

Ao Nuno André, aos meus filhos
Tomás e Maria e às minhas sobrinhas
Ana, Beatriz e Isabel

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor José António Teixeira a oportunidade que me ofereceu para dar continuidade ao trabalho iniciado no Mestrado, permitindo-me descobrir as potencialidades e os desafios da biorremediação de águas residuais contaminadas com metais pesados, uma área científica que passei a considerar apaixonante. Também ao longo deste meu percurso académico fico a dever-lhe vários ensinamentos, científicos e de carácter pessoal. O seu pragmatismo, objectividade e optimismo contribuíram de forma decisiva para a evolução do meu trabalho e servem-me de modelo na minha actividade profissional.

Agradeço ainda à Doutora Teresa Tavares a dedicação com que orientou o meu trabalho, a força e incentivos transmitidos nos momentos mais difíceis e o esforço de revisão final desta dissertação.

Estou igualmente grata a ambos os meus orientadores pela compreensão e facilidades que sempre demonstraram perante a minha intermitência na dedicação a este projecto, fruto da minha situação profissional.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia agradeço o apoio financeiro mediante a atribuição de uma bolsa de Doutoramento, no âmbito do Programa PRAXIS XXI, BD/15945/98.

Uma colaboração preciosa à realização deste trabalho foi a da indústria de cerveja UNICER, sediada em Leça do Balio, que autorizou a utilização da *S. cerevisiae* e das drêches. No período de duração do trabalho experimental foram vários os funcionários do laboratório de microbiologia que incomodei semanalmente para a recolha de amostras de levedura. Muito obrigada a todos.

Devo ainda agradecimentos à Doutora Lurdes Pereira, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, por toda a ajuda relativa à preparação das amostras para a microscopia electrónica de transmissão. Sem ela não teria sido possível “ver” o resultado do meu trabalho tão de perto.

Na recta final do trabalho experimental contei ainda com a inestimável ajuda do Bruno Fernandes. Para além de tudo o que está implícito a uma colaboração desta natureza, e do quanto foi enriquecedor conviver com um jovem tão activo e interessado, agradeço ao Bruno por todos os bidões de água destilada que carregou quando já estava “muito grávida” da minha filha.

Não posso deixar de agradecer ao Hugo Figueiredo todo o apoio relativo à espectroscopia de infravermelhos, incluindo a paciência com o arranjo gráfico dos espectros obtidos.

Ao meu colega Mestre Álvaro Queiroz devo várias aulas sobre a utilização do *software* MATLAB, muito úteis para a fase de apresentação dos resultados. Também a ele agradeço a paciência que teve com esta péssima aluna!

O ambiente de trabalho que encontrei no Departamento de Engenharia Biológica é sem dúvida um dos marcos mais importantes dos anos que lá passei. Para além dos conhecimentos científicos que pude apreender, a camaradagem e as amizades que fiz ao longo destes anos entre docentes,

funcionários e colegas nunca poderão ser esquecidos. De entre estes não posso deixar de lembrar com especial carinho a Ana Paula e a Lúvia que além da amizade partilharam comigo tantas viagens entre o Porto e Braga, tornando os milhares de quilómetros percorridos muito mais fáceis de suportar.

Também na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viana do Castelo encontrei apoios institucionais, nomeadamente com facilidades ao nível do arranjo dos horários para me libertar mais tempo para as deslocações ao DEB, e também o incentivo permanente dos colegas. Agradeço em especial àqueles que de alguma forma foram sobrecarregados para que pudesse dedicar-me com mais afinco à realização deste trabalho.

Os agradecimentos dos dois últimos parágrafos culminam numa colega, primeiro no DEB e depois na ESA-IPVC, que rapidamente se transformou numa das minhas Amigas: a Cristininha. Nos últimos anos tem sido um permanente porto de abrigo nos piores momentos, uma alavanca e um pilar para a concretização de projectos que de outra forma não passariam de utopias.

Aos meus amigos de sempre agradeço toda a força e amizade. Nos últimos tempos bem sabem que a vossa presença tem um significado especial para mim. À Manela e ao João devo ainda o acolhimento do Tomás como um membro da família. A semana de férias e os fins-de-semana fantásticos que lhe proporcionaram, além de o fazerem verdadeiramente feliz, também contribuíram decisivamente para que avançasse na escrita desta dissertação.

Os últimos agradecimentos vão para aqueles ocupam o primeiríssimo lugar no meu coração: a família, sendo impossível passar para palavras aquilo que verdadeiramente merecem. Os meus pais e os meus sogros revelaram-se incansáveis na sua ajuda, em especial por também terem desempenhado o papel de super-avós a tempo inteiro. Não posso deixar de ainda agradecer à Cândida as saborosíssimas sopas com couves da Tareca e todos os jantares que nos tem preparado. Além de salvarem os meus filhos de um período de má nutrição, todas as vitaminas ingeridas me foram úteis para superar o esforço dos últimos tempos. Aos meus pais devo ainda o incentivo pela minha incursão na investigação, sem o qual não teria chegado tão longe. Também à minha irmã, cunhados e sobrinhas estou grata pelo apoio e carinho constante. À Diana ao Filipe e à Beatriz agradeço ainda a compreensão pela minha ausência na fase difícil que têm atravessado. Aos meus queridos filhos e marido tenho de começar por me desculpar pela constante ausência que marcaram os últimos meses. Ao Nuno André devo toda a perseverança e determinação para concluir este percurso, aos meus filhos a inspiração e motivação. Sem o vosso amor e carinho nenhum esforço e sacrifício teria valido a pena. Estou eterna e profundamente grata a todos vós.

Utilização de Sub-produtos da Indústria Cervejeira na Remoção de Crómio Trivalente de Soluções Aquosas

Resumo

O enquadramento legal que define as orientações relativas à protecção ambiental tem evoluído no sentido de restringir os valores paramétricos de descarga de águas residuais para limites mais apertados e fomentar uma gestão de resíduos e efluentes industriais assente na minimização da sua produção e na sua reutilização. Esta tendência é, a par da necessidade de reduzir os custos inerentes ao tratamento e deposição de resíduos e efluentes, um dos incentivos ao desenvolvimento tecnológico associado à biorremediação de águas residuais contaminadas com metais pesados recorrendo a biossorventes facilmente disponíveis e com baixo custo, nomeadamente resíduos agrícolas e sub-produtos de processos industriais de fermentação.

A realização deste trabalho, que visou a avaliação do potencial de utilização de dois sub-produtos de uma indústria cervejeira Portuguesa, a levedura *S. cerevisiae* e as drêches, como biossorventes para o tratamento de soluções aquosas de Cr(III) e a contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia emergente que, comparada com os processos tradicionais (e.g. precipitação), tem um melhor desempenho ambiental, veio de encontro aos desígnios acima referidos. Os objectivos específicos do presente estudo incidiram sobre a caracterização da cinética, equilíbrio e mecanismo de interacção entre os biossorventes e o Cr(III), assim como a avaliação do respectivo desempenho em sistema aberto numa coluna de leito fluidizado. Os ensaios com as drêches envolveram a utilização da biomassa sem a aplicação de pré-tratamentos, e da biomassa submetida a um tratamento alcalino com NaOH, designados respectivamente por DST e DCT.

Os estudos cinéticos, efectuado em sistemas fechados com soluções de Cr(III) de concentração inicial (C_i) entre os 10 e os 400 mg.L⁻¹, revelaram que numa primeira fase, com uma duração de 2-7 h para as drêches e de 1-3 h para a *S. cerevisiae* dependendo de C_i , a acumulação de Cr(III) é mais rápida e segue um comportamento que é bem descrito pelo modelo de pseudo-segunda ordem, apontando para a quimiossorção como sendo a etapa limitante da sua velocidade. A partir desse período a acumulação de Cr(III) passa a ser mais lenta, verificando-se que a difusão intraparticular passa a contribuir significativamente para a velocidade global do processo.

Os ensaios posteriores, realizados com a finalidade de esclarecer as interacções entre o Cr(III) e os biossorventes, nomeadamente pelo estudo da evolução do pH do meio, do efluxo de cationes e pela caracterização da superfície da biomassa por espectroscopia de infravermelhos, vieram corroborar estes resultados, apontando para a troca iónica como a reacção interveniente na fase inicial da sorção de metal.

No caso da acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* foi ainda identificada, recorrendo respectivamente à observação de amostras por microscopia electrónica de transmissão (TEM) e de varrimento (SEM), a acumulação intracelular de Cr(III) e a sua deposição na superfície celular na forma de precipitados. A bioacumulação, observada a partir das 2 h de contacto com uma solução de $C_i = 25$ mg.L⁻¹, revela que o metal se concentra em determinados locais do citoplasma onde também aparece P e outros metais (K, Ca e Zn), sendo provável que correspondam a grânulos de fosfato. A precipitação do Cr(III) foi notada para tempos de contacto longos (superiores a 74 h em sistema aberto). A natureza dos precipitados não foi averiguada, podendo corresponder a complexos do metal com compostos intracelulares azotados, libertados em

consequência da permeabilização da membrana celular ou da lise das células, ou a hidróxidos metálicos formados pelo facto de o pH do meio tender para valores neutros ao longo dos ensaios, ou a ambos.

A dessorção do Cr(III) acumulado pela *S. cerevisiae* demonstrou ser pouco eficiente com os vários eluentes testados (Na_2CO_3 , EDTA, CH_3COOH , HCl, H_2SO_4 e HNO_3) e dependente do tempo de contacto da levedura com a solução de Cr(III). A irreversibilidade, que aumenta com o tempo de incubação, pode estar relacionada com a acumulação intracelular e a formação de precipitados. Em três ciclos de sorção-dessorção de 30 min, o eluente que conduziu aos melhores resultados de recuperação de Cr(III) foi H_2SO_4 que, à concentração de 0,1 M, apresentou uma eficiência de 52, 43 e 35 % respectivamente no primeiro, segundo e terceiro ciclo. No entanto quando se monitorizou a acumulação de Cr(III), que se sucede a um ciclo de dessorção, ao longo de 24 h, verificou-se o pior desempenho da biomassa nos 2º e 3º ciclos com este eluente.

O modelo de Langmuir é o que melhor se ajusta aos resultados experimentais relativos às isotérmicas de sorção. A capacidade máxima de acumulação de metal (q_{max}) foi superior para as DST, seguindo-se as DCT e a *S. cerevisiae*, respectivamente com os valores de 16,68, 13,64 e 12,57 mg.g^{-1} . No entanto, no sistema aberto, a previsão de desempenho obtida utilizando um modelo que resulta da aplicação da equação do modelo de Langmuir na equação de balanço mássico a um reactor contínuo perfeitamente agitado não descreve bem os resultados experimentais para nenhum dos bio-sorventes, nas condições operacionais testadas. Verificou-se ainda que a precipitação do Cr(III) induzida pela *S. cerevisiae* lhe permite superar a capacidade máxima de acumulação calculada pelo modelo de Langmuir, ultrapassando ainda o desempenho das drêches, com uma capacidade de acumulação superior num menor tempo de operação.

Considerando a capacidade de acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* e pelas DST, os respectivos desempenhos em sistema aberto e atendendo ao facto de não terem sido submetidas a pré-tratamentos, conclui-se que ambas podem ser consideradas bio-sorventes promissores para o tratamento de águas contaminadas com Cr(III).

Palavras chave: drêches, *Saccharomyces cerevisiae*, sorção, dessorção, cinética, equilíbrio, metais pesados

Cr(III) Biosorption from Aqueous Solutions – The Use of Spent Grain and Residual Biomass from Beer Production

Abstract

In order to reduce the environmental impact associated to industrial activities, environmental regulations tend to become more restrictive concerning the contaminants concentration limits allowed in wastewater discharge. These circumstances, together with the wastewater and waste management guidelines, regarding integrated prevention and pollution control, encourages technological developments to achieve cleaner production methods and wastewater treatment technologies more eco-friendly and cost efficient. Heavy metal contaminated wastewater bioremediation, using highly available and low-cost materials such as agricultural by-products or biomass residual from industrial fermentation operations, is receiving increasing attention and can be considered a promising alternative.

The present work, seeking the evaluation of *S. cerevisiae* and spent grain residual from a Portuguese brewing industry as potential biosorbents for Cr(III) contaminated wastewaters and the development of an emerging technology more eco-friendly than the traditional ones (e.g. metal precipitation), can be considered to accomplish these purposes. The study main goals were the kinetics, equilibrium and interaction mechanism metal-biosorbent characterization and to assess their performance in a continuous column system, operating with a fluidized bed. The experimental essays with spent grain included the material without pretreatments (NTSG) and spent grain treated with NaOH, designated by treated spent grain (TSG).

Kinetic studies were performed in batch systems with Cr(III) solutions at the initial concentration (C_i) ranging from 10 to 400 mg.L⁻¹. Experimental data revealed that Cr(III) uptake follows a rapid initial step, well described by the pseudo-second order kinetic model up to 2-7 h and 1-3 h, respectively with spent grain and *S. cerevisiae*, indicating metal chemisorption to be the rate limiting step. Beyond this period Cr(III) uptake becomes considerably slower, with intraparticle diffusion assuming an important role in the process global kinetics.

Additional investigation, involving changes in medium pH, cation efflux and biosorbent surface characterization with spectroscopic infrared analyses, contributed to elucidate Cr(III)-biosorbent interaction mechanism, and confirmed that chemisorption takes part of the metal uptake mechanism, with ion change being the most probable reaction occurring.

Cr(III) uptake onto *S. cerevisiae* further involved intracellular accumulation and surface precipitation, identified respectively with transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) observations. Bioaccumulation was recognized in cells with more than 2 h of contact with a 25 mg.L⁻¹ Cr(III) solution. The presence of Cr(III) in electron dense areas was confirmed by EDS analyses, where P and other metals (K, Ca and Zn) were also identified, suggesting the occurrence of a cellular metal detoxifying mechanism involving phosphates. Metal precipitation was identified in samples collected after long sorption times (more than 74 h in the column system). Metal precipitates composition was not ascertained being possible that they consist of complexes with intracellular compounds rich in N, leaked in result of membrane permeabilization or cell lysis, or comprise metallic hydroxides or both compounds.

Cr(III) desorption from *S. cerevisiae* was not very effective with the eluents tested (Na₂CO₃, EDTA, CH₃COOH, HCl, H₂SO₄ and HNO₃) exhibiting a significant dependence with sorption time. The observed

metal binding irreversibility increases with contact time, and can be related to intracellular accumulation and metal precipitation. In three consecutive sorption-desorption cycles, each of them with a 30 min duration, the best eluant was H₂SO₄ 0,1 M with recovery efficiencies of 52, 43 and 35 % respectively in the first, second and third cycle. However, when Cr(III) uptake following a desorption cycle, was monitored for 24 h, data pointed out this eluant to be the one that gives rise to the lower performance in the succeeding sorption cycles.

Langmuir model proved to be the equilibrium model that better fits to experimental data. Maximum uptake capacity (q_{max}) was determined to be higher for NTST, following TSG and *S. cerevisiae*, respectively with 16,68, 13,64 and 12,57 mg.g⁻¹. Nevertheless, the modelling study of Cr(III) sorption in the column systems, using a mass balance model to a continuous stirred tank reactor which included the Langmuir equilibrium isotherm, did not give reasonable predictions for the biosorbents performances for the tested operational conditions. Furthermore it was observed that Cr(III) precipitation, induced by *S. cerevisiae*, enhanced its metal uptake to values higher than q_{max} previously calculated and even exceeding spent grain performance, with a higher uptake capacity for a shorter operation time.

Considering *S. cerevisiae* and NTSG uptake capacities, their performances in the column systems and the fact that they were not submitted to pretreatments, it may be concluded that these industrial by-products can be both considered as promising biosorbents to treat Cr(III) contaminated wastewaters.

keywords: spent grain, *Saccharomyces cerevisiae*, sorption, desorption, kinetics, equilibrium, heavy metals

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – Introdução	1
1.1 Enquadramento e objectivos do trabalho	3
1.2 Metais pesados	6
1.2.1 Metais pesados no ambiente	7
1.2.2 Metais pesados e a saúde	9
1.2.3 O crómio	11
1.3 Tratamento de águas residuais com metais pesados	15
1.3.1 Tecnologias convencionais	15
1.3.2 Utilização de biomassa	20
1.3.2.1 Tipos de biomassa	21
1.3.2.2 Vantagens e aplicações	23
CAPÍTULO 2 – Acumulação de metais por bioSORVENTES	31
2.1 Interações metal-microrganismos	33
2.1.1 Mobilização de metais	35
2.1.1.1 Lixiviação	35
2.1.1.2 Alquilação	37
2.1.2 Imobilização de metais	37
2.1.2.1 Remoção de metais independente do metabolismo	38
2.1.2.2 Remoção de metais dependente do metabolismo – bioacumulação	39
2.2 Mecanismos de acumulação de metais	41
2.2.1 Adsorção	42
2.2.2 Troca iónica	43
2.2.3 Precipitação	43
2.2.3.1 Redução dissimilatória de metais e precipitação	44

2.2.3.2	Precipitação por sulfuretos	45
2.2.3.3	Precipitação por fosfatase	45
2.2.3.4	Precipitação por oxalatos e carbonatos	45
2.2.4	Oxidação-redução	46
2.2.5	Complexação	46
2.3	Variáveis que afectam a biossorção	47
2.3.1	Características iónicas do metal	47
2.3.2	Condições ambientais	50
2.3.2.1	pH	50
2.3.2.1.1.	Especiação dos metais	51
2.3.2.1.2.	Ionização dos sítios de ligação da biomassa	52
2.3.2.2	Presença de outros iões/substâncias	53
2.3.2.3	Temperatura	54
2.3.2.4	Composição do meio de cultura	55
2.3.3	Características do biossorvente	56
2.3.3.1	Sítios de ligação	56
2.3.3.2	Biomoléculas com propriedades de ligação a metais	59
2.3.3.3	Estado fisiológico da célula	61
2.3.3.3.1.	Efeito da viabilidade celular	61
2.3.3.3.2.	Idade das células	64
2.3.3.3.3.	Estado nutricional	65
2.4	Pré-tratamentos	66
2.4.1	Alteração do estado iónico da biomassa: Protonação e/ou saturação com iões metálicos leves	67
2.4.2	Imobilização/Granulação da biomassa	67
2.4.3	Modificação química da biomassa	70
2.4.4	Outros pré-tratamentos	71
2.5	Quantificação das interacções metal-biomassa	72
2.5.1	Modelo de Langmuir	74
2.5.2	Modelo de Freundlich	77

2.6	Cinética de sorção	77
2.6.1	Modelos de sorção-reacção	79
2.6.1.1	Modelo de Lagergren – reacção de pseudo-primeira ordem	79
2.6.1.2	Modelo de pseudo-segunda ordem	81
2.6.1.3	Modelo de Elovich	82
2.6.2	Modelos cinéticos baseados na difusão	82
2.6.2.1	Difusão externa	82
2.6.2.2	Difusão interparticular	83
2.6.2.3	Difusão intraparticular	83
2.6.3	Escolha do modelo cinético	84
2.7	Energia de activação da biossorção	85
2.8	Dessorção	86
2.9	Sistemas de biossorção em contínuo	88
2.9.1	Configuração do sistema	88
2.9.2	Avaliação do desempenho dos sistemas de biossorção	89
2.9.2.1	Colunas de leito fixo	89
2.9.2.2	Reactores contínuos perfeitamente agitados	94
CAPÍTULO 3	– Biossorventes	97
3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
3.1.1	Caracterização química da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
3.1.2	Composição da parede celular	98
3.1.3	Estrutura molecular da parede celular	100
3.1.4	Floculação	102
3.1.5	Propriedades de ligação a metais	104
3.1.5.1	Utilização de células viáveis vs. células não viáveis	104
3.1.5.2	Distribuição sub-celular dos metais	106
3.1.5.3	Papel dos grupos funcionais da parede celular	108
3.1.5.4	Papel dos exopolissacáridos	109

3.2 Drêches	110
3.2.1 Composição	110
3.2.2 Propriedades de ligação a metais	111
CAPÍTULO 4 – Procedimento experimental	115
4.1 Preparação dos biossorventes	115
4.1.1 Suspensão de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	115
4.1.2 Drêches	115
4.2 Soluções.	116
4.2.1 Soluções de crómio (III)	116
4.2.2 Soluções padrão para análise por espectrofotometria de absorção atómica	116
4.2.3 Soluções de ácidos, bases e eluentes	116
4.3 Ensaio em sistema fechado	117
4.3.1 Ensaio de cinética e isotérmicas de equilíbrio	117
4.3.2 Dessorção de Cr(III)	117
4.3.2.1 Estudo do efeito do tempo de sorção e da razão S/L na recuperação de Cr(III)	118
4.3.2.2 Optimização do tempo de contacto entre a biomassa e o eluente	118
4.3.3 Ciclos de sorção-dessorção	118
4.4 Ensaio em sistema aberto	119
4.4.1 Ensaio com levedura	120
4.4.2 Ensaio com drêches	121
4.5 Métodos analíticos	121
4.5.1 Determinação da concentração de biossorvente	121
4.5.1.1 Método para a determinação de sólidos totais	121
4.5.1.2 Método para a determinação de sólidos suspensos	121
4.5.2 Determinação da concentração de crómio, cálcio, potássio e magnésio	122
4.5.2.1 Método	122
4.5.3 Avaliação do efluxo de compostos intracelulares de baixo peso molecular	122
4.5.3.1 Método	122

4.5.4	Desfloculação da levedura	123
4.5.4.1	Reagentes	123
4.5.4.2	Método	123
4.5.5	Digestão das amostras	123
4.5.6	Espectroscopia de infravermelho associada a transformadas de Fourier (FTIR)	124
4.5.6.1	Método	124
4.5.7	Determinação da viabilidade da levedura	124
4.5.7.1	Reagentes	125
4.5.7.2	Método	125
4.5.8	Preparação das células de levedura para observação ao microscópio electrónico de varrimento (SEM)	125
4.5.8.1	Reagentes	126
4.5.8.2	Método	126
4.5.9	Preparação das células de levedura para observação ao microscópio electrónico de transmissão (TEM)	126
4.5.9.1	Reagentes	127
4.5.9.2	Método	127
4.6	Lavagem do material	128
4.7	Procedimentos de segurança e protecção ambiental	128
CAPÍTULO 5 – Equilíbrio e cinética de sorção e dessorção de Cr(III) na <i>S. cerevisiae</i> e nas drêches		131
5.1	Objectivos	131
5.2	Estudos cinéticos	131
5.2.1	Cinética de acumulação de Cr(III)	132
5.2.1.1	Cinética de acumulação de Cr(III) pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	132
5.2.1.2	Cinética de acumulação de Cr(III) pelas drêches	136
5.2.1.3	Ajuste ao modelo de difusão intraparticular	141
5.2.1.4	Ajuste a modelos de reacção química	144
5.3	Equilíbrio de sorção de Cr(III) na <i>S. cerevisiae</i> e nas drêches	151
5.4	Dessorção do Cr(III) ligado a <i>S. cerevisiae</i>	156

5.4.1	Optimização da razão S/L	156
5.4.2	Seleção do melhor tempo de contacto entre a <i>S. cerevisiae</i> e as soluções de Cr(III)	158
5.4.3	Optimização do tempo de contacto entre a biomassa e o eluente	161
5.4.4	Ciclos de sorção-dessorção	164
5.5	Comparação com outros sistemas de biossorção	168
5.6	Conclusões	169
CAPÍTULO 6	– Caracterização do mecanismo de interacção metal-biomassa	173
6.1	Objectivos	175
6.2	Efeito do pH	175
6.3	Efluxo de catiões	181
6.4	Efluxo de material intracelular	189
6.5	Viabilidade celular	193
6.6	Caracterização química da superfície dos biossorbentes por espectroscopia de infravermelho	198
6.7	Microscopia electrónica de transmissão e análises EDS	205
6.8	Conclusões	212
CAPÍTULO 7	– Desenvolvimento de um sistema aberto para o tratamento de soluções aquosas com Cr(III)	215
7.1	Objectivos	217
7.2	Análise do desempenho do sistema aberto na remoção de Cr(III)	217
7.2.1	Remoção de Cr(III) de soluções aquosas pela levedura <i>S. cerevisiae</i> em sistema aberto	219
7.2.2	Remoção de Cr(III) de soluções aquosas num sistema aberto com drêches	233
7.3	Conclusões	236

CAPÍTULO 8 – Conclusões gerais e sugestões para trabalho futuro	239
8.1 Conclusões gerais	241
8.2 Sugestões para trabalho futuro	243
CAPÍTULO 9 – Referências bibliográficas	245

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Destino dos metais pesados libertados de forma descontrolada no ambiente e a sua acumulação ao longo da cadeia alimentar. Adaptado de Volesky (2001).	7
Figura 2.1 – Mecanismos que contribuem para a acumulação, transformação e redução de toxicidade de metais. Adaptado de Gadd (1996).	33
Figura 2.2 – Mecanismos de biossorção. a) classificação de acordo com a dependência ao metabolismo celular; b) classificação de acordo com a localização, na célula, do metal removido. Adaptado de Veglio e Beolchini (1997).	37
Figura 2.3 – Especiação do Crómio (III) em função do pH do meio. Adaptado de Yun <i>et al.</i> (2001).	51
Figura 2.4 – Isotérmica típica para uma solução de um único sorbato. Adaptado de Kratochvil e Volesky (1998a) e Volesky (2004).	76
Figura 2.5 – Diagrama esquemático para a implementação de um sistema de biossorção a) colunas de leito fixo, adaptado de Davis <i>et al.</i> (2003b); b) reactor de leito fluidizado, adaptado de Volesky (2001).	88
Figura 2.6 – Curva de <i>breakthrough</i> obtida numa coluna de leito fixo. Adaptado de Kratochvil e Volesky (1998a).	90
Figura 3.1 – Organização molecular da parede celular da <i>S. cerevisiae</i> . Adaptado de Klis <i>et al.</i> (2006).	102
Figura 4.1 – Esquema representativo da instalação de remoção de crómio (III) em sistema aberto.	119
Figura 4.2 – Fotografia da instalação de remoção de crómio (III) em sistema aberto.	119
Figura 5.1 – Evolução da concentração de Cr(III) em solução ao longo do tempo de contacto com a suspensão de <i>S. cerevisiae</i> , para $C_i = 200, 100, 50, 25$ e 10 mg.L^{-1} .	134
Figura 5.2 – Perfil de acumulação de Cr(III) pela <i>S. cerevisiae</i> .	135
Figura 5.3 – Efeito do pH do meio na capacidade de acumulação de Cr(III) pelas drêches ($X = 5 \text{ g.L}^{-1}$). a) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$.	137
Figura 5.4 - Evolução da concentração de Cr(III) em solução ao longo do tempo de contacto com DST e DCT, para $C_i = 400, 300, 200, 100, 50$ e 25 mg.L^{-1} .	138

Figura 5.4 (continuação) – Evolução da concentração de Cr(III) em solução ao longo do tempo de contacto com DST e DCT, para $C_i = 400, 300, 200, 100, 50$ e 25 mg.L^{-1} .	139
Figura 5.5 – Perfil de acumulação de Cr(III) pelas drêches: a) DST; b) DCT.	140
Figura 5.6 – Ajuste dos resultados experimentais ao modelo cinético de difusão intraparticular: a) <i>S. cerevisiae</i> ; b) DST; c) DCT.	142
Figura 5.7 – Ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem aos resultados experimentais de remoção de Cr(III): a) <i>S. cerevisiae</i> ; b) DST; c) DCT.	150
Figura 5.8 – Acumulação de Cr(III) pela <i>S. cerevisiae</i> ao longo do tempo. Ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem.	150
Figura 5.9 – Acumulação de Cr(III) pelas drêches ao longo do tempo: a) DST; b) DCT. Ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem.	151
Figura 5.10 – Ajuste do modelo de Freundlich linearizado aos resultados experimentais: a) <i>S. cerevisiae</i> ; b) drêches.	152
Figura 5.11 – Ajuste do modelo de Langmuir linearizado aos resultados experimentais: a) <i>S. cerevisiae</i> ; b) drêches.	153
Figura 5.12 – Isotérmicas de equilíbrio de biossorção de Cr(III): a) <i>S. cerevisiae</i> ; b) drêches ($\text{pH}_i = 5$; $X = 5 \text{ g.L}^{-1}$). Ajuste do modelo de Langmuir aos resultados experimentais.	154
Figura 5.13 – Eficiência de recuperação de Cr(III) para razão S/L de 4 e 8 g/L (tempo de sorção = 15 min; concentração dos eluentes = 0,1 M; 0,01 M para EDTA).	157
Figura 5.14 – Eficiência de recuperação de Cr(III) em função do tempo de sorção: a) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; c) $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$.	160
Figura 5.15 – Eficiência de recuperação de Cr(III) em função do tempo de contacto com o eluente: a) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; c) $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$.	162
Figura 5.16 – Cr(III) acumulado e recuperado em três ciclos de consecutivos de sorção-dessorção. Duração dos ciclos: 30 min.	165
Figura 5.17 – Perfil de acumulação de Cr(III) para três ciclos de sorção-dessorção (tempo de sorção antes da fase de sorção = 30 min): a) H_2SO_4 ; b) HNO_3 ; c) HCl ; d) CH_3COOH .	168
Figura 6.1 – Evolução do pH e da acumulação de Cr(III) em função do tempo de contacto: comparação com o ensaio em branco.	177
Figura 6.2 – Efluxo de catiões da <i>S. cerevisiae</i> durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 200 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .	183

Figura 6.3 – Efluxo de catiões da <i>S. cerevisiae</i> durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .	183
Figura 6.4 – Efluxo de catiões da <i>S. cerevisiae</i> durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .	184
Figura 6.5 – Efluxo de catiões da <i>S. cerevisiae</i> durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .	184
Figura 6.6 – Efluxo de catiões da <i>S. cerevisiae</i> durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .	185
Figura 6.7 – Espectro de varrimento na zona UV-visível de amostras recolhidas para vários tempos de sorção: a) Ensaio em branco; b) $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$; c) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; d) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; e) $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$; f) $C_i = 200 \text{ mg.L}^{-1}$.	191
Figura 6.8 – Evolução da viabilidade das células de <i>S. cerevisiae</i> ao longo do tempo de sorção.	194
Figura 6.9 – Flocos de leveduras: ensaio em branco ($C_i = 0 \text{ mg.L}^{-1}$): a) 3h; b) 24 h (objectiva 40x).	195
Figura 6.10 – Flocos de leveduras: $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$: a) 3h; b) 24 h (objectiva 40x); c) 24 h (objectiva 100x).	195
Figura 6.11 – Flocos de leveduras: $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$: a) 24 h; b) 48 h (objectiva 40x).	195
Figura 6.12 – Flocos de leveduras: a ₁) e a ₂) amostra inicial ($t = 0$); b) 30 min; c) 2 h; d) 24 h; e) 48 h; f) 75 h; g) 97 h; h) 174 h (objectiva 100x).	196
Figura 6.13 – Flocos de leveduras: $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$: a) 30 min; b) 2 h; c) 24 h (objectiva 100x)...	196
Figura 6.14 – Flocos de leveduras: $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$: a) 30 min; b) 2 h; c) 24 h (objectiva 100x).	197
Figura 6.15 – Comparação do espectro de infravermelho das drêches sem tratamento e com tratamento, antes do contacto com soluções de Cr(III).	201
Figura 6.16 – Espectros de infravermelho das drêches sem tratamento sem contacto com soluções de Cr(III), e após 48 h em contacto com soluções de 50 e 200 mg.L^{-1} .	202
Figura 6.17 – Espectros de infravermelho das drêches com tratamento sem contacto com soluções de Cr(III), e após 48 h em contacto com soluções de 50 e 200 mg.L^{-1} .	203
Figura 6.18 – Espectros de infravermelho da <i>S. cerevisiae</i> sem contacto com soluções de Cr(III) ($t = 0$ e $t = 75 \text{ h}$), e após o contacto com soluções de 10 e 25 e 50 mg.L^{-1} neste metal por diferentes períodos.	204

Figura 6.19 – Espectros EDS de uma célula de <i>S. cerevisiae</i> da suspensão de levedura utilizada como inóculo: a) parede celular; b) interior da célula.	206
Figura 6.20 – Espectros EDS de uma célula de <i>S. cerevisiae</i> com 15 min de contacto com uma solução de Cr(III), sem contraste: a) parede celular; b) interior da célula.	207
Figura 6.21 – Espectros EDS de uma célula de <i>S. cerevisiae</i> com 2 h de contacto com uma solução de Cr(III), com contraste: a) parede celular; b) interior da célula.	208
Figura 6.22 – Espectros EDS de uma célula de <i>S. cerevisiae</i> com 2 h de contacto com uma solução de Cr(III), sem contraste: a) zona de elevada densidade electrónica; b) interior da célula, sem elevada densidade electrónica.	209
Figura 6.23 – Espectros EDS a uma célula de <i>S. cerevisiae</i> com 24 h de contacto com uma solução de Cr(III): a) parede celular, com contraste; b) interior da célula, com contraste; c) interior da célula, sem contraste.	211
Figura 7.1 – Concentração de Cr(III) na corrente de saída do sistema aberto: comparação dos valores experimentais com os teóricos, considerando o regime hidráulico de um reaktor contínuo perfeitamente agitado.	218
Figura 7.2 – Evolução da concentração de <i>S. cerevisiae</i> no interior do sistema aberto para as concentrações iniciais de Cr(III) de 25 e 50 mg.L ⁻¹	220
Figura 7.3 – Curva de <i>breakthrough</i> de Cr(III) para $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ considerando o sistema aberto sem enchimento, os valores obtidos pela simulação com a equação (7.4) e os valores experimentais.	220
Figura 7.4 – Curva de <i>breakthrough</i> de Cr(III) para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ considerando o sistema aberto sem enchimento, os valores obtidos pela simulação com a equação (7.4) e os valores experimentais.	221
Figura 7.5 – Perfil de pH e de concentração de Cr(III) e K na corrente de saída do sistema aberto para as concentrações iniciais de metal de 0, 25 e 50 mg.L ⁻¹	223
Figura 7.6 – Perfil de concentração de Ca e Mg na corrente de saída do sistema aberto para as concentrações iniciais de metal de 0, 25 e 50 mg.L ⁻¹	224
Figura 7.7 – Espectro de varrimento na zona UV-visível de amostras recolhidas na corrente de saída do sistema aberto num ensaio realizado com uma solução de Cr(III) de 50 mg.L ⁻¹	226
Figura 7.8 – Evolução da viabilidade das células de <i>S. cerevisiae</i> ao longo do tempo no sistema aberto, para as concentrações iniciais de 0, 25 e 50 mg.L ⁻¹	226

Figura 7.9 – Perfil de concentração de Cr(III) na corrente de saída do sistema aberto e evolução da concentração de biomassa no seu interior, para as concentrações iniciais de metal de 0, 25 e 50 mg.L ⁻¹	227
Figura 7.10 – Imagens de flocos de levedura obtidas ao fim de: a) 4 h; e b) 165 h de operação do sistema aberto, para a concentração inicial de Cr(III) de 25 mg.L ⁻¹ , e c) 166 h de operação no ensaio em branco.	228
Figura 7.11 – Imagens de preparações de <i>S. cerevisiae</i> recolhidas do interior da coluna ao longo do tempo obtidas por SEM: a) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 0,5 \text{ h}$; b) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 4 \text{ h}$, leveduras e drêche; c) $C_i = 0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 27 \text{ h}$, d) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 21 \text{ h}$; e) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 74 \text{ h}$; f) Imagem igual a e) obtida por electrões retrodifundidos, $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 74 \text{ h}$	230
Figura 7.12 – Imagens de preparações de <i>S. cerevisiae</i> recolhidas do interior da coluna ao longo do tempo obtidas por SEM: a) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 93 \text{ h}$; b) Imagem igual a a) obtida com electrões retrodifundidos, $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 93 \text{ h}$; c) $C_i = 0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 91 \text{ h}$, d) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 141 \text{ h}$; e) Imagem igual a d) obtida por electrões retrodifundidos, $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 141 \text{ h}$	231
Figura 7.13 – Espectros obtidos por análise de raios X aos locais das leveduras indicados por: a) 1 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 0,5 \text{ h}$; b) 2 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 74 \text{ h}$; c) 3 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 93 \text{ h}$; e d) 4 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 141 \text{ h}$, nas Figuras 7.11 e 7.12.	232
Figura 7.14 – Perfil de concentração de Cr(III) na corrente de saída do sistema aberto a operar com $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ sem enchimento, com DST e com DCT.	234
Figura 7. 15- Curva de <i>breakthrough</i> de Cr(III) para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ considerando o sistema aberto sem enchimento, os valores obtidos pela simulação com as equações (7.5) e (7.6) e os valores experimentais.	235

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Tecnologias convencionalmente utilizadas na remoção de metais pesados. Adaptado de Ahluwalia e Goyal (2007), Eccles (1999), Volesky (2001) e Zouboulis <i>et al.</i> (2004).	19
Tabela 1.2 – Resumo das características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.	24
Tabela 2.1 – Classificação em ácidos e bases fortes, fracos e de transição. Adaptado de Mack <i>et al.</i> (2007).	48
Tabela 2.2 – Grupos funcionais intervenientes na biossorção de metais e respectivos valores de pK_a	58
Tabela 4.1 – Reagentes utilizados na preparação de soluções ácidas, básicas e eluentes....	116
Tabela 4.2 – Condições de operação do espectrofotómetro de absorção atómica.	122
Tabela 4.3 – Especificações dos métodos de digestão utilizados para as amostras sólidas e líquidas.	124
Tabela 5.1 – Constantes de difusão intraparticular calculadas para os sistemas de sorção de Cr(III) a <i>S. cerevisiae</i> , DST e DCT.	143
Tabela 5.2 - Parâmetros calculados para o ajuste dos modelos cinéticos de Lagergren e pseudo-segunda ordem aos valores experimentais de acumulação de Cr(III) a DST, DCT e <i>S. cerevisiae</i> , até ao equilíbrio.	146
Tabela 5.3 - Parâmetros calculados para o ajuste dos modelos cinéticos de Lagergren e pseudo-segunda ordem aos valores experimentais de acumulação de Cr(III) a DST, DCT e <i>S. cerevisiae</i> , correspondentes à primeira fase linear da curva de difusão.	148
Tabela 5.4 – Parâmetros dos modelos de Freundlich e de Langmuir obtidos a partir do ajuste aos resultados experimentais da sorção de Cr(III) a <i>S. cerevisiae</i> , DST e DCT.	153
Tabela 5.5 – Valores de pH da suspensão de biomassa nas várias soluções eluentes (valor médio dos três ciclos, medidos no início da fase de dessorção), e valor médio da perda de biomassa resultante da fase de dessorção.	166
Tabela 6.1 – Caracterização da suspensão de <i>S. cerevisiae</i> e do respectivo sobrenadante...	182
Tabela 6.2 – Razão entre a libertação de catiões libertados e o crómio acumulado. Valores corrigidos relativamente ao ensaio em branco.	188

Tabela 6.3 – Bandas de absorção de infravermelho características de alguns grupos funcionais. Adaptado de http://www.spectroscopynow.com/FCKeditor/UserFiles/File/specNOW/eac10815.pdf	200
Tabela 7.1 – Valores calculados para a quantidade de Cr(III) acumulada pelo sistema aberto com <i>S. cerevisiae</i> e para a previsão do modelo traduzido na equação 7.4.	222
Tabela 7.2 - Quantidade de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} libertada no sistema aberto com <i>S. cerevisiae</i> ...	223
Tabela 7.3 – Valores calculados para a quantidade de Cr(III) acumulada pelo sistema aberto com DST e DCT e para a previsão do modelo traduzido nas equação 7.5 e 7.6.	235

Lista de Abreviaturas

- A_0 – factor de frequência independente da temperatura (min^{-1})
- b – constante do modelo de Langmuir (L.g^{-1})
- C – concentração de soluto em solução (mg.L^{-1})
- C_e – concentração de metal na corrente efluente da coluna (mg.L^{-1})
- C_f – concentração final de metal em solução no equilíbrio (mg.L^{-1})
- C_i – concentração inicial de metal em solução (mg.L^{-1})
- C_{out} – concentração dos catiões na corrente de saída do sistema aberto (mg.L^{-1})
- C_p – concentração de metal máxima na corrente de eluição (mg.L^{-1})
- C_t – concentração de soluto no instante t (mg.L^{-1})
- CF – factor de concentração
- d_p – diâmetro da partícula (cm)
- D_h – coeficiente de dispersão hidrodinâmico ($\text{m}^2.\text{h}^{-1}$)
- E – potencial de redução (V)
- E_A – energia de activação (kJ.mol^{-1})
- E^0 – potencial normal de redução (V)
- F – caudal de entrada num reactor contínuo perfeitamente agitado (L.h^{-1})
- h – velocidade inicial de sorção, quando $t \rightarrow 0$ ($\text{g. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
- K – constante de dissociação do modelo de Langmuir correspondente ao inverso de b (L.g^{-1})
- k_1 – constante de adsorção de pseudo-primeira ordem (min^{-1})
- k_2 – constante de sorção de pseudo-segunda ordem ($\text{g. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
- k_d – constante de difusão intraparticular ($\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$)
- K_F – constante do modelo de Freundlich ($\text{mg}^{1-1/N}.\text{L}^{1/N}.\text{g}^{-1}$)
- L – comprimento total do leito de sorção (m)
- L_m – comprimento da zona de sorção ou comprimento do leito mínimo/crítico (m)
- m – quantidade de metal acumulada no sistema aberto (mg)
- $m_{biomassa}$ – massa de metal ligada à biomassa na fase de sorção (mg)
- m_d – quantidade de metal dessorvido (mg)
- m_e – massa de metal na corrente de saída do sistema aberto (mg)

m_i – massa de metal na corrente de entrada do sistema aberto (mg)
 $m_{libertada}$ – massa total de K^+ , Ca^{2+} ou Mg^{2+} libertada pela *S. cerevisiae* no sistema aberto (mg)
 n – número de pontos
 n – número de electrões transferido numa reacção de oxidação-redução
 N – constante do modelo de Freundlich
 P – caudal de saída num reactor contínuo perfeitamente agitado ($L.h^{-1}$)
 Q – função da actividade dos produtos e reagentes numa reacção de oxidação-redução
 q – massa de soluto sorvido por massa de fase sólida ($mg.g^{-1}$)
 q_{10} – valor previsto pelo modelo de Langmuir para a quantidade de metal acumulada para a concentração final de 10 mg.L^{-1} ($mg.g^{-1}$)
 q_{200} – valor previsto pelo modelo de Langmuir para a quantidade de metal acumulada para a concentração final de 200 mg.L^{-1} ($mg.g^{-1}$)
 q_e – quantidade de metal retida pelo bioissorvente no equilíbrio ($mg.g^{-1}$)
 q_{max} – capacidade máxima de acumulação de metal pelo bioissorvente ($mg.g^{-1}$)
 q_t – quantidade de metal retida pelo bioissorvente ao fim do tempo t ($mg.g^{-1}$)
 $q_{t,calc}$ – quantidade de metal retida pelo bioissorvente calculada para o tempo t ($mg.g^{-1}$)
 $q_{t,exp}$ – quantidade de metal retida pelo bioissorvente ao fim do tempo t obtida experimentalmente ($mg.g^{-1}$)
 Q – caudal volumétrico ($mL.min^{-1}$)
 Q_r – caudal de recirculação ($mL.min^{-1}$)
 R – constante dos gases ideiais ($8,314\text{ kJ.mol}^{-1}.K^{-1}$)
 RC – razão de concentração
 S_s – área superficial da partícula para a transferência de massa ($cm^2.cm^{-3}$)
 t – tempo (h)
 t_b – tempo ao fim do qual o sorbato aparece na corrente efluente de uma coluna sorção, correspondente ao ponto de *breakthrough* (h)
 t_e – tempo ao fim do qual todo o leito da coluna fica saturado pelo sorbato (h)
 t_p – tempo que demora à obtenção da concentração máxima no eluente (h)
 ST – sólidos totais ($g.L^{-1}$)
 SV – sólidos voláteis ($g.L^{-1}$)
 T – temperatura da solução (K)

X_s – concentração de adsorvente na fase líquida (g.L^{-1})

u_z – velocidade intersticial do fluido unidimensional (m.h^{-1})

V_r – volume do reactor (L)

V_{alim} – volume de solução de Cr(III) alimentada ao sistema aberto (L)

z – direcção do espaço (m)

Letras gregas

α – velocidade de quimiosorção inicial, para a cobertura da superfície do adsorvente nula ($\text{g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

β – parâmetro relacionado com o grau de cobertura da superfície e a energia de activação da quimiosorção (g.mg^{-1})

β_1 – coeficiente de transferência de massa (cm.s^{-1})

ε – porosidade do leito

ε_p – porosidade das partículas de adsorvente.

ρ_p – massa específica do adsorvente (g.cm^{-3})

CAPÍTULO 1 – Introdução

CAPÍTULO 1 - Introdução

1.1 Enquadramento e objectivos do trabalho

A conservação do ambiente tem vindo a adquirir uma importância crescente ao nível social e económico. As preocupações inerentes à protecção ambiental e ao desenvolvimento sustentável têm culminado num enquadramento legal que preconiza a gestão de efluentes e resíduos assente em medidas que visam a sua minimização, reciclagem e valorização, tendo por objectivo a prevenção e o controlo integrado da poluição. Esta nova tendência na estratégia de abordagem ao combate à poluição foi introduzida no quadro legislativo nacional pelo Decreto-lei n.º 194/2000, que tem por objecto a prevenção e o controlo integrado da poluição:

“Com efeito, no contexto do princípio do desenvolvimento sustentável, hoje tão evidente quanto necessário à promoção de uma convivência harmoniosa entre crescimento económico, ambiente e equidade social, o novo regime jurídico da prevenção e controlo integrados da poluição visa promover o desenvolvimento económico em sintonia com a componente preventiva da protecção ambiental, conformando a actuação dos agentes potencialmente geradores de poluição, de acordo com uma visão do conjunto das diferentes vertentes ambientais afectadas por essa actuação.” (Decreto Lei n.º 194/2000 de 21 de Agosto).

