f$ ( $\mu\text{mol}^{1-1/n} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n}$ )	$1/n$	$R^2$	$\text{Log } K_{ads}$ ( $\text{L g}^{-1}$ )	$q_{max}$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$R^2$
Cd(II)	$22 \pm 2$	$0,74 \pm 0,03$	0,97	$6,9 \pm 0,6$	$7,9 \pm 0,9$	0,992
Zn(II)	$67 \pm 5$	$0,34 \pm 0,03$	0,98	$8,8 \pm 0,2$	$18,1 \pm 0,4$	0,98
Cd(II) na presença de Zn(II)	$0,36 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,04$	0,97	$7,7 \pm 0,2$	$0,129 \pm 0,008$	0,97
Zn(II) na presença de Cd(II)	$69 \pm 9$	$0,34 \pm 0,03$	0,93	$9,0 \pm 0,2$	$18,1 \pm 0,4$	0,98

Anidrase carbônica apresenta o íon zinco como cofator em seu sítio ativo e catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono em diversas fases da fisiologia da microalga. Se ocorrer ligada externamente na parede celular da microalga, pode atuar na aquisição de carbono inorgânico, na forma de íon bicarbonato, diretamente da água do mar (Morel, Reinfelder et al. 1994; Gao, Gao et al. 2009).

Cádmio não tem papel nutricional algum, mas algumas espécies de microalgas, tais como a *Tetraselmis suecica*, possuem mecanismos metabólicos que tornam o organismo tolerante ao metal pela produção de compostos não proteicos contendo grupos sulfidrílicos (Perez-Rama, Alonso et al. 2002; Perez-Rama, Vaamonde et al. 2006). Foram encontrados valores de LC50 de 7,9 mg L<sup>-1</sup> (70,3 µmol L<sup>-1</sup>) após seis dias de exposição. Por outro lado, Okamoto e colaboradores (Okamoto, Asano et al. 1996) observaram um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase em *T. gracilis* exposta a Cd(II), sugerindo que essa espécie metálica causa estresse oxidativo.

Outra possível explicação para a maior afinidade da microalga por Zn(II) em relação a Cd(II) pode ser a especiação desses metais em água do mar. Conforme os cálculos realizados com o programa MINEQL+, cerca 10,2 % de  $C_{Zn,T}$  encontra-se na forma de íon livre (Zn<sup>2+</sup>), enquanto para Cd(II) a contribuição de Cd<sup>2+</sup> é de apenas 0,39% (Figura 4.6). Os íons livres são aqueles que têm maior facilidade para interação com superfícies biológicas, ou seja, apresentam maior biodisponibilidade.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, a capacidade de adsorção de Cd(II) pela *T. gracilis* diminuiu drasticamente quando os experimentos foram realizados na presença de Zn(II), enquanto a capacidade de adsorção de Zn(II) não foi afetada. Esse resultado é consistente com as observações de Monteiro e colaboradores (Monteiro, Castro et al. 2011) para a microalga *Scenedesmus obliquus*. Entretanto, o comportamento não pode ser generalizado para qualquer espécie de microalga. No mesmo estudo de Monteiro e colaboradores (Monteiro, Castro et al. 2011) foi observado que *Desdesmus pleimorphus* foi capaz de remover maiores quantidades de Cd(II) quando na presença de Zn(II).

Ainda nos estudos de adsorção contendo a presença simultânea de Cd(II) e Zn(II) pode-se verificar que os parâmetros relacionados à intensidade de adsorção ( $1/n$  e  $K_{ads}$ , Tabela 8) não foram significativamente afetados para Zn(II) quando comparados àqueles obtidos das isothermas construídas sem a presença de Cd(II). Entretanto, para Cd(II) houve um claro aumento da energia de adsorção (menor valor de  $1/n$  e maior valor de  $K_{ads}$ ) quando os experimentos foram feitos na presença de Zn(II). Esse fato

pode ser explicado pela ocorrência de sítios com alta afinidade por Cd(II) (maior do que para Zn(II)), mas com pequena abundância. Como os métodos de cálculo usados até aqui fornecem apenas valores médios de termos relacionados à energia de adsorção, quando a titulação é feita sem a presença de Zn(II) existe, além dos sítios de alta afinidade, a disponibilidade de um grande número de sítios com baixa afinidade por Cd(II), o que resulta em menor valor de  $K_{ads}$  médio ou maior valor de  $1/n$  obtidos pelas equações de Langmuir e Freundlich, respectivamente (Tabela 8). Na situação de competição com Zn(II) só os sítios minoritários com alta afinidade por Cd(II) são ocupados por este íon, resultando em maiores valores dos termos relacionados à energia de adsorção e menor capacidade de adsorção (Maguerroski, Rigobello-Masini et al. 2013).

Para melhor descrever a afinidade dos sítios de adsorção por Cd(II) e Zn(II) em diferentes relações entre as concentrações de metal total e livre foram construídos os gráficos de  $\log K_{DEF}$  em função de  $\log \theta$ , ou seja, o logaritmo das constantes de equilíbrios diferenciais, dada pela média aritmética ponderada das constantes de equilíbrio condicionais  $K_j$  para todos os sítios do tipo  $j$  envolvidos na complexação em função do logaritmo do grau de ocupação de sítios (Altmann and Buffle 1988; Pinheiro, Mota et al. 1994; Chakraborty, Fafous et al. 2007), conforme ilustrado na Tabela 9. A Figura 16 ilustra a obtenção dos termos diferenciais  $\frac{d \ln C_{alga}}{d \ln \alpha}$  e

$\frac{d \ln \left( \frac{C_{M,T}}{C_{alga}} \right)}{d \ln \alpha}$  da equação 3.21 (Material e Métodos) por ajuste polinomial.

De modo consistente com os resultados obtidos com as equações de Freundlich e Langmuir, os gráficos de  $\log K_{DEF}$  em função de  $\log \theta$  (Figura 17) confirmaram a maior afinidade da microalga por Zn(II) em relação a Cd(II). Não foi possível estudar o processo de bioadsorção para ocupações de sítio similares porque em situações de baixa ocupação ( $-5,0 < \log \theta < -3,3$ ) nas quais os parâmetros de adsorção de Cd(II) foram calculados,  $C_{Zn}$  não foi detectável em consequência da formação de complexos superficiais muito estáveis e/ou inertes desse íon com a superfície da alga.

O cálculo de  $K_{DEF}^0$  e  $\Gamma$  para a bioadsorção de Zn(II) só foi possível para  $\log \theta$  entre -3,3 e -1,8 (Figura 17), condição na qual os sítios de adsorção para Cd(II) já se encontravam próximos da saturação, ou que a força de ligação seria tão fraca que impediria a obtenção de resultados confiáveis (Filella and Hummel 2011; May and Filella 2011). Os valores de  $\Gamma$ , assim como os valores de  $1/n$ , menores para Zn(II) do

que para Cd(II) refletem a maior heterogeneidade energética para a biossorção de Zn(II) (Tabela 10) e os valores entre 0,6 e 0,7 são consistentes com os valores encontrados para outros ligantes heterogêneos de ocorrência ambiental (Pinheiro, Mota et al. 1994; Rollemberg, Goncalves et al. 1999). Apesar da maior complexidade do cálculo e da possibilidade de obter constantes de adsorção (estabilidade) independentes da unidade de concentração do adsorvente ( $\text{g L}^{-1}$ ) os gráficos de  $\log K_{DEF}$  em função de  $\log \theta$  não forneceram informações relevantes além daquelas obtidas com as isotermas de Langmuir e Freundlich. Adicionalmente não foi possível ajustar os dados da isoterma de adsorção de Cd(II) quando na presença de Zn(II).

A comparação dos parâmetros de adsorção com dados da literatura é complicada, pois não se conhecem outros trabalhos que avaliaram a biossorção de Cd(II) e Zn(II) por *T. gracilis*. Por exemplo, a biossorção de Cd(II) por *T. suecica* atingiu uma capacidade máxima de adsorção de  $40,22 \text{ mg g}^{-1}$  ( $359 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ ) (Perez-Rama, Torres et al. 2010), mas nesse estudo os autores determinaram as concentrações livres de Cd(II) por absorção atômica em chama após um tempo de contato de 72 h, uma condição na qual processos de bioacumulação (internalização do metal) já pode estar ocorrendo, ao contrário das condições utilizadas nessa dissertação, em que somente a biossorção em curtos intervalos de tempo de contato foram investigados.

**Tabela 9:** Exemplo de planilha usada para o cálculo de  $K_{DEF}$  para ligação de Zn(II) na superfície da microalga *T. gracilis*