Um dos problemas de poluição considerado de difícil resolução é a contaminação das águas com metais pesados. Estes poluentes, presentes nas águas residuais de várias actividades industriais (Gavrilescu, 2004), são tidos como os principais contaminantes inorgânicos devido à sua recalcitrância e consequente persistência (Parvathi *et al.*, 2007), e também por terem efeitos indesejáveis mesmo a baixas concentrações (Sag e Aktay, 2002). Assim, a remoção eficaz de metais pesados de águas residuais e ambientes aquáticos está entre os assuntos considerados de maior importância nos países industrializados (Loukidou *et al.*, 2004b; Loukidou *et al.*, 2004c).

O cumprimento das metas legais, que passa pelo recurso à Melhor Tecnologia Disponível (MTD), compele as indústrias a mudanças para métodos de produção mais limpos, e impulsiona o desenvolvimento de sistemas de tratamento com melhor desempenho ambiental, mais eficientes e de mais baixo custo para o tratamento das águas residuais (Malik, 2004). No entanto, ainda que neste âmbito se consiga uma redução da quantidade de águas residuais contaminadas com metais, não é possível eliminar completamente sua produção, sendo premente desenvolver tecnologias mais eficazes e económicas no seu tratamento.

Neste contexto a biorremediação está a ganhar uma importância crescente como tecnologia alternativa para o tratamento de resíduos com metais pesados e também para a utilização conjunta com os métodos existentes (Melo e D'Souza, 2004). Os tratamentos de natureza biotecnológica, que consistem na utilização de materiais biológicos e microrganismos capazes de sequestrar metais de soluções diluídas através de mecanismos que envolvem a remoção biológica, a bioprecipitação e a biossorção (processos físico-químicos) (Pumpel *et al.*, 2001)

podem, então, ser parte da solução para os problemas de poluição por metais pesados, um desafio que se coloca há já vários anos (Vieira e Volesky, 2000).

No domínio da aplicação da biossorção ao tratamento de águas residuais é de referir que no início dos anos 90 foram desenvolvidos e comercializados dois biossorbentes, o AlgaSORB™ – biomassa não viável (*Chlorella vulgaris*) imobilizada em gel de sílica, e o AMT-Bioclain™ – biomassa granular derivada de *B. subtilis*. No entanto, estes biossorbentes não tiveram grande aceitação no mercado devido às falhas no conhecimento do mecanismo envolvido na sorção dos metais, nas falhas da selecção adequada de águas residuais para os ensaios à escala piloto e no *scale-up* (Ahluwalia e Goyal, 2007). Também têm surgido aplicações para a descontaminação de solos agrícolas através da inoculação com microrganismos com capacidade de acumulação de metais, e em biótopos dominados pelo confronto entre bactérias e metais pesados, como acontece em minas e locais de deposição de resíduos de indústrias não ferrosas (Zouboulis *et al.*, 2004).

Nos últimos anos tem-se estudado a capacidade de sequestro de metais por parte de vários materiais biológicos. Para além da utilização de biomassa microbiana, também se verifica uma tendência para explorar vários resíduos orgânicos industriais, agrícolas ou florestais (Bailey *et al.*, 1999; Kapoor e Viraraghavan, 1995; Malik, 2004). Sendo considerado que apenas os materiais de baixo custo com capacidade de remoção suficientemente elevada poderão ser utilizados em processos de biossorção à escala industrial (Kratochvil e Volesky, 2000; Volesky e Holan, 1995), a selecção daqueles com potencialidades mais promissoras para aplicação à escala industrial constitui o primeiro dos desafios a que é necessário dar resposta (Kratochvil e Volesky, 1998a).

Os materiais de baixo custo podem incluir materiais carbonáceos, produtos agrícolas e subprodutos residuais de actividades industriais (Ho *et al.*, 2002). A disponibilidade é um factor fundamental a considerar na selecção de um tipo de biomassa para ser utilizado em processos de biorremediação. Para viabilizar economicamente a remediação ambiental a fonte de biomassa deve ser de origem natural ou um resíduo de uma actividade industrial/económica (Vieira e Volesky, 2000). A maioria dos estudos sobre aplicações de biossorção a sistemas abertos baseia-se na aplicação de biomassa microbiana que tem de ser cultivada, ou imobilizada, ou pré-tratada, ou ainda recolhida do seu habitat natural, o que introduz custos adicionais ao processo (Saeed e Iqbal, 2003).

É assim possível assumir que a utilização de materiais residuais ou subprodutos de uma actividade industrial para o tratamento de águas residuais contaminadas com metais, não só pode contribuir para reduzir o seu custo de aquisição, tornando a sua utilização como biossorvente mais competitiva, como também pode desempenhar um papel importante como potenciador da utilização de recursos endógenos em aplicações de biorremediação ambiental.

O presente trabalho pretende caracterizar subprodutos do fabrico de cerveja, as drêches e rescaldos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como potenciais biossorbentes de crómio trivalente. Segundo Zouboulis *et al.* (2001) as leveduras têm sido utilizadas pelo Homem desde

há mais de 6000 anos em variadas aplicações, correspondendo hoje a um dos microrganismos com maior importância comercial, sendo ainda possível aumentar a sua significância e utilização industrial através da sua aplicação como biossorvente. A filosofia subjacente a este estudo vai de encontro a este desígnio, desejando contribuir para encontrar alternativas à valorização dos já referidos subprodutos, em simultâneo com o desenvolvimento de uma tecnologia eficiente e de baixo custo para o tratamento de águas residuais contaminadas com Cr(III).

Os objectivos específicos deste trabalho consistiram no estudo da cinética e do equilíbrio da acumulação de metal, na identificação dos mecanismos de interacção metal-biomassa e no desenvolvimento de um sistema aberto, consistindo numa coluna de leito expandido, para o tratamento de soluções aquosas com crómio trivalente.

De entre os aspectos positivos que motivaram este estudo há a destacar o facto de ambos os materiais testados como biossorbentes estarem disponíveis em grandes quantidades e de o local de produção se encontrar próximo de um centro urbano com elevada actividade industrial, o que possibilita a redução do custo de aquisição para os utilizadores de zonas industriais vizinhas. No que respeita em particular à levedura, é ainda de salientar o facto de ser floculante, propriedade que permite reduzir os custos associados à sua separação da fase líquida (Verstrepen e Klis, 2006), e que devido às proteínas e açúcares característicos da sua superfície podem contar com sítios de ligação a metais adicionais (Avery e Tobin, 1992; Soares *et al.*, 2002a). Esta característica não tem sido muito explorada nos trabalhos de investigação nesta área, que recorrem de uma forma generalizada a biomassa imobilizada e/ou em colunas de leito fixo.

As razões para se ter explorado a aplicação da levedura no seu estado viável e sem ser submetida a qualquer pré-tratamento, contrariamente à tendência verificada nos anos 80 e 90 (Wang e Chen, 2006), foram: i) a necessidade de aplicar um pré-tratamento que iria contribuir para tornar o processo mais dispendioso; ii) a falta de unanimidade no que respeita à capacidade de acumulação de metais em função da sua viabilidade, *e.g.* Brady e Tobin (1995), e Padmavathy *et al.* (2003) afirmam que a biomassa não viável adsorve maiores quantidades de metais do que a biomassa viável, mas Brady *et al.* (1994a), e Zouboulis *et al.* (2001) referem que a utilização de células viáveis aumenta, em alguns casos, a remoção de metais comparativamente à biomassa inactiva; e iii) a recente tendência que sugere as biotecnologias híbridas que integram a biossorção, a bioprecipitação e a bioacumulação usando células vivas para o tratamento de efluentes reais (Wang e Chen, 2006), havendo mesmo indicações de que se justifica uma revisão à aplicação de células vivas de forma encontrar um nicho no cenário actualmente dominado por processos puramente de biossorção (Malik, 2004).

No entanto, as principais vantagens decorrentes da utilização das células de levedura industrial, viável e floculante, também se revelaram como as principais limitações ao desenvolvimento do trabalho, uma vez que: i) nem sempre foi possível utilizar células nas mesmas condições fisiológicas, devido às limitações relativas ao *stock* disponível, dificultando a repetibilidade dos ensaios; ii) dado que não foi adicionado ao meio qualquer fonte de carbono, a viabilidade das células não permanece constante; iii) de igual forma a floculação das células pode alterar-se em

função das condições do meio (Verstrepen e Klis, 2006), verificando-se ainda variações na dimensão dos flocos ao longo dos ensaios.

O presente trabalho encontra-se dividido em 9 capítulos, dos quais os três primeiros se referem à revisão bibliográfica sobre a aplicação de biomaterias para a biorremediação de soluções de metais. Neste primeiro capítulo é de seguida apresentada uma revisão bibliográfica relativa à caracterização dos metais pesados, sendo referidos os seus efeitos no ambiente e na saúde, bem como das tecnologias de tratamento de águas residuais com metais pesados, em particular aquelas que utilizam biomassa. No segundo capítulo abordam-se a os mecanismos de acumulação de metais por biossorventes e apresentam-se diversos modelos utilizados para descrever o equilíbrio e a cinética da biossorção, e no terceiro capítulo caracterizam-se em maior profundidade os dois biomateriais a utilizar neste estudo, as drêches e a levedura *S. cerevisiae*. Os materiais e os métodos utilizados no desenvolvimento experimental do trabalho são descritos no quarto capítulo. Seguem-se três capítulos referentes à apresentação e discussão dos resultados experimentais. No primeiro destes apresentam-se os dados relativos ao equilíbrio e cinética de sorção de Cr(III) na *S. cerevisiae* e nas drêches e a dessorção do Cr(III) a partir da levedura, no Capítulo 6 apresenta-se uma abordagem ao estudo das interações metal-biomassa com vista à caracterização do mecanismo de acumulação de metal e por fim, no sétimo capítulo, os resultados do desenvolvimento de um sistema aberto para o tratamento de soluções aquosas com Cr(III) numa coluna de leito expandido. No oitavo capítulo apresentam-se as conclusões gerais do trabalho e algumas propostas de trabalho futuro que dêem continuidade e completem este estudo. No nono e último capítulo apresentam-se as referências bibliográficas consultadas e citadas ao longo do trabalho.

1.2 Metais pesados

Os metais pesados são geralmente definidos como metais com massa específica superior a 5 g.cm³. Esta definição, algo arbitrária, inclui 69 elementos dos quais 16 são sintéticos. De entre todos os metais pesados aqueles que estão vulgarmente associados a problemas de poluição são o antimónio, arsénio, cádmio, crómio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, mercúrio, níquel, prata, tálio, estanho, vanádio e zinco (Sze *et al.*, 1996).

A comunidade científica é unânime ao considerar que a descarga incontrolada de águas residuais com metais pesados coloca sérios problemas ambientais e de saúde pública, associados aos seus efeitos tóxicos e à sua acumulação ao longo da cadeia alimentar (Bailey *et al.*, 1999; Figueira *et al.*, 2000b; Goyal *et al.*, 2003; Holan e Volesky, 1994; Malik, 2004; Saeed e Iqbal, 2003; Volesky, 2001; Volesky e Holan, 1995; Zouboulis *et al.*, 2004). As águas residuais de actividades metalúrgicas e mineiras, de indústrias de electrónica e de acabamento de superfícies, de indústrias têxteis, curtumes e de produção de plásticos, fertilizantes, tintas e pigmentos contêm quantidades consideráveis de metais pesados (Ahluwalia e Goyal, 2007; Veglio *et al.*, 2000; Zouboulis *et al.*, 2004) cuja descarga, sem um tratamento adequado, para cursos de água

superficiais tem como consequência a acumulação de metais nas águas e nos sedimentos dos rios (Malik, 2004).

1.2.1 Metais pesados no ambiente

A poluição ambiental com metais, decorrente de actividades como as explorações mineiras, a industrialização e a urbanização, contribuem para acelerar os fluxos de metais na ecosfera (Puranik e Paknikar, 1997). As razões que levam a considerar os metais pesados como os principais poluentes inorgânicos são por um lado, a sua elevada mobilidade nos ecossistemas aquáticos e a sua toxicidade para as formas de vida superiores, e por outro o facto de mesmo estando presentes em concentrações diluídas, a sua recalcitrância e persistência implica que através de fenómenos ampliação naturais, as concentrações se vão tornando cada vez mais elevadas até ao ponto de adquirirem efeitos tóxicos (Atkinson *et al.*, 1998). Assim, a sua presença nos ecossistemas aquáticos constitui um dos problemas ambientais de maior importância na medida em que potencia a sua circulação e acumulação ao longo da cadeia alimentar, colocando sérios riscos particularmente para os animais e o Homem (Bishnoi *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2002).

O destino dos metais pesados, ao entrarem nos ecossistemas, torna-se difícil de seguir, começando a surgir danos à medida que passam de um nível trófico para outro superior, devido à sua acumulação nos tecidos vivos ao longo da cadeia alimentar, atingindo o Homem no seu topo, conforme se pode verificar na Figura 1.1 (Volesky, 2001). Assim, os efeitos tóxicos são mais acentuados em animais dos níveis tróficos superiores (Ahluwalia e Goyal, 2007).

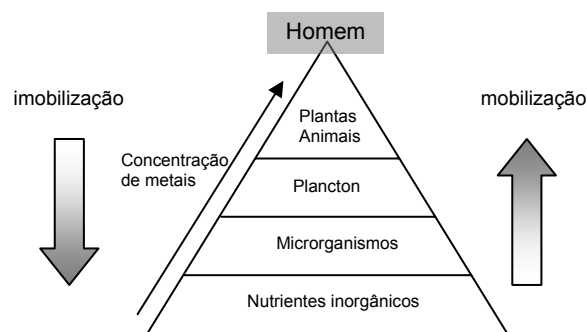


Figura 1.1 – Destino dos metais pesados libertados de forma descontrolada no ambiente e a sua acumulação ao longo da cadeia alimentar. Adaptado de Volesky (2001).

Vários microrganismos, através da actividade celular e/ou dos seus metabolitos, contribuem para alterar a especiação e a mobilidade dos metais através de mecanismos que fazem parte dos seus ciclos biogeoquímicos, levando-os a sofrer transformações para várias formas móveis antes de acabar nos biomas (Srinath *et al.*, 2002). A capacidade dos microrganismos afectarem a especiação dos metais está na base da sua capacidade de conduzir ou mediar os processos de

mobilização ou imobilização que influenciam o balanço de espécies metálicas entre as fases solúveis e insolúveis. A mobilização de metais pode ocorrer por protonação, quelação e transformação química, enquanto que a imobilização pode ocorrer por precipitação ou cristalização de compostos orgânicos ou inorgânicos insolúveis, ou por sorção, acumulação e sequestro intracelular. As reacções redox podem mobilizar ou imobilizar metais, dependendo das espécies metálicas envolvidas. Estes processos, além de integrarem o ciclo biogeoquímico dos metais, podem ser explorados pela biotecnologia ambiental (Gadd, 2004).

Os riscos ambientais de longo prazo associados aos metais pesados focaram as atenções para a sua rejeição nas águas residuais (Patzak *et al.*, 1997), pelo que o controlo das descargas de metais pesados e a sua remoção de soluções aquosas se tornou um desafio para o século XXI (Volesky, 2001). Do ponto de vista da gestão ambiental, as águas residuais com metais pesados devem ser tratadas na fonte de emissão, antes de descarregadas no meio hídrico não só para evitar a contaminação dos ecossistemas, como permitir poupanças energéticas e de recursos naturais através da recuperação e reciclagem dos metais (Tsezos *et al.*, 1995). Esta medida contribui para minimizar os impactes ambientais associados à actividade em causa, mas também para proteger a futura utilização deste recurso devido à crescente escassez de água, uma vez que os metais pesados regulam, indirectamente, a potencial reutilização de resíduos líquidos (Lehmann *et al.*, 2001).

O reconhecimento dos efeitos tóxicos e os impactes negativos dos metais pesados no ambiente, cada vez mais estudados e melhor compreendidos, contribuiu para a introdução de regulamentações cada vez mais restritivas no que respeita à concentração de metais pesados na descarga de águas residuais e também nas águas para consumo humano (Volesky, 2001). Com vista à protecção das reservas de água doce superficiais e subterrâneas, a União Europeia, numa recente revisão do quadro legislativo, publicou a Directiva Quadro da Água, com o objectivo de alcançar metas mais rigorosas no que respeita à protecção das águas naturais de fontes de poluição, o que inclui a diminuição dos valores limite de emissão para os metais pesados mais tóxicos em descargas industriais para valores abaixo dos mg.L^{-1} (Remoudaki *et al.*, 2003).

A imposição de regulamentação mais rígida aumenta a necessidade de inovar as tecnologias de tratamento existentes para a remoção de metais pesados de águas residuais e para atingir os limites de concentração de toxicidade actuais (Zouboulis *et al.*, 2004). A Indústria tem assim de dar resposta a estes requisitos legais mantendo a níveis reduzidos os seus custos de capital e de operação (Remoudaki *et al.*, 2003).

Verifica-se uma forte correlação entre a extensão da poluição por metais e a resistência bacteriana nos ambientes aquáticos. Os metais podem classificar-se como agentes causadores de stresse, provocando alterações ao nível da comunidade no sentido de uma menor diversidade bacteriana e para a prevalência de estirpes resistentes a metais (Srinath *et al.*, 2002). A selecção de microrganismos resistentes a metais e a sua utilização como bioindicadores de ambientes poluídos tem demonstrado ser uma ferramenta sensível e de confiança para a detecção de níveis

de metais abaixo do limiar de toxicidade. A utilização de ensaios combinados (peixes, algas, bactérias) está a ter uma adesão crescente para a avaliação de ecotoxicidade integrada, para permitir uma maior compreensão dos potenciais perigos associados à descarga de águas residuais contaminadas com metais (Hassen *et al.*, 1998).

Os metais pesados podem classificar-se, de acordo com o interesse em jogo e o seu impacte ambiental, em quatro categorias: 1) metais pesados tóxicos (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn, etc.); 2) metais estratégicos; 3) metais preciosos (Pd, Pt, Ag, Au, Ru, etc.); 4) elementos radioactivos (U, Ti, Ra, etc.). Os metais das categorias 1) e 4) são, do ponto de vista ambiental, os que constituem a maior ameaça (Volesky e Holan, 1995; Wang e Chen, 2006). Não sendo os recursos minerais de onde se extraem os metais renováveis, é imperativo que os metais considerados ambientalmente perigosos, ou que têm importância tecnológica, estratégica ou económica, sejam removidos e recuperados na fonte usando tecnologias apropriadas (Atkinson *et al.*, 1998).

Considerando o impacte ambiental associado à mobilização dos metais, são o mercúrio, o chumbo e o cádmio que merecem o maior destaque. No entanto são os metais estratégicos ou preciosos, que não constituindo necessariamente uma ameaça ambiental, os principais alvos das aplicações de sorção que permitam a sua concentração e recuperação a partir de soluções diluídas (Volesky e Holan, 1995), tanto pelo facto de se verificar um esgotamento dos recursos naturais disponíveis como pela instabilidade geopolítica que pode estar associada ao seu fornecimento (Volesky, 1987).

É ainda importante perceber que a remoção de um metal de uma solução só é de facto efectiva quando este é devidamente imobilizado. Paralelamente ao lento processo natural de mineralização dos metais, a sua efectiva remoção é alcançada apenas quando se tornam suficientemente concentrados ao ponto de poderem ser reincorporados no processo ou novamente comercializados (Volesky e Holan, 1995).

1.2.2 Metais pesados e a saúde

Em todos os grupos da tabela periódica há elementos estimulantes para os animais. A maioria dos elementos do quarto grupo é carcinogénica, podendo assumir-se que esse efeito está relacionado com a estrutura electrónica dos metais de transição (Ho *et al.*, 2002). A perigosidade dos metais está associada a danos no sistema nervoso, fígado e ossos, e também ao bloqueio de grupos funcionais de enzimas vitais (Malik, 2004)

A toxicidade dos metais teve já consequências ao nível da História, estando associada à queda do Império Romano (Volesky, 2001) e com acidentes com graves consequências na saúde como o caso da população Japonesa que vivia na baía de Minimata, que manifestou doenças neurológicas por comer peixe e marisco contaminado com metil-mercúrio, e os habitantes das margens do Rio Jinstsu que sofreram da doença Itai-Itai depois de se alimentarem de arroz

cultivado em terrenos irrigados com águas contaminadas com cádmio, chumbo e níquel (Rostami e Joodaki, 2002).

Segundo Valls e de Lorenzo (2002), do ponto de vista fisiológico os metais podem classificar-se em três categorias: i) essenciais não-tóxicos, e.g. Ca e Mg; ii) essenciais mas nocivos acima de determinada concentração, e.g. Fe, Mn, Zn, Cu, Co e Mo; e iii) tóxicos, quando prejudicam o crescimento ou o metabolismo de um organismo (Fasim *et al.*, 2002), e.g. Hg, Pb e Cd. Os primeiros desempenham papéis importantes no metabolismo celular principalmente como cofactores de vários processos enzimáticos. Estima-se que um terço de todas as enzimas conhecidas tem um cofactor metálico. A biodisponibilidade destes metais no ambiente é geralmente baixa, e as células têm mecanismos de transporte activo para a sua acumulação. A concentração destes metais nos organismos torna-se problemática não só quando a sua concentração intracelular excede os níveis fisiológicos (Blackwell *et al.*, 1997; Blackwell *et al.*, 1998), mas também quando é deficitária. Os problemas de saúde relacionados com os metais pesados podem revelar-se de forma crónica ou aguda, reflectindo-se no bem-estar individual e na sociedade através dos crescentes custos na saúde (Volesky, 2001).

No que respeita às características da toxicidade dos metais, podem destacar-se os seguintes aspectos: i) tem elevada duração no tempo; ii) é dependente da transformação de espécies de baixa toxicidade noutras de elevada toxicidade, ou *vice-versa*, em determinadas condições ambientais (e.g. Cr(III) e Cr(VI)); iii) está associada a riscos para a saúde pública devido aos efeitos de bioacumulação e bioamplificação ao longo da cadeia alimentar; iv) não é possível degradar os metais, apenas provocar alterações ao nível da sua valência e espécie; v) tem limites de toxicidade baixos (1,0 a 10 mg.L⁻¹ ou menos no caso de metais muito tóxicos como o mercúrio e o cádmio) (Wang e Chen, 2006).

Os efeitos tóxicos dos metais manifestam-se geralmente como resultado da sua elevada capacidade de coordenação, o que pode resultar no bloqueamento de grupos funcionais e a substituição de metais essenciais em biomoléculas com funções importantes, modificações conformacionais, desnaturação e inactivação de enzimas e a alteração da integridade celular ou de organelos (Blackwell *et al.*, 1998), o que macroscopicamente se reflecte na redução da taxa de crescimento, aumento da fase de latência e perturbações na morfologia e fisiologia (Blackwell *et al.*, 1995). Os mecanismos de resistência/tolerância a metais pesados incluem o seu sequestro por proteínas com propriedades ligantes a metais (metalotioninas), e a compartimentalização nos vacúolos (Blackwell *et al.*, 1998; Gharieb e Gadd, 1998; Ramsay e Gadd, 1997).

Do ponto de vista ecotoxicológico os metais mais perigosos são o mercúrio, o chumbo, o cádmio e o crómio na sua forma hexavalente (Ahluwalia e Goyal, 2007). São metais não essenciais, sem qualquer função biológica. Destes, o mercúrio tem vindo a requerer menos atenção pois está a cair em desuso nos processos industriais fruto da introdução de novas tecnologias (Volesky e Holan, 1995). O cádmio é muito utilizado em baterias recarregáveis de níquel-cádmio, em pigmentos, revestimentos, ligas e componentes para electrónica (Zouboulis *et al.*, 2004).

Também está presente em fertilizantes e fungicidas (Adamis *et al.*, 2003). A exposição ao cádmio provoca problemas nos ossos e no sistema renal, os principais sintomas da doença “Itai-Itai” (Yun e Volesky, 2003). A exposição crónica a elevados níveis de cádmio provoca disfunções renais, degeneração dos ossos, danos no fígado e no sangue, sendo o cádmio e os seus compostos considerados carcinogénicos para o Homem (Sheng *et al.*, 2004b). O chumbo é um metal perigoso muito tóxico para o Homem plantas e animais (Low *et al.*, 2000). É um metal neurotóxico (Puranik e Paknikar, 1997), com características cumulativas e não degradativas, podendo causar danos ao nível do sistema nervoso, renal e reprodutor (Sheng *et al.*, 2004b). A exposição dos humanos ao chumbo pode ocorrer através do ar, água ou alimentos. Existe uma longa história da exposição humana a níveis elevados de chumbo na água e alimentos, devido a práticas associadas à preparação de alimentos em recipientes revestidos com chumbo e o abastecimento de água através de tubagens em chumbo (Ho *et al.*, 2002).

Já o cobre é um metal essencial para todas as formas de vida, integrando várias enzimas, mas que acima de determinadas concentrações se torna tóxico. O excesso de cobre acumula-se no fígado, sendo a sua forma mais tóxica o ião Cu^+ . Existem evidências epidemiológicas, nomeadamente a elevada incidência de cancro entre os caldeireiros, que sugerem um efeito carcinogénico do cobre. Também se registam elevadas taxas de incidência de cobre no estômago em regiões onde a razão Zn:Cu no solo ultrapassa determinados limites (Ho *et al.*, 2002). A toxicidade do cobre nos seres vivos reflecte-se essencialmente ao nível enzimático, com uma incidência especial nas enzimas cuja actividade dependa dos grupos sulfidril e amino devido à elevada afinidade que o cobre, tal como outros metais, tem por ligandos de azoto e enxofre. Os ácidos nucleicos também podem ser alvo da sua acção tóxica. Nos seres humanos não estão descritos casos de envenenamento crónico por este metal, mas existem registos de envenenamento agudo por ingestão, com sintomas que incluem danos no fígado e rins, e febre com sintomas de gripe. Existem ainda relatos de efeitos locais como irritação das vias respiratórias superiores, dermatites e ainda perturbações gastrointestinais com vómitos, queimaduras epigástricas e diarreia. Também está descrita a indução de malformações do sistema nervoso central em fetos humanos (Sze *et al.*, 1996).

Como metal essencial pode referir-se o magnésio, o segundo catião mais abundante nos microrganismos, apenas excedido pelo K^+ . As elevadas necessidades de Mg^{2+} são uma consequência do seu papel na estabilização da estrutura de ribossomas e ácidos nucleicos, e na manutenção da integridade tanto da membrana celular como na de organelos, facilitando os mecanismos de reparação celular (e.g. após exposição a metais), e ainda é cofactor de mais de 300 enzimas (Blackwell *et al.*, 1998).

1.2.3 O crómio

A palavra crómio tem origem na palavra Grega *chroma*, que significa cor, por vários dos seus compostos serem coloridos (Martins, 2004). O crómio é um metal branco-prateado, duro, quebradiço e raramente é encontrado no estado livre na natureza (Mamaril *et al.*, 1997). É um

metal de transição, do grupo VI-B da tabela periódica, com várias aplicações industriais (Cervantes *et al.*, 2001; Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). Este elemento é o sétimo mais abundante na Terra, e o vigésimo primeiro nas rochas da crosta terrestre, onde a sua quantidade varia entre 100 e 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Nos solos o crómio pode aparecer em concentrações entre 5 a 3000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Cervantes *et al.*, 2001).

A produção mundial de crómio é de cerca de 10^7 t.ano⁻¹, sendo a principal fonte de Cr(III) a cromite $\text{FeO.Cr}_2\text{O}_3$. Do crómio produzido, 60 a 70 % destina-se à produção de metalóides como o aço inoxidável, 15 % é utilizado em processos químicos industriais, em particular como mordente em indústrias têxteis e de curtumes, para a produção de pigmentos e tintas, e no revestimento de superfícies por deposição electrolítica. Também é utilizado como protecção contra a corrosão, na produção de catalisadores, baterias, fungicidas e conservantes de madeira e no alumínio anodizado na indústria de aviação (Cervantes *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2005; Mamaril *et al.*, 1997).

As diversas aplicações de crómio tornaram-no um sério contaminante do ar, solo e da água (Cervantes *et al.*, 2001). O crómio encontra-se em águas residuais de indústrias de deposição electrolítica e acabamento de superfícies (Kratochvil *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2001), curtumes, tintas e pigmentos, têxtil, fertilizantes (Donmez e Kocberber, 2005), em águas residuais domésticas, e em águas de arrefecimento de unidades de produção de energia que frequentemente contêm aditivos de cromatos que actuam como biocida (Bingol *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2001).

Tal com os demais elementos de transição, o crómio pode apresentar vários estados de oxidação, desde a forma metálica de Cr(0), a Cr(II), Cr(III), Cr(V) e Cr(VI). No entanto, de entre os vários estados de oxidação possíveis, são o crómio trivalente e o hexavalente os que se encontram presentes em maior quantidade em ambientes aquáticos, e que são considerados ambientalmente mais importantes, em particular o Cr(VI) por ser o mais tóxico (Goyal *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2001). As formas mais estáveis do crómio são a trivalente e a hexavalente, cujas propriedades químicas são substancialmente diferentes (Bingol *et al.*, 2004; Cervantes *et al.*, 2001).

O IARC (*International Agency for Research on Cancer*) determinou que o crómio hexavalente é um ião carcinogénico para os humanos e a EPA (*Environmental Protection Agency*) definiu o limite máximo de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de crómio total para a água destinada ao consumo humano. De acordo com a Comissão Europeia o valor guia para a concentração de crómio total nas águas destinadas ao consumo humano deve ser de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Lazaridis *et al.*, 2003), correspondendo também ao valor paramétrico definido na legislação nacional (Decreto Lei n.º 243/2001 de 5 de Setembro).

A EPA estabelece para a descarga de águas residuais o limite de emissão de crómio total de 2 mg.L^{-1} , mas fixa um valor limite específico para o Cr(VI) de 0,05 mg.L^{-1} , por razões inerentes à maior toxicidade atribuída a esta espécie de crómio (Park *et al.*, 2005). Em Portugal o valor limite de emissão (VLE) de crómio total em águas residuais também é de 2 mg.L^{-1} , havendo uma maior

tolerância para a descarga de Cr(VI), cujo VLE é de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (Decreto Lei nº 236/98 de 1 de Agosto).

A solubilidade, disponibilidade e toxicidade dos iões metálicos é determinada pelo seu estado de oxidação. No caso do crómio, elevados estados de oxidação conferem-lhe maior solubilidade, reactividade e toxicidade, enquanto que para estados de oxidação mais baixos o metal tem solubilidade muito menor. Das espécies mais comuns, Cr(III) e Cr(VI), a forma trivalente é a mais estável, existindo na forma de hidróxido amorfo Cr(OH)_3 que precipita em solução a pH neutro a ligeiramente ácido. Na forma hexavalente o crómio existe na forma de cromato (CrO_4^{2-}) ou dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), ambos muito solúveis e com elevada toxicidade (Smith e Gadd, 2000). A maior solubilidade também contribui para aumentar a sua biodisponibilidade para os organismos vivos (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005) potenciando os seus efeitos tóxicos. Já o crómio trivalente tem pouca mobilidade em sistemas aquáticos devido à sua baixa solubilidade em água (Donmez e Kocberber, 2005)

Este elemento de transição encontra variadas aplicações em sistemas biológicos, apesar de não fazer parte integral de nenhuma enzima. A utilidade terapêutica de sais de Cr(III) têm sido estudada no controle de diabetes, e o seu papel na estabilização de proteínas é explorada pelas indústrias de curtumes (Rao *et al.*, 1999).

Está demonstrado que o crómio trivalente é um micronutriente essencial para os mamíferos, necessário ao metabolismo dos carboidratos e lípidos, em especial do colesterol (Bag *et al.*, 2000). Ratos com uma dieta deficitária em crómio desenvolveram intolerância à glucose (incapacidade de responder eficazmente a um aumento dos níveis de glucose no sangue). Esta deficiência foi revertida após a adição de materiais ricos em crómio à sua dieta (nomeadamente levedura de cerveja) (Vincent, 2000).

Para o Homem também estão associados sintomas de diabetes a uma dieta deficitária em crómio. A dose diária recomendada para a sua forma biologicamente importante, a trivalente, é para os adultos $\leq 35 \text{ } \mu\text{g}$. Há indicações de que a biomolécula cromodulina é crucial na compreensão do papel do crómio ao nível molecular, na medida que se descobriu que se liga ao receptor da insulina, estimulando a sua actividade, explicando-se assim as necessidades nutricionais de crómio (Vincent, 2003).

Os efeitos fisiológicos ecotoxicológicos do crómio dependem não só do seu estado de oxidação (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005) mas também da sua concentração. Em quantidades vestigiais este metal é considerado não tóxico e essencial para os humanos, animais, plantas e microrganismos, passando a tóxico e mutagénico em elevadas concentrações (Donmez e Kocberber, 2005; Mamaril *et al.*, 1997; Srinath *et al.*, 2002). Em concentrações elevadas o Cr(III) inibe o crescimento das plantas, e nos humanos pode diminuir a actividade do sistema imunitário (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005), havendo indicações de que a exposição prolongada ao crómio trivalente provoca reacções cutâneas alérgicas e cancro (Yun *et al.*, 2001). No entanto o Cr(III) pode formar compostos potencialmente tóxicos, carcinogénicos ou mutagénicos mesmo a baixas concentrações (Sawalha *et al.*, 2007).

Considerado tóxico para as plantas e animais, o Cr(VI) é um agente oxidante forte, e um potencial carcinogénico (Donmez e Kocberber, 2005). A inalação crónica e a ingestão em excesso de Cr(VI) origina problemas respiratórios, incluindo úlceras ou perfurações do septo nasal e tumor pulmonar, danos no fígado e rins e hemorragias internas. A exposição dérmica crónica e sub-crónica podem provocar dermatites de contacto e problemas de pele (Mamaril *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 2004a). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o Cr(VI) como carcinogénico para o Homem (Sheng *et al.*, 2004a). A propriedade que mais provavelmente está associada ao seu efeito tóxico para a maioria dos organismos é o seu elevado poder oxidante (Rapoport e Muter, 1995), com um mecanismo de acção que pode envolver a catálise de reacções de radicais livres e a ligação cruzada do DNA (Mamaril *et al.*, 1997). Nas plantas o Cr(VI) provoca danos no sistema radicular e nas membranas, diminui a actividade enzimática, provoca clorose, necrose e diminui o crescimento (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005).

Os danos oxidativos do DNA são considerados a base dos efeitos genotóxicos provocados pelo crómio. O Cr(III) também pode reagir com os grupos carboxílicos e sulfidril de grupos enzimáticos provocando alterações na sua estrutura e actividades. A modificação da actividade do DNA polimerase e de outras enzimas pode ser provocada pela deslocação de iões Mg^{2+} pelo Cr(III). A redução do Cr(VI) a estados de oxidação mais baixos envolve a formação de radicais livres, sendo a formação transiente de Cr(V) o mecanismo que provavelmente está associado à toxicidade do crómio. Os complexos de Cr(V) formam-se por redução do Cr(VI) por agentes redutores como NAD(P)H, $FADH_2$, várias pentoses, e a glutationa. Estes complexos reagem com H_2O_2 gerando quantidades significativas de radicais $\bullet OH$ que podem desencadear alterações de DNA ou conduzir a outros efeitos tóxicos. O Cr(III) intracelular pode ser sequestrado pelos grupos fosfato do DNA, afectando a replicação, a transcrição e provocando mutagénese (Cervantes *et al.*, 2001).

O ião cromato é transportado activamente através das membranas biológicas tanto nos procaríotas como nos eucaríotas. Pelo contrário, a maioria das células é impermeável ao Cr(III), provavelmente porque forma compostos insolúveis em soluções aquosas não ácidas (Cervantes *et al.*, 2001; Jianlong *et al.*, 2004). Uma vez dentro das células o Cr(VI) pode ser reduzido na mitocôndria, ácidos nucleicos ou citoplasma a Cr(III) que facilmente forma hidróxidos insolúveis. O Cr(III), que pode ser formado dentro da célula, liga-se a proteínas e interage com ácidos nucleicos (Rapoport e Muter, 1995). Reconhece-se no entanto que a redução de Cr(VI) a Cr(III) nas células e a subsequente ligação e ruptura de proteínas e ácidos nucleicos acentua o potencial tóxico de ambas as formas de crómio (Tobin e Roux, 1998). Devido ao elevado potencial de oxidação e à facilidade de penetração nas membranas celulares, os compostos de Cr(VI) são considerados 100 vezes mais tóxicos do que os sais de Cr(III) (Bag *et al.*, 2000).

Nas leveduras, o Cr(VI) entra nas células por intermédio de um transportador aniónico não específico, o sistema permease, que transporta diferentes aniões como o sulfato e o fosfato. Os efeitos tóxicos do Cr(VI) e do Cr(III) foram associados ao antagonismo com a acumulação de sulfato e ao transporte de ferro, respectivamente (Cervantes *et al.*, 2001).

Apesar destas diferenças em função do estado de oxidação, uma vez libertadas nos ecossistemas, as espécies de crómio tri- e hexavalente podem sofrer reacções de oxidação-redução que, dependendo da composição do meio, podem converter uma espécie na outra. O Cr(VI) é reduzido no solo à forma de Cr(III) principalmente através de reacções que envolvem matéria orgânica, Fe(II) e sulfuretos, enquanto que a oxidação do Cr(III) a Cr(VI) é mediada por óxidos de manganês (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005), alternância esta que não garante a perpetuidade da segurança inerente à espécie mais inócuca.

1.3 Tratamento de águas residuais com metais pesados

Qualquer actividade industrial que utilize metais pesados tem problemas de deposição de metais, podendo constituir fontes pontuais de descarga destas emissões (Volesky e Holan, 1995). Actividades como a exploração mineira ou o processamento de metais, nomeadamente a electrodeposição e o acabamento de superfícies, a produção de circuitos electrónicos, produtos químicos ou farmacêuticos geram, inevitavelmente, águas residuais contaminadas com metais pesados, cuja descarga provoca o aumento da presença de metais pesados no ambiente (Davis *et al.*, 2000). Sendo esta descarga controlada pela legislação em vigor surge, simultaneamente, a necessidade de eliminar de forma eficaz estes elementos das águas residuais resultantes destas actividades (Davis *et al.*, 2000; Lazaridis *et al.*, 2003).

A produção de águas residuais com crómio está associada a actividades como a deposição electrolítica, curtumes, tinturarias e em instalações com torres de arrefecimento de água onde este metal é utilizado como biocida. Estes efluentes têm Cr(III) e Cr(VI) em concentrações que podem variar entre as décimas e as centenas de miligramas por litro (Park *et al.*, 2005).

1.3.1 Tecnologias convencionais

A remoção de iões metálicos de águas residuais é importante tanto do ponto de vista ambiental como para a reutilização da água (Ho *et al.*, 2002). No entanto o enquadramento legal não impunha, até recentemente, estratégias de controlo integrado de poluição, resultando na escolha das opções tecnológicas mais económicas, ainda que daí resultassem resíduos secundários (Eccles, 1999). Segundo este autor o método mais simples e mais barato para a remoção de metais de soluções aquosas, consiste na adição de reagentes que aumentem o seu pH, convertendo o metal solúvel numa forma insolúvel (*e.g.* hidróxidos).

Na literatura as referências aos tratamentos físico-químicos actualmente mais aplicados para a remoção de metais de águas residuais são i) a precipitação com hidróxidos, carbonatos ou sulfuretos; ii) a oxidação-redução química, iii) sorção (adsorção/troca iónica); iv) processos membranares (ultrafiltração, electrodiálise, osmose reversa); v) recuperação electrolítica; vi) evaporação; vii) extracção líquido-líquido; viii) electrodeposição, todos eles com vantagens e limitações (Goyal *et al.*, 2003; Kalyani *et al.*, 2004; Kapoor e Viraraghavan, 1995; Lazaridis *et al.*,

2003). De entre estes, a precipitação é o mais comum. Os metais são precipitados na forma de hidróxidos pela adição de hidróxido de cálcio ou sódio, um método simples e de baixo custo, com as desvantagens de produzir grandes quantidades de lama às quais é difícil dar um destino final, e de a água tratada ainda poder conter metais em concentrações da ordem dos mg.L^{-1} . Outros métodos como a evaporação, electrólise, osmose inversa e troca iónica têm limitações na sua aplicabilidade por razões económicas e/ou tecnológicas, incluindo elevados custos de operação, obstrução de componentes, impraticabilidade a baixas concentrações de metal, recuperação não selectiva, etc. (Sze *et al.*, 1996).

A precipitação por ajuste de pH não é, no entanto, selectiva. Qualquer ião férrico em solução irá precipitar em primeiro lugar, seguindo-se outros metais pesados. Assim, a precipitação por adição de alcális (geralmente cal) vai gerar grandes quantidades de lamas sólidas que têm de ter um destino final adequado. A precipitação na forma de hidróxidos de Cu, Cd ou Hg numa solução de concentração 100 mg.L^{-1} , resulta na produção de lamas com respectivamente 1000, 900 e 500 mg.L^{-1} . No entanto a precipitação pode ser altamente eficiente, uma vez que se baseia na insolubilidade do precipitado e na eficácia da separação sólido-líquido. A primeira pode ser influenciada pela presença de agentes complexantes como o cianeto, ou pela possibilidade de o metal existir na forma aniónica (e.g. Cr(VI)). A separação sólido-líquido pode ser melhorada mecânica ou quimicamente (Eccles, 1999).

Também no tratamento de águas residuais com crómio, a precipitação química com cal ou soda caustica é actualmente o método mais utilizado (Gupta *et al.*, 2001; Yun *et al.*, 2001). O Cr(VI) pode ser facilmente reduzido, via química ou bioquímica, à forma trivalente tornando-se mais propício à remoção (Volesky e Holan, 1995). O processo convencional utilizado no tratamento de águas residuais das indústrias de deposição electrolítica e acabamento de superfícies consiste nos seguintes passos: i) redução do Cr(VI) a Cr(III); ii) precipitação do Cr(III) na forma de Cr(OH)_3 a pH elevado; iii) sedimentação do hidróxido insolúvel; e iv) deposição final da lama desidratada (Kratochvil *et al.*, 1998). As principais desvantagens deste processo de tratamento são a formação de quantidades significativas de lamas químicas tóxicas indesejáveis (Yun *et al.*, 2001) e os elevados custos associados à sua deposição final, o elevado custo dos produtos químicos utilizados na redução do Cr(VI) e a redução incompleta do Cr(VI) (Kratochvil *et al.*, 1998). Kratochvil e Volesky (1998b) acrescentam ainda como desvantagem a este processo de tratamento a reduzida eficiência para baixas concentrações de metal.

O tratamento químico, além de não permitir a recuperação dos reagentes utilizados na precipitação para reutilização em futuros ciclos de operação, gera lamas concentradas em metais, difíceis de desidratar e de tratar. Além disso, o teor de sólidos suspensos totais na água residual tratada pode manter-se inaceitavelmente elevado, devido às fracas propriedades de compactação das lamas. Para uma separação mais eficaz pode ser necessário adicionar floculantes (polielectrólitos) que contribuem para aumentar a salinidade e a condutividade das águas bem como o custo do processo. A dose de químicos necessária é função da concentração

de metal dissolvido, pelo que a sua monitorização deve ser apertada para permitir o ajuste da dose do agente precipitante (Atkinson *et al.*, 1998).

No caso do processo de curtimento de peles utiliza-se uma solução ácida de óxido de crómio que transforma a pele dos animais em couro curtido. O Cr(III) é absorvido pela pele e forma ligações cruzadas com as fibras de colagénio pela formação de ligações de coordenação entre os grupos funcionais das proteínas, impedindo a saída de azoto do couro e a sua consequente degradação. Neste processo gera-se uma água residual que pode ter uma concentração de Cr(III) até 3 g.L^{-1} a pH 4, cujo tratamento típico consiste no aumento do seu pH com ou sem a adição de coprecipitantes como o ferro ou coagulantes orgânicos. Após o tratamento de precipitação, as águas residuais apresentam valores de condutividade elevados (Tobin e Roux, 1998).

Estes processos físico-químicos, ainda que utilizados desde há décadas, têm uma eficiência económica limitada. A elevada necessidade de reagentes e a reduzida previsibilidade da remoção de metais, são algumas das desvantagens que lhe estão associadas e que são acentuadas no caso de grandes volumes de água residual com matéria orgânica complexa e baixas concentrações de metal (Malik, 2004). Têm ainda como desvantagem a produção de lamas químicas tóxicas cuja deposição final e/ou tratamento agravam a sua viabilidade técnico-económica e a sua eco-eficiência (Ahluwalia e Goyal, 2007).

Por outro lado, as actuais MTD para o tratamento de águas residuais com metais pesados, ou não têm a eficiência necessária ou são demasiado dispendiosas tornando-se proibitivas para os elevados volumes de água a tratar (Davis *et al.*, 2000; Volesky, 2001). Exemplo disso é a troca iónica, que podendo minimizar a formação de lamas químicas, tem um elevado custo associado às resinas utilizadas que limita a sua aplicação (Niu e Volesky, 1999; Yun *et al.*, 2001), particularmente para processos de pequena escala (Atkinson *et al.*, 1998). No entanto, o elevado custo das resinas de troca iónica pode, em alguns casos, ser compensado pelo valor do metal recuperado (Volesky, 1987). As resinas são vulneráveis à oxidação química, são afectadas pela presença de iões Ca^{2+} e Mg^{2+} em solução e são passíveis de sofrer obstrução *fouling* por precipitados e substâncias orgânicas (Atkinson *et al.*, 1998). Estas resinas nem sempre são suficientemente selectivas para permitir a recuperação de metais a partir de uma corrente (Kratochvil *et al.*, 1997; Tarley e Arruda, 2004).

A utilização de carvão activado tem com principais inconvenientes o atrito e o *fouling* do carvão, o que resulta em perdas de carvão no circuito de adsorção que podem atingir os 40 % (Niu e Volesky, 1999). Ambos os processos de adsorção e troca iónica são caros quando a concentração de metais varia na gama entre $10\text{-}100 \text{ mg.L}^{-1}$ (Goyal *et al.*, 2003).

A aplicação de tecnologias de membrana no tratamento de águas residuais contaminadas com metais também tem várias desvantagens. Para além dos elevados custos, as membranas podem não resistir a determinados químicos e condições de pH, e são susceptíveis de deterioração na presença de microrganismos. Os principais problemas que lhe estão associados são a compactação, curto período de operação e aplicabilidade apenas a correntes pouco concentradas em iões metálicos. O consumo de energia aumenta à medida que a concentração

da solução aumenta, e para operar o sistema com sucesso é necessária mão-de-obra especializada.