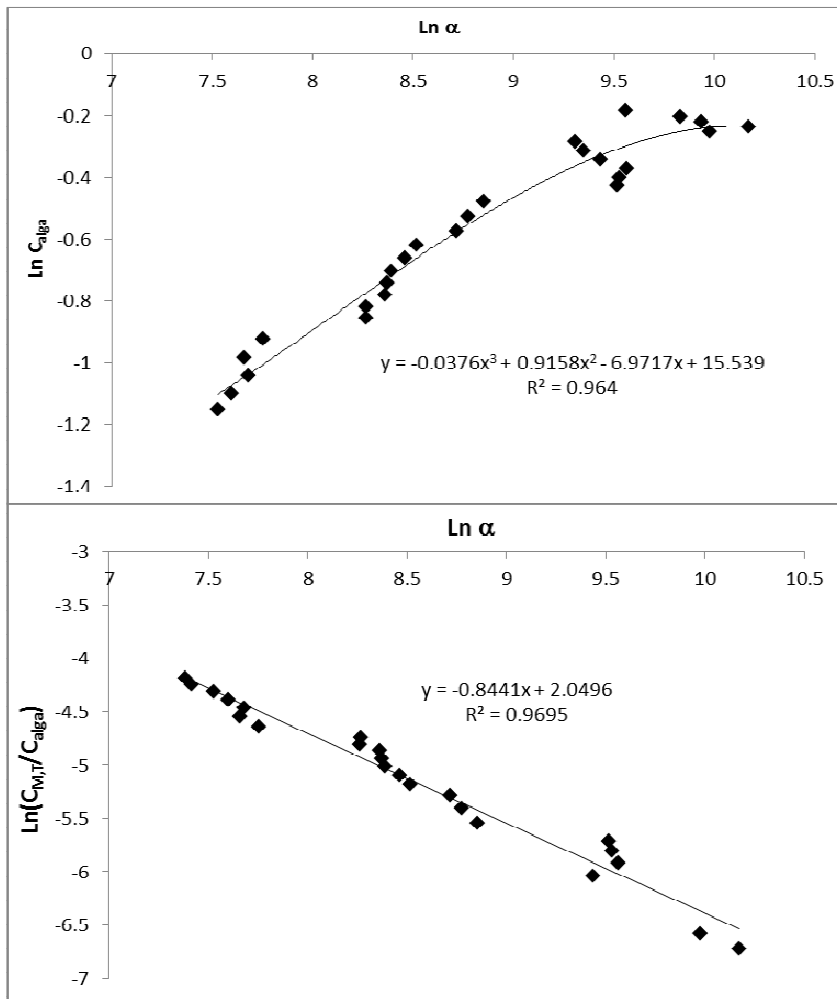
$C_{Zn,T}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$C_{Zn}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$C_{ZnL}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$\text{Ln } \alpha^a$	$\text{Ln } C_{\text{alga}}^b$	$\text{Ln} \left( \frac{C_{Zn,T}}{C_{\text{alga}}} \right)$	$\text{Log } \theta^c$	$\text{Log } K_{DEF}$
1,53	1,08E-10	1,525E-06	9,558552	-0,18572	-7,30461	-5,74	9,87
1,92	1,03E-10	1,917E-06	9,83386	-0,20252	-7,06708	-5,63	9,94
2,30	1,11E-10	2,295E-06	9,938247	-0,21905	-6,87777	-5,54	9,93
2,66	1,01E-10	2,661E-06	10,17505	-0,23531	-6,72067	-5,47	10,02
3,02	1,4E-10	3,016E-06	9,979451	-0,25131	-6,58663	-5,41	9,84
3,69	3,34E-10	3,692E-06	9,310426	-0,28257	-6,36657	-5,31	9,33
4,33	3,75E-10	4,328E-06	9,352585	-0,31287	-6,19024	-5,23	9,29
4,93	3,93E-10	4,927E-06	9,436506	-0,34229	-6,04349	-5,16	9,28
5,49	3,86E-10	5,493E-06	9,564096	-0,37086	-5,91806	-5,10	9,32
6,03	4,38E-10	6,027E-06	9,530405	-0,39864	-5,80868	-5,05	9,25
6,53	4,81E-10	6,533E-06	9,517289	-0,42567	-5,71182	-5,00	9,21
7,47	1,07E-09	7,467E-06	8,852766	-0,47763	-5,54631	-4,92	8,76
8,31	1,29E-09	8,312E-06	8,774163	-0,52702	-5,40836	-4,85	8,67
9,08	1,48E-09	9,079E-06	8,718825	-0,57409	-5,29023	-4,79	8,60
9,78	1,96E-09	9,778E-06	8,51604	-0,61904	-5,18701	-4,74	8,46
10,42	2,2E-09	1,042E-05	8,462491	-0,66206	-5,09537	-4,69	8,41
11,01	2,5E-09	1,101E-05	8,390256	-0,7033	-5,01299	-4,65	8,35
11,55	2,67E-09	1,155E-05	8,371419	-0,74291	-4,93815	-4,61	8,32
12,06	2,82E-09	1,205E-05	8,360983	-0,78101	-4,86959	-4,58	8,29
12,52	3,22E-09	1,252E-05	8,265333	-0,81771	-4,80631	-4,55	8,23
12,96	3,32E-09	1,295E-05	8,268254	-0,85311	-4,74755	-4,52	8,22
13,74	5,9E-09	1,373E-05	7,753026	-0,92036	-4,64122	-4,46	7,98
14,43	6,79E-09	1,442E-05	7,661021	-0,98338	-4,54692	-4,41	7,93
15,04	6,94E-09	1,503E-05	7,681375	-1,04265	-4,46213	-4,37	7,92
15,58	7,81E-09	1,557E-05	7,598652	-1,09861	-4,38502	-4,33	7,87
16,06	8,63E-09	1,606E-05	7,528737	-1,1516	-4,31428	-4,29	7,84
16,50	9,93E-09	1,649E-05	7,415919	-1,20193	-4,24888	-4,26	7,79

<sup>a</sup> calculado com a equação  $\alpha = \frac{C_{M,T}}{C_M}$

<sup>b</sup> concentração de alga em cada ponto da titulação em  $\text{g L}^{-1}$

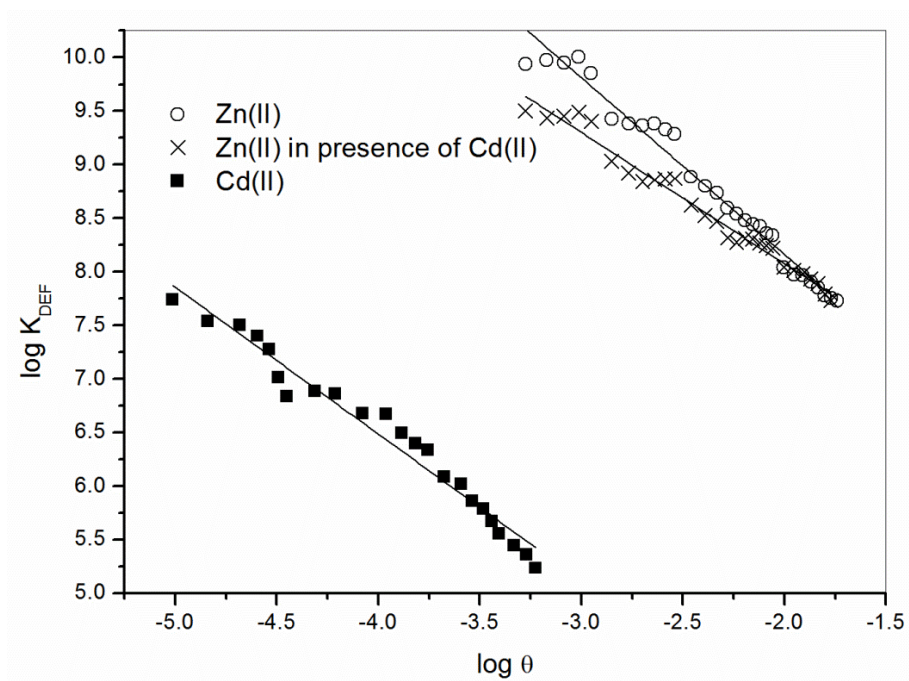
<sup>c</sup> calculado como  $\theta = \frac{C_{ML}}{C_{HL,T}}$

<sup>d</sup> calculado com a equação 3.21



**Figura 16:** Funções polinomial e linear ajustadas para o cálculo dos termos diferenciais da equação 3.21.





**Figura 17:** Funções de equilíbrio diferenciais em função de  $\log \theta$  para biossorção de Cd(II) e Zn(II) por *T. gracilis*.

**Tabela 10:** Parâmetros de adsorção obtidos pelas funções de equilíbrio diferenciais

Adsorbato	$\text{Log } K_{DEF}^0$	$\Gamma$	$R^2$
Cd(II)	$3,4 \pm 0,8$	$0,94 \pm 0,08$	0,98
Zn(II)	$5,4 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,1$	0,97
Zn(II) em presença de Cd(II)	$4 \pm 1$	$0,7 \pm 0,1$	0,97

## 5. CONCLUSÃO

Determinações voltamétricas feitas diretamente em suspensões de *T. gracilis* em água do mar (pH 8,2) mostraram uma maior afinidade e maior capacidade de adsorção de Zn(II) em comparação com Cd(II). Em misturas binárias o fator de capacidade de adsorção de Cd(II) foi diminuído drasticamente devido à competição com Zn(II). Para Zn(II) a competição com Cd(II) não teve efeito significativo nos fatores de capacidade e de intensidade de adsorção. Por outro lado, apesar da diminuição da capacidade de bioadsorção de Cd(II) na presença de Zn(II), nessa situação de competição, observou-se um aumento do parâmetro de intensidade, sugerindo a ocorrência de sítios minoritários com alta afinidade por Cd(II), provavelmente sulfidrílicos, na superfície da alga. Esses resultados sugerem que mesmo na presença de Zn(II), *T. gracilis* pode se ligar fortemente a pequenas quantidades de Cd(II), uma primeira etapa em processos de bioacumulação, os quais podem incorrer em biomagnificação desse metal tóxico através da cadeia alimentar em ecossistemas marinhos.