Na Tabela 1.1 são apresentadas as tecnologias correntemente utilizadas no tratamento de águas residuais contaminadas com metais pesados, evidenciando os constrangimentos de ordem técnica ou económica que por vezes limitam a sua aplicação (Goyal *et al.*, 2003; Zouboulis *et al.*, 2004), e que se podem resumir como sendo os elevados custos de capital, as elevadas necessidades de reagentes e energia, a remoção incompleta de metais e a geração de elevadas quantidades de lamas tóxicas com necessidades específicas para a sua deposição (Bai e Abraham, 2003; Mack *et al.*, 2007). Os custos globais do processo serão influenciados por vários critérios, nomeadamente a versatilidade e simplicidade, dependendo ainda de factores como a concentração de metal em solução, modo de operação do equipamento, necessidade de tratamentos secundários (e.g. regeneração do carvão activado granular (CAG) e resinas), selectividade e necessidade de deposição de lamas (Eccles, 1999).

Face a este cenário, e considerando que há tendência para a diminuição dos limites legais da concentração de metais nas águas e águas residuais, as actividades industriais produtoras de águas residuais contaminadas com metais pesados vão ser pressionadas para melhorar o seu desempenho ambiental, regenerando os banhos de soluções metálicas, reciclando os metais e os ácidos, e diminuindo os consumos de água. Neste contexto é urgente desenvolver novas tecnologias para a remoção e/ou recuperação de metais a partir de soluções diluídas (1 a 100 mg.L⁻¹) e que permitam a redução de metais para concentrações muito baixas (Gavrilescu, 2004), que sejam ecoeficientes e permitam a descarga das águas residuais com a qualidade exigida pelo enquadramento legal e a custos aceitáveis (Mack *et al.*, 2007; Saeed e Iqbal, 2003).

À luz destas questões, a utilização de materiais biológicos para o tratamento de águas residuais com metais pesados emergiu como uma opção económica e com benefícios ambientais (Ahluwalia e Goyal, 2007). A sorção e/ou complexação de metais dissolvidos baseada na actividade de biomassa microbiana fornece os fundamentos desta aplicação biotecnológica de biorremediação, conhecida por biossorção, para a remoção e recuperação de metais, prometendo vir a ser uma alternativa de tratamento economicamente atractiva e aplicável a uma grande variedade de águas residuais industriais (Volesky e Holan, 1995). A biossorção emerge, assim, como uma opção de baixo custo e *low-tech* para a remoção e recuperação de metais de águas residuais (Mack *et al.*, 2007).

Tabela 1.1 – Tecnologias convencionalmente utilizadas na remoção de metais pesados. Adaptado de Ahluwalia e Goyal (2007), Eccles (1999), Volesky (2001) e Zouboulis *et al.* (2004).

Método		Características de desempenho					Desvantagens	Vantagens
		Variações de pH	Selectividade	Presença de sólidos suspensos	Tolerância a orgânicos	[metal] adequada (mg/L)		
Precipitação química e filtração	HO	Tolerante	Não selectivo	Tolerante	Tolerante	> 10	<ul style="list-style-type: none"> • eficiência dependente de pH e presença de outros íões • gera lamas com elevado teor de água com custo de tratamento e deposição elevado (pode necessitar de adição de coagulante) • Falta de especificidade e pouca eficiência em soluções diluídas 	<ul style="list-style-type: none"> • simples e adequa-se a [metal] elevada • baixos custos de capital e de operação • desempenho previsível e bem compreendido a larga escala
	S	Tolerância limitada	Limitada, dependente do pH	Tolerante	Tolerante	> 10		
Oxidação ou redução química							<ul style="list-style-type: none"> • necessidade reagentes (não são universais) 	<ul style="list-style-type: none"> • mineralização
Tratamento electroquímico		Tolerante	Moderada	Pode ser ajustado para tolerar	Pode ser adaptado	> 10	<ul style="list-style-type: none"> • aplicável a concentrações de metal elevadas • sensibilidade a condições específicas (e.g. presença de compostos interferentes) • elevados custos 	<ul style="list-style-type: none"> • permite a recuperação do metal
Membrana/Osmose inversa		Limitada	Moderada	Problemas de obstrução	Intolerante	> 10	<ul style="list-style-type: none"> • necessita da aplicação de pressões elevadas • ocorrência de <i>fouling</i> da membrana • elevados custos 	<ul style="list-style-type: none"> • produz permeado (efluente) limpo (disponível para reciclagem)
Troca iónica		Tolerância limitada	Resinas quelantes podem ser selectivas	Problemas de obstrução	Pode ocorrer envenenamento	< 100	<ul style="list-style-type: none"> • sensível à presença de partículas (sólidos em suspensão) e compostos orgânicos • elevados custos de capital e operação • não selectiva e sensível a pH 	<ul style="list-style-type: none"> • eficiente, com capacidade para reduzir a [metal] a ppb • produz efluente limpo e permite a recuperação do metal • desempenho previsível e bem compreendido
Adsorção (CAG)		Limitada	Moderada	Obstrução	Pode ocorrer envenenamento	< 10	<ul style="list-style-type: none"> • não muito eficaz para alguns metais • elevados custos de capital 	
Evaporação							<ul style="list-style-type: none"> • consumo energético • produção de lamas 	<ul style="list-style-type: none"> • efluente puro (para reciclagem)

1.3.2 Utilização de biomassa

A actividade de investigação associada à biossorção teve início nos anos 80 (Volesky, 2001), sendo que apenas nessa década ficou bem estabelecido o potencial de biossorção de materiais biológicos (Volesky e Holan, 1995). Até à época os estudos sobre aplicações de microrganismos na recuperação ambiental centravam-se apenas na degradação de compostos orgânicos, dada a sua capacidade de oxidar matéria orgânica a CO₂ enquanto que apenas conseguem alterar a especiação dos metais em solução (Lovley e Coates, 1997). Verifica-se desde então um intenso esforço de investigação para a caracterização das propriedades de ligação a metais pesados por diferentes tipos de biomassa (Davis *et al.*, 2003b), propriedades essas que servem de base à remoção de metais pesados quando estes se apresentam em soluções diluídas (Vieira e Volesky, 2000).

Na sequência de estudos demonstrando que biossorbentes de baixo custo podem apresentar capacidade de remoção de metais elevada e selectividade, Volesky (1987) afirmou que a sua aplicação, além de constituir uma alternativa estratégica para a recuperação de metais, poderá ser útil quando as resinas de troca iónica não são economicamente viáveis, particularmente em processos combinados de purificação/recuperação de águas residuais com baixas concentrações de metais pesados (1-100 mg.L⁻¹).

A biossorção, definida como um processo passivo de ligação de iões a biomassa viva ou morta (Schiewer e Volesky, 1997), é assim reconhecida como uma potencial alternativa às tecnologias existentes (Palmieri *et al.*, 2002; Volesky, 2001; Yun e Volesky, 2003). O processo de acumulação de metais utilizando biossorbentes é basicamente um processo de contacto sólido-líquido, sendo, na sua configuração tecnológica, muito semelhante às aplicações de resinas de troca iónica ou de adsorção com carvão activado. O contacto adequado entre a solução de metal e o biossorvente pode ser realizado num dos seguintes sistemas: tanque descontínuo agitado, tanque contínuo agitado, reactor de leito fixo, reactor de leito pulsante, reactor de leito fluidizado, ou pela combinação de leitos múltiplos (Sag *et al.*, 2000).

O biossorvente pode concentrar metais pesados até mil vezes relativamente à sua concentração em solução (Davis *et al.*, 2003b). Este processo é normalmente muito eficiente, sendo possível explorar as características do processo para recuperar metais selectivamente (Palmieri *et al.*, 2002).

Segundo Sze *et al.* (1996), o biossorvente ideal para remover metais pesados de águas residuais industriais deve preencher os seguintes requisitos, comuns aos adsorbentes convencionais: i) deve possuir elevada capacidade de remoção de metais e elevada velocidade de acumulação; ii) deve ter o tamanho, forma e as propriedades físicas que permitem uma eficiente separação do efluente tratado e poder ser utilizado em sistemas de fluxo contínuo; iii) dever ser produzido a baixo custo e ser reutilizável sem perda significativa de viabilidade; e iv) deve permitir a recuperação dos metais sorvidos de forma económica.

1.3.2.1 Tipos de biomassa

Os principais incentivos à implementação da biossorção à escala industrial são a elevada eficiência no tratamento de águas residuais com baixas concentrações de metais pesados, a elevada qualidade do efluente gerado e os baixos custos que lhe estão associados (Davis *et al.*, 2003b; Kratochvil e Volesky, 2000). O primeiro desafio que se colocou ao seu desenvolvimento foi a selecção dos tipos de biomassa mais promissores de entre a vasta oferta de produtos com elevada disponibilidade e a baixo custo (Sag, 2001). Em vez de procurar, entre os milhares de espécies microbianas, por aquelas que têm características particulares para o sequestro de metais, é mais vantajoso procurar biomassas já disponíveis em grandes quantidades para suprir a potencial procura (Ahluwalia e Goyal, 2007). Esta busca tem centrado a atenção nas capacidades de ligação a metais de microrganismos (bactérias, leveduras, algas, etc.) (Goyal *et al.*, 2003), sendo-lhes recolhida a capacidade de sequestrar metais (Davis *et al.*, 2003a). Os materiais de natureza celulósica também são apontados como potenciais bons biossorbentes (Volesky e Holan, 1995).

A fonte e o tipo de biomassa têm um papel determinante no custo total do material biossorbente. Se a biomassa precisar de ser cultivada especificamente para este propósito, o preço de venda incluirá os custos de manutenção, de produção e ainda as taxas comerciais (Atkinson *et al.*, 1998). Os biomateriais a utilizar podem ter como origem i) subprodutos de indústrias de fermentação; ii) organismos naturalmente disponíveis em grandes quantidades na natureza (Ahluwalia e Goyal, 2007); e iii) biomassa com elevada capacidade de biossorção, especificamente propagada de forma relativamente económica em biorreactores utilizando meios de crescimento com fontes de carbono de baixo custo (e.g. melaço e soro de queijo) (Sag, 2001).

Uma vez que o custo de produção de biomassa especificamente para estas aplicações pode tornar o processo economicamente inviável à escala industrial, a matéria-prima que constitui os biossorbentes deve ser preferencialmente um material residual ou subproduto, como acontece com a biomassa obtida em processos de fermentação à escala industrial (Volesky e Holan, 1995; Zouboulis *et al.*, 2001), cujo destino mais vulgar é a alimentação animal, a utilização como fertilizante orgânico ou a incineração (Puranik e Paknikar, 1997). A abundância destes materiais e a das algas recolhidas no seu meio natural (recurso renovável) torna-os, do ponto de vista económico, particularmente interessantes para a aplicação em processo de biossorção (Lee e Volesky, 1997; White *et al.*, 1995). No entanto Atkinson *et al.* (1998) refere que as algas *Sargassum fluitans* e *Ascophyllum nodosum* ainda que disponíveis em abundância e tendo potencial de biossorção, podem ter a sua aplicação comprometida devido aos custos de recolha. Os resíduos agrícolas de natureza celulósica constituem outra fonte abundante de potenciais materiais biossorbentes. É um tipo de biomassa disponível, inesgotável, económica e que tem uma especificidade significativa para iões metálicos (Garg *et al.*, 2007).

Bailey *et al.* (1999) apresentam uma compilação de vários materiais considerados potenciais sorbentes de baixo custo para metais pesados. Segundo estes autores o custo do biossorbente é um parâmetro que importa considerar na comparação de materiais sorbentes. Em geral um

sorvente pode ser considerado de baixo custo se requerer pouco processamento, for naturalmente abundante ou for um produto residual de uma actividade industrial. Naturalmente que o investimento num processamento que aumente a capacidade de sorção de um material pode compensar dessa forma o seu custo.

Vários resíduos biológicos de indústrias de produção de cerveja, lacticínios e farmacêuticas podem ser utilizados como potencial alternativa no tratamento de águas residuais industriais com metais (Ozer e Ozer, 2003). De entre aqueles cujas propriedades de biossorção têm vindo a ser estudadas, é possível destacar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* residual da indústria alimentar e de bebidas, os fungos *Rhizopus arrhizus* da indústria alimentar, *Penicillium chrysogenum* da produção de antibióticos, e *Aspergillus niger* da produção de ácido cítrico e enzimas; as bactérias *Bacillus* spp. utilizadas na fermentação de aminoácidos e antibióticos, e *Streptomyces noursei* da indústria farmacêutica; e lamas activadas resultantes de estações de tratamento de águas residuais. Estes biossorbentes podem ser adquiridos sem custo ou a baixo custo, já que em algumas situações também representam um problema no que respeita à sua deposição final (Atkinson *et al.*, 1998). No entanto, há que considerar que alguns destes tipos de biomassa são *commercial commodities* e não um resíduo, como o caso da levedura de cerveja, vendida por um bom preço para alimentação animal (Volesky, 2001).

O requisito do biossorvente ter elevada capacidade de remoção de metais pode ser alcançado através da manipulação das condições de cultura e pela aplicação de pré-tratamentos (Sze *et al.*, 1996). Os biossorbentes são preparados a partir de biomassa naturalmente abundante e/ou residual de algas, musgo, fungos ou bactérias que é inactivada e geralmente pré-tratada através da lavagem com soluções ácidas e/ou bases antes da aplicação. Alguns tipos de biomassa têm de ser imobilizadas numa matriz de polímeros sintéticos e/ou inserida num material de suporte inorgânico como a sílica, de forma a produzir partículas com as propriedades mecânicas adequadas para poderem ser empacotadas em colunas de biossorção, a forma mais eficaz para a remoção contínua de metais (Figueira *et al.*, 2000a).

Nos últimos anos têm-se estudado vários biomateriais de baixo custo quanto ao seu potencial biossorvente, com vista ao tratamento de águas residuais industriais ou extracção de metais preciosos, de entre os quais se podem referir algas (Aksu, 2002; Bishnoi *et al.*, 2007; Cossich *et al.*, 2004; Donmez e Aksu, 2002; Doshi *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2001; Kalyani *et al.*, 2004; Kratochvil *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2004; Volesky *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2001), bactérias (Kefala *et al.*, 1999; Pagnanelli *et al.*, 2003; Solisio *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003a; Zouboulis *et al.*, 2004), leveduras (Bingol *et al.*, 2004; Blackwell *et al.*, 1997; Chen e Wang, 2007b; Goksungur *et al.*, 2005; Ozer e Ozer, 2003; Park *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007), fungos (Bai e Abraham, 2002; Butter *et al.*, 1998b; Puranik e Paknikar, 1997; Tobin e Roux, 1998), plantas (Malik *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 1999), drêches (Low *et al.*, 2000), bagaço de cana de açúcar (Garg *et al.*, 2007), casca de arroz (Tarley e Arruda, 2004), resíduos de cenoura (Nasernejad *et al.*, 2005) e de laranja (Khormaei *et al.*, 2007), bagaço de uva (Farinella *et al.*, 2007) entre outros.

Quando se determina a aplicabilidade de um determinado bioissorvente, a sua capacidade máxima para sequestrar metais também vai contribuir para o custo total do processo, pois influencia a quantidade de biomassa requerida por ciclo de tratamento, que por sua vez vai determinar a quantidade de lama gerada para deposição final e o custo de transporte que lhes está associado. Mesmo quando é possível adquirir uma biomassa sem qualquer custo, o volume que vai ser necessário transportar vai gerar custos que podem tornar o processo inviável (Atkinson *et al.*, 1998). De acordo com estes autores a capacidade de remoção que a biomassa deve ter para ser considerada competitiva com outras tecnologias é de 150 mg.g^{-1} , no entanto, e de acordo com os valores apresentados na Tabela 1.2, onde se são apresentadas as características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa, não é comum encontrarem-se biomassas com estas características.

1.3.2.2 Vantagens e aplicações

A combinação entre as pressões ambientais e a necessidade de redução de custos torna a remoção e a recuperação de metais de águas residuais um assunto prioritário, que representa oportunidades de negócio associadas ao desafio científico. Neste domínio a aplicação de processos de bioissorção, comparativamente aos sistemas de troca iónica, pode reduzir os custos de capital em 20 %, os custos de operação em 36 %, e os custos totais do tratamento em 28 % (Zouboulis *et al.*, 2004). O facto de o preço dos bioissorventes ser cerca de 10 % do preço das resinas de troca iónica confere-lhe uma vantagem económica e, atendendo que ainda é uma tecnologia em desenvolvimento, é de esperar optimizações o nível do seu desempenho e na redução de custos (Volesky, 2001).

As vantagens destes métodos de biorremediação, tidas como os incentivos do desenvolvimento de processos de bioissorção à escala industrial, são os baixos custos de operação, a minimização do volume de lamas químicas e/ou biológicas para tratar e deposição e a elevada eficiência para tratar águas residuais muito diluídas (Figueira *et al.*, 1999; Kadukova e Vircikova, 2005; Kratochvil e Volesky, 1998a; Mack *et al.*, 2007). Segundo Volesky (2001), a performance dos processos de bioissorção na remoção de metais é comparável à dos processos comercialmente seus competidores, como a troca iónica, sendo possível obter efluentes tratados com concentrações de metal da ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$. Também é apontada como vantagem da bioissorção, a possibilidade de se regenerar o bioissorvente e recuperar os metais (Kratochvil e Volesky, 1998b; Zouboulis *et al.*, 2001).

A bioissorção tem aplicação no tratamento de águas residuais com baixas concentrações em metais (Ahluwalia e Goyal, 2007), pelo que não contemplam necessariamente a substituição das tecnologias tradicionais, mas podem actuar como tratamento secundário ou de polimento para processos que não são totalmente eficientes, complementando-os em processos de optimização multidisciplinares permitindo alcançar valores abaixo da gama dos mg.L^{-1} no efluente final (Atkinson *et al.*, 1998; Bai e Abraham, 2002; Kefala *et al.*, 1999; Remoudaki *et al.*, 2003).

Tabela 1.2 – Resumo das características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.

Metal	Biomassa	Origem/Estado viabilidade	Pré-tratamento	pH	q_{max} (mg.g ⁻¹)	Referência
Ag	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	41,53	Chen e Wang (2007b)
Cd	<i>Actinomyces</i> JL322	Laboratorial/Viável		7	22,81	Kefala <i>et al.</i> (1999)
	<i>Actinomyces</i> JL322	Laboratorial/Não viável	Autoclavagem, 121 °C 20 min	7	35,98	Kefala <i>et al.</i> (1999)
	<i>Actinomyces</i> AK61	Laboratorial/Viável		7	23,02	Kefala <i>et al.</i> (1999)
	<i>Actinomyces</i> AK61	Laboratorial/Não viável	Autoclavagem, 121 °C 20 min	7	44,44	Kefala <i>et al.</i> (1999)
	<i>Aeromonas caviae</i>	Isolada de reservatório de água/Não viável	Esterilização	7	155,3	Loukidou <i>et al.</i> (2004b)
	<i>Bacillus laterosporus</i>	Isolada de solos poluídos/Não viável	Lavagem com NaCl 0,9 %, Autoclavagem a 121 °C	7	159,5	Zouboulis <i>et al.</i> (2004)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Isolada de solos poluídos/Não viável	Lavagem com NaCl 0,9 %, Autoclavagem a 121 °C	7	142,7	Zouboulis <i>et al.</i> (2004)
	Bagaço de uva	Adega	Secagem a 50 °C, moagem	7	53,84	Farinella <i>et al.</i> (2007)
	Casca de grão (<i>Cicer arietinum</i>)	Moagem	Fervura em água destilada	5	38,76	Saeed e Iqbal (2003)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Laboratorial/Não viável	Secagem a 60 °C	4	111	Aksu (2001)
	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Residual de um processo industrial de produção de antibiótico	Lavagem com Na ₂ SO ₄ /formaldeído		52,8	Butter <i>et al.</i> (1998b)
	Drêches	Indústria de cerveja	NaOH 0,5 M	5,3-5,6	17,3	Low <i>et al.</i> (2000)
	Quitina	Casca de caranguejo		5,7-6,4	15,34	Benguella e Benaissa (2002)
	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	15,41	Chen e Wang (2007b)
	<i>S. cerevisiae</i>	Levedura de padeiro industrial/Não viável	Etanol a 70 % (M/V), secagem a 70 °C	6	31,75	Goksungur <i>et al.</i> (2005)
	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 384	Laboratorial/Não viável	Autoclavagem, 121 °C 20 min	7,5	132,5	Park <i>et al.</i> (2003)
	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24858	Laboratorial/Não viável	Autoclavagem, 121 °C 20 min	7,5	125	Park <i>et al.</i> (2003)
	<i>S. cerevisiae</i> (padeiro)	Levedura desidratada e prensada comercial/Viável		4,5	22	Volesky <i>et al.</i> (1993)
<i>S. cerevisiae</i> (cerveja)	Levedura desidratada e prensada comercial/Viável		4,5	32	Volesky <i>et al.</i> (1993)	

Tabela 1.2 (continuação) – Resumo das características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.

Metal	Biomassa	Origem/Estado viabilidade	Pré-tratamento	pH	q_{max} (mg.g ⁻¹)	Referência
Cd	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Viável		5	8,46	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	5	8,36	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	6	20,31	Yan e Viraraghavan (2003)
Co	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	7,54	Chen e Wang (2007b)
Cr(III)	Caules de girassol		Corte do tecido externo em porções de 1 cm, lavagem com água destilada, secagem a 105 °C e moagem	3	6,24	Malik <i>et al.</i> (2005)
	<i>Eklonia</i> sp.	Costa da Coreia/Não viável	Secagem ao sol, lavagem com H ₂ SO ₄ 2 N, secagem a 80 °C	4	34,1	Yun <i>et al.</i> (2001)
	<i>Eklonia</i> sp.	Costa da Coreia/Não viável	Secagem ao sol, lavagem com H ₂ SO ₄ 1 M, secagem a 100 °C 240 h	3,5	38,4	Park <i>et al.</i> (2004)
	<i>Eklonia</i> sp.	Costa da Coreia/Não viável	Secagem ao sol, lavagem com H ₂ SO ₄ 1 M, secagem a 60 °C, 24 h	3,5	37,04	Park <i>et al.</i> (2004)
	Musgo			5	18,9	Lee <i>et al.</i> (1995)
	<i>Padina</i> sp.	Não viável	Moagem e secagem a 60 °C	3,8	43,68	Sheng <i>et al.</i> (2004a)
	Resíduos de cenoura		Secagem a 60 °C, moagem, lavagem com NaOH 0,5 M	4,5	45,09	Nasernejad <i>et al.</i> (2005)
	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	12,84	Chen e Wang (2007b)
	<i>Sargassum</i> sp.	Não viável	Secagem a 60 °C	3,5	68,11	Cossich <i>et al.</i> (2004)
	<i>Sargassum</i> sp.	Não viável	Moagem e secagem a 60 °C	3,8	41,08	Sheng <i>et al.</i> (2004a)
	<i>Spirulina</i> sp.	Maré de algas local/Viável			304	Doshi <i>et al.</i> (2007)
<i>Spirulina</i> sp.	Maré de algas local/Não viável	Secagem ao sol por 48 h		167	Doshi <i>et al.</i> (2007)	
<i>Spirugyra</i> sp.	Não viável	Secagem a 50 °C, moagem	5	28,16	Bishnoi <i>et al.</i> (2007)	

Tabela 1.2 (continuação) – Resumo das características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.

Metal	Biomassa	Origem/Estado viabilidade	Pré-tratamento	pH	q_{max} (mg.g ⁻¹)	Referência
Cr(VI)	<i>Bacillus laterosporus</i>	Isolada de solos poluídos/Não viável	Lavagem com NaCl 0,9 %, Autoclavagem a 121 °C	2,5	72,6	Zouboulis <i>et al.</i> (2004)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Isolada de solos poluídos/Não viável	Lavagem com NaCl 0,9 %, Autoclavagem a 121 °C	2,5	62	Zouboulis <i>et al.</i> (2004)
	Bagaço de cana de açúcar		Secagem ao sol, fervura em H ₂ O 30 min, secagem a 120 °C e moagem	2	0,63	Garg <i>et al.</i> (2007)
	Carolo de milho		Fervura em água 30 min, secagem a 120 °C, moagem	2	0,28	Garg <i>et al.</i> (2007)
	Drêches	Indústria cervejeira	Lavagem com solução de HCl 1 M na proporção 1:10 em massa, 1 h à temperatura ambiente, lavagem com H ₂ O	2	18,94	Low <i>et al.</i> (2001)
	<i>Dunaliella</i> sp.	Viável		2	111	Donmez e Aksu (2002)
	<i>Rhizopus nigricans</i>	Laboratorial/Não viável	Autoclavagem, secagem e moagem	2	123,45	Bai e Abraham (2002)
	<i>Rhizopus nigricans</i>	Laboratorial/Não viável	Autoclavagem, secagem e moagem, solução de propil trimetoxi silano 24 h	2	200,00	Bai e Abraham (2002)
	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria/Não viável	Secagem a 80 °C, tratamento com surfactante catiónico (CTBA)	5,5	94,34	Bingol <i>et al.</i> (2004)
	<i>S. cerevisiae</i>	Laboratorial/Não viável	Secagem a 100 °C	1	32,6	Ozer e Ozer (2003)
Sementes de <i>Ocimum basilicum</i>		Fervura em H ₂ O	1-1,5	205	Melo e D'Souza (2004)	
<i>Spirogyra</i> sp.	Tanques cimento/Não viável	Secagem ao sol e moagem	5,85	14,7	Gupta <i>et al.</i> (2001)	
Cu	<i>Cladophora crispata</i>	Canais de irrigação de água/Não viável	Secagem a 90 °C	4,5	57,5	Ozer <i>et al.</i> (2004)
	Pó de cortiça	Indústria		4,9	20	Chubar <i>et al.</i> (2003)
	Resíduos de laranja	Resíduo de indústria de processamento	Secagem a 70 °C, moagem e peneiração	4,5	23,47	Khormaei <i>et al.</i> (2007)
	Resíduos de laranja	Resíduo de indústria de processamento	Secagem a 70 °C, moagem e peneiração, 25 h em NaOH 0,1 M	4,5	52,08	Khormaei <i>et al.</i> (2007)

Tabela 1.2 (continuação) – Resumo das características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.

Metal	Biomassa	Origem/Estado viabilidade	Pré-tratamento	pH	q_{max} (mg.g ⁻¹)	Referência
Cu	<i>S. cerevisiae</i>	Levedura de padeiro/Não viável	Crosslinking com glutaraldeído 0,5 % 24 h, secagem por congelação		20,0	Yu <i>et al.</i> (2007)
	<i>S. cerevisiae</i>	Levedura de padeiro/ Não viável	Crosslinking com glutaraldeído 0,5 % 24 h, secagem por congelação, modificação com EDTA		192,3	Yu <i>et al.</i> (2007)
	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	10,21	Chen e Wang (2007b)
Cs	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	12,23	Chen e Wang (2007b)
Ni	<i>Chlorella vulgaris</i>	Não viável	Secagem a 60 °C	4,5	63,25	Aksu (2002)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Viável		5	11,09	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	5	6,34	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	6	20,491	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Pseudomonas putida</i> 5-x	Isolada de água residual de indústria de electrodeposição/Viável	Lavagem com tampão MES a pH 6,5		28,1	Wang <i>et al.</i> (2003a)
	<i>Pseudomonas putida</i> 5-x	Isolada de água residual de indústria de electrodeposição	Lavagem com NaCl 0,2 %, lavagem com HCl 0,1 M e Lavagem com tampão MES a pH 6,5		36,7	Wang <i>et al.</i> (2003a)
	<i>Sargassum sp.</i>	Não viável	Banho de acetona 1:10; Desidratação	5	181	Kalyani <i>et al.</i> (2004)
	<i>Sargassum sp.</i>	Não viável	Banho de HCl 1N a 50 °C, lavagem com NaOH 1 N; Desidratação	5	250	Kalyani <i>et al.</i> (2004)
Pb	Bagaço de uva	Adega	Secagem a 50 °C, moagem	3	42,27	Farinella <i>et al.</i> (2007)
	Drêches	Indústria de cerveja	NaOH 0,5 M	5,3-5,6	35,5	Low <i>et al.</i> (2000)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Viável		5	35,69	Yan e Viraraghavan (2003)

Tabela 1.2 (continuação) – Resumo das características de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.

Metal	Biomassa	Origem/Estado viabilidade	Pré-tratamento	pH	q_{max} (mg.g ⁻¹)	Referência
Pb	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	5	25,22	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	6	53,75	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>S. cerevisiae</i>	Levedura de padeiro industrial/Não viável	Etanol a 70 % (M/V), secagem a 70 °C	5	60,24	Goksungur <i>et al.</i> (2005)
	<i>S. cerevisiae</i>	Laboratorial/Não viável	Secagem a 100 °C	5	270,3	Ozer e Ozer (2003)
	<i>S. cerevisiae</i>	Levedura de padeiro/Não viável	Crosslinking com glutaraldeído 0,5 % 24 h, secagem por congelamento		4,5	Yu <i>et al.</i> (2007)
	<i>S. cerevisiae</i>	Levedura de padeiro/ Não viável	Crosslinking com glutaraldeído 0,5 % 24 h, secagem por congelamento, modificação com EDTA		65,0	Yu <i>et al.</i> (2007)
	<i>S. cerevisiae</i> <i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	Indústria de cerveja Industrial/Não viável	Biomassa desidratada, moagem Secagem a 60 °C, fervura em água	4 4	85,57 57,7	Chen e Wang (2007b) Puranik e Paknikar (1997)
Sr	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	9,99	Chen e Wang (2007b)
Zn	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Viável		5	7,75	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	5	16,62	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>Mucor rouxii</i>	Laboratorial/Não viável	Lavagem com NaOH 0,2 M 30 min, lavagem com H ₂ O até pH neutro, autoclavagem 30 min a 121 °C, secagem a 60 °C	6	53,85	Yan e Viraraghavan (2003)
	<i>S. cerevisiae</i>	Indústria de cerveja	Biomassa desidratada, moagem	4	9,68	Chen e Wang (2007b)
	<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	Industrial/Não viável	Secagem a 60 °C, fervura em água	5,5	21,3	Puranik e Paknikar (1997)

A capacidade de acumulação de metais por microrganismos também tem aplicação como método de biorremediação intrínseca e/ou forçada em sistemas naturais. Lovley e Coates (1997) referem que apesar de os óxidos de Fe(III) e argilas serem considerados os principais componentes do solo envolvidos no sequestro de metais, o estímulo do crescimento de microrganismos nativos com capacidade de bioabsorção tem utilidade para a imobilização de metais no solo e a consequente prevenção de contaminação de lençóis freáticos. Igualmente consideram a possibilidade de utilizar microrganismos com capacidade de bioabsorção em ambientes superficiais como uma barreira que impeça os metais de alcançar as águas subterrâneas. Barkay e Schaefer (2001) referem que a distribuição e a diversidade da população microbiana existente numa área contaminada, e a identificação dos genes que codificam fenótipos que favorecem as interações metal-microrganismo, são elementos críticos para a biorremediação de metais, sendo fundamentais para delinear estratégias de biorremediação como a bioestimulação da flora indígena ou a bioampliação com microrganismos cujas características específicas e ecofisiologia sejam compatíveis com as condições *in situ*. Estando demonstrada a remoção de metais *in situ* por algas (Gadd, 2000), estudos de carácter ecológico dos níveis de metais encontrados em algas marinhas servem também para detectar a contaminação da água por espécies metálicas (Holan e Volesky, 1994), abrindo a possibilidade de as utilizar como bioindicadores de poluição por metais pesados (Mehta *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de tecnologias de recuperação de metais baseadas na aplicação de biomassa microbiana dependem de factores como a capacidade de remoção, a eficiência e a selectividade do bioabsorvente, a facilidade de recuperação e de regeneração do bioabsorvente, a equivalência económica e de desempenho relativamente às tecnologias químicas e física, a imunidade relativamente à interferência de outros constituintes da água residual ou condições de operação (Atkinson *et al.*, 1998). Segundo Volesky (1987) os processos de bioabsorção devem preencher os seguintes requisitos: i) a acumulação e a libertação do metal devem ser eficientes e rápidas; ii) o bioabsorvente deve ser produzido a baixo custo e ser reutilizável; iii) o tamanho, forma e propriedades mecânicas das partículas devem ser adequados para aplicar a sistemas de fluxo contínuo de mistura completa, leito empacotado ou fluidizado; iv) a remoção do bioabsorvente da solução deve ser económica, eficiente e rápida; v) o bioabsorvente deve ser selectivo para permitir a separação de metais a partir de soluções mistas de metais; e vi) a dessorção deve ser selectiva, economicamente viável e envolver perdas de bioabsorvente mínimas.

De acordo com Wang e Chen (2006) os trabalhos de revisão sobre bioabsorção como os de Davis *et al.* (2003b), Kapoor e Viraraghavan (1995), Kratochvil e Volesky (1998a), Malik (2004), Volesky (2001), Volesky e Holan (1995), White *et al.* (1995), e Veglio e Beolchini (1997) apontam para o facto de a investigação nesta área se centrar nos seguintes aspectos: i) a pesquisa e selecção dos tipos de biomassa mais promissores; ii) o mecanismo de bioabsorção, que ainda não é completamente conhecido; e iii) o *scale-up*. A bioabsorção é uma área de interesse que ocupa uma interface entre a biologia, a química e a engenharia, cujo futuro depende do sucesso da interacção entre estas áreas disciplinares (Kefala *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 2 – Acumulação de metais por biossorventes

CAPÍTULO 2 – Acumulação de metais por bioissorventes

2.1 Interações metal-microrganismos

Os microrganismos podem ser utilizados para eliminar a contaminação ambiental de metais, removendo-os de águas contaminadas, sequestrando-os de solos e sedimentos ou solubilizando-os e facilitando a sua extração (Mejare e Bulow, 2001). O termo “biorremediação” normalmente associado à despoluição ambiental pela aplicação de sistemas biológicos que transformam os poluentes em produtos menos perigosos para o ambiente (Reis *et al.*, 2003), pode parecer não completamente ajustado quando aplicado a metais, pois na realidade nenhum processo pode degradar nem eliminar elementos inorgânicos (Barkay e Schaefer, 2001). Os microrganismos podem apenas alterar as suas propriedades químicas através de uma variedade de mecanismos (Gavrilescu, 2004) resumidos na Figura 2.1, que diferem quantitativamente e qualitativamente, dependendo das espécies usadas, da origem da biomassa e do seu processamento (Kefala *et al.*, 1999). Assim, neste caso os objectivos da remediação podem ser alcançados das seguintes formas: i) a precipitação, e conseqüentemente a imobilização dos contaminantes inorgânicos; ii) a concentração, logo a redução do volume das matrizes contaminadas; e iii) a compartimentalização dos metais para uma parte do ambiente onde os danos provocados são minimizados (Barkay e Schaefer, 2001).

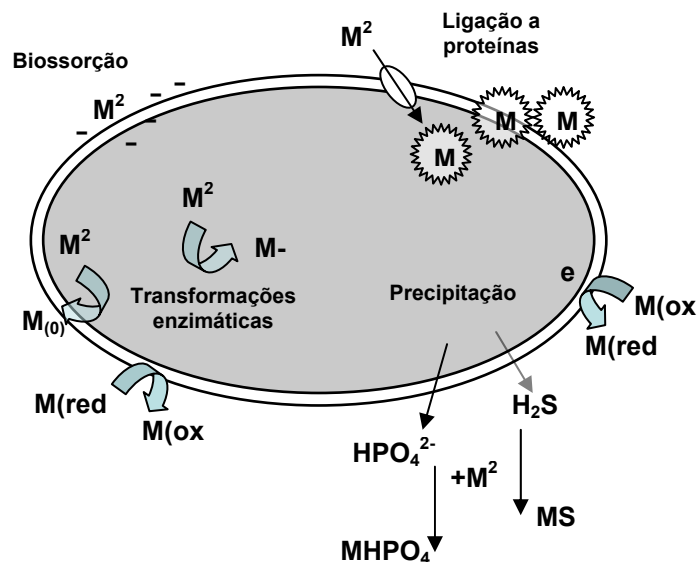


Figura 2.1 – Mecanismos que contribuem para a acumulação, transformação e redução de toxicidade de metais. Adaptado de Gadd (1996).

As interações metal-microrganismo podem envolver processos de transformação, sorção e mineralização dos metais. Nas aplicações de biorremediação, as interações metal-

microrganismos podem envolver os três fenómenos (Barkay e Schaefer, 2001). Estes processos de transformação são biogeoquimicamente importantes uma vez que intervêm na modificação da mobilidade e toxicidade dos metalóides e têm um potencial biotecnológico na biorremediação (White *et al.*, 1997), sendo que a integração destes processos pode resultar na descontaminação *in situ* ou *ex situ* de águas e solos (Gadd, 2000).

A forma como os microrganismos interagem com os metais depende em parte do facto de serem eucariotas ou procariotas. Ambos têm capacidade de se ligarem a iões metálicos presentes no ambiente externo à superfície celular ou de os transportar para o interior da célula para várias funções intracelulares. Alguns podem formar produtos metabólicos, ácidos ou ligandos, capazes de dissolver metais a partir de minerais ou formar aniões capazes de precipitar iões metálicos dissolvidos. Mas só entre os procariotas se encontram organismos capazes de oxidar metais como Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(I), AsO²⁻, Se⁰ ou SeO₃²⁻ ou reduzir Mn(IV), Fe(III), Co(III), AsO₄²⁻, SeO₄²⁻ ou SeO₃²⁻ conservando energia a partir dessas reacções (Gavrilescu, 2004).

Os mecanismos através dos quais os microrganismos produzem alterações na especiação e mobilidade dos metais são componentes fundamentais nos ciclos biogeoquímicos dos metais e também de outros elementos incluindo o carbono, azoto, enxofre e fósforo, com implicações adicionais na produtividade das plantas e na saúde humana. Assim, também as tecnologias tradicionais de tratamento de águas residuais como a lagunagem e zonas húmidas construídas têm intrínsecos os processos de remoção e transformação de metais, ainda que nestes casos não seja dada muita atenção a esta componente (Gadd, 2000).

A transformação microbiana dos metais resulta de várias funções biológicas. Pode ocorrer a redução dos metais na respiração aeróbia, originando a precipitação e redução de toxicidade se a espécie reduzida for menos tóxica e menos solúvel. Organismos quimolitotróficos oxidam Fe, S e Mn, obtendo energia por essa via. No entanto também ocorrem transformações de metais, nomeadamente de oxidação/redução, de alquilação/desalquilação, que não estão relacionadas com nenhuma função fisiológica, por processos cujo objectivo primário não está relacionado com a transformação dos metais, mas que no entanto alteram a sua solubilidade, mobilidade e toxicidade, servindo os propósitos das estratégias de biorremediação (Barkay e Schaefer, 2001).

Diferentes organismos exibem diferentes respostas aos iões tóxicos, como o transporte através da membrana celular, bioSORÇÃO às paredes celulares, aprisionamento nas estruturas extracelulares, precipitação, complexação e reacções de oxidação-redução, conferindo-lhes uma certa tolerância aos metais, demonstrando ter capacidade para remover metais de soluções aquosas, particularmente em soluções diluídas, quando a concentração varia entre 1 a 20 mg.L⁻¹ (Malik, 2004). Os eucariotas são mais sensíveis à toxicidade de metais do que as bactérias, sendo o seu mecanismo típico de regulação da concentração intracelular de metais a expressão de metalotioninas, uma família de proteínas quelantes de metais. As metalotioninas bacterianas são funcionalmente homólogas às proteínas ligantes de metais dos eucariotas: têm cadeia curta (cerca de 60 aminoácidos) e são ricas em cisteína. Outros tipos de mecanismos de resistência, que incluem o efluxo activo de metais e o seu sequestro ou transformação noutras

espécies químicas, podem tornar-se funcionais a concentrações acima da homeostase (ou nível não tóxico). Estes mecanismos de tolerância têm frequentemente origem nos plasmídeos o que facilita a dispersão de célula para célula (Valls e de Lorenzo, 2002).

Os processos biológicos tanto podem solubilizar os metais, contribuindo para aumentar a sua biodisponibilidade e potencial toxicidade, como podem imobilizá-los reduzindo a sua biodisponibilidade e toxicidade. O balanço entre estes dois processos varia dependendo do organismo, do seu ambiente e das alterações nas condições físico-químicas. Geralmente é mais fácil imobilizar um metal do que mobilizá-lo e recuperá-lo. No entanto um metal imobilizado pode continuar a ser uma fonte de problemas futuros se as condições ambientais dos sistemas naturais se modificarem (Gavrilescu, 2004; White *et al.*, 1997).

As interações metal-microrganismo podem ser analisadas como meio de remover, recuperar ou diminuir a toxicidade de metais na forma orgânica ou inorgânica. Neste ponto de vista a solubilização dos metais pode constituir uma alternativa para a sua remoção a partir de matrizes sólidas como solos, sedimentos e resíduos industriais. Por outro lado os processos de imobilização permitem a transformação dos metais *in situ* em formas insolúveis e quimicamente inertes, sendo também utilizados no tratamento de águas residuais (Gadd, 2004). A redução de sulfatos também ocorre naturalmente em zonas húmidas, naturais e construídas, contribuindo significativamente para a remoção de metais nesses sistemas (White *et al.*, 1997). Um processo integrado de biorremediação de solos contaminados com metais demonstrou ser eficaz na remoção e concentração de Cd, Cu e Zn recorrendo à biolixiviação seguida da precipitação dos metais na forma de sulfuretos levada a cabo por bactérias sulfato-redutoras (Gadd, 2000).

2.1.1 Mobilização de metais

A mobilização de metais pode ocorrer através de uma grande variedade de microrganismos e processos que incluem a lixiviação autotrófica ou heterotrófica, a quelação por metabolitos e sideróforos, e a metilação, que pode resultar na sua volatilização (White *et al.*, 1997). Estes processos podem conduzir à dissolução de compostos e minerais metálicos insolúveis incluindo óxidos, fosfatos, sulfuretos ou outros minérios mais complexos, e a dessorção de espécies metálicas de sítios de troca como a argila ou matéria orgânica no solo. Os microrganismos ainda podem mobilizar metais, metalóides e compostos organometálicos através de reacções de oxidação-redução. A solubilidade do Fe(III) e do Mn(IV) aumenta com a respectiva redução a Fe(II) e Mn(II); já a solubilidade do Cr(VI) diminui quando é oxidado a Cr(III), pelo que a reacção resulta na sua imobilização (Gadd, 2004).

2.1.1.1 Lixiviação

A lixiviação envolve a solubilização de metais, podendo ser levada a cabo através da produção de ácido orgânicos por microrganismos heterotróficos – lixiviação heterotrófica, pela oxidação bacteriana de ferro e enxofre com produção de ácido sulfúrico – lixiviação autotrófica, ou através

produção de sideróforos, ligandos específicos de Fe(III), excretados para auxiliar a sua assimilação, (Gadd, 2000; Lloyd e Lovley, 2001).

A lixiviação heterotrófica tem vindo a ser explorada com o objectivo de controlo de poluição e recuperação de metais, e ainda num contexto de fertilização mineral para aumentar a produtividade de culturas agrícolas (Gadd, 2000). Os microrganismos podem acidificar o ambiente através do efluxo de prótons via H⁺-ATPases da membrana plasmática para a manutenção do balanço de cargas, ou como resultado da acumulação de CO₂ da respiração. Esta acidificação pode resultar na libertação de cationes metálicos, nomeadamente pela competição entre os prótons e os metais em complexos aniónicos-metal ou na forma sorvida (Gadd, 2004).

Os ácidos orgânicos libertados no metabolismo heterotrófico podem actuar tanto pela contribuição de prótons como de aniões que podem actuar como complexantes dos metais. Os aniões citrato e oxalato podem formar complexos estáveis com vários metais. Muitos citratos metálicos têm elevada mobilidade e não são facilmente degradados. O ácido oxálico também pode actuar como agente de lixiviação para os metais que forma complexos estáveis com o oxalato (e.g. Al e Fe) (Gadd, 2004). Entre as espécies de fungos capazes de produzir ácidos orgânicos incluem-se *Mucor* spp. (ácido fumárico e glucónico), *Rhizopus* spp. (Ácido láctico, fumárico e glucónico) e *Aspergillus niger* (ácido cítrico, oxálico e glucónico) (White *et al.*, 1997).

A lixiviação autotrófica é levada a cabo maioritariamente por bactérias quimiolitotróficas acidofílicas que fixam CO₂ e obtêm energia da oxidação do ferro ferroso ou de compostos de enxofre reduzidos, que provocam a solubilização dos metais como consequência da formação de Fe(III) e H₂SO₄. Os microrganismos envolvidos incluem bactérias oxidantes de ferro e/ou enxofre: *Leptospirillum ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans*. Como resultado da oxidação do Fe e S, os sulfuretos metálicos são solubilizados simultaneamente com a diminuição de pH do meio envolvente, resultando na solubilização de outros compostos metálicos (Gadd, 2004).

A lixiviação de minérios por bactérias acidofílicas oxidantes de enxofre constitui uma actividade bioindustrial já estabelecida, e ainda que o seu maior interesse resulte da perspectiva hidrometalúrgica, também é possível encará-la como um método descontaminar solos ou outras matrizes (Gadd, 2000). Na perspectiva da biorremediação, tem sido utilizada a produção autotrófica de ácido sulfúrico para solubilizar metais de lamas de ETARs e de solos (Gadd, 2004).

Outro método de tratar solos contaminados com metais consiste na promoção da solubilização dos metais por sideróforos utilizando *Alcaligenes eutrophus*. Estas moléculas de coordenação de baixo peso molecular são ligandos muito específicos de Fe(III) (constantes de formação superiores a 10³⁰), excretadas em condições de baixa disponibilidade de ferro para ajudar a sua assimilação. No entanto também são capazes de se ligar a outros metais como Cr(III), Ga(III), Mg, Mn, Ni e U (Gadd, 1996; Gadd, 2004; White *et al.*, 1995). Os metais solubilizados são adsorvidos pela biomassa e/ou precipitados (Gadd, 2000).