## 6. PERSPECTIVAS

A continuidade dos estudos iniciados na presente dissertação deve envolver os seguintes experimentos:

- ✓ Comparar os resultados obtidos nas condições experimentais aqui descritas com resultados a serem obtidos por determinação da fração livre de metais após a separação das algas por centrifugação ou filtração.
- ✓ Estudar a influência de componentes da matéria orgânica natural (ácidos húmico e fúlvico) na bioadsorção de Cd(II) e Zn(II) pela *T. gracilis*.
- ✓ Verificar a atividade da enzima anidrase carbônica na presença de Cd(II).
- ✓ Realizar as medidas de bioadsorção usando sensores impressos para determinação de metais potencialmente tóxicos. Tais sensores usam o eletrodo de filme de Hg recoberto com filme polimérico para minimizar efeitos de adsorção de matéria orgânica sobre o eletrodo de trabalho, que não foram sistematicamente avaliados na presente dissertação.
- ✓ Dar continuidade aos estudos para outras espécies de microalgas.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agraz, R., A. Vanderwal, et al. (1994). "Voltammetric study of the interaction of cadmium with bacterial-cells." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **34**(1): 53-59.
- Aleixo, L. M., O. E. S. Godinho, et al. (1987). "Investigation of the effects of dilution and number of points in the performance of a linear method of potentiometric titration of weak bases." Microchemical Journal **35**(2): 153-156.
- Aleixo, L. M., O. E. S. Godinho, et al. (1992). "Potentiometric study of acid-base properties of humic-acid using linear functions for treatment of titration data." Analytica Chimica Acta **257**(1): 35-39.
- Alterio, V., E. Langella, et al. (2012). "Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CDCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*." Biochimie **94**(5): 1232-1241.
- Altmann, R. S. and J. Buffle (1988). "The use of differential equilibrium functions for interpretation of metal-binding in complex ligand systems - its relation to site occupation and site affinity distributions." Geochimica Et Cosmochimica Acta **52**(6): 1505-1519.
- Andrade, A. D., M. C. E. Rollemberg, et al. (2005). "Proton and metal binding capacity of the green freshwater alga *Chaetophora elegans*." Process Biochemistry **40**(5): 1931-1936.
- Bard, A. J. and L. R. Faulkner (2001). Electrochemical methods : fundamentals and applications. New York, Wiley.
- Berbel, F., J. M. Diaz-Cruz, et al. (2001). "Voltammetric analysis of heterogeneity in metal ion binding by humics." Environmental Science & Technology **35**(6): 1097-1102.
- Buffle, J. (1988). Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach. Chichester, West Sussex, England, New York, E. Horwood; Halsted Press distributor.
- Chakraborty, P., Fasfous, II, et al. (2007). "Simultaneous determination of speciation parameters of Cu, Pb, Cd and Zn in model solutions of Suwannee River fulvic acid by pseudopolarography." Analytical and Bioanalytical Chemistry **388**(2): 463-474.

- Cheng, C. J., T. Akagi, et al. (1987). "Simultaneous multielement analysis for trace-metals in sea-water by inductively-coupled plasma atomic emission-spectrometry after batch preconcentration on a chelating resin." *Analytica Chimica Acta* **198**: 173-181.
- Chiu, C. H., Y. H. Sung, et al. (2003). "Simultaneous determination of manganese, iron and cobalt in copper with a multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometer." *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **58**(3): 575-580.
- Christian, G. D. (2004). *Analytical chemistry*. Hoboken, NJ, Wiley.
- Cruz, B. H., J. M. Diaz-Cruz, et al. (2005). "Complexation of heavy metals by phytochelatin: Voltammetric study of the binding of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions by the phytochelatin (gamma-Glu-Cys)(3)Gly assisted by multivariate curve resolution." *Environmental Science & Technology* **39**(3): 778-786.
- da Silva, C. and J. Masini (2000). "Determination of Cu, Pb, Cd, and Zn in river sediment extracts by sequential injection anodic stripping voltammetry with thin mercury film electrode." *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **367**(3): 284-290.
- de Souza, D., S. A. S. Machado, et al. (2003). "Square wave voltammetry. Part 1: Theoretical aspects." *Quimica Nova* **26**(1): 81-89.
- Demirbas, A. (2008). "Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review." *Journal of Hazardous Materials* **157**(2-3): 220-229.
- Dudev, T. and C. Lim (2014). "Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins." *Chemical Reviews* **114**(1): 538-556.
- Esposito, A., F. Pagnanelli, et al. (2001). "Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations." *Hydrometallurgy* **60**(2): 129-141.
- Feng, D. and C. Aldrich (2004). "Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxima*." *Hydrometallurgy* **73**(1-2): 1-10.
- Filella, M. and W. Hummel (2011). "Trace element complexation by humic substances: issues related to quality assurance." *Accreditation and Quality Assurance* **16**(4-5): 215-223.
- Florence, T. M. (1970). "Anodic stripping voltammetry with a glassy carbon electrode mercury-plated in-situ." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **27**(2): 273-&.

- Florence, T. M. (1980). "Comparison of linear scan and differential pulse anodic-stripping voltammetry at a thin mercury film glassy-carbon electrode." Analytica Chimica Acta **119**(2): 217-223.
- Gao, G., K. S. Gao, et al. (2009). "Responses to solar uv radiation of the diatom skeletonema costatum (bacillariophyceae) grown at different zn<sup>2+</sup> concentrations." Journal of Phycology **45**(1): 119-129.
- Godinho, O., J.C. Masini, et al. (1992). "Implications of ignoring electrostatic interaction on simulated and experimental protein titration curves." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **29**(1): 135-141.
- Godinho, O. E. S. and L. M. Aleixo (1981). "Characterization and determination of titratable groups of proteins by linearization of titration curves .1. application to ovalbumin." Analytical Biochemistry **112**(2): 323-328.
- Gonzalez-Davila, M., J. M. Santana-Casiano, et al. (2000). "Copper adsorption in diatom cultures." Marine Chemistry **70**(1-3): 161-170.
- Gran, G. (1952). "Determination of the equivalence point in potentiometric titrations .2." Analyst **77**(920): 661-671.
- Guillard, R. R. and J. H. Ryther (1962). "Studies of marine planktonic diatoms .1. Cyclotella nana hustedt, and Detonula confervacea (cleve) gran." Canadian Journal of Microbiology **8**(2): 229-&.
- Han, X., Y. S. Wong, et al. (2006). "Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, Chlorella miniata." Journal of Colloid and Interface Science **303**(2): 365-371.
- Jiang, W., A. Saxena, et al. (2004). "Elucidation of functional groups on gram-positive and gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy." Langmuir **20**(26): 11433-11442.
- Kiefer, E., L. Sigg, et al. (1997). "Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces." Environmental Science & Technology **31**(3): 759-764.
- Kong, B., B. Y. Tang, et al. (2009). "Kinetic and equilibrium studies for the adsorption process of cadmium(II) and copper(II) onto Pseudomonas aeruginosa using square wave anodic stripping voltammetry method." Journal of Hazardous Materials **167**(1-3): 455-460.
- Langmuir, I. (1916). "The constitution and fundamental properties of solids and liquids Part I Solids." Journal of the American Chemical Society **38**: 2221-2295.

- Lee, K. H., M. Oshima, et al. (2002). "Inductively coupled plasma mass spectrometric determination of heavy metals in sea-water samples after pre-treatment with a chelating resin disk by an on-line flow injection method." Analyst **127**(6): 769-774.
- Locatelli, C. and G. Torsi (2001). "Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference." Journal of Electroanalytical Chemistry **509**(1): 80-89.
- Lund, W. and M. Salberg (1975). "Anodic-stripping voltammetry with florence mercury film electrode - determination of copper, lead and cadmium in sea-water." Analytica Chimica Acta **76**(1): 131-141.
- Maguerroski, K. D., M. Rigobello-Masini, et al. (2013). "A Voltammetric Study on the Adsorption of Cd(II) and Zn(II) on Marine Microalgae *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher." Journal of the Brazilian Chemical Society **24**(6): 922-930.
- Masini, J. (1993). "Evaluation of neglecting electrostatic interactions on the determination and characterization of the ionizable sites in humic substances." Analytica Chimica Acta **283**(2): 803-810.
- Masini, J., G. Abate, et al. (1998). "Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids." Analytica Chimica Acta **364**(1-3): 223-233.
- Masini, J. C., O. E. S. Godinho, et al. (1998). "Determination of ionizable groups of proteins by potentiometric titration in concentrated solutions of guanidine hydrochloride." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **360**(1): 104-111.
- Matheickal, J. T. and Q. M. Yu (1999). "Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae." Bioresource Technology **69**(3): 223-229.
- May, P. M. and M. Filella (2011). "Chemical modelling of multicomponent mixtures: quality assurance is more than just equilibrium data quality assessment." Accreditation and Quality Assurance **16**(4-5): 179-184.
- Miller, J. C. and J. N. Miller (1988). Statistics for analytical chemistry. Chichester, England, New York, E. Horwood; Halsted Press.
- Monteiro, C. M., P. M. L. Castro, et al. (2011). "Capacity of simultaneous removal of zinc and cadmium from contaminated media, by two microalgae isolated from a polluted site." Environmental Chemistry Letters **9**(4): 511-517.