2.1.1.2 Alquilação

A metilação é um dos processos intervenientes na transformação de metalóides (e.g. AsO_4^{3-} ou AsO_2^- a $(\text{CH}_3)_3\text{As}$) (White *et al.*, 1997). A metilação de Hg, As, Se, Sn, Te e Pb pode ser mediada por várias bactérias e fungos, em condições aeróbias e anaeróbias - biometilação. O mercúrio pode ser metilado por vários microrganismos, e.g. *Methanobacterium*, resultando na conversão dos sais de Hg^{2+} em compostos de metil mercúrio muito voláteis. O arsénio, o selénio e o telúrio podem sofrer reacções semelhantes (Gavrilescu, 2004).

Neste processo os grupos metilo são transferidos enzimaticamente para o metal. Os compostos de metal metilados formados diferem na sua solubilidade, volatilidade e toxicidade (Gadd, 2004). Os derivados biometilados dos metais são geralmente voláteis e podem ser eliminados de um sistema por evaporação. A biometilação de selénio já foi utilizada na biorremediação *in situ* de solo e água contaminado com selénio (White *et al.*, 1997).

2.1.2 Imobilização de metais

No domínio da biorremediação a solubilização dos metais permite a remoção dos metais de solos, sedimentos e resíduos. Alternativamente os processos de imobilização permitem a transformação *in situ* em formas insolúveis e inertes. Estes processos têm aplicação na remoção de metais de fases móveis como águas residuais, águas subterrâneas e lixiviados (White *et al.*, 1997).

São vários os processos que conduzem à imobilização de metais, sendo possível dividi-los em duas categorias: i) os mecanismos activos, que actuam directamente no metal e incluem precipitação na forma de compostos orgânicos ou inorgânicos como oxalatos, sulfuretos e fosfatos, o transporte e sequestro intracelular, e a oxidação-redução; e ii) os mecanismos passivos, que actuam indirectamente pela modificação do ambiente envolvente, e que correspondem à complexação com quelatos biológicos extracelulares, a sorção a componentes celulares ou exopolímeros, e a destruição de ligandos complexantes (Gavrilescu, 2004; White *et al.*, 1997). Apesar de a imobilização reduzir as espécies metálicas livres, também pode promover a solubilização de metais pelo facto de deslocar o equilíbrio no sentido de libertar mais metais para a solução (Gadd, 2004).

A imobilização de metais pode ser designada pelo termo genérico “biossorção”, que se refere ao sequestro de iões metálicos por materiais sólidos de origem natural (Volesky, 1986). Yan e Viraraghavan (2003) também definem biossorção num sentido lato, como os métodos biológicos utilizados para a remoção de metais. No entanto, outros autores optam por considerar a biossorção apenas como a forma passiva de remoção de metais, independente da actividade metabólica e que ocorre mesmo com biomassa morta, distinguindo-a da forma activa de acumulação de metais, dependente da actividade metabólica da célula, designada de bioacumulação (Tsezos *et al.*, 1995; Tsezos *et al.*, 1997).

A classificação dos mecanismos de acumulação de metais pode ser feita no tipo de dependência do metabolismo celular ou de acordo com a localização do metal na célula. A Figura 2.2 resume esta classificação.

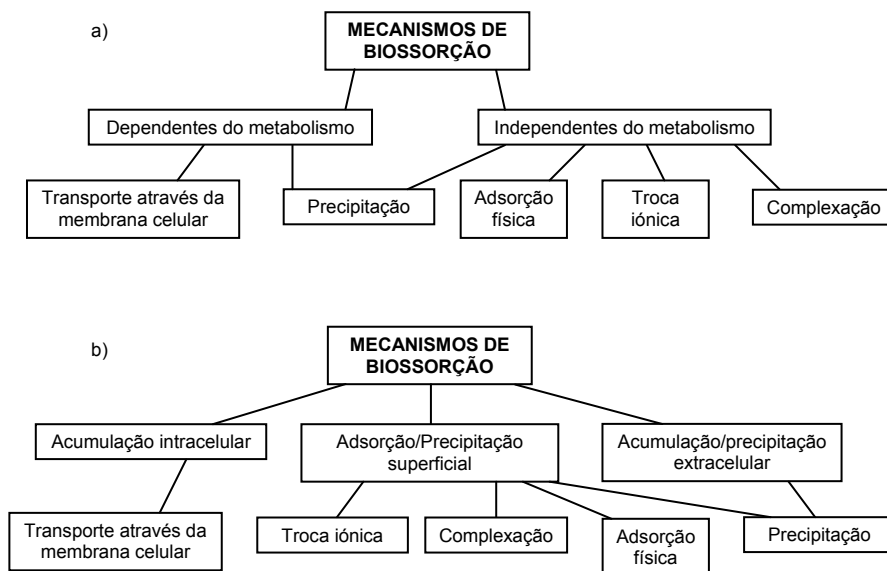


Figura 2.2 – Mecanismos de biossorção. a) classificação de acordo com a dependência ao metabolismo celular; b) classificação de acordo com a localização, na célula, do metal removido.

Adaptado de Veglio e Beolchini (1997).

A seguir apresenta-se uma abordagem do mecanismo de acumulação de metais de acordo com a dependência do metabolismo celular. Os mecanismos envolvidos na biossorção de metais serão aprofundados no sub-capítulo 2.2.

2.1.2.1 Remoção de metais independente do metabolismo

A maior parte dos estudos sobre biorremediação de metais com células em crescimento descreve o processo de remoção como sendo bifásico, caracterizado por uma fase inicial rápida de biossorção ou remoção passiva, com a duração de poucos minutos, independente do metabolismo, da temperatura, da presença de uma fonte de energia metabolizável e de inibidores metabólicos, e uma segunda fase mais lenta de remoção activa, de acumulação intracelular associada a mecanismos dependentes do metabolismo e influenciada por factores ambientais como a temperatura e inibidores metabólicos (Blackwell *et al.*, 1997; Malik, 2004).

Daqui resulta a utilização do termo “biossorção” para descrever a remoção de metais pesados em soluções aquosas, por ligação passiva a biomassa, através de mecanismos de remoção que não são controlados metabolicamente (Davis *et al.*, 2003b; Tsezos *et al.*, 1997) e que ocorre tanto em biomassa viável como não viável, correspondendo actualmente ao processo de biorremediação de metais mais utilizado (Barkay e Schaefer, 2001). Os vários mecanismos

envolvidos diferem qualitativa e quantitativamente de acordo com a espécie utilizada, a origem da biomassa e o seu processamento (Yetis *et al.*, 2000).

A bio sorção, tal como os processos de sorção convencionais, envolve um mecanismo de sorção muito rápido, baseado principalmente na quimiossorção. Em muitos sistemas a bio sorção do metal ocorre ao fim de 5 a 15 minutos após o contacto sólido-líquido, muitas vezes seguido de uma deposição de metal adicional muito mais lenta, possivelmente indicativa da ocorrência de um mecanismo de ligação ao metal secundário (Volesky e Holan, 1995). Assim, a concentração dos metais pela biomassa baseia-se em propriedades químicas e não na actividade biológica (Volesky, 2001). A biomassa exhibe a propriedade de bio sorção actuando exactamente como uma substância química, como um material de troca iónica de origem biológica, o que implica vantagens ao nível da aplicação industrial (Veglio e Beolchini, 1997). É particularmente a estrutura da parede celular de algumas algas, fungos e bactérias que é responsável por este fenómeno (Kalyani *et al.*, 2004).

Em geral esta fase de remoção passiva é rápida e reversível, não sendo aquela que limita a velocidade global da biorremoção. A velocidade global de bio sorção é limitada pela difusão intraparticular (Palmieri *et al.*, 2002). A bio sorção também pode providenciar sítios de nucleação para a formação de minerais estáveis. Em células vivas a actividade metabólica também influencia e/ou contribui para este processo na medida em que provoca alterações de pH, E_h , nutrientes orgânicos e inorgânicos, e metabolitos (Gadd, 1996; Gadd, 2004).

Actualmente a aplicação desta tecnologia, que compreende os mecanismos físico-químicos pelos quais as espécies metálicas são removidas de solução aquosa por biomassa microbiana, foi alargada a uma enorme variedade de produtos biológicos e até para aplicar à remoção de substâncias orgânicas (Gadd, 2000). Este fenómeno biológico pode ser explicado considerando diferentes tipos de interacções químicas e físicas entre os grupos funcionais da superfície do bio sorvente e os iões metálicos em solução (Esposito *et al.*, 2002).

2.1.2.2 Remoção de metais dependente do metabolismo – bioacumulação

A bio sorção é frequentemente seguida por um processo de ligação de metal mais lento e frequentemente irreversível, associado a mecanismos como a precipitação superficial, reacções redox, ligação covalente ou cristalização na superfície celular, ou frequentemente, a difusão para o interior e a ligação a proteínas ou outros sítios de ligação intracelulares (Aksu, 2001). Esta forma activa de remoção de metais é dependente da actividade metabólica de organismos vivos, e é designada de bioacumulação (Davis *et al.*, 2003b; Volesky, 1987). Este é um processo mais lento do que a bio sorção, que envolve o transporte de iões através da membrana celular até ao citoplasma (Palmieri *et al.*, 2002).

A acumulação de espécies catiónicas dentro das células ocorre por meio de sistemas de transporte membranas com diferentes afinidades e especificidades. Uma vez dentro da célula as espécies metálicas podem ser ligadas ou precipitadas, localizar-se em estruturas intracelulares

ou organelos, ou transferidas para estruturas específicas, dependendo do metal e do organismo envolvidos (Gadd, 2004). A bioacumulação pode ser considerada como a segunda parte do processo de sequestro de metais por biomassa viva. Uma vez que depende do metabolismo celular, pode ser inibido por inibidores metabólicos com as temperaturas baixas ou a limitação de fontes de energia (Kadukova e Vircikova, 2005). A bioacumulação permite a acumulação de maiores quantidades de metal (Blackwell *et al.*, 1995).

Estes mecanismos activos de interacção dos organismos vivos com os metais actuam tanto como mecanismo de defesa para evitar a intoxicação como para acumular metais essenciais presentes em concentrações vestigiais, contra o gradiente de concentração (Schmitt *et al.*, 2001). O transporte e a acumulação intracelular de metais contribuem para a remoção de metais de solução por células vivas, havendo uma fonte de carbono disponível e desde que não sejam excedidos os limites da toxicidade (Gadd *et al.*, 1998). Uma vez dentro das células os metais podem ser armazenados no citoplasma em associação a peptídeos com propriedades de ligação a metais, como as metalotioninas e as fitoquelatinas, ou localizar-se em estruturas celulares ou organelos como os vacúolos. Estes mecanismos, que dependem tanto dos microrganismos como do metal em questão, podem contribuir para a sua sobrevivência na presença de metais pesados (Gadd, 1996; Gadd *et al.*, 1998).

As diferenças básicas entre a biossorção e a bioacumulação residem na sua cinética e nos valores de energia de activação. A energia de activação necessária para a biossorção é de cerca de 21 kJ.mol⁻¹, o que está de acordo com a natureza física do processo, e é um processo rápido independente da presença de nutrientes específicos. A energia de activação da bioacumulação é de cerca de 63 kJ.mol⁻¹, correspondente a um processo bioquímico, e é um processo lento e dependente da disponibilidade de nutrientes (Kadukova e Vircikova, 2005; Mack *et al.*, 2007).

Os mecanismos de transporte sugeridos para a acumulação intracelular de iões metálicos incluem a peroxidação de lípidos, a permeação, por mediação de transportadores, canais/bombas iónicas e endocitose. O transporte é inibido a baixas temperaturas, mas não cessa. A maioria dos mecanismos de transporte de metais parece basear-se no gradiente electroquímico de protões através da membrana, que tem um potencial químico e eléctrico, ambos responsáveis pelo transporte de solutos iónicos através da membrana. Vários inibidores metabólicos que interferem com o potencial da membrana reduzem a acumulação de metais. A bioacumulação é favorecida pela presença de substratos metabolizáveis, como a glucose, podendo triplicar a quantidade de metal acumulado comparativamente à obtida na ausência de glucose (Blackwell *et al.*, 1995).

Estão atribuídas a microrganismos dos vários grupos, boas capacidades como biossorventes. O processo de acumulação dos metais é considerado complexo e dependente da química dos iões metálicos, das propriedades específicas dos organismos, da fisiologia da célula, e da influência físico-química ambiental como o pH, temperatura e concentração do metal. O mesmo metal pode ser acumulado por mecanismos diferentes por diferentes microrganismos (Goyal *et al.*, 2003). Quando são conhecidas as interacções metal-biomassa é possível otimizar o processo de

bio sorção ao nível molecular, o que pode incluir a modificação genética da biomassa para alterar características morfológicas e fisiológicas de modo a aumentar o seu desempenho na acumulação de metais (Srinath *et al.*, 2002; Volesky, 2001).

A acumulação de metais por leveduras envolve uma fase inicial rápida, de bio sorção dos metais a sítios de carga negativa da parede celular, seguida por uma fase lenta, dependente de energia, de entrada de metal para o interior das células. Tanto a camada externa de manano-proteína da parede celular como a camada interna de glucano-quitina desempenham um papel importante na acumulação de metais. A maioria dos metais intracelulares liga-se a grânulos de polifosfato localizados perto ou no interior dos vacúolos, ou a proteínas específicas de baixo peso molecular, nomeadamente as metalotioninas e fitoquelatinas (Malik, 2004).

2.2 Mecanismos de acumulação de metais

Compreender o mecanismo através do qual os microrganismos acumulam metais pesados, ou seja, conhecer a(s) forma(s) como o metal se liga à biomassa, é crucial para o desenvolvimento e maximização do potencial de processos microbianos para a concentração, remoção e recuperação de metais a partir de soluções aquosas, bem como para definir a estratégia de regeneração e reutilização do bio sorvente em múltiplos ciclos (Ahluwalia e Goyal, 2007; Kefala *et al.*, 1999; Volesky, 2001). Um bom contributo para este desígnio consiste na melhor compreensão das interações entre os sítios activos e as espécies iónicas em solução (como a adsorção física, troca iónica, complexação e microprecipitação superficial) (Pagnanelli *et al.*, 2004), pois estão envolvidos mecanismos complexos ainda não completamente compreendidos (Wang e Chen, 2006). Conhecer estes mecanismos também pode levar ao desenvolvimento de materiais sorventes análogos economicamente mais atractivos, além de tornar mais focalizado o processo de procura de bio sorventes, permitir “activar” biomateriais com pouca actividade bio sorvente, e desenvolver de pré-tratamentos a aplicar aos biomateriais simples e economicamente viáveis (Volesky, 2001).

Os mecanismos associados à bio sorção de metais pesados podem ser considerados como extracelulares. A sorção intracelular implica geralmente bio acumulação por um organismo viável (Davis *et al.*, 2003b). A ligação inicial de metais à biomassa, que ocorre por bio sorção, envolve basicamente a ligação à parede celular e, em alguns casos, a polímeros extracelulares (Blackwell *et al.*, 1995). Os mecanismos de sorção da parede celular baseiam-se em interações físico-químicas entre os metais e os grupos funcionais da parede celular dos microrganismos, que consiste principalmente em polissacáridos, lípidos e proteínas que têm capacidade de ligação a metais (Kadukova e Vircikova, 2005; Mack *et al.*, 2007). O termo *sorção* refere-se à ligação de um catião metálico a sítios de ligação livres, por oposição à ligação a sítios previamente ocupados por outros catiões, distinguindo-se ainda da adsorção que corresponde a um fenómeno de superfície físico e não químico (Davis *et al.*, 2003b). A sorção desempenha um papel fundamental para todas as interações metal-microrganismo. Interações com grupos específicos

da superfície celular podem potenciar ou inibir o transporte de metais e conseqüentemente, a sua transformação e a biomineralização (Barkay e Schaefer, 2001).

O processo de bioissorção começa pela difusão dos íões metálicos para a superfície da biomassa onde se ligam aos sítios activos da superfície celular com os quais têm afinidade (Aksu, 2002; Ozer *et al.*, 2004). Os sítios activos presentes na parede celular podem ser muito diferentes de acordo com a natureza do bioissorvente. Os grupos mais comuns são os carboxílicos, fosfato, sulfato, amino, amida, e hidroxilo (Esposito *et al.*, 2002).

A bioissorção de metais não se baseia apenas num único mecanismo de remoção, envolve vários processos de acumulação passiva, podendo incluir adsorção física, troca iónica, coordenação, complexação, quelação e microprecipitação inorgânica (Wang e Chen, 2006), numa combinação que difere quantitativa e qualitativamente dependendo do tipo de biomassa, da sua origem e o seu processamento (Davis *et al.*, 2000; Volesky e Holan, 1995) e ainda se os microrganismos estão mortos ou vivos e, neste caso se há crescimento (Gadd, 1990). Os dois mecanismos básicos para a acumulação de metais na parede celular são a interacção estequiométrica entre os grupos funcionais da parede celular, e a deposição inorgânica físico-química por adsorção ou precipitação inorgânica. Como consequência das possíveis interacções, a compreensão da bioissorção é um tanto complexa, requerendo o estudo tanto da solução do íão metálico como do mecanismo exacto envolvido (Loukidou *et al.*, 2004a).

Os mecanismos postulados como sendo determinantes dos processos de acumulação de metais são a: i) quimissorção por troca iónica, complexação, coordenação e quelação; ii) adsorção física envolvendo forças electrostáticas; e iii) microprecipitação (Volesky, 2001). Existe ainda a possibilidade de ocorrerem reacções de oxidação-redução no bioissorvente (Kratochvil *et al.*, 1998), e o aprisionamento iónico em capilares inter ou intrafibrilares e espaços da rede estrutural de polissacáridos, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da membrana e da parede celular (Ahluwalia e Goyal, 2007; Davis *et al.*, 2000; Volesky e Holan, 1995). A ligação inicial pode ser seguida pela deposição inorgânica de quantidades crescentes de metal no interior do envelope celular como precipitados de hidróxidos metálicos (Kefala *et al.*, 1999). Dada a complexidade dos biomateriais é possível que vários destes mecanismos ocorram em simultâneo, em graus que dependerão do bioissorvente em questão e das condições ambientais da solução (Volesky, 2001).

2.2.1 Adsorção

A ligação dos metais à biomassa independente do metabolismo é o único mecanismo presente quando se utiliza biomassa morta. A acumulação independente do metabolismo envolve essencialmente a adsorção física, química e iónica. Os íões metálicos podem ser adsorvidos a grupos da superfície celular, sendo a importância relativa de cada grupo difícil de determinar (Ahluwalia e Goyal, 2007).

A ligação de iões metálicos à parede celular tanto pode ocorrer por adsorção física, na qual os iões são atraídos pelo potencial negativo da parede celular, estabelecendo-se uma ligação electrostática que não é específica e não é influenciada pela valência do metal, como pode ocorrer por adsorção química (quimiossorção) que envolve a ligação específica de metais a sítios de ligação da parede celular. Este tipo de ligação pode até ocorrer na presença de um potencial repulsivo (Kefala *et al.*, 1999).

2.2.2 Troca iónica

Apesar de nem todos os potenciais bioSORVENTES terem sido analisados de uma forma sistemática, há evidências substanciais que identificam a troca iónica como sendo o principal mecanismo da bioSORÇÃO de metais (Figueira *et al.*, 2000b; Kratochvil e Volesky, 1998a), uma vez que explica muitas das observações que decorrem ao longo dos ensaios de remoção de metais pesados (Davis *et al.*, 2003b).

Diversos estudos de bioSORÇÃO de metais relatam a ocorrência de libertação de espécies iónicas do bioSORVENTE (Figueira *et al.*, 2000b) como protões, que provocam a descida do pH do meio em ensaios em descontínuo realizados sem controlo de pH, com correspondência estequiométrica entre iões libertados e sorvidos (Kratochvil e Volesky, 1998a), e iões Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Na^+ , como na alga *Ascophyllum nodosum* que em soluções de cobalto registou uma maior libertação destes iões comparativamente à libertação dos mesmos iões em soluções sem metal (Davis *et al.*, 2003b). A troca iónica também é considerada o principal mecanismo envolvido na acumulação de metais pela alga *Sargassum* (Figueira *et al.*, 1999), nomeadamente na remoção de Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} (Schiewer e Volesky, 1995).

A biomassa apresenta numerosos grupos moleculares que se sabe terem sítios de troca iónica, nomeadamente grupos carboxílicos, sulfato, fosfato e amino. Os grupos acetamida da quitina, polissacáridos estruturais dos fungos, grupos amino e fosfato dos ácidos nucleicos, grupos amida, amino, sulfidril e carboxílicos das proteínas e grupos hidroxilo dos polissacáridos são alguns exemplos (Ahluwalia e Goyal, 2007; Volesky, 2001). Segundo Davis *et al.* (2003b) importa referir que o termo *troca iónica* não identifica explicitamente o mecanismo de ligação envolvido, sendo utilizado como “chapéu” para descrever as observações experimentais. O mecanismo de ligação envolvido pode ser físico, por forças electrostáticas ou forças de *London-van der Waals*, ou envolver ligações químicas, iónicas ou covalentes.

2.2.3 Precipitação

A biomineralização corresponde à formação de precipitados de metais insolúveis resultante da interacção com produtos metabólicos. A percepção da importância deste processo na formação de minerais e na evolução geoquímica é uma das áreas com grande potencial e interesse de investigação no domínio das interacções metal-microorganismos (Barkay e Schaefer, 2001). A precipitação tanto pode ocorrer de forma dependente do metabolismo, como de forma

independente. No primeiro caso a remoção de metal está associada com um sistema de defesa activo dos microrganismos, que reagem na presença de metais tóxicos produzindo compostos que favorecem a sua precipitação. No caso de a precipitação ser independente do metabolismo celular, pode ocorrer por consequência de uma interacção química entre o metal e a superfície celular (Veglio e Beolchini, 1997).

A precipitação microbiológica de metais resulta da redução dissimilatória ou é consequência secundária do processo metabólico não relacionado com a transformação de metais, e.g. a redução de Cr(VI) a Cr(III) por bactérias sulfato-redutoras pode dever-se à respiração bacteriana ou à redução indirecta por Fe^{2+} ou sulfureto. A redução indirecta pela formação de sulfuretos ou fosfatos é a estratégia que mais atenção tem recebido.

2.2.3.1 Redução dissimilatória de metais e precipitação

A redução é uma das transformações químicas mais importantes catalisadas por microrganismos que pode afectar a solubilidade dos metais. A redução dissimilatória, em que a redução está associada à obtenção de energia, ocorre em condições anaeróbias, onde o metal na forma oxidada actua na respiração como aceitador final de electrões (Gadd, 1996). Este processo é catalisado por enzimas ligadas à membrana, citocromos do tipo c ou associados a estes citocromos. A redução dissimilatória por bactérias sulfato redutoras tem sido alvo de vários estudos porque intervém na redução-precipitação de espécies tóxicas como U(VI), Cr(VI), Tc(VI) e As(V) por via enzimática. As bactérias sulfato redutoras são heterotróficas anaeróbias que conjugam a oxidação de uma fonte de carbono, como o lactato, o acetato ou o etanol para obtenção de energia, e a produção de ATP através de uma cadeia transportadora de electrões que tem o SO_4^{2-} como aceitador final de electrões, reduzindo-o a sulfureto (Smith e Gadd, 2000; White *et al.*, 1997). Este mecanismo trás consequências importantes para os processos biotecnológicos de remoção de metais pois cria condições redutoras, promove a remoção de acidez (White *et al.*, 1997) e o sulfureto produzido pode interagir com vários metais precipitando-os na forma de sulfuretos metálicos (Smith e Gadd, 2000), desempenhando assim um papel importante na imobilização de metais em sedimentos, tendo sido também aplicado na biorremediação de metais em águas e lixiviados (Gadd, 2000). A solubilidade dos sulfuretos metálicos é geralmente muito baixa, daí que mesmo a produção de uma pequena quantidade de sulfureto seja suficiente para reduzir drasticamente a concentração de metais solúveis (Gadd, 2004; White *et al.*, 1995).

O ácido sulfídrico é produzido por bactérias sulfato-redutoras (e.g. *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* spp.) (Gadd, 1996). Por exemplo a *Desulfovibrio desulfuricans* combina a oxidação de uma variedade de dadores de electrões com a redução de Tc(VII) por uma hidrogenase periplasmática, um caso de imobilização de metais promovida pela sua precipitação na periferia da célula na forma de óxido (Valls e de Lorenzo, 2002). Estes processos de redução podem acompanhar outros mecanismos indirectos de precipitação de metais, como em sistemas microbianos sulfato-redutores onde a redução de Cr(VI) a Cr(III) pode ser o resultado indirecto da

redução por Fe^{2+} e do S^{2-} produzido (Gadd, 2000). A redução de Se(VI) à forma elementar insolúvel (Se(0)) já foi utilizada na remediação de águas residuais e solos contaminados (Gadd, 2000). A redução de SeO_3^{2-} a Se(0) foi observada com vários microrganismos, nomeadamente *Fusarium* spp., *S. cerevisiae*, *Candida albicans* e *Aspergillus funiculosus* (White *et al.*, 1995).

2.2.3.2 Precipitação por sulfuretos

A formação de sulfuretos metálicos é o mecanismo principal envolvido na precipitação biológica de metais. Muitos metais e metalóides formam sulfuretos com constantes de estabilidade muito elevadas (e.g. 10^{-18} para FeS e 10^{-53} para HgS). Esta reacção é comum nos tratamentos convencionais de tratamento de águas residuais, quando substâncias complexantes como os ácidos orgânicos de cadeia curta, NTA ou EDTA, interferem no usual tratamento de neutralização-precipitação com cal ou soda caustica (Pumpel *et al.*, 2003). O mecanismo natural de precipitação de metais mais conhecido é o associado à produção de sulfuretos por bactérias sulfato-redutoras que, em biofilmes bacterianos, resulta na deposição de sulfuretos metálicos na sua superfície, seguida do aprisionamento nos exopolissacáridos. Os biorreactores com consórcios de bactérias sulfato-redutoras também podem ser utilizados como um processo de descontaminação integrado. No primeiro passo os metais são mobilizados do solo por bactérias oxidante de enxofre, e os metais biolixiviados são posteriormente removidos do efluente por precipitação num reactor em condições anaeróbias (Valls e de Lorenzo, 2002). Em ambientes anaeróbios as bactérias redutoras de sulfatos como as *Desulfovibrio* e a *Desulfotomaculum* produzem sulfureto de hidrogénio, que por sua vez reage com os metais solúveis formando sulfuretos metálicos insolúveis (Gavrilescu, 2004).

2.2.3.3 Precipitação por fosfatase

A quimiossorção microbiana na qual os fostatos produzidos biologicamente precipitam os metais na forma de fosfatos metálicos é eficaz para vários metais. O processo global resulta da contribuição de mecanismos acumulativos e de quimiossorção (Gadd, 2000). Neste caso a acumulação de metais é mediada por uma fosfatase que liberta fosfato inorgânico a partir de uma molécula orgânica dadora de fosfato (e.g. glicerol-2-fosfato), resultando na precipitação dos metais na biomassa na forma de fosfatos (Gadd, 2004). A maior parte dos estudos envolve *Citrobacter* sp. isolada de solos contaminados com metais (Valls e de Lorenzo, 2002).

2.2.3.4 Precipitação por oxalatos e carbonatos

A imobilização de metais através da formação de oxalatos metálicos insolúveis é um processo de elevado interesse ambiental tanto do ponto de vista da sobrevivência dos fungos, por aumentar a tolerância a ambientes com elevadas concentrações de metais tóxicos, como na desagregação do solo, formação de minerais e redução da toxicidade de metais (Jarosz-Wilkolazka e Gadd, 2003). Os cristais de oxalato de cálcio são frequentemente associados a fungos, e são formados

por precipitação do cálcio solubilizado com o oxalato. Este processo tem uma grande importância nos processos biogeoquímicos do solo pois actua como reservatório de cálcio e influencia a disponibilidade de fosfato. Os fungos podem formar oxalatos metálicos com vários outros metais, e.g. Cd, Co, Cu, Mn, Sr e Zn. Também são encontrados em associação com biofilmes bacterianos precipitados mineralizados de carbonatos (Gadd, 2004). Jarosz-Wilkolazka e Gadd (2003) identificaram o ácido oxálico como um metabolito importante produzido pelos fungos de putrefacção da madeira (*Bjerkandera fumosa*, *Fomitopsis pinicola*, *Phlebia radiata* e *Trametes versicolor*) como resposta ao stress induzido por metais tóxicos, atestando o potencial de utilização destes fungos na biorremediação de locais contaminados.

2.2.4 Oxidação-redução

Os microrganismos também podem mobilizar ou imobilizar metais, metaloides e compostos organo-metálicos por processos de oxidação-redução. O Fe(III) e o Mn(IV) aumentam a sua solubilidade após redução a Fe(II) e Mn(II) respectivamente (Gadd, 2004). Outras espécies microbianas podem imobilizar eficientemente metais pesados pela sua capacidade de reduzir estes elementos a um estado de oxidação mais baixo, dando origem a uma espécie metálica menos bioactiva (Valls e de Lorenzo, 2002), e.g. o U(VI) e o Cr(VI) são imobilizados por redução a U(IV) e Cr(III) (Gadd, 2004). A redução não-dissimilatória ocorre em vários microrganismos como mecanismo de acumulação ou tolerância aos metais (Gadd, 1996). Quando os metais são reduzidos para potenciais redox mais baixos, a sua mobilidade e toxicidade podem ser diminuídas tornando possível a sua aplicação como método de biorremediação. Algumas bactérias podem recorrer a esta redução para criar as condições necessárias ao seu crescimento, tornando-o um processo natural para aplicações *in situ* (Gadd, 2000)

A oxidação bacteriana de Fe é ubíqua em ambientes com Fe²⁺ suficiente e condições que permitam assegurar o crescimento bacteriano: águas de drenagem, escórias de minas, tubagens de drenagem e irrigação, e rizosferas de plantas. Os fungos também oxidam metais (Gadd, 2004). O desenvolvimento de tecnologias biológicas integradas para a descontaminação de solos tem-se baseado na utilização de bactérias que oxidam enxofre a ácido sulfúrico (lixiviação autotrófica) para promover a solubilização de metais, seguido do tratamento do lixiviado obtido (rico em sulfatos e iões metálicos) com bactérias sulfato-redutoras, resultando na precipitação dos metais na forma de sulfuretos (White *et al.*, 1997).

2.2.5 Complexação

A remoção de metais ainda pode ocorrer através da formação de complexos na superfície celular, após a interacção entre o metal e o sítio de ligação (Veglio e Beolchini, 1997). A formação de complexos, ou coordenação, resulta da combinação de um catião com moléculas ou aniões com pares de electrões livres (bases). O carácter da formação de um complexo pode ser electrostático (*i.e.* forças de Colombo) ou covalente. O catião metálico envolvido na formação de

um complexo designa-se por átomo central, e o anião ou molécula ao qual se liga, por ligando. A formação de complexos com ligandos multidentados (base com mais do que um átomo ligando) designa-se por quelação, e os complexos formados por quelatos. O tipo de ligação estabelecida nos complexos pode ter carácter predominantemente covalente ou electrostático (Davis *et al.*, 2003b).

A complexação extracelular ocorre pela interacção dos metais com os polímeros excretados pelos microrganismos ou matéria orgânica acumulada a partir da biomassa morta. Os polímeros extracelulares incluem polissacáridos, proteínas e ácidos nucleicos. Alguns tipos de microrganismos têm como agentes quelantes moléculas de baixo peso molecular designados de sideróforos, sintetizados e excretados por bactérias dos géneros *Pseudomonas*, *Actinomycetes* e *Azotobacter* para captar e fornecer o ferro de que necessitam para a sua actividade metabólica (Gavrilescu, 2004).

2.3 Variáveis que afectam a biossorção

A biossorção não depende só da composição química da célula e dos seus componentes, mas também de factores físico-químicos externos e da química do metal em solução (Volesky, 1987). O desenvolvimento de tecnologias de biossorção necessita da identificação dos factores físicos e químicos que regulam a sorção dos metais que, a par do conhecimento do mecanismo do biossorvente responsável pela ligação aos metais, auxiliam a optimização do desempenho dos materiais biossorventes no tratamento de águas residuais com metais (Kefala *et al.*, 1999).

A capacidade de biossorção é principalmente afectada por três tipos de factores: i) as características iónicas do metal (peso atómico, raio iónico, valência, etc.); ii) as condições ambientais (pH, temperatura, força iónica, tempo de contacto, etc.); e iii) a natureza do biossorvente, que pode determinar diferenças na selectividade e afinidade para os metais uma vez que as características genéticas, bioquímicas e celulares da biomassa afectam o mecanismo de ligação do metal (tipo e espécie de microrganismo, as suas condições de crescimento, estado fisiológico, idade das células) (Chen e Wang, 2007b; Dostalek *et al.*, 2004; Pagnanelli *et al.*, 2003; Tsezos *et al.*, 1997; Volesky, 1987).

2.3.1 Características iónicas do metal

A extensão com que os iões metálicos se vão ligar a um ligando depende da sua química e da sua preferência pela formação de ligações iónicas ou covalentes. Os iões metálicos actuam como ácidos de Lewis aceitando pares de electrões dos ligandos. A maioria dos ligandos inorgânicos pertence aos grupos V, VI e VII da tabela periódica. Os iões metálicos podem dividir-se em três classes: A, B e transição, de acordo com a classificação de Pearson dos elementos, dependendo da estabilidade dos complexos que formam com os elementos destes grupos (Brady

e Tobin, 1995; Tsezos *et al.*, 1996). Na Tabela 2.1 é apresentada a classificação de alguns elementos e compostos.

Tabela 2.1 – Classificação em ácidos e bases fortes, fracos e de transição. Adaptado de Mack *et al.* (2007).

Fortes (Classe A)	Fracos (Classe B)	Transição
Bases O ₂ , OH ⁻ , F ⁻ , Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , CH ₃ COO ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , H ₂ O, ROH, RO ⁻ , R ₂ O, NH ₃ , RNH ₂ , N ₂ H ₄	H ⁻ , R ⁻ , CN ⁻ , I ⁻ , C ₂ H ₄ , RNC, CO, R ₃ P, (RO) ₃ P, R ₃ As, RSH, R ₂ S, RS ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , :SCN ⁻ (dador S)	C ₅ H ₅ ⁻ , N ₂ , :NO ₂ ⁻ , C ₆ H ₅ NH ₂ , N ₃ ⁻ , :SO ₃ , Br ⁻ , SCN ⁻ (dador N)
Ácidos H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ BF ₃ , Al ³⁺ , AlCl ₃ , Al(CH ₃) ₃ Mn ²⁺ , Cr ³⁺ , Cr(VI), Mn(VII), Mo(VI), W(VI), Sc ³⁺ , La ³⁺ , Ce ³⁺ , Lu ³⁺ , Ti ⁴⁺ , Zr ⁴⁺ , Hf ⁴⁺ , VO ²⁺ , UO ₂ ⁺ , Th ⁴⁺ , Pu ⁴⁺ CO ₂ , SO ₃	B(CH ₃) ₂ , GaCl ₃ , GaI ₃ , GaBr ₃ Cu ⁺ , Co(CN) ₅ ³⁺ , Ag ⁺ , Cd ²⁺ Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Pt ⁴⁺ , Au ⁺ , Hg ₂ ²⁺ , Hg ²⁺ , Tl ⁺ M ⁰ (átomos de metais)	B(CH ₃) ₃ Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ Ru ²⁺ , Rh ²⁺ , Sn ²⁺ , Sb ³⁺ Rh ³⁺ , Ir ³⁺ , Pb ²⁺ , Bi ³⁺

Os metais da classe A, ou metais fortes, têm a seguinte ordem de preferência para a ligação a átomos dadores de electrões em ligandos biológicos: O > N > S, formando facilmente complexos com ligandos dadores de oxigénio como HO⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, COO⁻, enquanto que os metais da classe B, ou metais fracos, têm a ordem inversa de preferência para a ligação. As ligações dos ácidos de Lewis da classe A com os ligandos têm carácter predominantemente iónico, enquanto que os ácidos de Lewis da classe B são metais fracos polarizáveis que formam preferencialmente ligações covalentes com os ligandos biológicos (Kogej e Pavko, 2001; Tsezos *et al.*, 1996). Segundo este princípio os metais fortes têm preferência pela ligação a bases fortes, e os metais fracos preferem associar-se a bases fracas Os metais que não se incluem nestas dois grupos constituem a classe de transição (Mack *et al.*, 2007). De acordo com Brady e Tobin (1995) existe uma acentuada separação entre estes metais e os da classe A, mas a distinção com os da classe B não é tão clara.

O potencial de um metal para complexar um ligando depende do seu poder de polarização, ou seja da razão carga/raio do catião. Um catião de elevado poder de polarização tem uma elevada densidade de carga positiva e é descrito como um ácido de Lewis forte. A energia da orbital de valência vazia do ião metálico é tomada como uma medida da sua capacidade para aceitar electrões e assim formar ligações covalentes. A energia da orbital está relacionada com a electronegatividade (X_m), definida como uma medida do poder de atracção de um átomo desse elemento para o par de electrões partilhados numa ligação covalente. O índice covalente é calculado por $X_m^2 r$, onde r é o raio iónico (Brady e Tobin, 1995).

Assim, a natureza da ligação metal-ligando pode ser expressa pelo índice covalente ($X_m^2 r$), que caracteriza a importância das interações covalentes relativamente às iónicas entre os iões metálicos e os ligandos. A partir da extensão da ligação de iões metálicos com diferentes

carácter iónico é possível determinar a estrutura e a importância dos grupos activos (Kogej e Pavko, 2001). Em geral quanto maior o índice covalente de um metal, maior é o seu carácter de classe B, e consequentemente o seu potencial para formar ligações covalentes com ligandos biológicos (Brady e Tobin, 1995).

Chen e Wang (2007b) determinaram a capacidade máxima de ligação de vários metais à levedura *S. cerevisiae* proveniente de uma indústria de cerveja na forma desidratada. Os autores afirmam que a variação de capacidade de biossorção entre os metais, verificada como seguindo a ordem $Pb^{2+} > Ag^+ > Cr^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Sr^{2+} > Ni^{2+} > Cs^+$, se pode dever às diferenças das características iónicas dos metais. Do estudo de correlação entre a capacidade máxima de biossorção (q_{max}) e várias propriedades iónicas (nº de oxidação, nº atómico, raio iónico, variação do potencial de oxidação, potencial electroquímico, electronegatividade, 1ª constante de hidrólise, índice covalente, carga iónica, características de coordenação: classe A, B ou transição, entre outros). Verificaram que o índice covalente foi a propriedade que demonstrou maior significância estatística na correlação com q_{max} . A razão entre o raio atómico e o peso atómico (AR/AW) e a carga iónica efectiva também demonstraram alguma significância, mas menor do que o índice covalente.

Para elucidar a estrutura dos grupos de ligação a metais nas paredes celulares de *R. nigricans*, Kogej e Pavko (2001) estabeleceram uma correlação entre q_{max} e X_m^2r , concluindo que a acumulação da biomassa é maior para metais da classe B, seguida de iões de transição (Fe, Cu, Cd, Zn e Ni), e menor para metais da classe A. Iões metálicos com maior índice covalente (Pb, Ag) ligaram-se em maior extensão do que os iões com carácter tipicamente iónico. Isto indica que os iões metálicos formam predominantemente ligações de carácter covalente com os sítios de ligação da biomassa, o que é uma indicação indirecta da importância da quitina e do quitosano como sítios de ligação.

Também Brady e Tobin (1995) atribuem a ordem crescente de acumulação de $Sr^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+}$ a *Rhizopus arrhizus* à natureza covalente crescente destes metais. Representando a acumulação de metal no equilíbrio (q_e) em função do índice covalente, verificaram uma boa correlação, indicando que os melhores resultados de remoção de metal resultam da contribuição crescente do carácter covalente da ligação à medida que o carácter de classe B dos metais aumenta. Pela realização de ensaios que monitorizaram a libertação de metais de biomassa previamente saturada com um metal, quando colocado na presença de um outro, concluíram que quanto maior a natureza covalente da ligação metal-biomassa, mais forte é a ligação. A libertação de protões, tida como um indicador de ligação covalente, também aumenta na mesma ordem, o que é consistente com o princípio da classificação dos metais (fortes/fracos) e suporta as observações de que o aumento dos níveis de remoção resultam de um aumento da componente de ligação covalente. Verificaram ainda que o total de cationes libertados (Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+) corresponde estequiometricamente a apenas uma fracção do metal removido.

Os modelos que correlacionam as características iónicas dos metais com a sua bioactividade ainda são pouco explorados (Chen e Wang, 2007b).

2.3.2 Condições ambientais

2.3.2.1 pH

A eficiência da biossorção depende muito da química do metal em solução (Volesky, 1987). Vários estudos referem o pH como um dos parâmetros mais importantes que afectam a biossorção (Aksu, 2002; Garg *et al.*, 2007; Ozer *et al.*, 2004; Pagnanelli *et al.*, 2003; Rostami e Joodaki, 2002; Wang e Chen, 2006; Yetis *et al.*, 2000), pois afecta não só a dissociação dos sítios de ligação como a química dos metais em solução: hidrólise, complexação por ligandos orgânicos e/ou inorgânicos, reacções redox e de precipitação, e também afecta a especiação e a disponibilidade para a biossorção dos metais (Esposito *et al.*, 2002).

O pH do meio de adsorção relaciona-se com o mecanismo de adsorção do metal à superfície da biomassa e reflecte a natureza da interacção físico-química entre o ião em solução e os sítios de adsorção da célula (Ozer *et al.*, 2004). Uma característica da sorção de metais a superfícies, bióticas ou abióticas, é que para um dado valor de pH da solução, a sorção é superior para valores de pH apenas ligeiramente mais ácidos do que o pH para o qual ocorre a precipitação do metal na forma de hidróxidos. À medida que o pH vai aumentando, quando se atinge o limite de solubilidade da solução, a sorção é largamente reduzida devido à ocorrência de precipitação (Schneider *et al.*, 2001).

A influência do pH na acumulação de metais por leveduras, algas e bactérias é muito similar. A $\text{pH} < 2$ a acumulação de metais por leveduras é praticamente nula, devido à competição iónica entre protões e cations metálicos para os sítios de ligação, o que se traduz numa reduzida interacção entre os metais e a biomassa. O intervalo de pH entre 4 e 8 é genericamente aceite como sendo o óptimo para a biossorção de metais para quase todos os tipos de biomassa (Blackwell *et al.*, 1995). A remoção máxima de Cr(III) pela levedura de padeiro *S. cerevisiae* ocorre ao pH de 5,2, não se verificando incrementos de remoção por aumentos adicionais do pH da solução (Mapolelo e Torto, 2004).

Segundo Mack *et al.* (2007), a resposta dos metais pesados a um processo de biossorção resultou na sua classificação em três classes, de acordo com o seu comportamento a um pH específico. Os metais da Classe I – Al^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , UO_2^{2+} e Zn^{2+} , ligam-se fortemente a pH próximo da neutralidade mas não se ligam, nem são facilmente desorvidos do biossorvente, a $\text{pH} < 2$. Pensa-se que este comportamento se deve às interacções electrostáticas entre os iões metálicos após a ionização dos grupos funcionais a valores de pH perto da neutralidade. Os metais da Classe II - PtCl_4^{2-} , CrO_4^{2-} e SeO_4^{2-} , revelam um comportamento oposto aos da Classe I, ligam-se fortemente a pH baixo e de forma fraca a $\text{pH} > 5$. Os metais da Classe III são os que se ligam de forma mais forte pois a ligação é independente do pH.

2.3.2.1.1 Especificação dos metais

O pH do meio afecta a especificação dos metais em solução, pelo que é importante o seu estudo para avaliar o desempenho da biossorção, em particular nos casos, como o do crómio, em que a valência dos iões varia devido a reacções de hidrólise (Yun *et al.*, 2001).

As reacções de hidrólise ocorrem para a generalidade dos cationes metálicos, e dada a diversidade de complexos de hidróxidos que se podem formar em solução, o comportamento químico de um metal pode ser uma função complexa do pH do meio e da sua concentração. Os complexos de hidróxidos são frequentemente polinucleares reduzindo os iões metálicos livres para sequestro. O aumento do pH pode resultar na precipitação de hidróxidos ou óxidos com os mesmos resultados (Blackwell *et al.*, 1995). A pH acima de 6 o Cu começa a precipitar na forma de hidróxidos insolúveis, impossibilitando o estudo da verdadeira sorção (Ozer *et al.*, 2004).

O pH em que se verifica que a solução fica sem carga corresponde ao ponto isoeléctrico com a menor solubilidade para os iões metálicos. Esta situação, que pode ser bastante favorável à deposição dos metais, pode tornar o estudo dos sítios de ligação mais difícil. A microprecipitação que ocorre no sistema de sorção, ainda que possa complicar o estudo da sorção, do ponto de vista da aplicação do processo pode aumentar desejavelmente a imobilização do metal, e assim aumentar aparentemente a eficiência global da capacidade de acumulação dos biomateriais (Volesky e Holan, 1995).

Yun *et al.* (2001) apresentam um diagrama de especificação do Cr(III) em função do pH, calculado a partir de dados termodinâmicos da sua hidrólise (Figura 2.3), onde se pode verificar que até pH 2 a espécie dominante é Cr^{3+} . Aumentando o pH a fracção molar desta espécie diminui, aumentando a de CrOH^{2+} e, ao atingir o pH de 5 é esta última a espécie dominante. Nesta gama de valores a espécie Cr(OH)_2^+ é negligenciável. Para valores de pH superiores a 5 começa a formação de precipitado de hidróxido de crómio.

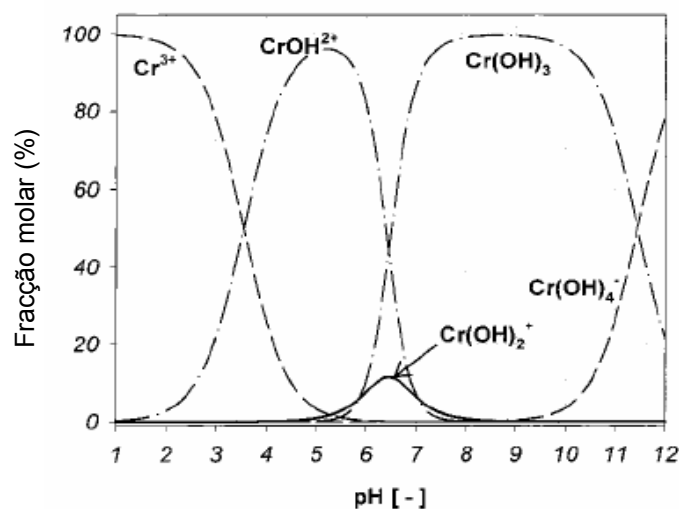
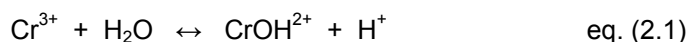


Figura 2.3 – Especificação do Crómio (III) em função do pH do meio. Adaptado de Yun *et al.* (2001).