- Morel, F. M. M., J. R. Reinfelder, et al. (1994). "Zinc and carbon co-limitation of marine-phytoplankton." Nature **369**(6483): 740-742.
- Naja, G. and B. Volesky (2006). "Behavior of the mass transfer zone in a biosorption column." Environmental Science & Technology **40**(12): 3996-4003.
- Okamoto, O. K., C. S. Asano, et al. (1996). "Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae)." Journal of Phycology **32**(1): 74-79.
- Palchetti, I., S. Laschi, et al. (2005). "Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals." Analytica Chimica Acta **530**(1): 61-67.
- Parmeggiani, A. C. and J. C. Masini (2003). "Evaluating Scatchard and Differential Equilibrium Functions to study the binding properties of Cu(II) to the surface of mixed species of lyophilized *Spirulina* (Cyanobacteria)." Journal of the Brazilian Chemical Society **14**(3): 416-424.
- Pehrsson, L., F. Ingman, et al. (1976). "Acid-base titrations by stepwise additions of equal volumes of titrant with special reference to automatic titrations .1. theory, discussion of gran functions, hofstee method and 2 proposed methods for calculating equivalence volumes." Talanta **23**(11-1): 769-780.
- Perez-Rama, M., J. A. Alonso, et al. (2002). "Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*." Bioresource Technology **84**(3): 265-270.
- Perez-Rama, M., E. Torres, et al. (2010). "Sorption isotherm studies of Cd(II) ions using living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch." Journal of Environmental Management **91**(10): 2045-2050.
- Perez-Rama, M., E. T. Vaamonde, et al. (2006). "Composition and production of thiol constituents induced by cadmium in the marine microalga *Tetraselmis suecica*." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 128-136.
- Piech, R., B. Bas, et al. (2008). "The cyclic renewable mercury film silver based electrode for determination of manganese(II) traces using anodic stripping voltammetry." Journal of Electroanalytical Chemistry **621**(1): 43-48.
- Pinheiro, J. P., A. M. Mota, et al. (1994). "Complexation study of humic acids with cadmium(II) and lead(II)." Analytica Chimica Acta **284**(3): 525-537.
- Poldoski, J. E. and G. E. Glass (1978). "Anodic-stripping voltammetry at a mercury film electrode - baseline concentrations of cadmium, lead, and copper in selected natural-waters." Analytica Chimica Acta **101**(1): 79-88.

- Price, N. M. and F. M. M. Morel (1990). "Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom." Nature **344**(6267): 658-660.
- Rigobello-Masini, M., E. Aidar, et al. (2003). "Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta)." Brazilian Journal of Microbiology **34**(3): 267-272.
- Rigobello-Masini, M. and J. Masini (2001). "Application of modified Gran functions and derivative methods to potentiometric acid titration studies of the distribution of inorganic carbon species in cultivation medium of marine microalgae." Analytica Chimica Acta **448**(1-2): 239-250.
- Rigobello-Masini, M., E. Aidar, et al. (2003). "Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta)." Brazilian Journal of Microbiology **34**(3): 267-272.
- Rolleberg, M. C., M. L. S. Goncalves, et al. (1999). "Thermodynamics of uptake of cadmium by *Chlorella marina*." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **48**(1): 61-68.
- Sanna, G., M. I. Pilo, et al. (2000). "Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes." Analytica Chimica Acta **415**(1-2): 165-173.
- Savvaidis, I., M. N. Hughes, et al. (2003). "Differential pulse polarography: a method for the direct study of biosorption of metal ions by live bacteria from mixed metal solutions." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **84**(2): 99-107.
- Schiewer, S. and B. Volesky (1997). "Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons." Environmental Science & Technology **31**(9): 2478-2485.
- Schiewer, S. and M. H. Wong (2000). "Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae." Chemosphere **41**(1-2): 271-282.
- Schijf, J. and A. M. Ebling (2010). "Investigation of the Ionic Strength Dependence of *Ulva lactuca* Acid Functional Group pK(a)s by Manual Alkalimetric Titrations." Environmental Science & Technology **44**(5): 1644-1649.
- Serafim, D. M. and N. R. Stradiotto (2008). "Determination of sulfur compounds in gasoline using mercury film electrode by square wave voltammetry." Fuel **87**(7): 1007-1013.