Segundo Yun *et al.* (2001), no intervalo de pH entre 1 e 5 a especiação do crómio pode ser expressa pela seguinte reacção:



Cuja constante de equilíbrio (K_s) é dada pela equação (2.2):

$$K_s = \frac{[\text{CrOH}^{2+}][\text{H}^+]}{[\text{Cr}^{3+}]} = 10^{-3,55} \quad \text{eq. (2.2)}$$

A equação (2.1) mostra que a hidrólise dos iões Cr(III) liberta protões que contribuem para acidificar o meio, facto que deve ser tido em consideração na interpretação das alterações de pH verificadas nos sistemas biomassa-soluções metálicas ao longo dos processos de biossorção. Se a espécie Cr^{3+} estiver a ser removida da solução, o equilíbrio desloca-se para a esquerda resultando na subida de pH do meio. Se for a espécie CrOH^{2+} a ser removida pela biomassa, o equilíbrio desloca-se para a direita tornando a solução mais ácida. No entanto, o pH da solução também pode ser alterado pela libertação ou acumulação de protões pela biomassa (Yun *et al.*, 2001).

Os iões de Cr(III) podem ainda envolver-se em reacções de complexação com espécies aniónicas. As constantes das reacções de complexação constam de bases de dados termodinâmicos que fazem parte de programas informáticos utilizados para calcular o equilíbrio químico em soluções aquosas.

2.3.2.1.2 Ionização dos sítios de ligação da biomassa

A carga da biomassa, tal como a do metal, é dependente do pH (Yun *et al.*, 2001). A pH baixo os ligandos da parede celular estão associados a protões, restringindo a aproximação de catiões metálicos em resultado de forças de repulsão. É para valores de pH acima do ponto isoeléctrico que a carga superficial da biomassa assume valores negativos. Assim, à medida que o pH aumenta um número crescente de ligandos, como os grupos carboxilo, fosfato, imidazol e amino, passam ao estado ionizado com carga negativa, ocorrendo a atracção dos catiões metálicos e a biossorção à superfície celular (Aksu, 2002; Ozer *et al.*, 2004).

A natureza ácida (pK_a) e a concentração dos sítios activos pode ser determinada por titulação potenciométrica da biomassa. A análise destas curvas evidencia a influência do pH na desprotonação dos grupos funcionais da parede celular. Para valores de pH superiores ao pK_a , os sítios estão principalmente na forma dissociada, e podem trocar H^+ com metais em solução. A pH abaixo do pK_a podem ocorrer fenómenos de complexação, em especial com os grupos carboxílicos (Esposito *et al.*, 2002).

A primeira constante de hidrólise reflecte a tendência de um ião metálico se ligar a ligandos intermediários como os grupos funcionais bioquímicos com átomos de oxigénio doadores de electrões. Os ligandos intermediários incluem grupos carboxílicos, hidroxilos, aldeídos, cetonas e amino (Chen e Wang, 2007b).

Considerando um certo sítio de ligação (B_jH), a sua reacção com um protão e a respectiva constante de equilíbrio (K_j) definem-se pelas equações (2.3) e (2.4) respectivamente (Yun *et al.*, 2001):



$$K_j = \frac{[B_j^-][H^+]}{[B_jH]} \quad (2.4)$$

A concentração total de sítios de ligação $[B_j]_T$ é igual ao somatório das configurações protonadas e ionizadas:

$$[B_j]_T = [B_jH] + [B_j^-] \quad (2.5)$$

Substituindo a equação (2.4) na equação (2.5):

$$[B_j]_T = [B_j^-] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_j} \right) \quad \text{eq. (2.6)}$$

2.3.2.2 Presença de outros iões/substâncias

É comum os efluentes industriais reais conterem vários componentes iónicos, incluindo catiões metálicos e aniões, cuja presença afecta negativamente a biossorção. Geralmente a capacidade de biossorção de um metal individual é reduzida pela presença de co-iões, incluindo outros iões metálicos e aniões presentes na solução. No entanto a capacidade de biossorção total de metais em solução permanece inalterada (Wang e Chen, 2006).

Neste contexto é importante estudar o efeito que as impurezas eventualmente presentes poderão ter no desempenho da acumulação de metais para avaliar as condições reais do processo. As impurezas podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos, até outros metais e espécies iónicas, substâncias dissolvidas, coloidais ou suspensas (Volesky, 2001), que ou vão competir com o ião com interesse para os sítios de ligação, ou diminuem a especificidade do biossorvente ligando-se a sítios onde este não se liga, o que revela ser a maior complicação da aplicação da biossorção em condições industriais (Mack *et al.*, 2007). De acordo com Pumpel *et al.* (2003) em soluções reais com matrizes iónicas complexas verifica-se a competição entre os catiões para os sítios de ligação à biomassa, constatando-se que a presença de elevadas concentrações de sódio na água residual com origem de um banho de electrodeposição inibiu por completo a biossorção de níquel por cianobactérias.

Segundo Tsezos *et al.* (1996) este efeito pode ser relacionado com a classificação de iões metálicos de Pearson em classe A, classe B e de transição apresentada em 2.3.1. Os autores realizaram estudos de biossorção em soluções com misturas de dois metais entre as várias classes, concluindo que há efeitos de competição iónica significativos em misturas de metais da mesma classe e, pelo contrário, não há influência significativa da presença de um co-ião quando pertencem a classes diferentes. Os metais de transição são sempre afectados pela presença de

co-íões. Daqui resulta que, no contexto da bioissorção, os metais presentes na água residual que forem classificados da mesma forma vão exibir preferências idênticas para a ligação aos sítios de ligação (Mack *et al.*, 2007).

A matéria particulada dissolvida geralmente reduz a toxicidade dos metais por complexação e ligação. Proteínas, ácidos húmicos e metabolitos celulares libertados em consequência de danos induzidos na membrana, ligam quantidades apreciáveis de íões livres tornando-os inacessíveis para a bioissorção (Blackwell *et al.*, 1995).

2.3.2.3 Temperatura

A temperatura pode afectar vários factores importantes para a bioissorção, como i) a estabilidade das espécies iónicas em solução; ii) a estabilidade dos complexos metal-biomassa, dependendo dos sítios de bioissorção; iii) a configuração da parede celular do microrganismo; e iv) a ionização dos grupos químicos da parede celular (Ozer *et al.*, 2004).

A temperatura a que a reacção de sorção ocorre raramente é relevante, sendo a maior parte das reacções independentes da temperatura ou exotérmicas. No entanto há excepções em que a temperatura afecta a interacção entre o bioissorvente e os íões metálicos, geralmente pela influência na estabilidade dos metais em solução e dos complexos metal-bioissorvente formados, e na ionização da parede celular (Mack *et al.*, 2007). O efeito da temperatura é mais visível nos mecanismos de acumulação dependentes do metabolismo, sendo a gama entre 25-35 °C a referida como óptima para a acumulação de metais (Blackwell *et al.*, 1995).

O aumento da temperatura das soluções metálicas pode alterar a estrutura físico-química dos bioissorventes, aumentando ou diminuindo o número de sítios de ligação (Kefala *et al.*, 1999). Estes autores verificaram que a bioissorção de Cd a *Actinomyces* não viável aumenta com a temperatura, no entanto este efeito é diminuto, apresentando uma variação de entalpia de apenas 5,530 kJ.kmol⁻¹. Segundo Aksu (2002) a bioissorção de Ni²⁺ pela *Chlorella vulgaris* também é endotérmica, verificando-se que a capacidade de acumulação de metal aumenta com a temperatura até aos 45 °C. Já a bioissorção de Cd²⁺ à mesma alga é exotérmica, verificando-se que na gama de temperatura entre 20 a 50 °C a acumulação é máxima para 20 °C (Aksu, 2001). A energia de activação calculada para o primeiro caso foi de 25,92 kJ.mol⁻¹, e no segundo caso de - 8,0 kJ.mol⁻¹.

Ozer *et al.* (2004) descrevem o aumento da capacidade de bioissorção de Cd²⁺ pela *Cladophora crispata* entre os 15 e os 25 °C. A diminuição da quantidade de metal acumulado no equilíbrio (q_e) na gama entre 25-50 °C significa que este processo de bioissorção é exotérmico. Também verificaram que q_e e a constante cinética do modelo de pseudo-segunda ordem (k_2) aumentaram até os 25 °C, corroborando os resultados experimentais para a temperatura óptima. Ozer e Ozer (2003) observaram um aumento de q_e para o Pb, Ni e Cr(VI) bioissorvidos pela *S. cerevisiae* entre os 15 e os 25 °C, e uma diminuição entre os 25 e os 40 °C, indicando que a bioissorção destes

metais à levedura é exotérmica, atribuindo a diminuição da capacidade de acumulação a temperaturas mais elevadas pode ser resultado de danos nos sítios de ligação da biomassa.

2.3.2.4 Composição do meio de cultura

A biossorção depende da disponibilidade dos grupos funcionais na superfície celular e da natureza do metal. Uma vez que a estrutura da parede celular e o estado metabólico da célula dependem da composição do substrato, o crescimento em diferentes meios vai influenciar a capacidade e selectividade da acumulação de metais criando diferentes sítios de ligação ou diversos sistemas enzimáticos na célula (Dostalek *et al.*, 2004; Engl e Kunz, 1995). O meio de crescimento determina a química da parede celular pela formação dos vários grupos da parede celular, e pode levar ao aumento da capacidade de acumulação (Kapoor e Viraraghavan, 1995).

A adição tanto de cisteína como de glucose ao meio de crescimento aumentou a capacidade de ligação da levedura *S. cerevisiae* a Cd, Cu e Pb. Pelo contrário, os suplementos de amónia e fosfato invertem esta tendência (Engl e Kunz, 1995). De acordo com estes autores a fonte de carbono pode influenciar os sistemas enzimáticos das células bem como induzir alterações nas fracções de mananos e glucanos ou nas proteínas da superfície, criando diversidade nos sítios de ligação. Os suplementos de cisteína, glucose, amónia, e fosfato no meio de fermentação conduzem ao aparecimento de diferentes grupos funcionais: a cisteína introduz ligandos –S e –N, a glucose ligandos –C, a amónia ligandos –N e os fosfatos ligandos –P.

Goyal *et al.* (2003) estudaram a sorção de Cr(VI) por *S. cerevisiae* em diferentes fases do crescimento e cultivada em meios com diferentes fontes de carbono (glucose, frutose e sacarose), bem como o efeito da adição de nutrientes suplementares ao meio de cultura (glucose, cisteína, amónia e fosfatos). Verificaram que a remoção de metal era menor usando como fonte de carbono a frutose. O enriquecimento do meio original permitiu a adição de grupos funcionais suplementares na superfície celular, constatando-se que todos os nutrientes contribuíram para aumentar a remoção de Cr(VI) pela levedura, sendo a cisteína e a glucose aqueles que contribuíram para o maior incremento.

O efeito da adição de L-cisteína ao meio de crescimento de *S. cerevisiae* na biossorção de Ag⁺ a células inteiras e às paredes celulares isoladas também foi estudado por Simmons e Singleton (1996), evidenciando uma correlação entre a capacidade de biossorção deste metal e a adição deste suplemento ao meio de crescimento. Os autores constataram que a adição de L-cisteína em concentrações acima de 1 mM conduziu a um aumento do teor de proteína tanto das células inteiras como das paredes celulares isoladas. Verificaram ainda um incremento significativo dos grupos sulfidril na composição das células inteiras: 375, 523 e 816 % para suplementos de 1, 2,5 e 5 mM de L-cisteína, respectivamente, mas menos acentuado nas paredes isoladas: 0, 10,6 e 61,7 % para a mesma ordem de concentração de aminoácido. Assim, concluíram que a adição de aminoácidos contendo enxofre ao meio de crescimento melhorou a capacidade de biossorção

de prata através do aumento dos níveis de proteína e/ou pela alteração dos níveis de compostos de enxofre na célula.

2.3.3 Características do bio sorvente

O sucesso da remoção de metais pesados de soluções depende das propriedades de ligação da biomassa seleccionada e da química do metal em solução. As paredes celulares da biomassa, que são os locais que primeiro contactam com a solução, actuam como as principais superfícies de ligação aos metais. A sua estrutura complexa representa uma rede extensiva de sítios de ligação heterogéneos com diferentes afinidades, forças de ligação e mecanismos de ligação aos metais (Kogej e Pavko, 2001). Também a diversidade de biomoléculas e organelos intracelulares providencia uma enorme diversidade de potenciais sítios de ligação a metais (Blackwell *et al.*, 1995).

Assim, para tornar a utilização da biomassa mais eficiente os grupos funcionais da biomassa com capacidade de ligação (sítios de ligação) a metais devem ser identificados, e o mecanismo do processo de ligação deve ser compreendido. Estes são pré-requisitos para a modelação da bio sorção (Yun e Volesky, 2003).

2.3.3.1 Sítios de ligação

É generalizadamente aceite que a parede celular microbiana é a estrutura principalmente responsável pelo comportamento de bio sorção dos metais (Volesky e Holan, 1995; Wang *et al.*, 2003b). A composição, estrutura e carga da parede, assim como a presença de materiais poliméricos extracelulares são factores a considerar. Nos fungos a parede celular é constituída até 90 % por polissacáridos, com o β -glucano a constituir a principal estrutura polimérica da parede da *S. cerevisiae*. Outros componentes incluem proteínas, lípidos, e pigmentos e esta diversidade reflecte-se na presença de uma gama de potenciais sítios de ligação a metais (Rapoport e Muter, 1995), dos quais se destacam os grupos carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), tiol (-SH), fosfato (-PO₄³⁻), sulfato (-SO₄²⁻) e hidroxilo (-OH) (Ginisty *et al.*, 1998; Goksungur *et al.*, 2005; Sag e Aktay, 2002). No entanto, a presença de grupos funcionais não garante a sua acessibilidade para a bio sorção, talvez devido a barreiras conformacionais, estereoquímicas ou outras (Volesky e Holan, 1995). A importância de um dado grupo para a bio sorção de um dado metal por uma certa biomassa depende de factores como o número de sítios no material bio sorvente, a acessibilidade a esses sítios, o estado químico desses sítios (isto é a disponibilidade) e a afinidade entre o sítio e o metal (Vieira e Volesky, 2000).

A composição bioquímica da biomassa tem grande importância na definição da sua selectividade para iões metálicos, nomeadamente na definição da sequência de afinidade para a ligação a metais, selectividade da biomassa e influência da força iónica na ligação em sistemas multi-metal (Davis *et al.*, 2003b). As diferenças estereoquímicas nas estruturas de polissacáridos das paredes celulares podem constituir uma diferença significativa na aceitação de iões metálicos por

parte dessas estruturas que por sua vez podem ter uma profunda sustentação do desempenho de bio sorção dos materiais que os contêm (Volesky e Holan, 1995).

A maior parte da ligação de metais a peptidoglicanos advém dos resíduos de carboxilato das cadeias peptídicas (Goyal *et al.*, 2003). Os grupos carboxílicos dos peptidoglicanos são os principais sítios de ligação nas bactérias Gram positivas, enquanto que os grupos fosfato contribuem significativamente para a bio sorção nas bactérias Gram negativas. A quitina, um polímero de N-acetilglucosamina, é um componente estrutural importante das paredes celulares dos fungos, é reconhecida como um bio sorvente tal como o quitosano e outros derivados da quitina. Os fungos contêm ainda polímeros fenólicos e melaninas que possuem potenciais sítios de ligação a metais, sendo particularmente importantes os grupos que contêm oxigénio: grupos carboxilo, hidroxilo (de álcoois e fenóis) e carbonilo (Gadd, 1996; Gadd, 2004). Os principais componentes estruturais das leveduras são os glucanos, os mananos e as proteínas, enquanto que os componentes característicos de outros fungos são a celulose, a quitina e diferentes tipos de glucanos (Kogej e Pavko, 2001).

A fase de selecção de um bio sorvente adequado, ou seja, a avaliação da sua capacidade de sequestrar grandes quantidades de metal a partir da água contaminada pode incluir como teste preliminar a titulação potenciométrica da biomassa, que permite uma determinação qualitativa (pelo pK_a) e semi-quantitativa da natureza e número dos sítios de ligação presentes na parede celular. Esta caracterização é particularmente importante quando o mecanismo mais importante envolvido na remoção dos metais é a troca iónica (Loukidou *et al.*, 2004c). Os bio sorventes podem ser considerados como materiais naturais de troca iónica que contêm grupos ácidos fracos e básicos (Figueira *et al.*, 2000a). Do equilíbrio ácido-base é sabido que na gama de pH entre 2,5 e 5 a ligação de cationes metálicos é determinada pelo estado de dissociação dos grupos ácidos fracos (Kratochvil e Volesky, 1998a). Na Tabela 2.2 são apresentados alguns dos grupos funcionais associados à troca iónica e os respectivos valores de pK_a . Para o estudo da ligação de metais a grupos funcionais específicos disponíveis na superfície microbiana também se tem recorrido a técnicas instrumentais sensíveis como a microscopia electrónica de transmissão (TEM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelhos, e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX), entre outros (Pethkar *et al.*, 2001).

Apesar dos esforços dos investigadores não foi possível identificar o papel de um grupo funcional específico na ligação a metais, o que pode ser atribuído ao facto a um mesmo microrganismo estarem envolvidos vários mecanismos de remoção. Em muitas situações a biomassa liga-se a diferentes metais de forma não específica, dificultando o estabelecimento do papel dos grupos funcionais (Pethkar *et al.*, 2001).

Vários estudos têm vindo a demonstrar a importância dos grupos carboxílicos da biomassa na bio sorção de metais (Davis *et al.*, 2000; Kratochvil e Volesky, 1998a; Palmieri *et al.*, 2002; Sawalha *et al.*, 2007). Também Davis *et al.* (2003b) referem que a capacidade de adsorção das algas castanhas está directamente relacionada com a presença dos grupos carboxílicos. Estes

são geralmente os grupos funcionais ácidos mais abundantes destas algas, constituindo a maior percentagem de sítios tituláveis na biomassa desidratada (tipicamente superior a 70 %), verificando-se ainda que a maior parte dos metais pesados estudados apresenta a sua capacidade de remoção máxima a pH próximo da constante de dissociação dos ácidos carboxílicos observados nas algas castanhas (pK_a perto de 5).

Tabela 2.2 – Grupos funcionais intervenientes na biossorção de metais e respectivos valores de pK_a .

Grupo funcional	Localização	pK_a	Fonte
Carboxilo	Proteínas, quitina	3-4,4 4,6 3-5 3,5-5 3,5-5,5	Eccles (1999) Yun <i>et al.</i> (2001) Figueira <i>et al.</i> (1999), Niu e Volesky (2000) Sheng <i>et al.</i> (2004b) Kratochvil e Volesky (1998a), Sag (2001)
Sulfonato	Ácido cisteico	1,3 1-2,5	Eccles (1999) Sheng <i>et al.</i> (2004b)
Fosfato	Polissacáridos, ácidos nucleicos, fosfolípidos, glicoproteínas	0,94-2,1	Eccles (1999)
Hidroxilo	Polissacáridos	9,5-10,5 10,0	Eccles (1999) Yun <i>et al.</i> (2001)
Amino	Quitina, quitosano, proteínas, ácidos nucleicos	4,1 3,5-6	Eccles (1999) Niu e Volesky (2000)
Imino	Péptidos	13	Eccles (1999)
Imidazol	Histidina	6-7	Eccles (1999)

Os grupos fosfato da camada lipídica da membrana celular (cabeça polar) também actuam como sítios de troca iónica com metais, contribuindo para a biossorção dos metais (Palmieri *et al.*, 2002). Os grupos fosfato estão presentes principalmente nas glicoproteínas e acredita-se que têm um papel importante na biossorção por terem carga negativa a $pH > 3$. Nas células de fungos os iões metálicos podem ligar-se aos grupos amino da quitina (R_2-NH) e do quitosano ($R-NH_2$). A quitina e as suas proteínas associadas também contêm muitos grupos carboxílicos. O aspartame, glutamato e a cisteína também têm um papel importante na quelação dos metais (Kratochvil e Volesky, 1998a; Sag e Aktay, 2002).

Yun *et al.* (2001) na caracterização dos sítios de ligação de Cr(III) à alga *Ecklonia* sp., identificaram vários grupos funcionais tituláveis capazes de participar na ligação ao crómio trivalente: i) grupo hidroxilo (pico de absorção IV a 3340 cm^{-1} a 3380 cm^{-1} ; $pK_a = 10,0 \pm 0,3$); ii) grupo não identificado, que pode ser $P=O$, $P-O-C$ ou $P-OH$ (picos de absorção IV a 1150 cm^{-1} ,

910 a 1040 cm^{-1} e 970 a 1050 cm^{-1} respectivamente; $\text{pK}_a = 7,2 \pm 0,4$) e iii) grupo carboxílico (pico de absorção IV de C=O a 1838 cm^{-1} ; $\text{pK}_a = 4,6 \pm 0,1$). Os autores concluem que no intervalo de pH a que se realizaram os ensaios (1 a 5, pois a $\text{pH} > 5$ ocorre precipitação do crómio), o grupo funcional capaz de ter um papel significativo na ligação ao crómio é o grupo carboxílico.

2.3.3.2 Biomoléculas com propriedades de ligação a metais

As bactérias e os organismos superiores desenvolveram mecanismos de resistência a metais tóxicos tornando-os inócuos. Os organismos respondem ao stresse usando diferentes mecanismos de defesa como a exclusão, bombeando os metais para fora da célula, a compartimentalização, ou a desintoxicação enzimática, geralmente por reacções redox, convertendo o metal numa forma menos tóxica (Mejare e Bulow, 2001), e ainda produzindo vários compostos com capacidade de ligação, específica e não específica, a metais, incluindo desde simples ácidos orgânicos e álcoois, a macromoléculas como polissacáridos, ácidos húmicos e fúlvicos. Também as substâncias poliméricas extracelulares excretadas por bactérias, algas e fungos têm a capacidade de ligação a metais ou de aprisionamento de matéria particulada como os precipitados metálicos (Gadd, 2004).

Um dos mecanismos de protecção contra os metais pesados consiste na sua compartimentalização em vacúolos, o que limita a sua concentração no citoplasma (Gomes *et al.*, 2002). Os vacúolos são o maior compartimento intracelular das leveduras, e as suas funções incluem o armazenamento de aminoácidos, enzimas hidrolíticas e metabolitos, e ainda a manutenção da homeostase do pH do citoplasma. Também lhes foi atribuído um papel importante na regulação da concentração de vários metais no citoplasma através da sua compartimentalização, incluindo de Li^+ , Cs^+ , K^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Esta acumulação de metais no vacúolo serve tanto para as funções metabólicas essenciais, como para evitar a acumulação de metais tóxicos no citoplasma, reduzindo o seu efeito tóxico (Gharieb e Gadd, 1998; Ramsay e Gadd, 1997). O transporte destes catiões metálicos através da membrana vacuolar ocorre pela troca com protões accionada pelo gradiente electroquímico (pH) transmembranar. A troca catião-protão é efectuada por um transportador H^+ -ATPase específico (Ramsay e Gadd, 1997).

Nos organismos eucarióticos a maior parte dos metais intracelulares ligam-se a grânulos de polifosfato localizados nos vacúolos ou na proximidade destes, (Yazgan e Ozcengiz, 1994) verificando-se ainda que dentro das células as principais moléculas envolvidas na sequestração de metais são pequenos peptídeos designados por fitoquelatinas ($(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$), a glutathione, um tripeptídeo precursor da síntese de fitoquelatinas, constituído por (L- $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$), e proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteína, as metalotioninas (Gharieb e Gadd, 2004; Gomes *et al.*, 2002). A introdução e/ou sobre-expressão das proteínas com propriedades de ligação a metais tem sido explorada para desenvolver biomassa com propriedades específicas de ligação a metais, aumentando a capacidade de ligação, a tolerância ou a acumulação de metais em plantas e bactérias (Gadd, 2004; Mejare e Bulow, 2001).

As metalotioninas, que também são encontradas no reino animal, plantas e alguns procariontes, podem ser induzidas por várias substâncias incluindo metais pesados (Wang e Chen, 2006). Estas proteínas, de baixo peso molecular (6 a 10 kDa) e ricas em cisteína, têm propriedades específicas de ligação a metais desempenhando funções na redução da toxicidade, armazenamento e regulação intracelular de metais (Gadd, 2004). A cisteína, bastante referida nas discussões sobre as propriedades de ligação proteínas de metais, tem 3 sítios de coordenação possíveis: os grupos amino, sulfidril e carboxílicos (Niu e Volesky, 2000). Na *S. cerevisiae* estas proteínas foram induzidas por cobre mas não pelo cádmio ou zinco (Gadd, 1990).

As fitoquelatinas, outras proteínas com capacidade de ligação a metais, são peptídeos que contêm ácido glutâmico e cisteína na posição amino terminal, foram identificadas em plantas, algas e vários microrganismos (Gadd, 2004), assumindo um papel muito relevante na redução de toxicidade de metais por algas, plantas, fungos e leveduras (Gadd, 1996; Gadd, 2000). Estas moléculas neutralizam o efeito tóxico dos metais livres ligando-se a eles no interior da célula (Gomes *et al.*, 2002).

Outra molécula intracelular com influência na sensibilidade aos metais pesados é a glutatona (GSH), um tiol de baixo peso molecular que funciona como uma forma de armazenamento de enxofre e azoto endógeno. Na *S. cerevisiae* a glutatona contribui para 1 % do peso seco da célula, e desempenha um papel importante na protecção das leveduras a biocidas e certos iões metálicos (Gharieb e Gadd, 2004; Wang e Chen, 2006). Gharieb e Gadd (2004) estudaram o papel da glutatona na acumulação e tolerância da *S. cerevisiae* a metalóides, utilizando nos ensaios uma estirpe selvagem e uma geneticamente modificada, sem glutatona. Demonstraram a independência da actividade da glutatona intracelular na tolerância ao Co, Cu, Cr (na forma de K_2CrO_4), Mn, Ni, Te e Zn, verificando sensibilidade da estirpe sem glutatona apenas para o Se e o Cd. No que respeita à capacidade de acumulação de metais, não detectaram diferenças significativas entre as duas estirpes para o Co, Cu, Mn e Te. Com o Cr verificaram que a acumulação foi superior na estirpe selvagem, ao contrário do Ni e do Zn. No que respeita ao Cr os autores afirmam que os resultados podem significar que a glutatona tem um papel predominantemente activo na acumulação de cromato em vez da diminuição do seu efeito tóxico.

Os biopolímeros, em particular os exopolissacáridos microbianos também são considerados biossorventes interessantes. Os exopolissacáridos são produzidos por várias bactérias e algas marinhas, e podem ser excretados para o meio ou podem associar-se com a parede celular ou formar uma camada de mucilagem extracelular gelatinosa ou cápsula em torno da célula (Melo e D'Souza, 2004). Os exopolímeros microbianos, compostos por polissacáridos, glicoproteínas e lipopolissacáridos podem ter um importante papel ao regular a exposição das células a variações de concentração ambiental de metais pesados. Muitos destes exopolissacáridos actuam como polianíons em condições ambientais naturais, o que permite a interacção entre os grupos aniónicos e os catiões metálicos. Os exopolissacáridos neutros também podem ligar-se e aprisionar formas metálicas insolúveis. A produção de exopolissacáridos é influenciada pelas

condições de crescimento, nomeadamente pela presença de iões metálicos que promovem a floculação e sedimentação (Gadd, 1996).

Os biomateriais ricos em quitina/quitosano são reconhecidamente bons bioissorventes para metais, estando a sua capacidade para formar complexos, em especial com iões metálicos de transição ou pós-transição, bem documentada. A quitina é um polissacárido natural, constituído por monómeros de (1,4)2-acetamida-2-deoxi-D-glucose, alguns dos quais são desacetilados (quitosano) (Niu e Volesky, 2003). Metabolitos celulares, como os nucleótidos, RNA, fosfato inorgânico têm capacidades significativas de ligação a metais (Blackwell *et al.*, 1995).

2.3.3.3 Estado fisiológico da célula

Na avaliação do estado fisiológico das células na bioissorção, pode considerar-se o efeito da viabilidade, o estado nutricional e a idade das células.

2.3.3.3.1 Efeito da viabilidade celular

A capacidade de acumulação de células mortas pode ser maior, equivalente ou menor do que a capacidade das células vivas, o que pode depender do tratamento utilizado para a inactivação das células e da ocorrência de alterações subsequentes na estrutura da parede (Gadd, 1990). A capacidade de bioissorção das células mortas tem sido estudada mais intensamente do que a das células vivas (Kapoor e Viraraghavan, 1995). Os estudos de bioissorção envolvendo biomassa não viável dominaram a investigação nesta área nos anos 80-90 do século passado. No entanto têm vindo a ser evidenciadas, em ensaios realizados à escala piloto, limitações associadas às aplicações industriais da bioissorção com células não viáveis imobilizadas, como o custo associado às técnicas de imobilização e pré-tratamento utilizadas na produção dos bioissorventes requeridos com biomassa residual (Wang e Chen, 2006).

Mais recentemente têm vindo a ser sugeridas biotecnologias híbridas que integram a bioissorção, a bioprecipitação e a biorredução usando células vivas (Tsezos, 2001) e que podem passar pela utilização de consórcios microbianos (Malik, 2004). Em contraste aos métodos físico-químicos convencionais e à bioissorção com células não viáveis, a utilização de biomassa viva abre a possibilidade de desenvolver um processo de um estágio único para a clivagem de complexos organo-metálicos, degradação de compostos orgânicos, imobilização de elementos metálicos e metalóides dissolvidos e finamente dispersos, e em alguma extensão, a remoção ou degradação de alguns iões inorgânicos como a amónia, nitratos e fosfatos, substâncias podem estar presentes na complexa matriz dos efluentes de indústrias de acabamento de superfícies (Pumpel *et al.*, 2001). Para a levedura *S. cerevisiae* são igualmente importantes os estudos com células viáveis e não viáveis, mas para explorar o mecanismo de acumulação de metais, em especial as interacções metal-microrganismo, devem ser utilizadas inevitavelmente células vivas para investigação específica ao nível molecular (Wang e Chen, 2006).

Vários autores afirmam que em processos de biorremediação de águas residuais industriais a utilização de biomassa não viável é preferível à viável (Bustard *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 2002), na medida em que não é afectada pelos compostos tóxicos presentes nestas correntes e também por não ter limitações relacionadas com as condições necessárias ao crescimento celular. Assim, podem assumir-se como vantagens associadas à utilização de biomassa inactiva a inexistência de: i) limitações associadas à toxicidade dos metais, ii) necessidades de nutrientes e outros factores de crescimento, iii) preocupações associadas à necessidade de manutenção de culturas puras (Goksungur *et al.*, 2005; Padmavathy *et al.*, 2003; Tsezos *et al.*, 1997); e ainda o facto de iv) a biomassa poder ser obtida a partir de processos de fermentação industrial; v) o processo não ser governado pelo estado fisiológico da célula; vi) a biomassa actuar como uma resina de troca iónica e o equilíbrio ocorrer entre alguns minutos a poucas horas de contacto; vii) não serem necessárias condições de assepsia, nem manter as condições ambientais (e.g. pH e temperatura) óptimas para o crescimento; viii) o metal poder ser recuperado facilmente por eluição, se houver interesse económico nesse procedimento, ou pode incinerar-se a biomassa carregada de metal (Ahluwalia e Goyal, 2007); ix) a capacidade de dessorção de metais em condições extremas ser superior; e x) não representar um risco para a saúde pública, o que é importante quando se utilizam espécies patogénicas (Brady *et al.*, 1994a; Zouboulis *et al.*, 2001). Quando se usam células vivas ainda existe o risco de que o metal possa acumular-se dentro das células sendo criado um novo resíduo. Também é mais difícil prever o comportamento celular na presença de metais (Kadukova e Vircikova, 2005)

No que diz respeito às desvantagens associadas ao uso de biomassa não viável Ahluwalia e Goyal (2007) indicam que: i) a saturação precoce pode ser um problema, obrigando à dessorção do metal para reiniciar um novo ciclo; ii) o potencial de melhoramento biológico do processo é limitado porque as células não estão a metabolizar. Uma vez que a produção do agente de adsorção ocorre durante a fase de pré-crescimento, não há controlo biológico das características do bioissorvente, particularmente no caso de se utilizar biomassa residual de processos de fermentação industrial; e iii) não existe potencial de alterar biologicamente a valência do metal para formas menos solúveis ou até para a degradação de complexos organometálicos.

Frequentemente a bioissorção por si só não é suficiente para uma remediação eficaz dos metais. Nestas circunstâncias a aplicação de células vivas em crescimento pode revelar-se uma melhor opção devido à sua capacidade de auto-regeneração, existência de sistemas enzimáticos activos que podem estar envolvidos na complexação e ligação de metais pesados, potenciando a acumulação metabólica contínua depois da adsorção física, e ao potencial de optimização através do desenvolvimento de espécies resistentes e modificação da superfície celular. Para além disso os metais difundidos para o interior da célula ligam-se a proteínas intracelulares antes de serem incorporadas nos vacúolos ou outros locais intracelulares, processos geralmente irreversíveis e que como tal garantem menores riscos de libertação do metal de volta ao ambiente (Malik, 2004).

Ainda que existam limitações práticas significativas associadas ao recurso sistemas de células vivas, como a sensibilidade às condições ambientais e a necessidade de energia metabólica externa, estes desafios podem ser ultrapassados através da selecção das estirpes e explorando a utilização de resíduos orgânicos como fonte de carbono. O isolamento e a selecção de estirpes resistentes a metais constitui um passo crucial para ultrapassar o primeiro obstáculo à utilização de sistemas de células vivas. Também se espera das células resistentes maiores capacidades de ligação a metais, o que por si já constitui um pré-requisito para melhorar o processo combinado de biossorção/bioacumulação/bioprecipitação necessária para melhorar a eficiência do processo. Outra abordagem possível é o recurso a desenvolver consórcios microbianos, mais capazes de resistir a condições extremas muitas vezes encontradas nas águas residuais industriais como picos de pH e elevadas concentrações de metal (Malik, 2004).

Devido à toxicidade inerente aos metais, a maior parte dos sistemas vivos têm sido utilizados para a descontaminação de efluentes com concentrações de metais pesados abaixo dos limites de toxicidade. A complexidade dos sistemas deste tipo, que podem envolver microrganismos e plantas superiores como por exemplo nas zonas húmidas construídas, abrange vários mecanismos como a biossorção, a precipitação, e o aprisionamento dos metais em partículas, contribuindo para a concentração dos metais nos sedimentos diminuindo consideravelmente a sua mobilidade no ambiente e a sua biodisponibilidade (White *et al.*, 1995). Em casos extremos, para as células vivas, a acumulação pode ocorrer devido ao aumento de permeabilidade como resultado da ruptura da parede celular e subsequente exposição de sítios de ligação (Kapoor e Viraraghavan, 1995).

Células inactivadas através de condições físicas ou químicas extremas podem demonstrar propriedades de acumulação de metais muito diferentes das células originais (Wang e Chen, 2006). Segundo Kapoor e Viraraghavan (1995) os métodos utilizados para tornar a biomassa não viável incluem métodos físicos: secagem em vácuo, tratamento térmico (Melo e D'Souza, 2004; Saeed e Iqbal, 2003), ou autoclavagem (Kefala *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003); métodos químicos: tratamento com vários reagentes orgânicos e inorgânicos como os ácidos (Wang *et al.*, 2003a) ou alcalis (Low *et al.*, 2000; Nasernejad *et al.*, 2005; Yan e Viraraghavan, 2003), etanol (Goksungur *et al.*, 2005), formaldeído, glutaraldeído (Yu *et al.*, 2007), entre outros; e métodos mecânicos como a ruptura mecânica (Riordan *et al.*, 1997).

Geralmente estes métodos melhoram de alguma forma a biossorção, sendo o tratamento com alcalis o mais eficaz no aumento da capacidade de biossorção de fungos devido à desacetilação da quitina da parede celular e a consequente formação de complexos quitina-glucano com maior afinidade para os iões metálicos (Kapoor e Viraraghavan, 1995), enquanto que o tratamento ácido não tem praticamente influência na biossorção de fungos (Wang e Chen, 2006). A levedura *S. cerevisiae* quando inactivada através de secagem por aplicação de calor e submetida a trituração, aumenta a sua capacidade de acumulação de alguns metais, incluindo urânio (Brady *et al.*, 1994a). A levedura *Candida utilis* revelou ter uma maior actividade de sorção quando submetida a desidratação do que quando é utilizada fresca (Rapoport e Muter, 1995).

No entanto, existe ambiguidade no que respeita à melhor opção entre a utilização de células viáveis ou inativas para o sequestro de metais (Blackwell *et al.*, 1995), sendo referidas na bibliografia situações contraditórias no que respeita ao efeito da viabilidade celular na capacidade de acumulação de metais.

Kefala *et al.* (1999) estudaram a biossorção de Cd^{2+} por células vivas e mortas de duas estirpes de *Actinomyces*, verificando uma maior remoção de metal pelas células não viáveis, o que pode ser atribuído a vários mecanismos de resistência que permitem às células vivas adaptarem-se a meios contendo metal, nomeadamente o transporte dos iões de Cd^{2+} para fora da célula. Este incremento da remoção nas células não viáveis pode justificar-se pelo aumento da área superficial da parede celular e pela exposição de sítios de ligação intracelulares das células resultante da desidratação e moagem (Avery e Tobin, 1992).

Srinath *et al.* (2002) isolaram 71 estirpes bacterianas resistentes ao Cr(VI) a partir de uma mistura de águas residuais de 25 indústrias de curtumes indianas. Em 11 estirpes o limite de tolerância ao Cr(VI) (concentração mínima a partir da qual não se verificou crescimento) foi superior a 100 mg/L. Verificaram que a capacidade de acumulação depende do limite de tolerância ao metal. As células com maior capacidade de acumulação foram aquelas com limite de tolerância mais baixo ($< 50 \text{ mg.L}^{-1}$). Estes autores verificaram ainda um aumento entre 5 a 20 % da biossorção de Cr(VI) utilizando células mortas, referindo que ainda que possa ocorrer internalização de metal pelas células vivas, os mecanismos de efluxo de metal podem ter sido dominantes.

No que respeita a leveduras, Goksungur *et al.* (2005) referem que as células inativas não libertam proteína e exibem uma maior capacidade de remoção de metal do que as células vivas, situação corroborada por Avery e Tobin (1992) em ensaios de remoção de Sr^{2+} por duas estirpes de *S. cerevisiae*, uma de colecção e outra residual da produção de cerveja. Por outro lado Gadd (1990) defende que as células vivas, em particular de leveduras, exibem frequentemente níveis de acumulação intracelular superiores aos não viáveis, sendo capazes de precipitar metais à volta das células em resultado do processo metabólico e também de sintetizar proteínas intracelulares com propriedades de ligação a metais.

2.3.3.3.2 Idade das células

A acumulação de metais por microrganismos depende da composição dos ligandos da biomassa. De acordo com a espécie microbiana, a taxa de formação da parede celular durante o crescimento, a ultraestrutura do citoplasma e a taxa de formação de exopolissacáridos pode variar. A estrutura celular também pode variar de acordo com o tempo de cultura (Park *et al.*, 2003). Assim, a idade das células também tem influência na biossorção de metais, verificando-se geralmente que as células nas fases iniciais do crescimento demonstram maior capacidade de biossorção de metais relativamente às células na fase estacionária (Wang e Chen, 2006).

Num estudo realizado com *S. cerevisiae* residual de uma indústria de cerveja e mantida em meio de crescimento em laboratório, Simmons e Singleton (1996) comparam a capacidade de acumulação de Ag^+ entre biomassa não viável com 24 h e 96 h de incubação, concluindo que as primeiras o dobro da capacidade máxima de remoção de Ag^+ . As paredes celulares isoladas removeram consideravelmente menos Ag^+ do que as células inteiras (aproximadamente 10 %, enquanto que a parede celular corresponde a 25 % do peso da célula), continuando a ser maior a das células com 24 h. Comparando a composição da células e das paredes celulares com 24 h e 96 h, verificaram que a quantidade de proteínas diminuiu enquanto que a de carboidratos aumentou. Assim a razão proteína:carboidratos diminuiu com o aumento do tempo das células (cerca de 45 % nas células inteiras). As células expostas a prata observadas por microscopia electrónica de transmissão (TEM) apresentam precipitados escuros tanto na parede celular como no interior da célula. As células mais novas (24 h) têm maior quantidade de precipitado do que as mais velhas. Os precipitados foram analisados por microanálise de raios-X, apresentando picos de Ag e S, enquanto que as células não expostas ao metal não apresentaram estes picos, o que parece indicar que a prata se liga a uma molécula contendo enxofre e que precipita à sua volta, parecendo que a concentração destes precipitados na célula diminui com a idade.

2.3.3.3.3 Estado nutricional

A glucose é uma fonte de carbono muito utilizada, actuando também como fonte de energia. Na biossorção com células vivas a adição de glucose aumenta o crescimento celular e melhora a biossorção de metais (Wang e Chen, 2006).

Avery e Tobin (1992) ao estudarem a acumulação de Sr^{2+} a estirpes de *S. cerevisiae* de colecção e residual da produção de cerveja, verificaram que as células vivas quando incubadas na presença de glucose (2 %) aumentaram a remoção de Sr^{2+} em 30 a 45 %, estímulo atribuído à bioacumulação de metal através de mecanismos dependentes do metabolismo celular, associados à maior síntese de proteínas transportadoras localizadas na membrana. A remoção associada à actividade metabólica foi maior na estirpe industrial do que na de colecção, eventualmente devido à recolha recente do processo de fermentação, cujas condições são propícias a uma maior taxa metabólica. A localização dos catiões na levedura, quando incubadas na presença de glucose, é essencialmente determinada por transporte activo em resposta ao gradiente electroquímico de prótons, gerado por H^+ -ATPases da membrana, através da membrana citoplasmática e vacuolar. Neste estudo também foi evidenciada que a diferença ecofisiológica de células de colecção e com proveniência industrial, influencia as características da remoção de metais, não só pela capacidade de remoção (foi superior nas células residuais de produção de cerveja) mas também pela localização intracelular do metal (mais elevada no vacúolo da estirpe industrial). Da mesma forma Blackwell e Tobin (1999) verificaram que a remoção de Cd(II) por células viáveis de *S. cerevisiae* na presença e na ausência de glucose (2 %), foi mais rápida na primeira hora de contacto, e a quantidade total de metal removida maior no ensaio realizado com adição de glucose ao meio.

Stoll e Duncan (1996) verificaram que o pré-tratamento de células viáveis de *S. cerevisiae* com glucose (que consistiu na adição de glucose até à concentração final de 50 mM 30 min antes do ensaio de sorção) aumentou a sua capacidade de acumular metais a partir de efluentes de indústrias de deposição electrolítica. Este aumento foi atribuído ao facto de o mecanismo envolvido ser dependente do metabolismo, daí as células privadas de uma fonte de energia antes dos ensaios de sorção terem menor capacidade de bioacumulação. Os autores verificaram ainda que a adição de glucose directamente à solução de metal não tem qualquer efeito na acumulação de metais, parecendo haver uma inibição do consumo de glucose na presença de iões metálicos.

Também Mapolelo e Torto (2004) verificaram o aumento da eficiência de biossorção de Cr^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} em 30-40 % realizando um pré-tratamento com 10-20 mM de glucose. No caso do Cr(III) a maior acumulação verificada na presença de glucose pode estar relacionada com o papel que este metal desempenha no metabolismo de carboidratos de mamíferos e leveduras, estando relacionado com o factor de tolerância a glucose (GTF), um complexo catiónico de baixo peso molecular que consiste em Cr^{3+} , ácido nicotínico e os aminoácidos glicina, ácido glutâmico e cisteína. Assim, é possível que o metabolismo de carboidratos da *S. cerevisiae*, requerendo Cr(III) como componente da GTF, contribua para o aumento da acumulação de Cr(III) na presença de glucose.

2.4 Pré-tratamentos

Para terem aplicação prática, os biossorventes devem ser capazes de resistir à abrasão e pressão, e permanecerem permeáveis às espécies metálicas a sequestrar (Volesky, 1987). A preparação dos biossorventes a partir de biomassa residual de processos industriais para a aplicação a processos de sorção de grande escala requer uma alteração na consistência da biomassa. Normalmente esta biomassa tem uma aparência de lama, bolo seco ou pó, e deve ser processada de forma a ser transformada em pequenos grânulos capazes de resistir às condições da biossorção (Volesky, 2001).

A capacidade de biossorção pode ser incrementada pela aplicação de algumas técnicas de pré-tratamento como os tratamentos ácidos com HCl, HClO_4 , H_2SO_4 , HNO_3 , ou alcalinos. Também são referidos tratamentos com produtos inorgânicos como CaCl_2 e KSCN e produtos orgânicos como o etanol, metanol, acetona e clorofórmio. O objectivo destes pré-tratamentos é melhorar as características da superfície dos microrganismos relativamente aos seus mecanismos de adsorção de metais. Isto pode acontecer por aumento da carga negativa da superfície celular por tratamento com NaOH, ou tornando sítios disponíveis para biossorção por tratamento ácido, e reforço da troca iónica com a introdução de catiões como Ca^{2+} usando CaCl_2 (Yetis *et al.*, 2000).

No entanto no recurso a pré-tratamentos em aplicações à escala real, os seus custos devem ser considerados, ainda que o aumento dos custos possa ser compensado pelo aumento da eficiência do processo (Puranik e Paknikar, 1997).

2.4.1 Alteração do estado iónico da biomassa: Protonação e/ou saturação com iões metálicos leves

A forma iónica da biomassa pode afectar a capacidade de sorção, a selectividade, a estabilidade química e as propriedades físicas dos biossorventes (Kratochvil *et al.*, 1997). Vários estudos de biossorção indicam que, à semelhança das resinas de troca iónica sintéticas, os biossorventes podem ser preparados em diferentes formas iónicas: na forma protonada ou saturada com iões Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , etc., através da lavagem da biomassa com ácidos minerais, bases ou soluções de sais. Um aspecto muito importante a considerar na definição deste pré-tratamento é a afinidade das diferentes espécies iónicas com o biossorvente, só fazendo sentido a sua aplicação se as espécies a sorver tiverem maior afinidade para o material do que as utilizadas na sua pré-saturação, verificando-se o inverso para a fase de regeneração. Assim, a selecção da forma iónica do biossorvente a utilizar na fase de sorção, e o eluente a utilizar na sua regeneração deve assegurar que em ambas as fases se verifique a troca da espécie que apresenta menor afinidade para o biossorvente pela espécie com a maior afinidade (Kratochvil e Volesky, 1998a).

A conversão de *Rhizopus arrhizus* da forma protonada para as formas Na-, Ca-/Mg- por lavagens com soluções de NaHCO_3 e água dura resultou no aumento da capacidade da coluna de biossorção para mais do triplo (Fourest *et al.*, 1994).

2.4.2 Imobilização/Granulação da biomassa

Não é qualquer tipo de biomassa que pode ser aplicada directamente num processo de sorção. Geralmente é demasiado frágil não podendo ser aplicada em colunas sem um tratamento prévio de consolidação e granulação (Volesky e Holan, 1995).

A utilização de biomassa microbiana na forma de suspensão trás desvantagens, associadas ao pequeno tamanho das partículas, baixa resistência mecânica, e dificuldades na separação da biomassa do meio líquido (White *et al.*, 1995). A baixa resistência mecânica da biomassa pode provocar dificuldades associadas com a sua separação da corrente líquida, contribuindo com limitações para a operação do sistema. Outro dos problemas associados à fragmentação da biomassa é a restrição do fluxo em sistemas de operação em contínuo (Patzak *et al.*, 1997). A imobilização, ou transformação da biomassa numa forma particulada ou granular desejada, é uma forma de melhorar as propriedades físicas do biossorvente. Este processo pode melhorar a performance de operação de um sistema em contínuo e a reutilização do biossorvente (Volesky, 1987). Uma vez que a viabilidade do processo de biossorção depende da disponibilidade e do custo da biomassa, a forma como esta matéria-prima é transformada num biossorvente activo é muito importante. A imobilização ou granulação e os pré-tratamentos aplicados determinam o preço do produto final (Volesky, 2001).

A utilização de reactores convencionais em grande escala requer que as partículas de biomassa imobilizada tenham propriedades semelhantes às dos adsorventes comerciais, tanto na dimensão (0,5 a 1,5 mm de diâmetro) como na resistência física e química. Também devem ter

elevada porosidade e hidrofobicidade para minimizar problemas de difusão para as partículas (White *et al.*, 1995). Através do recurso às tecnologias convencionais de granulação pode conseguir-se, em muitas situações, a obtenção de grânulos de bioissorventes adequados à sua aplicação. Para produzir os grânulos a biomassa tem de ser imobilizada, ou seja, transformada em partículas sólidas recorrendo a várias técnicas, nomeadamente a encapsulação numa estrutura do tipo membrana, a inclusão numa matriz permeável e forte, ou a formação de biofilme. Os bioissorventes imobilizados são análogos às resinas de troca iónica, baseando-se o processo de remoção de metais no contacto e separação sólido-líquido. Têm vindo a ser exploradas várias configurações de biorreactores para este efeito: tanques agitados, leitos empacotados, fluidizados ou de leito móvel (Gadd *et al.*, 1998; Hatzikioseyan *et al.*, 2001).

As principais razões para recorrer a técnicas de imobilização são: i) permitir a recuperação do bioissorvente carregado com metal; ii) permitir a utilização do bioissorvente em colunas de leito fixo ou fluidizado; iii) melhorar a estabilidade física, através da maior resistência mecânica e melhor separação da biomassa do meio líquido, e química do bioissorvente; iv) melhorar as características de adsorção e dessorção do bioissorvente; v) alterar ou melhorar a gama de selectividade do bioissorvente; e vi) conferir maior tolerância aos metais para as células vivas (Gadd, 2004; Sag, 2001).

A escolha da matriz de imobilização é um factor chave para a aplicação da biomassa, na medida em que determina a resistência mecânica e química da partícula final de bioissorvente a ser utilizada em processos de sorção-dessorção. Um dos biopolímeros mais estudados como matriz de imobilização é o alginato de sódio, havendo também estudos sobre a utilização de poliuretano, poliacrilamida, polivinil álcool (PVA) (Bai e Abraham, 2003), agar, celulose, alginatos, sílica-gel e glutaraldeído (Atkinson *et al.*, 1998; White *et al.*, 1995).

No entanto, também é amplamente reconhecido que a imobilização tem efeitos adversos no desempenho dos bioissorventes reduzindo a sua capacidade de ligação aos metais, e mais importante do que isso, aumentando o tempo necessário para que ocorra a acumulação do metal, e ainda conduz ao aumento dos custos de pré-tratamento da biomassa. A imobilização das células microbianas para formar grânulos aumenta o tamanho individual das partículas bioissorventes, e também a distância média intraparticular através da qual os metais têm de se difundir até chegar aos sítios de ligação. O facto de a razão entre a área superficial e o volume ser superior nas células individuais também facilita a transferência de massa externa entre o soluto e bioissorvente. Assim, a imobilização afecta negativamente a cinética da bioissorção (Butter *et al.*, 1998a). Quando a biomassa é imobilizada o número de sítios de ligação facilmente acessíveis aos metais é reduzido largamente, uma vez que a maioria dos sítios de ligação fica retido dentro da matriz. Os metais, para se ligarem a estes sítios, os catiões têm de se difundir através da matriz sólida, um processo que pode ser até 100 vezes mais lento do que a difusão na água (Butter *et al.*, 1998b). Paralelamente aos problemas associados à resistência à difusão, os custos associados à imobilização em matrizes tornam este processo impraticável para aplicações de bioacumulação de metais à escala real (Soares *et al.*, 2002a).

Segundo Volesky (2001), uma das áreas a desenvolver no domínio da biossorção é a granulação dos materiais biossorventes, pois dela depende o *scale-up* das aplicações de biossorção. A configuração do processo de biossorção mais eficiente é, sem dúvida, a de um reactor de leito fixo. O leito tem de ser poroso para oferecer resistência mínima à passagem do fluxo, mas permitindo um máximo de transferência de massa para as partículas. Assim, a dimensão das partículas deve ser pequena, mas praticável no que respeita a queda de pressão ao longo da coluna. Torna-se então necessário otimizar a situação de compromisso entre a dimensão das partículas (que deve ser pequena para minimizar a transferência de massa intraparticular) e o funcionamento do sistema no que respeita à queda de pressão ao longo do leito (que deve ser elevada para permitir o fluxo através do leito).

Bai e Abraham (2003) estudaram a capacidade de biossorção de Cr(VI) a *Rhizopus nigricans* nas formas livre e imobilizada a várias matrizes, verificando que a capacidade de biossorção foi maior nas células livres, seguida pelas imobilizadas em polissulfona, poliisopreno, PVA, alginato de sódio e poliacrilamida.

Brady *et al.* (1994a) compararam a biossorção de Cu^{2+} por *S. cerevisiae* nativa, biomassa sujeita a um tratamento alcalino (NaOH 2 M a 70-90 °C por 15 min), e levedura com tratamento alcalino granulada (filtração, secagem a 70 °C por 12 h e moagem). A biomassa granulada demonstrou uma capacidade de biossorção de Cu(II) 27 % inferior à da biomassa viável original. A biomassa apenas submetida ao tratamento alcalino de inactivação, sem a subsequente granulação aumentou, a capacidade de biossorção em 117 %. Este tratamento remove uma quantidade considerável de manoproteínas da célula, que não é retida na biomassa durante o processo de granulação. Assim a biomassa granulada é constituída essencialmente por glucano e algum quitosano (a quitina deve ser maioritariamente convertida a quitosano durante o tratamento alcalino a quente). As manoproteínas demonstram ter uma elevada capacidade de ligação aos metais, podendo ser utilizadas como floculantes de metal.

Wong *et al.* (1993) referem que a capacidade de remoção de Cu^{2+} por células de *Pseudomonas putida* II-11 imobilizada em gel de poliacrilamida corresponde apenas a 54 % da capacidade de remoção das células livres. A diminuição da capacidade de ligação a metais pela biomassa imobilizada pode ser atribuída ao *crosslinking* de potenciais sítios de ligação da superfície celular, ficando desta forma mascarados pelo gel. O mesmo pode acontecer à matriz, que por si só também pode ter capacidade de ligação a metais (Atkinson *et al.*, 1998).

Lopez *et al.* (2002) refere que também a utilização de células em suspensão num processo de biossorção, representa custos e dificuldades técnicas para o processo de separação. No entanto estes autores verificaram que o equilíbrio de remoção de Ni^{2+} utilizando células de *Pseudomonas fluorescens* ocorre após 5 min, utilizando células em suspensão, e apenas após 24 h com as células imobilizadas numa matriz de agar-agar, o que indica que a taxa de acumulação foi reduzida pela difusão do Ni^{2+} através da matriz. A eficiência de remoção de metal pela biomassa diminuiu de 80 % para 26 % com a imobilização. A capacidade máxima de acumulação de metal (q_{max}) das células livres foi de 145 mg.g^{-1} , valor que sofreu uma redução de cerca de quatro

vezes para as células imobilizadas (37 mg.g^{-1}), indicando que a imobilização reduz o número de sítios activos nas células. Também a afinidade das células para os iões Ni^{2+} diminui em consequência da imobilização. Assim, é preferível a utilização de sistemas com células em suspensão quando se pretende uma remoção rápida de metal de solução e a perda de biomassa não constitui um problema. No entanto os sistemas de células imobilizadas podem ser preferíveis em certas circunstâncias devido ao facto de a imobilização permite uma maior flexibilidade na operação do sistema e facilita a reutilização do sistema e a recuperação do metal.

Apesar das vantagens da imobilização já referidas, este processamento constitui um custo adicional e significativo, que pode comprometer a sua aplicação em determinadas circunstâncias. A maior restrição da imobilização está associada às limitações difusionais acrescidas, relativamente aos sistemas de células em suspensão, que se traduzem em curvas de *breakthrough* mais dispersas e na redução do tempo de serviço da coluna. (Sag, 2001).

2.4.3 Modificação química da biomassa

A modificação química da biomassa pode dar origem a variações na capacidade e afinidade para a ligação a metais pesados. A introdução de grupos carboxilo e etilenodiamino adicionais a *A. niger* resultou no incremento da capacidade máxima de remoção de níquel de cerca de 70 mmol.kg^{-1} para $1060 \text{ mmol.kg}^{-1}$ (Gadd, 2000).

O tratamento com HClO_4 dissolve polissacáridos da camada exterior da parede celular dos fungos produzindo novos sítios de ligação (grupos amino). Os grupos acetil do monómero da quitina quando tratados com NaOH foram hidrolisados a grupos amino e têm um par de electrões disponível para coordenação e têm comportamento de base de Lewis forte. O aumento da biossorção de Pb após o tratamento com NaOH deveu-se ao aumento de grupos funcionais na parede celular, particularmente com carga negativa, como os grupos fosfato e carboxilo das proteínas, ligandos -N nas proteínas, quitina e quitosano (Yetis *et al.*, 2000).

O tratamento da biomassa com NaOH ou outros reagentes alcalinos aumenta a capacidade de adsorção de alguns metais. O tratamento cáustico da biomassa tem as vantagens de destruir enzimas autolíticas que provocam a deterioração da biomassa e remover compostos que mascaram sítios reactivos (Vianna *et al.*, 2000). Uma forma de realizar a recuperação de metais é através da utilização de plantas, algas e biomassa microbiana, por vezes tratada com uma base forte para aumentar a capacidade de ligação a metais, para remover as espécies metálicas das soluções aquosas (Valls e de Lorenzo, 2002).

Yan e Viraraghavan (2003) verificaram que a capacidade de remoção de Pb^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} com biomassa de *Mucor rouxii* viável a pH 5 foi superior à da biomassa pré-tratada com NaOH 0,2 M e autoclavada a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min a pH 5 mas menor do que a pH 6. A remoção de Zn^{2+} da biomassa pré-tratada foi superior à da biomassa viva tanto a pH 5 como 6. A maior capacidade de remoção da biomassa viável foi atribuída à componente de acumulação intracelular que pode ter uma contribuição substancial na capacidade de acumulação total de algumas estirpes de

fungos, enquanto que a biomassa morta só remove metais por mecanismos passivos que incluem a ligação à superfície da parede celular. Uma vez que esta ligação envolve grupos funcionais cuja disponibilidade é afectada pelo pH e outros iões, o que pode explicar a maior capacidade de bioissorção da biomassa a certos valores de pH.

Goksungur *et al.* (2005) compararam a capacidade de sorção de Cd^{2+} e Pb^{2+} a *Saccharomyces cerevisiae* desidratada, submetida a três pré-tratamentos: térmico, caustico e com etanol, verificando que todos eles aumentavam a capacidade de sorção de metais. De entre os três o pré-tratamento com etanol é o que demonstra melhores resultados, o que pode ser explicado pelo aumento da disponibilidade de sítios de ligação.

2.4.4 Outros pré-tratamentos

Devido à importância da parede celular na bioissorção, a esterilização química, térmica ou a sua desintegração mecânica podem contribuir para melhorar a capacidade de ligação a metais. As células degradadas oferecem uma maior área superficial e expõem os componentes intracelulares e mais sítios de ligação superficiais devido à ruptura das membranas celulares (Wang e Chen, 2006).

Riordan *et al.* (1997) e Riordan e Mchale (1998) testaram o efeito da lavagem e da ruptura celular de levedura não viável, residual de uma indústria cervejeira na remoção de urânio e chumbo a partir de soluções aquosas. Os primeiros verificaram que a lavagem, por duas vezes, da biomassa com água destilada seguida de centrifugação, reduziu a capacidade de remoção de urânio para cerca de metade. Assim concluíram que os componentes eliminados pelas lavagens, vestígios de meio de fermentação e produtos da fermentação ligados às leveduras, contribuem significativamente para a remoção de U da solução. Já Riordan e Mchale (1998) verificaram o efeito oposto em ensaios de bioissorção de Pb^{2+} – a lavagem aumentou a capacidade de remoção de chumbo de 99 mg.g^{-1} para 127 mg.g^{-1} .

Nos ensaios realizados com biomassa submetida a um tratamento de homogeneização, que provoca a ruptura celular, Riordan *et al.* (1997) verificaram que não houve variação significativa na acumulação de urânio, enquanto que Riordan e Mchale (1998) observaram que a capacidade máxima de remoção de chumbo diminuiu para 38 mg.g^{-1} . Estes resultados contrariam o expectável devido ao aumento de área superficial do bioissorvente para a ligação ao metal decorrente da ruptura celular, indiciando que a remoção de algum material dissolvido e/ou na forma de pequenas partículas que não são retidas por centrifugação contribuem muito significativamente para o processo global de remoção de chumbo, existindo assim outro mecanismo para além da bioissorção.

A exposição de biomassa residual de uma destilaria de *whiskey*, constituída por células de levedura e bactérias não viáveis, a impulsos eléctricos curtos e intensos resultou num aumento da acumulação de urânio (Bustard *et al.*, 1998).

Yu *et al.* (2007) modificaram a parede da levedura de padeiro, *S. cerevisiae*, com EDTA verificando um aumento da capacidade da acumulação de Pb^{2+} e Cu^{2+} em 10 e 14 vezes respectivamente. Paralelamente verificaram que a capacidade de acumulação da biomassa modificada é menos afectada pelo pH do meio.

A superfície da *S. cerevisiae* também é influenciada pela desidratação-rehidratação, verificando-se um aumento da electronegatividade da superfície das células submetidas a estes processos, que pode explicar o aumento da biossorção dos metais durante a fase inicial da interacção com a parede celular (Rapoport e Muter, 1995).

2.5 – Quantificação das interacções metal-biomassa

Do ponto de vista científico a biossorção é uma área de estudo que constitui um desafio pois requer a aplicação de princípios da química orgânica e da geoquímica. Os principais objectivos destes estudos são a elucidação dos mecanismos de ligação, da afinidade relativa dos iões metálicos para a biomassa e da forma como ambos são afectados pelas condições ambientais, e por último, a implementação, com sucesso, do sistema de biorremediação (Davis *et al.*, 2003b).

O primeiro passo para alcançar estes objectivos é a quantificação da capacidade de uma dada biomassa sequestrar metais pesados de uma solução aquosa, o que tradicionalmente é feito pela caracterização do estado de equilíbrio entre a biomassa e a solução aquosa de metal (Davis *et al.*, 2003b). O equilíbrio de sorção é estabelecido quando a concentração de sorbato na solução está num balanço dinâmico com o sorbato da interface (Ho *et al.*, 2000).

A biossorção envolve uma fase sólida – o sorvente (biomassa), e uma fase líquida – o solvente, geralmente água, onde se encontra dissolvida a espécie a sorver – o sorbato (iões metálicos). Dada a maior afinidade do sorvente pelo sorbato, este é atraído para o sólido ligando-se a ele através de vários mecanismos, até se estabelecer um equilíbrio entre o sorbato dissolvido e o ligado ao sorvente, ao qual corresponde uma concentração de sorbato em solução designada por concentração final ou de equilíbrio, C_f . Assim, a concentração inicial de sorbato (C_i) é pouco relevante para os ensaios de equilíbrio de sorção realizados em descontínuo. É a afinidade do sorvente com o sorbato que determina a sua distribuição entre as fases líquida e sólida. A qualidade do sorvente é avaliada pela quantidade de sorbato que é capaz de atrair e reter na forma imobilizada (Kratochvil e Volesky, 1998a).

O processo de sorção é monitorizado pela medição da quantidade de metal ainda em solução até que esta se mantenha inalterada ao longo do tempo. A quantidade de metal retida pelo biossorvente (q) é quantificada pelo balanço mássico ao sistema, considerando que o sorbato que não está em solução, está ligado à fase sólida. Os parâmetros ambientais dos sistemas de sorção, e em particular o pH, devem ser controlados ao longo de todo o tempo de ensaio, a não ser que se utilize um modelo de sorção de troca iónica capaz de considerar a variação de concentração de protões do sistema (Kratochvil e Volesky, 1998a).

Os resultados experimentais obtidos nos ensaios de sorção podem ser interpretados recorrendo a várias relações que descrevem a distribuição dos iões metálicos entre o sorvente e a fase líquida (Benguella e Benaissa, 2002). O modelo utilizado para descrever estes resultados deve ser capaz de prever a ligação dos metais pesados tanto a baixas como a altas concentrações e, idealmente, deve permitir tanto prever o comportamento do biossorvente como descrever o do mecanismo envolvido (Davis *et al.*, 2003b). Os princípios das isotérmicas de sorção são frequentemente utilizados para avaliar quantitativamente o desempenho de diferentes biossorventes. Estas isotérmicas correspondem à representação gráfica da quantidade de metal retida pelo biossorvente (q) em função da concentração final de equilíbrio de metal em solução (C_f) obtida para várias concentrações de metal iniciais (Kratochvil e Volesky, 1998a). Os modelos de isotérmicas de equilíbrio são geralmente classificados como equações empíricas e modelos mecanísticos, baseados no mecanismo de biossorção, que podem ser utilizados não só para representar mas também para explicar e prever o comportamento experimental do biossorvente (Wang e Chen, 2006).

Os modelos empíricos para sistemas de solutos únicos utilizados para descrever o equilíbrio de biossorção são os modelos de Langmuir, de Freundlich e de Brunauer-Emmet-Teller (BET). Os modelos de Langmuir e Freundlich, os mais utilizados, geralmente ajustam bem os resultados experimentais (Chojnacka, 2005; Gulnaz *et al.*, 2005; Yang e Volesky, 1999c). No entanto, estes modelos, inicialmente aplicados à sorção a carvão activado, não reflectem os mecanismos envolvidos na biossorção, apenas são capazes de ajustar bem as curvas experimentais. Assim, a utilização dos modelos empíricos assenta apenas na adequabilidade entre a tendência seguida pelos resultados experimentais e a forma da expressão matemática associada ao modelo. Esta abordagem tem uma utilidade limitada pois as equações das isotérmicas obtidas por ajuste dos dados não permitem explicar o comportamento de biossorção segundo uma interpretação física com significado, nem prever a operação do sistema em diferentes condições ambientais, reflectindo o efeito de variáveis como o pH da solução, a força iónica, o tipo de electrólito e as forças electrostáticas têm na biossorção (Benguella e Benaissa, 2002; Kratochvil e Volesky, 1998a; Volesky e Holan, 1995; Wang e Chen, 2006; Yun *et al.*, 2001; Yun e Volesky, 2003). No entanto já surgiram modelos empíricos que consideram a competição entre diferentes espécies em solução, tanto por modificações aos modelos empíricos acima referidos como pela introdução de coeficientes de correcção adicionais (Esposito *et al.*, 2002).

Uma vez que estes modelos não consideram a ocorrência de fenómenos como a troca iónica entre os metais e protões, nem a formação de complexos entre os metais e os grupos funcionais da superfície da biomassa, e estando estes mecanismos associados à biossorção de iões metálicos a vários tipos de biomassa (Fein *et al.*, 2001; Figueira *et al.*, 2000b; Schiewer e Volesky, 1995; Yang e Volesky, 1999c), têm vindo a ser desenvolvidos modelos que contemplam estes fenómenos, permitindo representar não só o comportamento experimental mas também explicar e prever o comportamento da acumulação de metais com base na compreensão dos mecanismos de biossorção. Os dois tipos de modelos mecanísticos desenvolvidos são o de troca iónica e o de complexação superficial (Wang e Chen, 2006).

Os modelos mecanísticos são geralmente equações matemáticas mais complexas cujo desenvolvimento se baseia na caracterização preliminar da biomassa, para identificar a natureza e concentração dos sítios activos, e na subsequente formulação de hipóteses de reacção entre os sítios de adsorção e o ião metálico (Pagnanelli *et al.*, 2003). O desenvolvimento destes modelos baseia-se na caracterização do biossorvente, destacando-se o estudo das suas propriedades ácido-base, através de ensaios de titulação potenciométrica, na medida em que o pH é um dos parâmetros ambientais que mais afecta o desempenho da biossorção. As propriedades ácido-base dos grupos activos do biossorvente podem dar uma previsão da capacidade de remoção a diferentes pH de equilíbrio e podem ser utilizados para estudar interacções iónicas em solução (Pagnanelli *et al.*, 2004). Também são geralmente realizadas análises de infravermelho e de raios-X, com a finalidade a identificar os sítios activos de ligação da parede celular servindo como guia para a escolha de possíveis mecanismos de operação (adsorção física, complexação, troca iónica, microprecipitação superficial) (Esposito *et al.*, 2002).

Para os modelos de complexação superficial é ainda necessária a determinação das constantes de estabilidade de todos os possíveis complexos entre o metal e a superfície da biomassa, o que dada a complexidade associada à sua aplicação em sistemas reais, pode ser realizado por estimativa recorrendo a programas informáticos específicos (Fein *et al.*, 2001).

No contexto deste trabalho, apenas foram aplicados os dois modelos empíricos mais utilizados, o modelo de Langmuir e o modelo de Freundlich, pelo que apenas estes vão ser desenvolvidos com maior detalhe.

2.5.1 Modelo de Langmuir

O modelo de adsorção de Langmuir tem sido tradicionalmente utilizado para quantificar e comparar o desempenho de diferentes biossorventes. Este modelo foi originalmente desenvolvido para descrever o equilíbrio de adsorção gás-sólido de carvão activado, e só posteriormente a sua utilização foi alargada à descrição das relações de equilíbrio entre uma fase líquida e uma fase sólida (Davis *et al.*, 2003b). Este modelo, que considera a sorção como um fenómeno químico (Volesky, 2004), tem sido aplicado com sucesso a vários processos de sorção de poluentes (Ho *et al.*, 2002).

Segundo Davis *et al.* (2003b), uma representação simples do fenómeno de adsorção corresponde à migração do adsorbato (A) para uma superfície, ocupando um sítio de ligação (S) no adsorvente, dando origem a um complexo (SA), o que pode ser representado pela seguinte reacção de equilíbrio:



Assumindo que os sítios de ligação têm igual afinidade para o adsorbato, a constante de adsorção é dada por

$$K_{ads} = \frac{[SA]}{[S][A]} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{ads}^{\circ}}{RT}\right) \quad \text{eq. (2.8)}$$

A concentração máxima de sítios de ligação, S_T , é dada por:

$$[S_T] = [S] + [SA] \quad \text{eq. (2.9)}$$

Combinando as equações (2.8) e (2.9) obtém-se:

$$[SA] = [S_T] \left(\frac{K_{ads}[A]}{1 + K_{ads}[A]} \right) \quad \text{eq. (2.10)}$$

Definindo a concentração superficial como:

$$\Gamma = \frac{[SA]}{\text{Massa de adsorvente}} \quad \text{eq. (2.11)}$$

e

$$\Gamma_{max} = \frac{[S_T]}{\text{Massa de adsorvente}} \quad \text{eq. (2.12)}$$

obtém-se a equação geral do modelo de Langmuir:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \left(\frac{K_{ads}[A]}{1 + K_{ads}[A]} \right) \quad \text{eq. (2.13)}$$

O modelo de Langmuir considera que a ligação à superfície consiste basicamente em forças físicas (i.e. forças electrostáticas ou de *London-van der Waals*) (Davis *et al.*, 2003b), assumindo ainda que existe um número finito de sítios de ligação distribuídos de forma homogénea pela superfície do adsorvente, a adsorção é limitada à formação de uma monocamada e os sítios de ligação têm a mesma afinidade para a adsorção, e não há interações entre as moléculas adsorvidas (Donmez e Aksu, 2002).

No caso da biossorção pelo menos a premissa de que todos os sítios de ligação têm igual afinidade para os substratos não se verifica, na medida em vários grupos funcionais contribuem para este fenómeno, apresentando, cada um deles, uma dada afinidade para cada metal pesado. Também a estequiometria de 1:1 prevista pelo modelo não se verifica, pois na situação da troca iónica ser o mecanismo dominante, verifica-se aproximadamente a libertação de 2 prótons por ligação de um ião metálico divalente (Davis *et al.*, 2003b).

Ainda assim o modelo de Langmuir é frequentemente utilizado para ajustar os resultados experimentais, assumindo a forma:

$$q_e = q_{max} \left(\frac{bC_f}{1 + bC_f} \right) \quad \text{eq. (2.14)}$$

onde q_e é a quantidade de metal retida pelo biossorvente no equilíbrio (mg.g^{-1} ou mmol.g^{-1}), q_{max} é a capacidade máxima de acumulação (mg.g^{-1} ou mmol.g^{-1}), representando um limite prático da

capacidade de adsorção, correspondente à formação de uma monocamada que cobre a superfície do sorvente, C_f é a concentração final de metal em solução no equilíbrio (mg.L^{-1} ou mmol.L^{-1}), e b é a constante indicativa da afinidade entre a biomassa e o metal (Davis *et al.*, 2003b).

No contexto de aplicação deste modelo a sistemas de biossorção, b não pode ser considerada verdadeiramente como a constante de adsorção de Langmuir, pois os sistemas metal-biomassa não satisfazem os pressupostos assumidos para a sua aplicação nem pode ser relacionada com a energia livre de Gibbs (eq. 2.8) (Davis *et al.*, 2003b).

Segundo Kogej e Pavko (2001) a equação (2.14) também pode aparecer na forma:

$$q_e = \frac{q_{\max} C_f}{K + C_f} \quad \text{eq. (2.15),}$$

sendo K a constante de dissociação correspondente ao inverso de b .

Os parâmetros da isotérmica de Langmuir, b e q_{\max} , são úteis para avaliar quantitativamente o desempenho da biossorção e proceder à comparação directa com outros biossorventes (Holan e Volesky, 1994; Loukidou *et al.*, 2004c).

Na Figura 2.4 está representada uma isotérmica de adsorção típica.

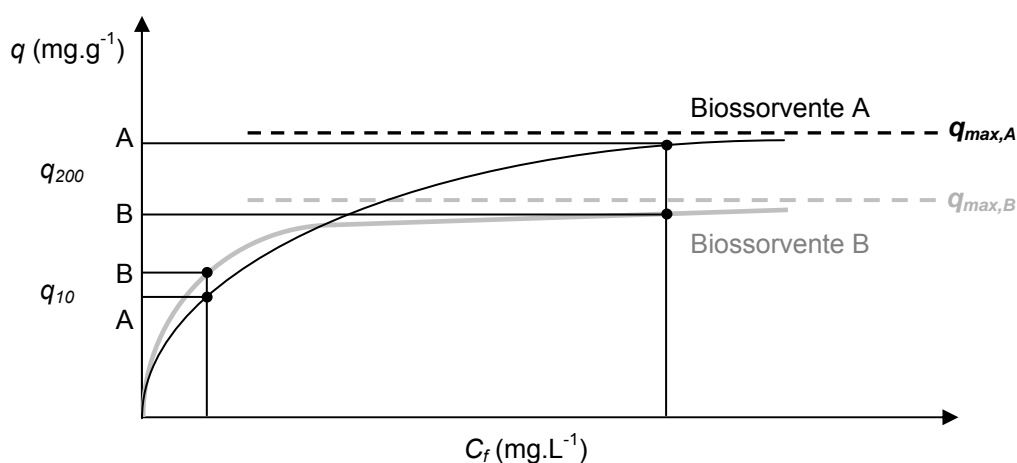


Figura 2.4 – Isotérmica típica para uma solução de um único sorbato. Adaptado de Kratochvil e Volesky (1998a) e Volesky (2004).

Os valores de b reflectem o declive inicial das isotérmicas de biossorção. Para valores de b elevados o declive inicial da isotérmica é maior, indicando uma afinidade para o metal superior. Assim, na implementação de um sistema de biossorção é desejável que a biomassa apresente valores elevados de q_{\max} e b (Davis *et al.*, 2003b). A resposta à questão “qual é o melhor biossorvente?” deve ser dada em função da concentração residual, sendo desejável considerar valores de C_f baixos (e.g. 10 mg.L^{-1}) e elevados (e.g. 200 mg.L^{-1}) (Kratochvil e Volesky, 1998a).

Pelo exemplo apresentado na Figura 2.4 é possível constatar que o bio sorvente A tem um q_{max} superior ao bio sorvente B, exibindo uma capacidade de remoção de metal mais elevada quando a concentração da solução a tratar é elevada. No entanto, na situação inversa, é o bio sorvente B, com um valor de b superior, que tem o melhor desempenho, sendo mais adequado em situações de operação a baixas concentrações de metal (Volesky, 2004).

2.5.2 Modelo de Freundlich

A isotérmica de Freundlich também tem sido utilizada para quantificar o equilíbrio de sistemas de bio sorção, determinando, tal como o modelo de Langmuir, a extensão do equilíbrio de sorção como uma função da concentração de equilíbrio do metal em solução, sem considerar o pH do meio ou a presença de outros iões em solução. Este modelo considera a sorção a superfícies heterogéneas, ou superfícies com sítios de ligação com afinidades diferentes para o adsorbato. Foi assumido que os sítios de ligação mais fortes são ocupados em primeiro lugar, e que a força de ligação diminui com o aumento do seu grau de ocupação. A isotérmica de Freundlich é definida pela seguinte equação (Davis *et al.*, 2003b):

$$q_e = K_F C_f^{1/N} \quad \text{eq. (2.16)}$$

onde K_F e N são constantes empíricas representando, respectivamente, a capacidade de ligação e a afinidade ou intensidade de ligação a metais. Para a adsorção ser favorável o valor da constante n deve ser superior a 1 (Ozer *et al.*, 2004). Segundo Volesky (2004) este modelo não traduz uma capacidade de bio sorção finita, podendo ser apenas razoavelmente interpretado na gama de concentrações baixas a intermédias.

2.6 Cinética de sorção

A cinética descreve a velocidade de remoção do soluto de solução, que por sua vez controla o tempo de residência para a acumulação do sorbato na interface sólido-líquido. Assim, é importante prever a velocidade com que o poluente é removido da solução aquosa para desenvolver sistemas de tratamento adequados (Ho e Mckay, 1999b). Os dados obtidos no estudo da cinética de sorção podem ser utilizados para determinar o tempo necessário para atingir o equilíbrio e desenvolver modelos de previsão para ensaios de coluna, e para conhecer as variáveis que influenciam o processo (Singh *et al.*, 2001). O estudo da cinética permite ainda, através da aplicação de diferentes modelos, aferir possíveis mecanismos de bio sorção (Loukidou *et al.*, 2004a). Podem usar-se modelos de transferência de massa e reacção química para o estudo do mecanismo de bio sorção e aferição do seu passo limitante, no entanto pode ser incorrecto aplicar modelos cinéticos simples, como os de primeira e segunda ordem, a sistemas de sorção com superfícies sólidas heterogéneas em que os fenómenos de transferência de massa e reacção química são frequentemente experimentalmente inseparáveis (Ho e Mckay, 1999b; Ho e Mckay, 1999a; Ozer *et al.*, 2004).

Para avaliar a aplicabilidade dos sistemas de sorção como tecnologias de controlo de poluição da água, é importante considerar o custo e a capacidade de remoção do produto, bem como a sua forma de aplicação. Nesta perspectiva, a capacidade de sorção e o tempo de contacto necessário, são dois dos parâmetros que mais importa conhecer, o que se reflecte na importância do estudo do equilíbrio de sorção e da sua cinética. Se o estudo do equilíbrio é importante para determinar a afinidade ou capacidade de um sorvente, os dados termodinâmicos apenas permitem a previsão o estado final de um sistema a partir de um estado inicial de não-equilíbrio. Assim é importante determinar de que forma a velocidade de sorção depende da concentração de sorbato em solução e de que forma é afectada pela capacidade de sorção ou pelo carácter do sorvente. A análise da cinética permite determinar a velocidade de acumulação do soluto, que por sua vez determina o tempo de residência necessário à conclusão da reacção (Ho *et al.*, 2000).

A velocidade e o mecanismo da reacção de adsorção constituem elementos essenciais à operação do processo (Ho, 2004a). Em comparação com as tecnologias tradicionais, a cinética intrínseca à biossorção é rápida, conduzindo rapidamente ao equilíbrio entre o ião metálico e o microrganismo, geralmente o equilíbrio geralmente ao fim de poucos minutos após o contacto sólido-líquido (Gavrilescu, 2004; Hatzikioseyan *et al.*, 2001). Para efeitos práticos de aplicação da biossorção, as suas elevadas velocidades de reacção são muito vantajosas uma vez que permitem a utilização de reactores de pequeno volume, com maior eficiência e menor consumo energético (Atkinson *et al.*, 1998; Loukidou *et al.*, 2004b). O padrão de adsorção geralmente observado consiste numa remoção bifásica, com um estágio inicial independente do metabolismo rápido, seguido por outro mais lento, atingindo-se o equilíbrio ao fim de alguns minutos. A concentração inicial de metal afecta significativamente a cinética. As concentrações elevadas estabelecem forças motrizes mais fortes para a transferência de massa, dando origem a cinéticas mais rápidas (Atkinson *et al.*, 1998).

A cinética de adsorção depende das interacções adsorbato-adsorvente e das condições do sistema. O mecanismo de sorção envolve frequentemente a reacção química entre os grupos funcionais do sorvente e os iões metálicos, formando complexos organo-metálicos, ou uma reacção de troca catiónica. Podem ainda estar envolvidos outros mecanismos, como os processos de transferência de massa, que podem actuar em série ou em paralelo, nomeadamente. Assim os processos de sorção podem descrever-se nas seguintes fases: i) difusão no *bulk*; ii) transferência de massa externa (difusão externa através do filme de líquido que rodeia as partículas); iii) difusão à superfície do sólido (difusão superficial); iv) difusão nos poros do sólido (difusão interna); e v) ligação ao sorvente (quimiossorção) (Brás, 2005; Ho *et al.*, 2001; Loukidou *et al.*, 2004b). Qualquer um destes passos, individualmente ou de forma combinada, pode ser o limitante do processo (Ho *et al.*, 2000).

A velocidade a que ocorrem estes mecanismos vai determinar a cinética global da sorção, sendo o processo mais lento o mais relevante (Brás, 2005), o passo limitante. Para velocidades de agitação suficientemente elevadas a fase de difusão do *bulk* pode ser desprezada. Quando a

reação química na fase sólida é rápida, e não está associada a processos de transporte na fase sólida, é o processo de transporte na fase líquida que determina a velocidade global da biossorção (Ho *et al.*, 2000), sendo as de difusão externa e difusão interna as possíveis controladoras da velocidade do processo (Gerente *et al.*, 2000). Normalmente em sólidos porosos a difusão interna é o passo limitante para a avaliação da cinética total, enquanto que em sólidos pouco porosos este fenómeno é normalmente negligenciado, sendo neste caso a difusão externa e a quimiossorção que determinam a cinética global do processo (Brás, 2005). A difusão externa também desempenha um papel importante, que depende do regime hidráulico do reactor (Kefala *et al.*, 1999; Volesky e Holan, 1995). Quando se utiliza biomassa em suspensão num sistema bem agitado, todas as paredes celulares estão facilmente acessíveis para a acumulação do metal, pelo que o efeito da difusão externa pode ser assumido como pouco significativo e desprezado (Aksu, 2001; Aksu, 2002).

Uma vez que o mecanismo de sorção depende da interação sorbato-sorvente e das condições do sistema, não é possível prever o seu comportamento através do tipo de soluto envolvido (Ho *et al.*, 2000). Segundo Ho e McKay (1999b) o apuramento do mecanismo cinético que descreve o sistema que pode ser realizado por experimentação. Os requisitos são o conhecimento de: i) todos os detalhes da reação, incluindo a energética e a estereoquímica; ii) distâncias interatómicas e ângulos no decorrer da reação; e iii) os passos moleculares individuais envolvidos no mecanismo.

Têm sido desenvolvidos modelos de vários graus de complexidade para descrever a cinética da biossorção de metais em sistemas fechados (Loukidou *et al.*, 2004c). Uma vez que tanto a difusão intraparticular, como a transferência de massa externa ou as reações químicas de ligação podem fazer parte dos passos limitantes do processo (Sag e Aktay, 2002), estes podem dividir-se em modelos consideram como passo limitante da cinética de biossorção uma reação química ou a difusão, sendo utilizados para analisar qual destes mecanismos controla o processo de biossorção (Vilar *et al.*, 2007).

2.6.1 Modelos de sorção-reação

2.6.1.1 Modelo de Lagergren – reação de pseudo-primeira ordem

A equação cinética de Lagergren, desenvolvida em 1898 para a adsorção de ácido oxálico e ácido malónico a carvão, foi a primeira a ser desenvolvida para sistemas de sorção de sistemas líquido/sólido tendo por base a capacidade de sorção do sorvente e tem sido desde então largamente aplicada a variados sistemas de adsorção tanto a carvão activado como biomateriais (Ho, 2004a; Ho e McKay, 1999b; Ho e McKay, 1999a; Ozer *et al.*, 2004).

A equação apresentada por Lagergren, também conhecida por cinética de pseudo-primeira ordem (Ho e McKay, 1999b), é:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad \text{eq. (2.17)}$$

onde q_e e q_t ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) representam, respectivamente, a quantidade de soluto retido no equilíbrio e para o tempo t ; k_1 (min^{-1}) representa a constante de adsorção de pseudo-primeira ordem. Este modelo assume que a cobertura inicial da superfície do sorvente é nula (Martins, 2004).

Integrando a eq (2.17) entre as condições fronteira para t e q_t : (0,0) e (t,q_t) obtém-se:

$$\ln\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = k_1 t \quad \text{eq. (2.18)}$$

A equação (2.18) pode ser linearizada:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2,303} t \quad \text{eq. (2.19)}$$

Da aplicação da equação (2.19) aos dados experimentais verificam-se as seguintes diferenças relativamente a uma cinética de primeira ordem: i) o parâmetro q_e não representa o número de sítios de ligação disponíveis; e ii) $\log(q_e)$ é um parâmetros de ajuste e nem sempre corresponde à ordenada na origem do gráfico $\log(q_e - q_t)$ vs. t , ao contrário do que aconteceria numa cinética de primeira ordem (Ho *et al.*, 2000; Ho e Mckay, 1999a; Sag e Aktay, 2002).

Para ajustar a equação (2.19) aos resultados experimentais é necessário conhecer a capacidade de sorção no equilíbrio, q_e , que pode ser obtida a partir do modelo de Langmuir. No entanto em muitas situações o valor real deste parâmetro é desconhecido porque o processo de quimiossorção tende a ficar desmesuradamente lento, sendo a quantidade sorvida significativamente menor à quantidade do equilíbrio. Assim, torna-se necessário arranjar uma forma de estimar a capacidade de acumulação de metal no equilíbrio por extrapolação dos valores experimentais para $t = \infty$, ou tratar q_e com o um parâmetro ajustável para ser determinado por tentativa erro (Aksu, 2001; Ho *et al.*, 2000; Ho e Mckay, 1999a).

Os resultados da capacidade de sorção no equilíbrio, q_e , usando o método de tentativa-erro podem diferir dos determinados pela ordenada na origem da equação (2.19). Uma explicação para as diferenças entre os valores de q_e experimentais e teóricos é que existe um desfaseamento temporal, difícil de quantificar, possivelmente devido ao controlo da camada limite ou da resistência externa no início da sorção.

Ho e Mckay (1999a) sugerem a introdução de uma constante de tempo, t_0 , para melhorar a aplicabilidade do modelo:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2,303} (t + t_0) \quad \text{eq. (2.20)}$$

com t_0 a representar um parâmetro ajustável que torna q_e adequado para utilizar na equação de cinética. O seu valor pode ser calculado pela ordenada na origem obtida através da regressão linear da equação (2.20).

Outra desvantagem deste modelo é o facto de, em algumas situações, não ajustar bem os resultados para toda a gama de tempo de contacto, só se verificando a linearidade do ajuste para os primeiros 20-30 min de ensaio (Aksu, 2001; Ho e Mckay, 1999a; Sag e Aktay, 2002).

2.6.1.2 Modelo de pseudo-segunda ordem

No desenvolvimento do modelo de pseudo-segunda ordem assume-se que os mecanismos envolvidos na remoção de metal são basicamente a complexação e a troca iónica. Estas reacções são influenciadas pela quantidade de metal na superfície no adsorvente e pela quantidade de metal adsorvida no equilíbrio, o que significa que a taxa da reacção é directamente proporcional ao número de sítios de ligação da superfície de adsorvente (Ozer *et al.*, 2004), baseando-se na capacidade de sorção da fase sólida (Aksu, 2001). A expressão da cinética de pseudo-segunda ordem a seguir apresentada traduz a forma como a velocidade da reacção depende da capacidade de sorção no equilíbrio, mas não da concentração de sorbato (Ho, 2004b).

Segundo Ho *et al.* (2000) a velocidade de um processo de sorção química de pseudo-segunda ordem é dada pela equação (2.21):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad \text{eq. (2.21)}$$

onde q_e representa a quantidade de metal sorvida no equilíbrio (mg.g^{-1}), q_t a quantidade sorvida no tempo t (mg.g^{-1}), e k_2 a constante de sorção de pseudo-segunda ordem ($\text{g. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Integrando a eq. (2.21) assumindo como condições fronteira: $t = 0$ a $t = t$, e de $q_t = 0$ a $q_t = q_t$ obtém-se:

$$\frac{1}{q_e - q_t} = \frac{1}{q_e} + k_2 t \quad \text{eq. (2.22)}$$

Rearranjando a equação (2.22):

$$q_t = \frac{t}{\frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}} \quad \text{eq. (2.23)}$$

Que por sua vez pode ser rearranjada para a forma linear:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad \text{eq. (2.24)}$$

A velocidade inicial de sorção, h , definida quando $t \rightarrow 0$, é dada por:

$$h = k_2 q_e^2 \quad \text{eq. (2.25)}$$

Podendo a equação (2.24) passar a representar-se por:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_e} t \quad \text{eq. (2.26)}$$

Assim, a representação gráfica de t/q_t vs. t deve dar uma relação linear de declive $1/q_e$ e ordenada na origem $1/h$ ou $1/(k_2 q_e^2)$ (Ho e McKay, 2004), permitindo calcular simultaneamente a capacidade de sorção no equilíbrio, a constante de reacção de pseudo-segunda ordem e a velocidade de sorção inicial sem haver necessidade de conhecimento prévio de nenhum dos

parâmetros (Ho *et al.*, 2001; Ho, 2004b). Os valores de k_2 podem ser interpretados como uma medida do coeficiente de difusão interna (Vasudevan *et al.*, 2003).

Segundo Aksu (2001), este modelo, ao contrário do de cinética de pseudo-primeira ordem, prevê o comportamento para toda a gama de tempo de contacto.

2.6.1.3 Modelo de Elovich

De acordo com Ho e Mckay (2004) o modelo de Elovich foi desenvolvido para descrever a quimiossorção de gases a sólidos, sendo a sua forma diferencial descrita pela equação (2.27):

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha \exp(-\beta q_t) \quad \text{eq. (2.27)}$$

Nesta equação α e β são constantes, sendo que α representa a velocidade de quimiossorção inicial, para a cobertura da superfície do adsorvente nula (quando $q_t \rightarrow 0$, $dq_t/dt \rightarrow \alpha$), e β está relacionado com a extensão de cobertura da superfície e a energia de activação da quimiossorção.

Integrando a equação (2.27), assumindo como condições fronteira $q_t = 0$ quando $t = 0$, e $q_t = q_t$ quando $t = t$:

$$q_t = (1/\beta) \ln(1 + \alpha\beta t) \quad \text{eq. (2.28)}$$

Estes autores apresentam ainda uma equação simplificada, assumindo que $\alpha\beta t \gg 1$:

$$q_t = (1/\beta) \ln(\alpha\beta) + (1/\beta) \ln(t) \quad \text{eq. (2.29)}$$

A equação (2.29) é a equação de uma recta, pelo que representando q_t vs. t podem calcular-se os valores das constantes α e β pelo declive e ordenada na origem.

2.6.2 Modelos cinéticos baseados na difusão

2.6.2.1 Difusão externa

A equação apresentada por Ho *et al.* (2000) para um modelo de difusão externa é:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \left(\frac{R}{2,303}\right)t \quad \text{eq (2.30)}$$

Esta equação é idêntica à equação (2.19) apresentada para o modelo de pseudo-primeira ordem, o que significa que é difícil distinguir entre um controlo da cinética ditado por difusão externa de uma cinética de pseudo-primeira ordem. No entanto, quando se realizam ensaios a diferentes velocidades de agitação, estes autores afirmam que os processos controlados pela difusão externa têm uma maior dependência da agitação, verificando-se que nos ensaios realizados com agitação a difusão externa geralmente só é o passo limitante durante os primeiros minutos.