- Seymour, M. D., J. W. Clayton, et al. (1977). "Determination of pka values of acid components in atmospheric condensates by linearization of segmented titration curves." Analytical Chemistry **49**(9): 1429-1432.
- Sheng, P. X., Y. P. Ting, et al. (2004). "Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms." Journal of Colloid and Interface Science **275**(1): 131-141.
- Sherigara, B. S., Y. Shivaraj, et al. (2007). "Simultaneous determination of lead, copper and cadmium onto mercury film supported on wax impregnated carbon paste electrode - Assessment of quantification procedures by anodic stripping voltammetry." Electrochimica Acta **52**(9): 3137-3142.
- Skoog, D. A., D. M. West, et al. (1996). Fundamentals of analytical chemistry. Fort Worth, Saunders College Pub.
- Sunda, W. G. and S. A. Huntsman (1998). "Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater." Environmental Science & Technology **32**(19): 2961-2968.
- Svancara, I., C. Prior, et al. (2010). "A Decade with Bismuth-Based Electrodes in Electroanalysis." Electroanalysis **22**(13): 1405-1420.
- Tarley, C. R. T. and M. A. Z. Arruda (2004). "Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents." Chemosphere **54**(7): 987-995.
- Van Leeuwen, H., R. Cleven, et al. (1989). "Voltammetric techniques for complexation measurements in natural aquatic media - role of the size of macromolecular ligands and dissociation kinetics of complexes." Pure and Applied Chemistry **61**(2): 255-274.
- Van Leeuwen, H. P. and R. M. Town (2003). "Electrochemical metal speciation analysis of chemically heterogeneous samples: The outstanding features of stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential." Environmental Science & Technology **37**(17): 3945-3952.
- Vilar, V. J. P., C. M. S. Botelho, et al. (2009). "Copper removal by algal biomass: Biosorbents characterization and equilibrium modelling." Journal of Hazardous Materials **163**(2-3): 1113-1122.
- Volesky, B. (1990). Biosorption of heavy metals. Boca Raton, Fla., CRC Press.

- Volesky, B. (1994). "Advances in biosorption of metals - selection of biomass types." FEMS Microbiology Reviews **14**(4): 291-302.
- Volesky, B. (2001). "Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century." Hydrometallurgy **59**(2-3): 203-216.
- Volesky, B. (2003). "Biosorption process simulation tools." Hydrometallurgy **71**(1-2): 179-190.
- Volesky, B. (2007). "Biosorption and me." Water Research **41**(18): 4017-4029.
- Volesky, B. and Z. R. Holan (1995). "Biosorption of heavy-metals." Biotechnol Prog **11**(3): 235-250.
- Waller, P. A. and W. F. Pickering (1990). "Evaluation of labile metal in sediments by anodic-stripping voltammetry." Talanta **37**(10): 981-993.
- Zhu, W. W., N. Bing, et al. (2007). "Simultaneous determination of chromium(III) and cadmium(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry on a stannum film electrode." Talanta **72**(5): 1733-1737.

## **8. SÚMULA CURRICULAR**

### ***DADOS PESSOAIS***

Kamila dos Santos Maguerroski

Curitiba – PR – 24 de dezembro de 1985

### ***EDUCAÇÃO***

Colégio Elisa Andreoli – São José – SC – 2002

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2009.  
Bacharelado em Química

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2009  
Bacharelado em Química Tecnológica

### ***OCUPAÇÃO***

Instrutora de Educação Profissional da Unidade Integrada SESI/SENAI de Niquelândia de setembro de 2012 até janeiro de 2014.

### ***PUBLICAÇÕES***

Maguerroski, Kamila dos Santos; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C.. Determinação do ácido rosmarínico usando um biossensor contendo peroxidase imobilizada em quitosana reticulada. 18<sup>º</sup> Seminário de Iniciação Científica da UFSC – Florianópolis - SC – outubro de 2008.

Maguerroski, Kamila dos Santos; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C.. Determinação de ácido rosmarínico usando biossensor contendo líquido iônico e peroxidase de vegetal. 16-SBQSul; XVI Encontro de Química da região sul - Blumenau – SC – novembro de 2008.

Maguerroski, Kamila dos Santos; Fernandes, S.C.; Franzoi, A.C.; Vieira, I.C.(2008) "Pine nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor" Enzyme and Microbial Technology, 44: 400-405

Maguerroski, Kamila dos Santos; SILVA, V. D.; Nascimento, M.G. . Bio-hidrogenação de 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. 17-SBQ-sul; XVII Encontro de química da região sul - Rio grande – RS – novembro de 2009.

Maguerroski, Kamila dos Santos; Rigobello-Masini; Masini, Jorge Cesar . Determinação de sítios ionizáveis na superfície da microalga *Tetraselmis gracilis* por titulação potenciométrica ácido-base - 18-SBQ-sul - XVIII Encontro de química da região sul - Curitiba- PR – novembro de 2010.

Maguerroski, K. D., M. Rigobello-Masini, et al. (2013). "A Voltammetric Study on the Adsorption of Cd(II) and Zn(II) on Marine Microalgae *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher." Journal of the Brazilian Chemical Society **24**(6): 922-930.