Quando se utiliza um sistema de células livres em suspensão num sistema bem agitado, todos os sítios de ligação da parede celular estão disponíveis para a biossorção o efeito de difusão no filme externo pode ser considerado pouco significativo e desprezado (Donmez e Aksu, 2002).

2.6.2.2 Difusão interparticular

Segundo Ho *et al.* (2000) uma das equações de sorção de um soluto a partir de um líquido mais utilizadas é a desenvolvida por McKay e Allen:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_i} - \frac{1}{1+X_sK}\right) = \ln\left(\frac{X_sK}{1+X_sK}\right) - \frac{1+X_sK}{X_sK} \beta_1 S_s t \quad \text{eq. (2.31)}$$

Aqui C_t é a concentração de soluto no instante t (mg.L^{-1}), C_i é a concentração inicial de soluto (mg.L^{-1}), K é a constante do modelo de Langmuir, X_s é a concentração de adsorvente na fase líquida (g.L^{-1}), β_1 é o coeficiente de transferência de massa (cm.s^{-1}) e S_s é a área superficial da partícula para a transferência de massa ($\text{cm}^2.\text{cm}^{-3}$), que por sua vez é calculada por:

$$S_s = \frac{\delta X_s}{d_p \rho_p (1 - \varepsilon_p)} \quad \text{eq. (2.32)}$$

onde d_p é o diâmetro da partícula (cm), ρ_p é a massa específica do adsorvente (g.cm^{-3}), e ε_p é a porosidade das partículas de adsorvente. A partir do ajuste dos dados experimentais à equação (2.31) é possível calcular o valor do coeficiente de transferência de massa a partir do declive da recta (Martins, 2004).

2.6.2.3 Difusão intraparticular

Um modelo de difusão intraparticular simples de aplicar é o de Weber e Morris (1962), citado por Wu *et al.* (2001), segundo o qual a aproximação ao equilíbrio varia de acordo com a função $(Dt/r^2)^{1/2}$, onde r é o raio da partícula e D a difusividade do soluto na partícula. Esta função permite o cálculo da constante inicial de difusão intraparticular por linearização da curva $q_t = f(t^{1/2})$. De acordo com Ho *et al.* (2000) este é um dos modelos de difusão intraparticular mais utilizados, e se este fenómeno for o passo limitante que determina a velocidade da sorção, a representação da quantidade de sorbato adsorvido, q_t , em função da raiz quadrada do tempo de sorção dará uma linha recta que passa na origem, cujo declive, k_d , é constante de difusão intraparticular ($\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$):

$$q_t = k_d t^{1/2} \quad \text{eq. (2.33)}$$

O gráfico de q_t vs. $t^{1/2}$ pode apresentar multi-linearidade, indicando que estão envolvidos dois ou mais fenómenos. A primeira porção da curva, de maior declive, corresponde à fase de sorção superficial externa, a segunda é a fase de sorção gradual, onde a difusão intraparticular é que controla o processo, e a terceira, é a fase final de equilíbrio onde a difusão intraparticular começa

a abrandar devido à baixa concentração de soluto em solução. Comparando as três constantes (k_{d1} , k_{d2} e k_{d3}) é possível verificar que $k_{d1} > k_{d2} > k_{d3}$ (Gulnaz *et al.*, 2005).

A difusão intraparticular é o passo limitante em vários processos de biossorção, como a sorção de cobre à levedura unicelular *S. cerevisiae* (Ho *et al.*, 2000). Também Loukidou *et al.* (2004a) e (2004b) consideraram, respectivamente, o mecanismo biossorção de Cr(VI) e Cd(II) a *Aeromonas caviae* como sendo controlado pela difusão intraparticular através da realização de dessorção com a biomassa carregada de metal. Verificaram que a dessorção com HCl 0,1 M e EDTA 0,1 M não foi instantânea, ainda que as condições fossem favoráveis, atribuindo este facto a um processo de contra-difusão de uma porção do metal originalmente sorvido nos sítios internos da biomassa porosa.

No caso de uma partícula de biomassa não porosa, o transporte de soluto dentro da partícula pode ser negligenciado assumindo-se que a biossorção ocorre principalmente à superfície da partícula (parede celular), Esta ideia pode ser estendida a casos de macroporos grandes onde os iões metálicos têm acesso imediato para reagir com os sítios de ligação da superfície interna (Loukidou *et al.*, 2004b).

2.6.3 Escolha do modelo cinético

Dada a diversidade de modelos cinéticos que se podem aplicar, não é indicado optar por escolher um modelo para testar no sistema de sorção em questão. O modelo escolhido deve ser consistente com o mecanismo proposto, ainda que a identificação de um potencial mecanismo não é suficiente, por si só, para definir o passo limitante que define a velocidade global de sorção. Um factor que pode contribuir para complicar este processo é que o passo limitante pode ir variando ao longo do processo de sorção, *e.g.* inicialmente o processo é controlado pela difusão externa, passando depois a ser controlado pela quimiossorção, que após algum tempo pode dar origem a um processo controlado pela difusão interna. Assim, a identificação do modelo correcto envolve a selecção e teste de vários modelos e sistemas de variáveis na gama completa de sorção, desde $t = 0$ até ser atingida a saturação do sorvente (Ho *et al.*, 2000).

De acordo com estes autores em primeiro lugar deve ser realizada uma pesquisa sobre o sistema sorbato-sorvente para tentar encontrar informação sobre o mecanismo de sorção envolvido, procurando indicações sobre a existência de grupos funcionais no sorvente que possam envolver-se em reacções químicas, *e.g.* grupos ácidos podem providenciar sítios de troca iónica ou grupos amino que podem fornecer pares de electrões para formar ligações covalentes com metais (quelação).

Por fim deve tentar diferenciar-se entre um processo controlado pela quimiossorção ou pela difusão, sendo esta distinção difícil de caracterizar. Geralmente pode afirmar-se que quando um processo atinge o equilíbrio ao fim de 3 h, é controlado pela reacção química, mas se o equilíbrio ocorrer após 24 h, o processo é controlado por difusão. Pode ainda acontecer que apenas um dos processos, ou ambos, constitua o passo limitante no período de 3 h ou 24 h. Ho *et al.* (2000)

indicam algumas linhas de orientação para conseguir esta distinção: i) o facto de as variações no pH terem maior efeito nos processos de sorção controlados por reacções; ii) um bom ajuste da equação (2.33) aos resultados experimentais dá indicação que o processo é controlado por difusão intraparticular, sendo no entanto necessária a confirmação do mecanismo através da análise do efeito das variáveis do sistema em k_d , e.g. nos sistemas controlados pela difusão k_d varia linearmente com o inverso do diâmetro das partículas e da espessura do filme, e o produto de k_d pela massa de sorvente deve variar linearmente com a massa de sorvente. As equações teóricas para a difusão intraparticular indicam que os valores de k_d variam com a raiz quadrada da concentração. Se, pelo contrário, a velocidade do processo for controlada quimicamente, a constante da equação vai ser independente do diâmetro das partículas e do caudal, dependendo apenas da concentração dos iões em solução e da temperatura (Ho e McKay, 1999b); iii) calcular a energia de sorção (equação 2.34) realizando estudos a diferentes temperaturas: a velocidade da sorção controlada por reacção aumenta mais rapidamente com a temperatura do que as dos processos por difusão. Para processos controlados por difusão a energia de sorção é geralmente inferior a 23-30 kJ.mol⁻¹; em processos controlados pela reacção, a energia de sorção é geralmente superior a 25-30 kJ.mol⁻¹.

2.7 Energia de activação da biossorção

A energia de activação da biossorção pode ser determinada através da equação de Arrhenius, se verificar uma relação linear entre a constante de velocidade e a temperatura (Aksu, 2001):

$$k = A_0 \exp\left(\frac{-E_A}{RT}\right) \quad \text{eq. (2.34)}$$

Aqui A_0 é o factor de frequência independente da temperatura (min⁻¹), E_A a energia de activação (kJ.mol⁻¹), R a constante dos gases ideais (8,314 kJ.mol⁻¹.K⁻¹) e T a temperatura da solução (K). Traçando $\ln k$ vs. $1/T$ obtém-se uma linha recta de declive ($-E_A/R$) (Aksu, 2002).

A magnitude da energia de activação pode dar uma ideia acerca do tipo de sorção que ocorre: química ou física. Na adsorção física o equilíbrio é atingido rapidamente e é reversível porque as necessidades de energia são baixas, geralmente os valores de energia de activação são inferiores a 4,2 kJ.mol⁻¹ pois as forças envolvidas são fracas. A adsorção química é específica e envolve forças mais fortes do que a adsorção física. Assim, a energia de activação da adsorção química é da mesma magnitude do calor das reacções químicas, entre 21 a 420 kJ.mol⁻¹. A adsorção química pode, por sua vez, dividir-se em dois tipos: activada e não activada (menos frequente). Uma adsorção química activada significa que a taxa varia com a temperatura de acordo com uma energia de activação finita (entre 8,4 e 83,7 kJ.mol⁻¹), enquanto que na adsorção química não activada a quimiossorção ocorre muito rapidamente, sugerindo que a energia de activação é próxima de zero (Aksu, 2002; Ozer *et al.*, 2004).

Utilizando as constantes cinéticas do modelo de pseudo-segunda ordem Ozer *et al.* (2004) calcularam a energia de activação da biossorção de Cu(II) a *Cladophora crispata* para duas

zonas do gráfico k_2 vs. $1/T$: a primeira zona, até aos 25 °C, corresponde a uma linha recta de declive negativo com energia de activação de 51,5 kJ.mol⁻¹; e a segunda zona, na gama de temperatura entre 25-50 °C, a energia de activação calculada foi de -35 kJ.mol⁻¹. Até os 25 °C verifica-se um aumento da bioissorção de Cu²⁺ com o aumento da temperatura, a partir desse valor de T o processo de bioissorção é exotérmico.

2.8 Dessorção

Para aplicar, com sucesso, a tecnologia de bioissorção ao tratamento de águas residuais, deve ser investigada a recuperação dos iões metálicos adsorvidos e a reciclagem e reutilização da biomassa para um novo ciclo de sorção (Aldor *et al.*, 1995). É desejável que os iões metálicos possam ser recuperados através de um ciclo de dessorção, numa solução concentrada, bem como regenerar o bioissorvente sem que ocorra a destruição da integridade das paredes celulares, e logo dos sítios de ligação da superfície celular, para que possa ser utilizado em sucessivos ciclos de sorção-dessorção (Atkinson *et al.*, 1998; Volesky, 2001; Yu e Kaewsarn, 2001). Esta abordagem permite a combinação da remoção e recuperação dos metais das águas contaminadas, com a obtenção simultânea de dois produtos valorizados: a água tratada e o metal aptos a serem reutilizados (Butter *et al.*, 1998b). Simultaneamente, do ponto de vista económico, esta estratégia diminui os custos de tratamento de resíduos carregados com metais, tornando o processo economicamente mais eficiente, contribuindo para aumentar as vantagens dos produtores de bioissorventes (Bux *et al.*, 1995).

Se um bioissorvente for abundante e tiver baixo custo, como a biomassa residual de processos de fermentação, as lamas activadas resultantes do tratamento biológico de águas residuais ou as algas marinhas, e o seu custo de transporte for reduzido, a sua recuperação não é considerada importante e os metais podem ser separados recorrendo a técnicas destrutivas como a incineração, que dará origem a cinzas com uma elevada concentração de metal, ou a exposição a ácidos e bases fortes. No entanto, estas técnicas destrutivas contribuem para aumentar o custo de deposição das lamas (Atkinson *et al.*, 1998; Volesky, 1987).

A dessorção dos metais pesados pode ser realizada utilizando vários agentes de eluição que actuam segundo diferentes mecanismos para libertar os metais imobilizados para a solução (Aldor *et al.*, 1995; Yu e Kaewsarn, 2001). Na selecção do eluente é importante considerar uma elevada eficiência, um custo e toxicidade reduzidos, e uma capacidade de recuperação não destrutiva de forma a assegurar a regeneração da biomassa e permitir a sua reutilização em sucessivos ciclos de sorção-dessorção, o que pode passar por utilizar soluções diluídas (Aldor *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2000). Paralelamente também é importante que o eluente potencie a obtenção de um elevado factor de pré-concentração, pelo que o volume da solução de eluente a utilizar também deve ser o mais baixo possível (Bag *et al.*, 2000). A recuperação do metal a partir da corrente de eluente é geralmente considerada como uma operação independente do processo de sorção, realizada numa instalação diferente por processos e

operações distintos (Volesky, 2001). O eluente concentrado pode ser tratado por co-precipitação, floculação, gerando-se nestes casos uma lama tóxica, ou por electrodeposição o que permite recuperar o metal na forma sólida o que é mais desejável (Davis *et al.*, 2003b).

O deslocamento do equilíbrio de biossorção no sentido inverso pode ser alcançado com vários produtos químicos, nomeadamente: i) ácidos, dos quais se destacam o ácido clorídrico, o ácido nítrico, e o ácido sulfúrico, referidos como tendo a capacidade de reprimir a acumulação independente do metabolismo e a acumulação intracelular, podendo ser agentes de dessorção eficazes; ii) bases; iii) agentes complexantes orgânicos, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que podem ser eluentes eficientes e aparentemente não têm efeitos adversos na biomassa; e iv) sais como o cloreto de cálcio, o carbonato e o bicarbonato de sódio ou potássio. (Gadd, 1990; Palmieri *et al.*, 2002; Yu e Kaewsarn, 2001). Da mesma forma que se verificam diferenças na afinidade na ligação dos metais ao sítio de ligação predominante na biomassa nas condições do ensaio, traduzindo-se numa certa selectividade do biossorvente para a acumulação dos metais, pode verificar-se a existência de selectividade na fase de dessorção, o que pode revelar-se vantajoso se for desejável a separação e isolamento dos metais (Volesky, 2001).

Um indicador importante da eficácia do processo de sorção é sua a capacidade global de concentrar o metal, o que é avaliado através de um parâmetro designado por razão de concentração (*RC*) (Aldor *et al.*, 1995; Volesky, 2001), avaliado pela razão entre a concentração de metal na corrente de eluição e a concentração da corrente de entrada (Davis *et al.*, 2003b). Quanto mais elevado for *RC* melhor será o desempenho do processo de sorção, tornando a recuperação do metal mais viável ao ficar concentrado num pequeno volume de solução eluente (Volesky, 2001), o que permite ainda a redução do volume de resíduos gerados, pela aplicação de ciclos sucessivos de sorção-dessorção (Davis *et al.*, 2003b).

Outro parâmetro importante da dessorção é a razão sólido-líquido, *S/L* (g.L^{-1}), correspondendo à razão entre a massa de biossorvente carregado de metal (*g*) e o volume de eluente utilizado (*L*). Para uma mesma quantidade de biomassa carregada e eficiência de dessorção, uma maior razão *S/L* dá origem a um eluato mais concentrado em metal. No entanto, sendo a biossorção um processo reversível, uma elevada concentração de metal libertado para a solução pode diminuir a eficiência da dessorção uma vez que quando se estabelece o novo estado de equilíbrio permanece algum metal residual ainda ligado à biomassa. Para a dessorção ser eficiente é necessário otimizar a razão *S/L*, para obter uma elevada extracção de metal da biomassa e um eluato de elevada concentração (Aldor *et al.*, 1995).

Wilhelmi e Duncan (1996) testaram a dessorção de Cu(II) de *S. cerevisiae* imobilizada em gel de poliácridamida com H_2SO_4 , HCl, HNO_3 , CaHCO_3 , Ca_2CO_3 , KCl, e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, verificando que os ácidos minerais foram os mais eficientes. Verificaram ainda que o tratamento com NaOH utilizado para neutralizar o biossorvente após a eluição aumentou a capacidade de ligação da biomassa ao cobre. Em oito ciclos de adsorção-dessorção a remoção de Cu^{2+} aumentou de 65 % no primeiro ciclo para valores entre 70 a 85 % nos últimos ciclos. A recuperação de metal, utilizando HCl para reduzir o pH a 2, foi em média superior a 85 %, e pela observação de preparações de

biomassa por microscopia electrónica de transmissão (TEM), não se observaram danos nas células sujeitas a estes ciclos. Os autores referem que os ensaios de sorção-dessorção com biomassa em suspensão não tiveram sucesso devido às elevadas perdas de biomassa entre cada ciclo, o que não se verificou com a biomassa imobilizada.

A recuperação de Cu de *Pseudomonas putida* imobilizada em gel de poliacrilamida foi de 94 % usando HCl 0,1 M e 94 % usando EDTA 0,1 M. Em cinco ciclos de sorção-dessorção com HCl 0,1 M não se verificaram alterações na capacidade de remoção de metal pelo biossorvente, e a recuperação foi sempre superior a 90 % (Wong *et al.*, 1993).

2.9 Sistemas de biossorção em contínuo

2.9.1 Configuração do sistema

Os ensaios dinâmicos são, a par dos ensaios de equilíbrio, fundamentais para a modelação matemática dos sistemas de biossorção. Estes ensaios envolvem a análise simultânea do comportamento do equilíbrio de sorção, das propriedades do fluxo do líquido e da transferência de massa, e, em sistemas como os representados na Figura 2.5 a), da forma como a zona de saturação do sorvente evolui no tempo e no espaço, ao longo da coluna (Volesky, 2001).

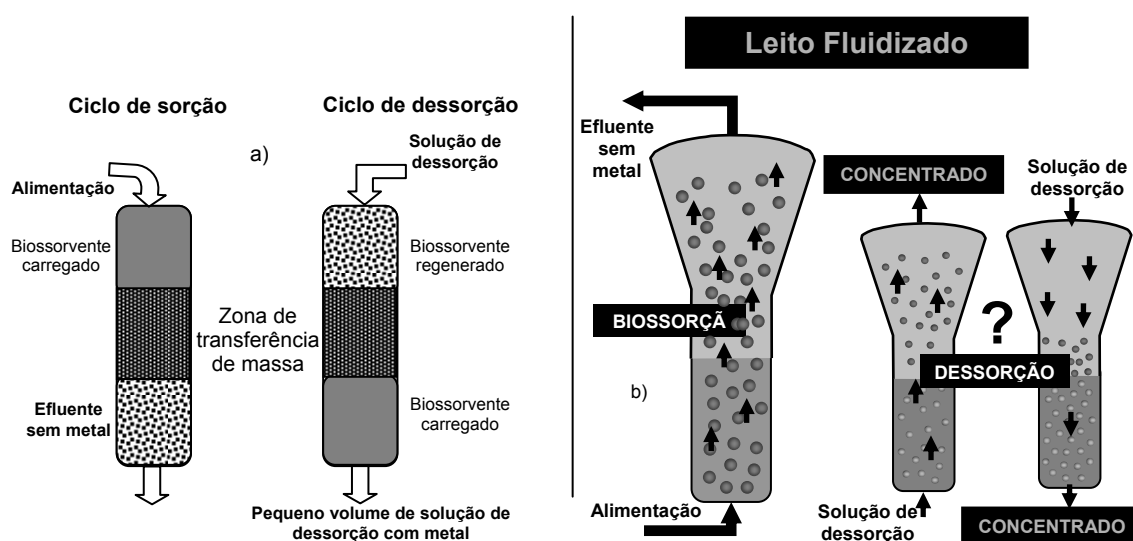


Figura 2.5 – Diagrama esquemático para a implementação de um sistema de biossorção a) colunas de leito fixo, adaptado de Davis *et al.* (2003b); b) reactor de leito fluidizado, adaptado de Volesky (2001).

Os processos de separação que envolvem a adsorção-dessorção são, por motivos inerentes à sua eficiência, preferencialmente realizados em reactores de leito empacotado, em que o leito fica gradualmente saturado, desde o ponto de alimentação até à saída. A vantagem destes sistemas é a obtenção da maior densidade de sorvente possível, resultando numa elevada

produtividade volumétrica. Esta configuração, considerada a óptima para este tipo de processos, é a geralmente utilizada para a biossorção de metais com novos materiais biossorventes (Sag, 2001; Volesky *et al.*, 2003). Considerando um reactor contínuo perfeitamente agitado, em que há mistura completa do seu conteúdo, a composição da saída reflecte exactamente a do seu interior. Isto traduz-se na existência de uma diferença de concentração, que resulta como força motriz para o processo de sorção, muito pequena. De uma forma geral este tipo de reactor não será a escolha adequada para um processo de sorção, a não ser que se organizem vários em série. No entanto, algumas particularidades tecnológicas de um dado processo podem justificar a sua opção, como no caso de suspensões que não podem ser tratadas em colunas de leito empacotado pelo risco de obstrução. A estimativa do desempenho destes sistemas torna-se especialmente desafiadora devido à complexidade da dinâmica do seu fluxo (Volesky, 2001).

2.9.2 Avaliação do desempenho dos sistemas de biossorção

2.9.2.1 Colunas de leito fixo

O desempenho de colunas de sorção de leito fixo é avaliado pela análise das curvas obtidas da representação da concentração de metal no seu efluente em função do tempo de operação. Estas curvas assumem a designação curvas de *breakthrough* (Figura 2.6) para a fase de adsorção, e curvas de eluição para a fase de dessorção (Volesky *et al.*, 2003). O tempo que decorre até ao aparecimento do ponto de *breakthrough*, e a forma da curva obtida, são características muito importantes para determinar a operação e a resposta dinâmica da coluna de biossorção (Hatzikioseyan *et al.*, 2001).

As curvas de *breakthrough* mostram o comportamento da remoção do metal, sendo representadas como a concentração de metal adsorvido (C_{ads}), concentração de metal à entrada (C_i), concentração de metal à saída da coluna (C_t) ou a concentração normalizada (C_t/C_i) em função do tempo de operação ou do volume de solução tratado, para uma dada altura de leito (Malkoc e Nuhoglu, 2006). O ponto de *breakthrough* define-se como o tempo (t_b) em que o sorbato aparece na corrente efluente da coluna a uma concentração pré-definida. O tempo t_e corresponde ao tempo ao fim do qual todo o leito da coluna fica saturado pelo sorbato e a sua concentração na corrente eluente iguala a da corrente afluyente, perdendo-se a eficiência da coluna (Volesky *et al.*, 2003). Na prática, quando se opera uma coluna única, a alimentação da coluna é interrompida quando se atinge o ponto de *breakthrough* definido. Para sistemas com múltiplas colunas operando em série a carga das colunas é mantida até ao ponto de saturação. A variação do ponto de *breakpoint* e de saturação com as variáveis de operação como o caudal de entrada tem grande interesse prático (Chu, 2004).

No decurso do ensaio a zona de estado estacionário move-se ao longo da coluna, deslocando a zona onde ocorre a sorção à sua frente (Volesky, 2001). A posição da curva ao longo do eixo do volume depende da capacidade da coluna relativamente à concentração da alimentação, o que é definido pelo equilíbrio (Sag, 2001). A forma da curva é determinada pela forma da curva da

isotérmica de equilíbrio e é influenciada pelos processos de transporte de massa na coluna e no adsorvente. As razões pelas quais, nas curvas de *breakthrough* reais, a zona de transferência de massa aparece com a forma de “S” prendem-se com o mecanismo de adsorção e as condições de transferência de massa. O desempenho de adsorção mais eficiente corresponde à forma da curva de *breakthrough* o mais abrupta possível (Chu, 2004; Volesky *et al.*, 2003).

O intervalo de tempo entre t_b e t_e (Δt) corresponde ao comprimento da zona de transferência de massa do leito (zona de sorção) (Volesky *et al.*, 2003). Estes autores referem que o comprimento desta zona pode ser avaliado segundo uma expressão sugerida por Ruthven:

$$L_m = L \left(1 - \frac{t_b}{t_e} \right) \quad \text{eq. (2.35)}$$

onde L é o comprimento total do leito de sorção e L_m é o comprimento da zona de sorção (m), também designado por comprimento do leito mínimo ou crítico. Este parâmetro indica o comprimento do leito mínimo necessário para obter o tempo de *breakthrough*, t_b , a $t = 0$.

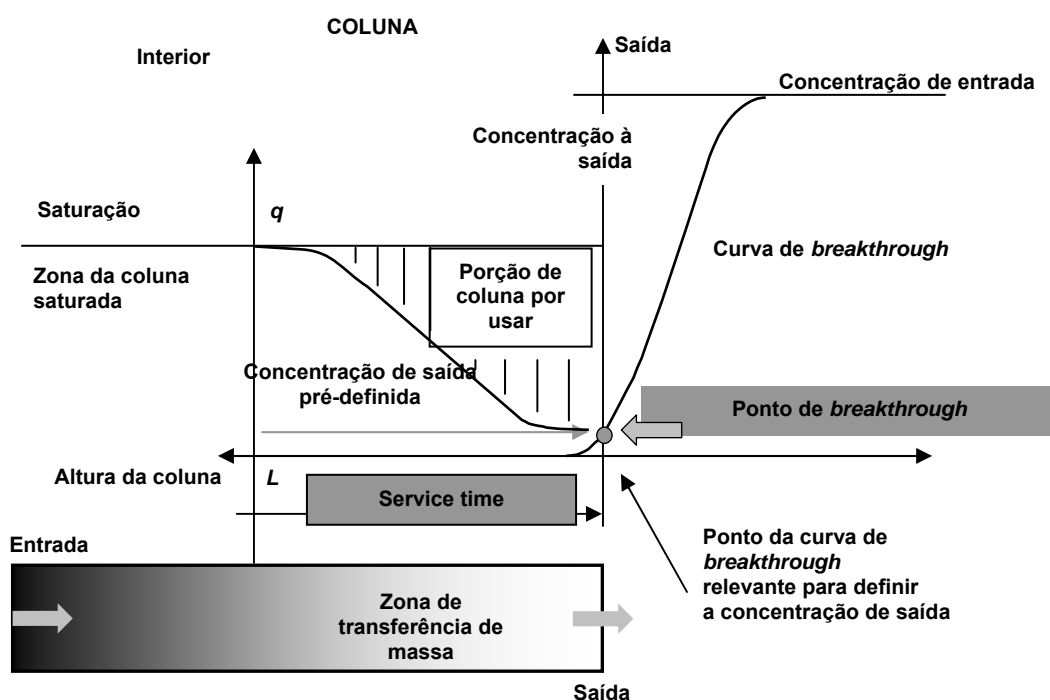


Figura 2.6 – Curva de *breakthrough* obtida numa coluna de leito fixo. Adaptado de Kratochvil e Volesky (1998a).

A falta de informação sobre a biossorção em colunas deve-se em parte ao facto de a remoção de metais pelos biossorventes ainda não ser completamente conhecida e porque a maior parte dos biomateriais utilizados como biossorventes precisam de ser imobilizados, granulados ou processados antes de serem aplicados à coluna. A aplicação da modelação aos processos de biossorção teve um grande impulso a partir de meados dos anos 90 do século passado, após o

desenvolvimento de um modelo para colunas de troca iónica de leito fixo por Tan e Spinner em 1994. Os modelos utilizados até então eram os aplicados à adsorção a carvão activado. (Kratochvil *et al.*, 1997).

Uma das abordagens à análise do desempenho de colunas de biossorção tem sido pela aplicação do modelo de sorção de Bohart-Adams, desenvolvido para aplicações a carvão activado granular (CAG). Este modelo assume que a taxa de adsorção é proporcional à capacidade residual do CAG e à concentração das espécies sorventes. O desempenho da coluna é avaliado representando graficamente o tempo de operação em função da profundidade do leito para diferentes caudais de entrada e comprimentos do leito (Kratochvil e Volesky, 1998a). De acordo com estes autores, ainda que a metodologia dos ensaios à escala piloto e a avaliação dos seus resultados seja útil para o dimensionamento de colunas, não deve ser utilizado este modelo para interpretar os resultados experimentais obtidos pois a sua validade é restrita às condições utilizadas nos ensaios piloto. O modelo assume a presença de apenas uma espécie contaminante, não permite a previsão do desempenho da coluna para alterações de pH, forma iónica do biossorvente e composição da corrente de alimentação.

Posteriormente foi desenvolvido um modelo para a avaliação de desempenho de processos de troca iónica de sistemas multi-componente em colunas – ECM (*Equilibrium Column Model*), que permite prever a taxa mínima de utilização do biossorvente ($\text{kg biossorvente.L}^{-1}$ de solução tratada), a ordem de eluição dos iões da coluna e a ocorrência de saturação. A utilização do modelo é simples, bastando conhecer as constantes de equilíbrio das espécies envolvidas, no entanto assume que a resistência à transferência de massa da difusão dos iões da solução para e o sorvente e *vice-versa* é desprezável, o que nunca se verifica nos sistemas reais, daí não ser capaz de prever com exactidão o tempo de operação da coluna (Kratochvil e Volesky, 1998a).

Um modelo mais completo, que inclui as limitações da transferência de massa é o modelo MTM (*Mass Transfer Model*), possibilitando a previsão das curvas de *breakthrough* do sistema e as curvas de eluição da fase de regeneração da coluna. Para resolver as equações deste modelo é necessária uma aplicação informática específica, e conhecer os coeficientes de transferência de massa de todas as espécies. A maior vantagem deste modelo é que permite simular e prever o desempenho da coluna em várias condições, incluindo caudais de entrada, composição da alimentação, tamanho da coluna, porosidade do leito e formas iónicas do biossorvente. Desta forma constitui uma ferramenta de engenharia para a realização do *scale up* dos processos de biossorção, permitindo a selecção das condições a utilizar em ensaios piloto e a simular os resultados do processo final com base nos resultados destes ensaios (Kratochvil e Volesky, 1998a).

Segundo Hatzikioseyan *et al.* (2001) também tem sido largamente aplicada ao estudo do desempenho de colunas de biossorção, a equação ADR (*Advection-Dispersion-Reaction*) seguindo uma abordagem baseada na solução das equações do balanço material à fase líquida, sendo o soluto transportado e biossorvido na fase sólida. À luz do conceito de equilíbrio local rápido, inerente à biossorção, a equação ADR e a isotérmica de biossorção são suficientes para

descrever o sistema. A equação ADR, simplificada para a forma unidimensional, aplicada a um único soluto sujeito apenas à reacção de sorção, é dada por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_h \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + u_z \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{\rho_p(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \left(\frac{\partial q}{\partial t} \right) \quad \text{eq. (2.36)}$$

Nesta equação C é a concentração de soluto em solução (mg.L^{-1}), D_h é o coeficiente de dispersão hidrodinâmico ($\text{m}^2.\text{h}^{-1}$), ε é a porosidade do leito (volume de vazio/volume total), q é o massa de soluto sorvido por massa de fase sólida (mg.g^{-1}), ρ_p é a massa específica do biossorvente (g.m^{-3}), t é o tempo (h), u_z é velocidade intersticial do fluido unidimensional (m.h^{-1}), e z é a direcção do espaço (m). O termo do lado direito da equação (2.36) inclui a difusividade do soluto e o seu movimento no *bulk* nos dois primeiros termos, e o processo de sorção no terceiro termo. O termo correspondente à dispersão tem sido utilizado para ultrapassar a não idealidade do fluxo e também para compensar os casos em que existem resistências à transferência de massa na fase líquida ou sólida.

O termo mais importante no balanço material ao soluto é a velocidade de acumulação do soluto pelo material biossorvente descrita pelo termo $\partial q/\partial t$. A aproximação mais simplista do modelo assume que a escala de tempo associada ao processo microscópico de transferência de massa para os sítios de sorção, e o subsequente tempo de sorção são muito menores do que os associados aos processos macroscópicos de transporte de fluidos. Isto assume que o equilíbrio prevalece localmente e que ocorre rapidamente. Assim, a taxa de variação da concentração da fase sorvida, q , em qualquer ponto z , é instantaneamente reflectida pela taxa de variação da concentração da solução, C , nesse ponto. Assume-se então que as resistências à transferência de massa nas fases líquida e sólida são negligenciáveis e que a reacção de biossorção é instantânea. Esta aproximação resulta nos modelos de equilíbrio local (LEM – *Local Equilibrium Model*) e incorporam na eq. (2.36) apenas a equação da isotérmica (Hatzikioseyan *et al.*, 2001).

Se for utilizado o modelo de Langmuir, fazendo dq/dt :

$$\frac{dq}{dt} = \frac{q_{\max} b}{(1 + bC)^2} \quad \text{eq. (2.37)}$$

Substituindo na equação (2.36):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_h \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u_z \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{\rho_s(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{q_{\max} b}{(1 + bC)^2} \frac{\partial C}{\partial t} \quad \text{eq. (2.38)}$$

Os parâmetros necessários para descrever o sistema são: i) o comportamento biossorvente do material, expresso nos parâmetros das isotérmicas (e.g.: Langmuir: q_{\max} , b , ou outra isotérmica adequada ao sistema); ii) as propriedades físicas do sistema biossorvente (ρ_s); iii) as condições de operação da unidade (caudal volumétrico, Q e concentração de entrada, C_i); iv) o empacotamento da coluna (ε); v) as características volumétricas da coluna (comprimento e área da secção transversal (A); que determinam a velocidade intersticial do fluido: $u_z = (Q/A) * \varepsilon$); e

vi) grau de divergência do fluxo de pistão ideal e da consideração de equilíbrio rápido expressa pelo coeficiente de dispersão aparente da coluna (D_h).

A análise das curvas de *breakthrough* passa pela análise da sua geometria. Uma curva “normal” tem forma de “S” e é simétrica. Assim, o ponto de inflexão corresponde a metade da zona de transferência de massa ($\Delta t/2 + t_b$), quando a concentração da corrente efluente da coluna é metade da concentração da afluente (Volesky *et al.*, 2003). Hatzikioseyan *et al.* (2001) apresentam resultados de simulações do modelo para o efeito de cada dos parâmetros acima referidos na posição e forma da curva de *breakthrough*. Verificaram que t_b é muito dependente das características biossorventes da biomassa, enquanto que a forma da curva é essencialmente afectada pelo coeficiente de dispersão da coluna.

No que respeita à transferência de massa, quanto maior o diâmetro da partícula (d_p) maior será a resistência à difusão intraparticular, originando uma curva de *breakthrough* mais atenuada. O grau de dispersão do fluxo na coluna de sorção é descrito pelo número adimensional de Peclet, sendo que ambos aumentam com o comprimento da coluna. Quando o coeficiente de dispersão é baixo, a curva de *breakthrough* obtida é abrupta, tornando-se mais achatada à medida que o coeficiente de dispersão aumenta. A utilização de um coeficiente de dispersão axial aparente pode ser utilizado como um parâmetro de ajuste para simular dados experimentais mesmo quando o processo tem limitações de transferência de massa e/ou reacção. O caudal da alimentação da coluna afecta o coeficiente de transferência de massa extraparticular e, particularmente, a cinética global da sorção. Quando o regime de fluxo se afasta do fluxo em pistão, e se verificam resistências à transferência de massa significativas nas fases líquida e sólida (cinética de biossorção lenta), as curvas obtidas são achatadas e precoces (Hatzikioseyan *et al.*, 2001; Volesky *et al.*, 2003).

Valores elevados capacidade máxima de acumulação de metal (q_{max}) e de afinidade (b) resultam numa zona de transferência de massa menor (desejável), traduzindo-se na forma de “S” com um declive abrupto que as isotérmicas favoráveis têm nas curvas de *breakthrough*. A concentração de entrada na coluna não tem influência no tempo de *breakthrough* (t_b) desde que não se exceda a gama favorável e linear da isotérmica, pois um aumento de concentração resulta num aumento da capacidade. Para concentrações que excedem a gama favorável a forma da curva de *breakthrough* acima descrita tende a afastar-se da desejável. Pelo contrário a isotérmica de Langmuir é praticamente linear quando opera a baixas concentrações, o que resulta no alongamento da curva de *breakthrough* (Volesky *et al.*, 2003).

As curvas de *breakthrough* e de eluição podem ser analisadas quantitativamente. A quantidade de metal retido na coluna, representado pela área abaixo da curva, pode ser obtida por integração numérica. Dividindo a massa de metal pela massa de sorvente (M) obtém-se a capacidade de acumulação do biossorvente, q . Isto corresponde a um ponto da isotérmica de equilíbrio em que a concentração afluente à coluna corresponde à concentração de equilíbrio final, C_f . Bag *et al.* (2000) reportam uma capacidade de *breakthrough* para o sistema de biossorção de Cr(III) a *S. cerevisiae* immobilizada em sepiolite, definida como sendo a quantidade

de iões metálicos que pode remover por unidade de massa antes de ser detectado no efluente da coluna, como sendo de $11,9 \text{ mg.g}^{-1}$.

A curva de eluição geralmente tem a forma de uma curva de distribuição de frequência assimétrica, com um incremento da concentração de metal acentuado seguido de uma descida suave. A curva é analisada pela eficiência da eluição, calculada pela integração da curva. A quantidade de metal desorvido (m_d , mg) calcula-se multiplicando a área debaixo da curva pelo caudal de alimentação, de acordo com a equação (2.39), onde C_e é a concentração da corrente efluente da coluna (mg.L^{-1}) e Q o caudal (mL.min^{-1}) (Volesky *et al.*, 2003):

$$m_d = Q \int C_e dt \quad \text{eq. (2.39)}$$

A razão entre m_d e a massa de metal ligada à biomassa na fase de sorção (m_{biomassa}) corresponde à eficiência da eluição. Outros parâmetros de interesse na avaliação da eluição são o tempo que demora à obtenção do pico, t_p , e a correspondente concentração máxima de metal, C_p . O factor de concentração do processo, CF , calcula-se dividindo C_p pela concentração da corrente afluyente à coluna, C_i .

2.9.2.2 Reactores contínuos perfeitamente agitados

Veglio *et al.* (2000) desenvolveram um balanço material ao sistema CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*), utilizado para simulação dos resultados experimentais:

$$V \frac{dC_e}{dt} = FC_i - PC_e - \frac{dq}{dt} X \quad \text{eq. (2.40)}$$

com C_e representando a concentração de metal no reactor e na corrente de saída (mg.L^{-1}), t o tempo (h), F o caudal de entrada e P o caudal de saída (L.h^{-1}), X a concentração de biomassa (g.L^{-1}) e V o volume do reactor (L).

A biossorção é um processo muito rápido, podendo ser considerado o equilíbrio no reactor. Considerando $F = P$ e substituindo a equação do modelo de Langmuir na eq. (2.40) obtém-se:

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{F(C_i - C_e)}{V \left(1 + \frac{q_{\max} K X}{(C_e + K)^2} \right)} \quad \text{eq. (2.41)}$$

Onde K corresponde ao inverso de b . Os valores experimentais foram comparados com os simulados tendo os autores verificado uma boa concordância entre os valores previstos pela equação (2.42) e os valores experimentais apenas para baixas concentrações de biomassa ($< 1 \text{ g/L}$). Para concentrações de biomassa mais elevadas concluem que devem ser considerados outro fenómenos, apontando como possível factor para a discordância o factor de os ensaios terem sido realizados sem controlo de pH.

CAPÍTULO 3 – Biosorventes

CAPÍTULO 3 - Biossorventes

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares eucarióticos, etimologicamente associados a processos de fermentação (Arnold, 1981). A biomassa de levedura mais comum, a *Saccharomyces cerevisiae*, é um subproduto residual de processos de fermentação, geralmente considerada uma *commercial commodity* aproveitada para alimentação animal. Esta levedura tem vindo a ser utilizada como biossorvente dada a sua capacidade de acumular metais pesados, mantendo a sua integridade e resistência em ambientes rigorosos (Vieira e Volesky, 2000; Wilhelmi e Duncan, 1996), sendo considerada um tipo de biossorvente promissor (Chen e Wang, 2007a).

Segundo Volesky (1987) a *S. cerevisiae* demonstra apenas capacidade moderada para a actividade como biossorvente, no entanto esta afirmação, de acordo com Wang e Chen (2006) decorre do facto de ser comparada com fungos do género *Rhizopus*, excelentes biossorventes para Pb, Cd, Cu e Zn. No entanto, esta levedura já demonstrou ter capacidade de biossorção de Cd superior a adsorventes como o óxido de alumínio e carvão activado, sendo que, quando comparada com outros biossorventes pode ser considerada um biomaterial com características únicas para a investigação e aplicação prática da biossorção, nomeadamente por ser: i) facilmente cultivada a larga escala, usando tecnologias de fermentação simples e com meio de crescimento económico; ii) obtida facilmente como subproduto de várias indústrias de alimentos e bebidas; iii) um tipo de biomassa considerado seguro sendo facilmente aceite pelo público quando aplicado na prática; e iv) um organismo modelo ideal para identificar o mecanismo de biossorção envolvido na remoção de iões metálicos, em especial para investigar as interacções metal-microrganismo ao nível molecular (Goksungur *et al.*, 2005; Lovley e Coates, 1997; Stoll e Duncan, 1996; Wang e Chen, 2006; Zouboulis *et al.*, 2001).

Atendendo a estas particularidades, verifica-se que a *S. cerevisiae* é alvo de diversos estudos de biossorção, que compreendem uma diversidade de condições ambientais e fisiológicas das células, nomeadamente a utilização de células viáveis (Stoll e Duncan, 1996; Suh *et al.*, 1998a), e células não viáveis (Brady *et al.*, 1994a); células em diferentes condições nutricionais (Goyal *et al.*, 2003); células granuladas (Brady *et al.*, 1994a); células floculantes: (Marques *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2002a; Soares *et al.*, 2002b); células modificadas (Goksungur *et al.*, 2005); células fraccionadas (Brady e Duncan, 1994); células mutuantes (Gharieb e Gadd, 1998; Gomes *et al.*, 2002; Ramsay e Gadd, 1997); culturas de laboratório (Avery e Tobin, 1992; Engl e Kunz, 1995; Park *et al.*, 2003); e culturas industriais de diferentes origens: levedura de cerveja (Avery e Tobin, 1992; Simmons e Singleton, 1996), e levedura de padeiro: (Adamis *et al.*, 2003; Mapolelo e Torto, 2004; Yu *et al.*, 2007).

3.1.1 Caracterização química da *Saccharomyces cerevisiae*

A caracterização de alguns parâmetros químicos da *S. cerevisiae* residual da produção de cerveja foi realizada por Parvathi *et al.* (2007) e Zouboulis *et al.* (2001), estes numa estirpe obtida numa indústria Portuguesa (UNICER): teor de humidade (73,26 %); sólidos solúveis em água, após a suspensão de 1 g de levedura desidratada em 1 L de água por 1 h (22 %); pH da suspensão 1 g/L (5,6-5,8) (Zouboulis *et al.*, 2001), e 5,7 (Parvathi *et al.*, 2007); teor inorgânico avaliado a 550 °C (5,56 %) (Zouboulis *et al.*, 2001), e 11,16 % (Parvathi *et al.*, 2007).

O catião mais abundante nesta levedura é o potássio, seguido do magnésio. As elevadas necessidades de Mg^{2+} devem-se ao seu papel na estabilização das estruturas ribossómicas e dos ácidos nucleicos, na manutenção da integridade da estrutura das membranas (celular e de organelos), e como cofactor em mais de 300 enzimas (Blackwell *et al.*, 1997; Blackwell *et al.*, 1998). O conteúdo de K, Mg e Ca de levedura de cerveja fresca foi determinada como sendo de aproximadamente 620, 225 e $< 4 \mu\text{mol.g}^{-1}$ peso seco (a 55 °C), respectivamente (Blackwell e Tobin, 1999).

O conteúdo de Mg^{2+} e Ca^{2+} intracelular em leveduras de uma estirpe de colecção e residual da produção de cerveja também foi analisado por Avery e Tobin (1992), constatando que nestas últimas o conteúdo de Mg^{2+} no citoplasma era de $6,15 \pm 0,37$ e $5,43 \pm 0,08 \mu\text{mol.g}^{-1}$ peso seco (55 °C), e no vacúolo de $38,2 \pm 0,2$ e $38,8 \pm 0,3 \mu\text{mol.g}^{-1}$ nas células incubadas na ausência e na presença de 2 % de glucose; Para o Ca^{2+} os valores determinados no citoplasma e no vacúolo foram respectivamente de $1,93 \pm 0,27$ e $1,64 \pm 0,08 \mu\text{mol.g}^{-1}$ peso seco (55 °C), e $1,13 \pm 0,02$ e $1,09 \pm 0,05 \mu\text{mol.g}^{-1}$ nas células incubadas na ausência e na presença de 2 % de glucose. Os autores concluíram que o Mg^{2+} se localiza predominantemente no vacúolo, e que apesar de a quantidade intracelular total deste catião ser maior na estirpe laboratorial, no citoplasma da estirpe residual da produção de cerveja a concentração deste catião é 2,5 vezes superior.

3.1.2 Composição da parede celular

As leveduras têm fundamentalmente as mesmas estruturas sub-celulares que as plantas e animais superiores, sendo utilizadas como sistemas modelo para várias áreas de base e de aplicação das ciências da vida, medicina e biotecnologia. A única estrutura ausente nas células animais, e que desempenha um papel importante na regulação do transporte de materiais de e para o interior da célula, é a parede celular situada na superfície externa da célula (Osumi, 1998).

A parede celular das leveduras desempenha quatro funções principais: i) a estabilização condições osmóticas internas – para limitar a entrada de água do meio externo os fungos desenvolveram uma parede celular robusta e elástica; ii) a protecção contra stresse físico, funcionando como uma película protectora – a combinação de uma resistência mecânica considerável e uma elevada elasticidade permitem à parede transmitir e redistribuir o stresse físico oferecendo protecção contra danos mecânicos; iii) a manutenção da forma da célula; e iv) servir de estrutura de sustentação de proteínas – os polissacáridos da parede celular funcionam

de estrutura de suporte a uma camada externa de glicoproteínas, que limitam a permeabilidade celular a macromoléculas, protegendo a célula de ataques de proteínas externas e limitando o escape de componentes solúveis da estrutura da parede para o meio. O elevado grau de ligação a açúcares das proteínas da parede celular e a presença de grupos fosfato carregados negativamente nas suas cadeias laterais de carboidratos provavelmente contribui para a retenção de água (Klis *et al.*, 2006)

As paredes celulares das leveduras também são os principais componentes celulares responsáveis pela ligação a metais, em particular em soluções aquosas diluídas. A ligação aos metais é mais eficiente quando a parede celular está intacta. Assim, é imperativo que, durante a fase de dessorção, que não ocorram danos na parede celular de forma a não inviabilizar a sua reutilização em ciclos de sorção-dessorção (Zouboulis *et al.*, 2001).

A composição em polissacáridos, a estrutura e espessura da parede celular das leveduras variam consideravelmente com as condições ambientais (Klis *et al.*, 2006). A parede celular da *S. cerevisiae* tem aproximadamente 70 ± 10 nm de espessura, correspondendo a cerca de 25 % do peso seco da célula, consistindo numa estrutura multilaminar microfibrilar constituída por polissacáridos (90 %), sendo o manano e o glucano os principais polímeros estruturais. A sua composição química, expressa em percentagem de peso seco consiste em glucano (28,8 %), manano (31 %), proteínas (13 %), lípidos (8,5 %), quitina (1 %), quitosano (2 %), azoto (2,1 %), fosfato (0,31 %), e iões inorgânicos como Ca^{2+} e Mg^{2+} (cerca de 3 %) (Brady *et al.*, 1994b; Patzak *et al.*, 1997; Volesky, 1987). Esta diversidade reflecte-se com a presença de uma grande variedade de potenciais sítios para a complexação de metais, nomeadamente nos grupos carboxilato, fosfato, sulfidril e amino (Zouboulis *et al.*, 2001).

A parede celular dos fungos *Ascomycetes* tem uma dupla camada (De Groot *et al.*, 2005). Na *S. cerevisiae* a parede celular é constituída principalmente por β -glucanos e manoproteínas, e uma pequena quantidade de quitina e lípidos. Os glucanos estão entrelaçados com as fibrilas de quitina na camada estrutural interna da parede celular, enquanto que a camada externa consiste em manoproteínas, a maioria das quais está ligada à parede celular por ligações covalentes a heteropolímeros de 1,6- β -glucano e 1,3- β -glucano (Kapteyn *et al.*, 1997).

O glucano é um polímero de glucose com ligações β -(1,3) e ramificações com ligações β -(1,6). A sua localização predomina do lado da membrana celular, tendo como função manter a rigidez da célula e impedir a lise osmótica. A camada exterior da parede celular consiste em polímeros de manano ligados a proteínas. Esta matriz tem ligações cruzadas com pontes de dissulfureto e pontes de hidrogénio. O manano é um polímero de manose formando uma cadeia principal com ligações α -(1,6) e cadeias laterais com ligações α -(1,2) e α -(1,3) que se ligam à cadeia principal por ligações α (1-2). A cadeia principal está ligada às proteínas por dímeros de N-acetil glucosamina a resíduos de asparagina. Cadeias de manano mais curtas, semelhantes às ramificações da cadeia principal, ligam-se directamente a resíduos de serina e treonina. Nas leveduras o manano encontra-se na forma de um complexo proteína-polissacárido ligado covalentemente, de 25-500 kDa, no qual a fracção proteica contribui com 5 a 10 %. As proteínas

encontram-se em toda a parede celular, mas predominam na camada externa de manano. A quitina é um polímero de resíduos de N-acetilglucosamina ligados por ligações glicosídicas β - (1,4), estando associada às proteínas da parede celular por ligações a aminoácidos não aromáticos. Encontra-se na forma de microfibrilas na camada interna da parede celular na matriz de glucano. O quitosano é produzido por deacetilação da quitina (Brady *et al.*, 1994b).

A diversidade de compostos orgânicos da parede celular das leveduras resulta da origem a espectros de infravermelho altamente complexos (Padmavathy *et al.*, 2003). Estes autores realizaram a análise FTIR a uma amostra de levedura de padeiro (*S. cerevisiae*), reportando numa tabela as diferentes bandas, divididas por três regiões: a dos açúcares: 790-1180 cm^{-1} , onde identificaram picos a 1040, 1079 e 1141 cm^{-1} ; a das proteínas: 1400-1700 cm^{-1} , com picos a 1456, 1553 e 1647 cm^{-1} ; e a dos ácidos nucleicos: 1200-1290 cm^{-1} , onde apenas foi identificado um pico a 1242 cm^{-1} . Os picos largos entre 3800 e 2500 cm^{-1} são devidos a grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$ e a pontes de hidrogénio. A banda larga observada na região 3800-2500 cm^{-1} , com um máximo a 3400 cm^{-1} pode ser atribuído à presença de grupos hidroxilo, que estão ligados por pontes de H com grupos NH - das amidas secundárias (grupos $(\text{R}-\text{NHCOCH}_3)$) da quitina. A banda de absorção a 1652 cm^{-1} foi devida à distensão do grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) da banda I da amida conjugada com a deformação NH . A banda a 1540 cm^{-1} pode ser explicada pela presença da banda II de uma amida secundária provocada pela distensão $\text{N}-\text{H}$ e $\text{C}-\text{N}$ das amidas secundárias. As bandas dos anéis de glucose são observados entre 1040 e 1160 cm^{-1} .

Amostras de *S. cerevisiae* de uma indústria cervejeira (UNICER) foram submetidas a medidas electrocinéticas para vários valores de pH por Zouboulis *et al.* (2001). Os ensaios foram realizados para uma gama de pH entre 3 e 11,5, verificando-se potenciais-zeta negativos em todo este intervalo. O ponto de carga zero da levedura deverá ocorrer a pH inferior a 3. Bingol *et al.* (2004) também determinaram o potencial zeta para leveduras de *S. cerevisiae* residuais de um processo industrial, verificando que entre pH 2 e 8 assume valores sempre negativos, e de valor absoluto crescente. Para pH 5 o valor do potencial zeta é de cerca de -20 mV.

3.1.3 Estrutura molecular da parede celular

A sobrevivência dos microrganismos na presença de metais depende das suas propriedades bioquímicas e estruturais intrínsecas, da adaptação fisiológica e/ou genética e, no que concerne às condições ambientais, da especiação do metal, a sua disponibilidade e toxicidade. A construção da parede celular, é crucial para a sobrevivência e, no caso das leveduras, composta por várias camadas, contendo grupos aniónicos aos quais se ligam os catiões metálicos. Mais de 90 % da parede celular das leveduras é constituída por polissacáridos complexados com proteínas, lípidos e outras substâncias. A capacidade de sorção da parede celular não é determinada maioritariamente pelo seu conteúdo proteico, mas antes pela estrutura organizacional de todo o complexo proteína-carbohidratos e pelo grau de dissociação dos grupos funcionais com carga negativa e a sua acessibilidade aos metais. Os grupos fosfodiéster e carboxílicos conferem o potencial eléctrico superficial à parede, verificando-se variações

significativas nas características da parede dependendo se das fases do ciclo de vida e das condições da cultura (Blackwell *et al.*, 1995).

Quando observada por microscopia electrónica de transmissão (TEM) a parede da *S. cerevisiae* revela uma camada externa fibrilar, constituída por manoproteínas, fortemente associada a uma camada interna, constituída por polissacáridos, que funciona de estrutura de sustentação à camada protectora externa. O principal polissacárido estrutural é o 1,3- β -glucano moderadamente ramificado. Devido à presença de cadeias laterais as moléculas de 1,3- β -glucano só se podem associar localmente através de pontes de hidrogénio, resultando na formação de uma rede tridimensional contínua, altamente elástica. As extremidades não redutoras das moléculas de 1,3- β -glucano podem funcionar como sítios de ligação para a ligação covalente de outros polissacáridos. Na face externa da rede de 1,3- β -glucano encontram-se cadeias de 1,6- β -glucano muito ramificadas, que por sua vez se podem ligar covalentemente a uma classe de proteínas da parede celular, as GPI modificadas (glicosilfosfatidilinositol). O 1,6- β -glucano pode ainda ligar-se ao 1,3- β -glucano ou à quitina numa ligação covalente forte das GPI à parede celular. No interior da rede de 1,3- β -glucano, podem aparecer ligações a cadeias de quitina depois de ocorrer a citocinese. A quitina pode aparecer ligada não só às extremidades redutoras do 1,3- β -glucano mas também às cadeias de 1,6- β -glucano, particularmente em resposta ao stresse. Uma segunda classe de proteínas ligadas covalente à parede celular, menos frequente do que as GPI, são as ASL (*Alkali-Sensitive-Linkage*), que incluem as PIR (*Protein with Internal Repeats*). Ligam-se directamente à rede de 1,3- β -glucanos da parede celular através de uma ligação sensível a alcális. As proteínas da parede celular podem não estar apenas ligadas aos polissacáridos da parede celular, mas também se podem ligar através de pontes dissulfureto a outras proteínas. As PIR da *S. cerevisiae* estão directamente ligadas ao 1,3- β -glucano (De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006). Na Figura 3.1 está representado um esquema da organização estrutural da parede da *S. cerevisiae*.

A população de proteínas da parede celular pode variar na composição dependendo da fase do ciclo celular, das condições ambientais e do estado de desenvolvimento. Apesar de o genoma da *S. cerevisiae* incluir dúzias de genes codificadores de proteínas da parede celular, só foram identificados 15-20 proteínas em células em crescimento exponencial em meio enriquecido (De Groot *et al.*, 2005).

A porosidade de paredes celulares isoladas de *S. cerevisiae* estima-se como sendo muito baixa, inferior a 1000 Da. No entanto em células *in vivo* este valor pode estar sub-estimado devido à elasticidade da rede de polissacáridos e em condições normais poder estar consideravelmente esticada devido à pressão osmótica das células vivas, tendo sido demonstrado que proteínas (citocromo c) de 12 kDa atravessam rapidamente a parede celular. Também foi demonstrado que a camada externa de proteínas limita a porosidade da parede celular. Esta limitação na porosidade também contribui para impedir que proteínas da superfície solúveis com elevada massa molecular se percam para o meio (De Groot *et al.*, 2005).

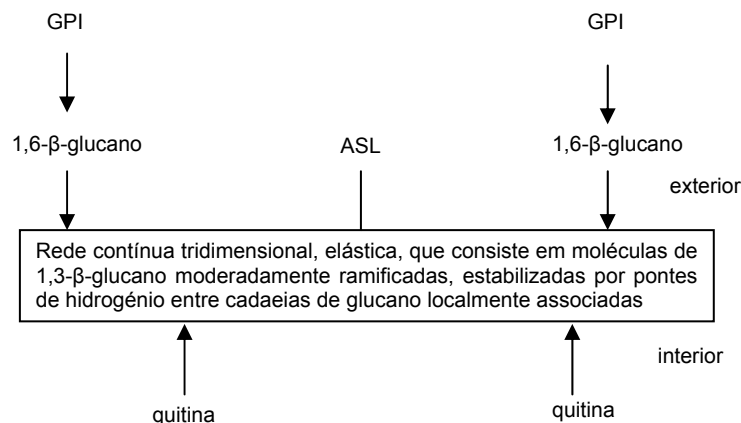


Figura 3.1 – Organização molecular da parede celular da *S. cerevisiae*. Adaptado de Klis *et al.* (2006).

3.1.4 Flocculação

Para além de estabilizar as células e as proteger de forças mecânicas, a parede celular também serve de ferramenta para os microrganismos interagirem com o seu ambiente e *vice-versa*. Uma das funções mais críticas da superfície celular é a sua capacidade para aderir a outras células ou superfícies. A adesão célula a célula entre leveduras é designada de flocculação (Verstrepen e Klis, 2006). Adicionalmente as proteínas e açúcares característicos da superfície das estirpes de leveduras industriais flocculantes podem providenciar sítios de ligação a metais adicionais. As diferenças fisiológicas entre estas estirpes e as culturas laboratoriais também podem reflectir-se ao nível da acumulação intracelular de metais uma vez que a actividade dos mecanismos de transporte de catiões pode ser influenciada pelo histórico das células (Avery e Tobin, 1992).

A flocculação é geralmente definida como a capacidade das células se agregarem espontaneamente e formarem flocos que sedimentam rapidamente no meio de cultura, sendo uma característica de expressão genética descrita como uma interacção da parede celular. Esta potencialidade tem vindo a ser explorada industrialmente na produção de cerveja, vinho e em fermentações etanólicas em contínuo. Ao permitir um aumento da concentração da biomassa no biorreactor ou por facilitar o processamento a jusante, a capacidade flocculante das leveduras é um factor importante no desempenho global do processo (Teixeira *et al.*, 1995). Estas aplicações industriais exploram esta propriedade pela facilidade e custos reduzidos associados à separação da biomassa dos vários produtos da fermentação (Verstrepen e Klis, 2006).

A adesão é conferida através de proteínas superficiais da célula designadas por adesinas ou floculinas que ligam aminoácidos específicos ou resíduos de açúcar na superfície de outras células ou promove a ligação a superfícies abióticas. As adesinas dos fungos partilham todas a mesma estrutura com três domínios: uma parte terminal -C que contém uma âncora GPI que permite a ligação à parede celular; um terminal -N que se estende para o exterior da parede celular e contém frequentemente um polissacárido ou péptido como domínio de ligação; e uma longa porção intermédia caracterizada pela presença de múltiplas repetições ricas em serina e

treonina. Em muitos casos os iões Ca^{2+} permitem que as adesinas adquiram a sua confirmação activa. A adesão da *S. cerevisiae* é caracterizada por ser do tipo “sensível a açúcares” (*lectin-like adhesion*), que, tal como o nome indica, depende da ligação das lectinas para a adesão a resíduos de açúcares na superfície de outras células. As adesinas deste grupo têm um domínio de ligação a lectinas no seu terminal –N. A adição de alguns açúcares inibe competitivamente a adesão (Verstrepen e Klis, 2006).

Na floculação da *S. cerevisiae* as lectinas da parede celular que reconhecem e se ligam a ligandos periféricos da parede celular de células adjacentes. Estes ligandos são peptidomananos, heteropolissacáridos constituintes da parede celular (Géhin *et al.*, 2001). Os iões Ca^{2+} actuam como cofactores activando a capacidade de floculação (Teixeira *et al.*, 1995). Estes autores referem ainda que um aumento da floculência está fortemente correlacionado com o aumento da hidrofobicidade da superfície celular, não havendo correlação entre a floculação e o potencial zeta de estirpes de *S. cerevisiae* ainda que fosse de esperar que a carga superficial tivesse alguma influência na floculação.

O tipo de adesão que ocorre na *S. cerevisiae* ainda pode ser dividida em duas categorias: Flo1 e NewFlo. Enquanto que na primeira a agregação passa apenas pelo reconhecimento e ligação de oligómeros de manose na sua superfície, na segunda podem ligar-se vários açúcares (manose, glucose, maltose). A maioria das estirpes industriais são do tipo NewFlo pois a inibição por competição conferida pelos açúcares no meio impendem-na de flocular antes de todos os açúcares fermentáveis serem convertidos a etanol, o que é o exactamente desejado pelos produtores de vinho e cerveja. Os genes da adesão são activados por diferentes respostas ambientais como a limitação em C ou N ou variações de pH ou níveis de etanol. A mudança entre a forma não floculada para a floculada provavelmente permite a adaptação das leveduras ao stresse (Verstrepen e Klis, 2006).

Um floco de levedura pode ser considerado um agregado de partículas esféricas incluído um espaço intersticial. É um sistema heterogéneo caracterizado por parâmetros como a porosidade, tamanho das células e densidade da biomassa. A imobilização de células e enzimas dá frequentemente origem a problemas de ordem prática como a limitação de da difusão de substratos ou produtos. O mesmo pode acontecer em agregados de células floculantes (Fontana *et al.*, 1991). Os parâmetros dos fenómenos de transporte, como as taxas de transporte e de difusão dependem do tamanho das células. A formação de agregados influencia consideravelmente os fenómenos de transporte uma vez que os agregados tendem a ter maiores taxas de sedimentação e coeficientes de difusão mais baixos. O tamanho dos flocos depende não só da composição do meio, da taxa de arejamento, da taxa de diluição e da idade das células. Flocos de grande dimensão permitem manter uma elevada concentração de biomassa total no biorreactor, mas o número de células viáveis é menor. Em flocos pequenos onde o gradiente de transferência de massa é menor o crescimento e a manutenção das células no seu interior torna-se possível (Vicente *et al.*, 1998). No entanto, a utilização de estirpes floculantes para a remediação de metais oferece diversas vantagens associadas à sedimentação natural das

células após o tratamento, como a simplicidade do processo, baixos custos energéticos e evitando o recurso à imobilização das células (Malik, 2004).

Soares *et al.* (2002a) estudaram a remoção de Cu^{2+} de soluções aquosas por duas estirpes isogénicas da levedura *S. cerevisiae*, uma floculante e outra não floculante, verificando que a primeira tem uma capacidade de acumulação de metal superior. Os autores atribuem esta diferença à presença de proteínas superficiais características (lectinas) da estirpe floculante. Também Avery e Tobin (1992) observaram uma maior capacidade de remoção de Sr^{2+} por uma estirpe de *S. cerevisiae* residual da produção de cerveja comparativamente a uma estirpe laboratorial. Estes resultados encorajam o desenvolvimento de sistemas de biorremediação de águas contaminadas com metais utilizando células floculantes, evitando o recurso à imobilização em matrizes, permitindo a aplicação de biorreactores de biomassa suspensa com diferentes configurações.

3.1.5 Propriedades de ligação a metais

Localizar o sítio de deposição do metal no biossorvente e compreender o mecanismo de sequestro do metal são aspectos cruciais na procura de um processo de biossorção eficiente, com elevada capacidade de remoção e selectividade (Volesky, 1987). Em geral a concentração de metais no citoplasma é menor do que nos organelos ou vacúolos, desempenhando estes uma função importante na regulação da concentração de metais no citoplasma, tanto para as funções metabólicas essenciais como na diminuição dos efeitos tóxicos de espécies metálicas, permitindo manter no citoplasma concentrações de metais baixas (Blackwell *et al.*, 1995).

Os fungos podem interagir com os metais e seus derivados de diferentes formas. Alguns mecanismos permitem a mobilização dos metais em formas disponíveis para a acumulação celular e a lixiviação do sistema, e.g. complexação com ácidos orgânicos. Por outro lado a imobilização pode resultar da sorção a componentes celulares e exopolímeros, transporte e sequestro intra e extracelular ou precipitação (Jarosz-Wilkolazka e Gadd, 2003). Alguns componentes celulares como a quitina presente na parede celular dos fungos têm propriedades de ligação a metais significativas. Estes mecanismos dependem do estado metabólico e nutricional das células uma vez que isso afecta não só a expressão de mecanismos de defesa dependentes de energia como a síntese de componentes estruturais da parede, pigmentos e metabolitos que afectam a disponibilidade do metal e a resposta do organismo (Gadd *et al.*, 2001).

3.1.5.1 Utilização de células viáveis vs. células não viáveis

As leveduras exibem frequentemente elevados níveis de acumulação intracelular. São capazes de precipitar metais à volta das células em resultado do processo metabólico e também são capazes de sintetizar proteínas intracelulares com propriedades de ligação a metais (Gadd, 1990). A levedura *S. cerevisiae* acumula metais através de dois mecanismos, a biossorção e a

bioacumulação, podendo este último ser responsável pela acumulação de quantidades de metal superiores ao primeiro (Suh *et al.*, 1998a).

Suh e Kim (2000) estudaram o efeito de vários tratamentos na acumulação de Pb^{2+} a *S. cerevisiae* residual de uma indústria de cerveja. Os estados fisiológicos estudados foram o original (células vivas, sem tratamento), células autoclavadas 5 min (sem viabilidade mas com a forma original da célula preservada), autoclavada 5 vezes por 15 min (resulta na destruição da forma original da célula e na eluição de materiais intracelulares), e células desidratadas e moídas. Verificaram que a ordem de acumulação a Pb^{2+} foi: células vivas (260 mg.g^{-1}) > células autoclavadas 5 vezes durante 15 min (150 mg.g^{-1}) > células desidratadas e sujeitas a moagem (100 mg.g^{-1}) > células autoclavadas 5 min (30 mg.g^{-1}). Os ensaios tiveram a duração de quase 250 h e foram realizados sem adição de soluções tampão, ácidos ou bases para ajustar o pH. O facto de as células autoclavadas 5 vezes por 15 min demonstrarem maior capacidade de ligação ao chumbo do que as células autoclavadas 5 min pode dever-se ao facto de os materiais eluídos também estarem envolvidos na ligação ao metal.

Suh *et al.* (1998b) estudaram a acumulação de Pb^{2+} por células de *S. cerevisiae* viáveis e não viáveis (autoclavadas 15 min) concluindo que a acumulação nas células vivas é 10 vezes superior. Explicaram esta diminuição na capacidade de acumulação de Pb^{2+} em primeiro lugar pelo facto de nas células mortas só ocorrer acumulação na superfície das células e depois por haver desnaturaçãõ dos sítios de ligação do Pb^{2+} durante a autoclavagem. Suh *et al.* (1998a) também afirmam que as células vivas de *S. cerevisiae* podem sequestrar até três vezes mais Cu^{2+} do que as células mortas. Estas observações justificam a utilização de células vivas em detrimento de células não viáveis.

Também Adamis *et al.* (2003) testaram a remoção de Cd^{2+} a células de *S. cerevisiae* (fermento de padeiro) em várias fases de crescimento e sujeitas a alguns pré-tratamentos (autoclavagem, tratamento térmico a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min, desidratação). Verificaram que a capacidade de remoção de cádmio foi, por ordem crescente: células não viáveis (autoclavadas), células na fase exponencial de crescimento com e sem pré-tratamento térmico, células na fase estacionária desidratadas e, com a maior capacidade de remoção, as células viáveis (frescas) em fase estacionária. Estes autores verificaram ainda que as células frescas na fase estacionária, após 24 h em contacto com uma solução de Cd até 100 mg.L^{-1} mantinham a sua viabilidade inalterada. Estas observações justificam a utilização de células vivas em detrimento de células mortas.

A acumulação de metais a células viáveis de *S. cerevisiae* envolve uma fase inicial rápida, que compreende a ligação aos grupos com carga negativa da parede celular e o transporte passivo dos iões metálicos através da parede celular por um período de 3 a 5 min, seguida por uma fase lenta, de penetração através da membrana até ao citoplasma, e por fim a acumulação de metal no interior das células (Park *et al.*, 2003). Tanto a camada externa de manano-proteína da parede celular como a camada interna de glucano-quitina desempenham um papel importante na acumulação de metais. A maioria dos metais intracelulares liga-se a grânulos de polifosfato

localizados perto ou no interior dos vacúolos, ou se ligam a proteínas específicas de baixo peso molecular, nomeadamente as metalotioninas e fitoquelatinas (Malik, 2004).

Suh *et al.* (1998a) estudaram o processo de acumulação de Pb^{2+} por células viáveis de *S. cerevisiae* verificando também que ocorre uma primeira fase, com a duração de 3-5 min, independente do metabolismo, na qual o Pb^{2+} se liga à parede celular, um segundo passo, que difícil de ser classificado claramente como dependente ou independente do metabolismo, em que o metal atravessa a membrana celular até ao citoplasma, e um terceiro passo, que ocorre após as 2 h de contacto, em que o Pb^{2+} se acumula no citoplasma, claramente independente do metabolismo.

Volesky *et al.* (1993) também identificaram uma cinética rápida associada à acumulação de Cd a células viáveis de *S. cerevisiae* recolhidas na fase exponencial de crescimento, com 73 % do metal a ser removido da solução ao fim de 3 min de contacto. Verificaram, em observações por TEM e análise dos espectros EDAX, que o metal se acumulou predominantemente em vacúolos, não sendo aparentes alterações nos organelos das células (ao fim de 15 h).

3.1.5.2 Distribuição sub-celular dos metais

As leveduras, têm um reconhecido potencial de ligação a metais pesados (Blackwell *et al.*, 1995), podendo grande parte desses metais permanecer associados à parede celular (Patzak *et al.*, 1997), ou ligar-se a componentes intracelulares. As alterações que reduzem a acumulação intracelular de metal, sejam por modificação genética ou por adaptação, e que podem incluir o aumento da capacidade de ligação dos metais à parede celular, a redução da acumulação pelo sistema transportador de Mg^{2+} , a indução de precipitação dos metais na forma de sulfuretos ou fosfatos na forma de excreção de metabolitos, ou por aprisionamento em exopolissacáridos, aumentam a resistência das leveduras ao efeito tóxico dos metais (Blackwell *et al.*, 1995). A distribuição sub-celular de Cd é diferente em estirpes de *S. cerevisiae* resistentes e sensíveis ao metal. Nas primeiras foram detectadas proteínas ligantes de Cd de baixo peso molecular (< 30000) no citoplasma, nas estirpes sensíveis a maior parte do Cd estava ligado a material citosólico insolúvel (Gadd, 1990).

A levedura de padeiro possui sistemas de transporte específicos para a acumulação de qualquer ião metálico. Depois de entrar na célula os iões metálicos podem ser compartimentalizados em diferentes organelos sub-celulares como a mitocôndria ou o vacúolo (Wang e Chen, 2006). Gharieb e Gadd (1998) demonstram que a acumulação de Cr(V) por *S. cerevisiae* não ocorre no vacúolo mas sim no citoplasma das células. Ramsay e Gadd (1997) verificaram uma ocorrência semelhante na acumulação de Cu^{2+} e Cd^{2+} por *S. cerevisiae*, atribuindo a ligação de Cu^{2+} a metalotioninas e a de Cd^{2+} a fitoquelatinas no citoplasma, e ainda o envolvimento da membrana e parede celular com sulfuretos, mas demonstraram que, pelo contrário, na acumulação de Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} por esta levedura o vacúolo desempenha um papel fundamental.

Yazgan e Ozcengiz (1994) estudaram a distribuição sub-celular resultante da acumulação de Ag^+ , Cu^{2+} e Cd^{2+} a *S. cerevisiae* e *K. marxianus* viáveis, verificando que a ligação a componentes solúveis do citoplasma é mais evidente na *S. cerevisiae*. No entanto, em ambas as leveduras a maior parte dos metais foi localizada na fracção celular insolúvel. Para a *S. cerevisiae* a distribuição foi de 80 % para a prata, 86,6 % para o cobre e 94,6 % para o cádmio. Assim os autores concluem que a acumulação de metais por material celular insolúvel é o principal mecanismo de acumulação de metal em ambas as leveduras

Pelo contrário, Simmons e Singleton (1996) verificaram que em células não viáveis de *S. cerevisiae* a quantidade de Ag^+ acumulada por células intactas foi superior à acumulada pelas paredes celulares isoladas, concluindo que os componentes intracelulares ligam mais prata do que a parede celular. Também Gadd (1990) refere que a maior parte dos iões Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e K^+ acumulados por esta levedura foram localizados no vacúolo, onde se podem ligar a polifosfatos de baixo peso molecular.

A localização de metais nas leveduras, na presença de um substrato metabolizável, é determinada pelo transporte activo em resposta ao gradiente electroquímico de protões através das membranas citoplasmáticas e vacuolares, gerado por H^+ -ATPases na membrana (Blackwell *et al.*, 1995). No que respeita à localização dos metais acumulados nas leveduras *S. cerevisiae*, na presença e na ausência de glucose, Blackwell e Tobin (1999) verificaram que no primeiro caso a quantidade de Cd acumulado foi maior, correspondendo a aproximadamente o dobro, no entanto a % de metal em cada fracção celular, expressa em como % do total de Cd celular permaneceu constante ao longo das 5 h de ensaio. Os autores localizaram 5-10 % do Cd acumulado na solução de lavagem das células, 2-3 % no citoplasma, 22-28 % nos vacúolos e 60-65 % ligado a estruturas celulares, indicando que o cádmio tem igualmente tendência para se ligar preferencialmente a material celular no interior da célula.

Também a importância relativa da compartimentalização citoplasmática ou vacuolar do Sr^{2+} por *S. cerevisiae* depende de a acumulação ser passiva ou activa. Nas leveduras não metabolizantes o Sr^{2+} intracelular localizava-se predominantemente no citoplasma. A acumulação realizada na presença de glucose resultou num pequeno aumento da concentração do metal no citoplasma, mas mais significativo no vacúolo (Avery e Tobin, 1992). Blackwell *et al.* (1995) referem que foi identificada a presença de um sistema de transporte activo de Zn^{2+} para estabelecer e manter um gradiente deste metal através da membrana vacuolar.

Park *et al.* (2003) estudaram a distribuição de Cd a duas estirpes de *S. cerevisiae* através de análises SEM-EDS e TEM-EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*), verificando que na estirpe ATCC 834 não se observou Cd no interior das células, enquanto que na ATCC 24858, uma estirpe utilizada para a produção de etanol, se encontrou Cd tanto no interior como na parede celular. Esta diferença pode ser explicada pela diferença na estrutura da parede celular. A espessura da camada de glucanos é semelhante nos dois organismos, mas a espessura do manano é superior na estirpe ATCC 834, o que pode dificultar a acumulação intracelular. O facto de, ainda assim, esta estirpe exibir uma capacidade de acumulação de Cd mais elevada pode

dever-se à maior área superficial, devida à importância da troca iónica entre os iões metálicos e iões H^+ , K^+ , Mg^{2+} , e Ca^{2+} que ocorre na parede celular durante a adsorção de metais.

Gomes *et al.* (2002) apresentam um mecanismo de transporte e compartimentalização de Cd^{2+} na *S. cerevisiae*, sugerindo que inicialmente o Cd^{2+} é removido de solução através do transportador Zrt1, um transportador responsável pela elevada afinidade da acumulação de zinco. Uma vez dentro da célula o metal forma um complexo com a glutathione reduzida (GS) que é posteriormente sequestrado no vacúolo pela proteína Ycfl, uma proteína transportadora que medeia o transporte de Cd-GSH na acumulação vacuolar. Também apontam a possibilidade de um sistema activo limitar a acumulação de Cd^{2+} na *S. cerevisiae*, a proteína Cad2, que permite controlar o nível intracelular de Cd^{2+} através de um sistema de efluxo.

3.1.5.3 Papel dos grupos funcionais da parede celular

A capacidade de biossorção de metais pela *S. cerevisiae* é atribuída à carga que se desenvolve em resultado da dissociação de grupos carboxílicos, amino, hidroxilo, entre outros grupos funcionais, na parede celular (Chen e Wang, 2007a) resultando na ligação dos metais por coordenação com os referidos grupos (Gavrilescu, 2004). O papel que cada um destes grupos desempenha na biossorção é dependente do metal envolvido.

Brady e Duncan (1994) analisaram as propriedades de ligação de Cu às paredes celulares de *S. cerevisiae* através da modificação química dos grupos funcionais. Bloqueando os grupos carboxílicos, amino e hidroxilo a capacidade de ligação ao Cu diminuiu, sendo então possível relacioná-los com a ligação a este metal. Concluíram ainda que tanto a fracção proteica como a de polissacáridos estão envolvidas na ligação aos iões metálicos: os polímeros da parede celular que contêm azoto são as proteínas, a quitina e o quitosano. Assim, os metais que se ligam aos grupos amino estão associados ou ao quitosano ou aos grupos N- terminais das proteínas ou às cadeias laterais de lisina ou arginina (aminoácidos que contribuem com cerca de 8 % molar das proteínas da parede celular). Os grupos carboxílicos também estão associados à fracção proteica (como as cadeias laterais dos aminoácidos ácidos como o ácido glutâmico e o ácido aspártico que contribuem com cerca de 14 % molar da proteína da parede celular). Assim, com a participação dos grupos amino e carboxílicos na ligação ao Cu, pode constatar-se a importância das proteínas na ligação aos metais. Os grupos hidroxilos, que fazem parte dos polissacáridos da parede celular, são muito mais numerosos do que os restantes dois grupos. Mas uma vez que quando foram bloqueados se verificou que são responsáveis pela ligação de quantidades de metal idênticas aos grupos amino e carboxílico, os autores sugerem que tenham menor afinidade para a ligação ao Cu, ainda que pelo seu elevado número desempenhem um papel importante.

O estudo da acumulação de Cu^{2+} , Cd^{2+} e Co^{2+} a componentes isolados das paredes celulares desta levedura (mananos, glucanos e quitina) foi realizado por Brady *et al.* (1994b). Os autores verificaram que todos os componentes, mas em particular os mananos, acumularam maiores quantidades de metal do que as paredes celulares intactas, eventualmente devido à exposição

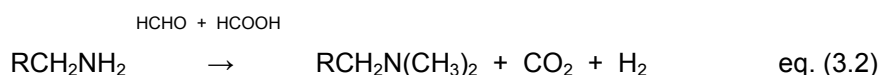
de um maior número de sítios de ligação decorrentes da respectiva extracção. A remoção, por digestão enzimática, da fracção proteica da parede celular reduziu a capacidade de acumulação de metais em cerca de 30 %. A análise da composição da fracção proteica da *S. cerevisiae* revela que os dois aminoácidos ácidos, o ácido glutâmico e o ácido aspártico correspondem a 30,9 % e 40,3 % do total de aminoácidos das duas fracções proteicas mais importantes da parede celular, sendo os restantes resíduos principalmente neutros. O conteúdo de enxofre das proteínas desta levedura também é elevado, estando provavelmente na forma de resíduos de cisteína que podem estar envolvidos na coordenação de metais pesados conjuntamente com outros grupos funcionais. Estas proteínas podem então ser consideradas polianiónicas e, conseqüentemente, com elevada capacidade de ligação a metais. A ordem de capacidade de ligação a metais apontada para os componentes da parede celular é: proteínas > manose > quitina > glucano. Os autores também concluem que a camada externa da parede celular de manano-proteína é mais importante na acumulação a metais do que a camada interna de glucano-quitina.

Volesky (1987) refere que os grupos polifosfato e carboxílicos da parede celular da *S. cerevisiae* intervêm na complexação de metais e elementos radioactivos. No caso do urânio os grupos fosforilo formam complexos estáveis com este elemento, e os grupos carboxílicos intervêm apenas quando os primeiros estão saturados.

Jianglong (2002) estudou o efeito da modificação da parede celular, através do pré-tratamento com formaldeído, metanol e glutaraldeído na biossorção de Cu^{2+} a *S. cerevisiae* residual de produção de cerveja. Verificou que o pré-tratamento com glutaraldeído, um reagente que origina a ligação cruzada com múltiplos grupos funcionais, praticamente não altera a capacidade de biossorção da levedura, mas tanto o metanol, e em particular o formaldeído, alteram significativamente a capacidade da *S. cerevisiae* se ligar aos iões Cu^{2+} . O efeito do metanol é a esterificação dos grupos carboxílicos da parede celular através da eq. 3.1, provocando a redução da ligação dos metais aos grupos carboxílicos:



O tratamento com formaldeído resulta na metilação dos grupos amino através da reacção 3.2, impedindo-os de participar na ligação aos metais pesados. O autor conclui então que os grupos amino têm um papel mais importante na ligação aos iões Cu^{2+} do que os grupos carboxílicos.



3.1.5.4 Papel dos exopolissacáridos

Muitos produtos extracelulares podem complexar ou precipitar metais pesados, mas a possível relevância destes processos para a remoção de metais tem recebido pouca atenção (Gadd, 1990). O ácido cítrico pode ser um quelante eficiente o ácido oxálico pode cristais de oxalato insolúveis com os metais à volta das paredes celulares. A produção de H_2S por leveduras pode

resultar na precipitação intensa de metais na forma sulfuretos insolúveis predominantemente na parede celular e em seu redor. Em estirpes de *S. cerevisiae* em crescimento em meio rico em cobre apareceram colónias escuras devido à formação de CuS (Gadd, 1990).

Alguns microrganismos ainda produzem e excretam substâncias poliméricas extracelulares (EPS) como polissacáridos, glucoproteínas, lipopolissacáridos, péptidos solúveis, etc. Estas substâncias possuem uma quantidade substancial de grupos funcionais aniónicos com capacidade para adsorver iões metálicos. O papel dos EPS na biossorção em sistemas com leveduras não é geralmente considerado. Não está claro se as células de *S. cerevisiae* excretam EPS, ainda que segundo Wang e Chen (2006) as proteínas envolvidas na floculação podem ser consideradas EPS.

As células de leveduras floculantes produzem proteínas superficiais, as lectinas, que se sabe serem activadas e terem sítios de ligação específicos para o Ca^{2+} (Avery e Tobin, 1992), podendo haver ocupação dos metais a estes sítios de ligação. Estes autores observaram uma maior capacidade de remoção de Sr^{2+} por uma estirpe de *S. cerevisiae* residual da produção de cerveja comparativamente a uma estirpe laboratorial, apontando para esta situação o facto de se associar a produção de exopolissacáridos à promoção da floculação da *S. cerevisiae*, estando bem documentado o papel destes compostos no sequestro de metais.

3.2 Drêches

3.2.1 Composição

As drêches correspondem à fracção insolúvel do mosto, preparado por moagem e mistura dos cereais como o malte, a cevada germinada; e cereais não maltados como griz, arroz ou trigo), separada por filtração (<http://www.unicer.pt/gca/index.php?id=407>; consultado a 7 de Maio de 2007).

Este resíduo lenho-celulósico é um material rico em proteína e fibra, com baixo valor acrescentado, geralmente utilizada para alimentação animal (Carvalho *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2003). No entanto, dada a composição deste material, têm vindo a ser exploradas novas aplicações, nomeadamente como aditivo alimentar (mistura até 15 % em farinha para produção de pão com maior teor de fibra e proteína), para recuperação de polissacáridos e proteínas, e.g. oligómeros solúveis não digeríveis que actuam como pré-bióticos, para aplicação em alimentos funcionais (Macheiner *et al.*, 2003), como suporte de imobilização de biomassa (Branyik *et al.*, 2004) e também como biossorvente (Low *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2001).

No entanto, ainda que as drêches sejam um produto de baixo custo e elevada disponibilidade que, segundo Silva *et al.* (2004), podem constituir uma alternativa economicamente vantajosa nos processos de tratamento de águas residuais, a sua aplicação em sistemas de biorremediação de metais é praticamente inexistente.

A composição das drêches pode variar dependendo com a variedade de cevada utilizada, o período da sua colheita, as características do lúpulo e de outros adjuvantes adicionados, e da tecnologia utilizada na produção da cerveja (Carvalho *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2003). Carvalho *et al.* (2004) apresentam a seguinte composição média para as drêches que analisaram (em base de peso seco): glucano (21,9 %), xilano (20,6 %), arabinano (9,0 %), lenhina Klason – resíduo insolúvel em ácido (21,7 %), grupos acetil (1,1 %), proteína (24,6 %) e cinzas (1,2 %). Santos *et al.* (2003) analisaram a variabilidade da composição de oito lotes de drêches. A composição média determinada nas amostras preservadas por secagem (60 °C, 18 h), em base de peso seco, foi: proteínas (24,2%), lípidos (3,9 %), cinzas (3,4 %), conteúdo fenólico extraído por alcális (18,7 %), pentoses (xilose + arabinose) (21-27,3 %).

O espectro FTIR das drêches, na região entre 4000-2500 cm^{-1} é dominado pela banda de distensão das ligações (C-H) com dois picos a 2925 e 2854 cm^{-1} , e por uma banda larga e intensa do grupo -OH com um máximo a 3402 cm^{-1} . Na região 2000-400 cm^{-1} o espectro é dominado pela banda de distensão (C-O-C) dos polissacáridos e um pico das ligações aromáticas (C=C), característico da lenhina, a 1514 cm^{-1} e uma banda intensa e larga de C=O com três picos, a 1739, 1713 e 1657 cm^{-1} (Silva *et al.*, 2004).

A celulose é um polímero natural de unidades de β -D-glucose contendo vários grupos hidroxilo primários e secundários. A estrutura da lenhina apresenta quantidades significativas de grupos metoxi e hidroxilo livres. Ambos os constituintes têm capacidade de adsorver vários metais pesados (Farinella *et al.*, 2007). O teor de lenhina pode aumentar a biossorção de íons metálicos a sorventes de origem botânica. O grupo fenólico da madeira tem um papel importante através da formação de complexos com os íons (Malik *et al.*, 2005).

3.2.2 Propriedades de ligação a metais

Low *et al.* (2001) estudaram a remoção de Cr(VI) com drêches, concluindo que o pré-tratamento com HCl aumentou a acumulação de metal de 48,8 % para 73,5 %, atribuindo este incremento à protonação da biomassa. O tratamento alcalino, com NaOH, resultou na diminuição da eficiência de remoção de metal para 31,4 %. O valor de q_{max} determinado foi de 18,94 mg.g^{-1} o que segundo os autores o posiciona favoravelmente em comparação com outros biossorventes de baixo custo.

Na biossorção de Pb e Cd Low *et al.* (2000) verificaram que o efeito dos pré-tratamentos foi inverso: o tratamento alcalino resultou no aumento da acumulação de ambos os metais relativamente ao controlo, e o tratamento ácido diminuiu a eficiência de acumulação. O conteúdo proteico das drêches lavadas com água e submetidas ao tratamento alcalino revelou ser pouco significativa (3,05 e 2,26 % respectivamente) não sendo atribuídas às proteínas um papel muito relevante na biossorção destes metais. A sorção de ambos os metais revelou ser endotérmica, aumentando com o aumento da temperatura na gama entre os 15 e os 55 °C, mas de uma forma mais acentuada para o chumbo.

CAPÍTULO 4 – Procedimiento experimental

CAPÍTULO 4 – Procedimento experimental

4.1 Preparação dos biossorventes

O estudo de biorremediação de soluções sintéticas de crómio (III) foi realizado para dois subprodutos do fabrico de cerveja – levedura e drêches. Os produtos utilizados nos ensaios laboratoriais foram ambos cedidos pela indústria cervejeira UNICER, sediada em Leça do Balio, Portugal.

4.1.1 Suspensão de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura utilizada foi uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* resultante do fabrico de cerveja (UNICER). A levedura foi recolhida do depósito de stockagem após três fermentações, na própria manhã em que se iniciaram os ensaios (levedura fresca). Este procedimento teve por objectivo obter a biomassa com a sua maior capacidade floculante e manter as condições fisiológicas semelhantes de ensaio para ensaio. O peso seco da levedura fresca foi determinado para cada recolha em triplicado.

Com o objectivo de eliminar vestígios dos produtos da fermentação, submeteu-se a levedura fresca a três lavagens com água destilada em frascos de polietileno de 250 mL, centrifugando-se a 3000 rpm durante 3 min (centrífuga refrigerada, modelo Sigma 4K 10 B-Braun) antes de rejeitar o sobrenadante. Após a ressuspensão em água destilada a levedura fica pronta a ser inoculada nas soluções de metal ou colocada na coluna.

A suspensão de levedura obtida foi caracterizada, em triplicado, quanto ao pH, peso seco, concentração de Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} , e foi submetida a contagem de células viáveis. Ainda foi avaliada a perda de massa associada às lavagens da levedura fresca.

4.1.2 Drêches

As drêches, igualmente resultantes do fabrico de cerveja (UNICER), apresentavam-se desidratadas e com granulometria heterogénea, encontrando-se armazenadas em saco de polietileno em local seco no laboratório. Os ensaios de biossorção foram realizados com drêches sem tratamento químico (DST), e drêches com tratamento alcalino com NaOH 0,5 M (DCT).

A preparação das DST para os ensaios de biossorção consistiu em lavagens sucessivas com água destilada, secagem a 60 °C, e peneiração por crivo de 1 mm.

As DCT foram preparadas submetendo as DST ao contacto com uma solução de NaOH 0,5 M durante 4 h num matraz de 5 L, com agitação e à temperatura ambiente, de acordo com o método descrito por Low *et al.* (2000), seguindo-se a respectiva lavagem com água destilada até

pH constante do sobrenadante em lavagens sucessivas e secagem a 60 °C. As drêches secas foram armazenadas em recipientes de polietileno selados.

4.2 Soluções

4.2.1 Soluções de crómio (III)

As soluções de crómio foram preparadas a partir de $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merk) dissolvido em água destilada. O pH das soluções foi ajustado com soluções de HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M ou 0,5M.

4.2.2 Soluções padrão para análise por espectrofotometria de absorção atómica

Os elementos analisados por espectrofotometria de absorção atómica foram o Cr(III), Ca, K e Mg. As respectivas soluções-mãe foram preparadas a partir da diluição das ampolas de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CaCl_2 , KCl e MgCl_2 (Riedel-deHaën) em água ultra-pura até perfazer um volume de 1 L. A concentração final é de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ no ião metálico a analisar.

Os padrões foram preparados nas gamas de concentrações indicadas para a calibração, por diluição da solução mãe em água ultra-pura. A conservação foi efectuada por refrigeração a 4 °C.

4.2.3 Soluções de ácidos, bases e eluentes

Ao longo do trabalho experimental foram preparadas diversas soluções de ácidos e bases que foram utilizadas para acertar o pH de soluções de Cr(III), no tratamento das drêches ou como eluentes nos ensaios de dessorção. Estas soluções foram preparadas por dissolução ou diluição em água destilada dos reagentes apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Reagentes utilizados na preparação de soluções ácidas, básicas e eluentes.

Reagente	Marca	Método de preparação da solução
H_2SO_4 95-97 %, p.a	Riedel-deHaën	Diluição em água destilada
HCl 37 %, p.a	Riedel-deHaën	Diluição em água destilada
HNO_3 75 %, p.a	Riedel-deHaën	Diluição em água destilada
CH_3COOH , 100 %, p.a	Riedel-deHaën	Diluição em água destilada
EDTA, p.a	Riedel-deHaën	Dissolução em água destilada
Na_2CO_3 , p.a	Riedel-deHaën	Dissolução em água destilada
NaOH, 98 %	Absolve	Dissolução em água destilada

4.3 Ensaios em sistema fechado

Todos os ensaios em sistema fechado foram realizados em *erlenmeyers* por incubação das suspensões de solução de crómio-levedura, solução de crómio-eluyente ou solução de crómio-drêches a 30 °C com agitação orbital a 150 rpm (incubadora com controlador de temperatura, modelo CERTOMAT H e agitador orbital, modelo CERTOMAT R).

As amostras recolhidas (cerca de 10 mL) foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi colocado em tubos de polietileno com tampa, para posterior doseamento de Cr(III), Ca, K e Mg. A preservação das amostras foi realizada por acidificação a pH < 2 (adição de 75 µL de HNO₃ concentrado) e refrigeração (4 °C).

A concentração de levedura nas soluções de metal foi determinada pelo teor em sólidos suspensos totais da solução de metal após a inoculação.

4.3.1 Ensaios de cinética e isotérmicas de equilíbrio

As isotérmicas foram realizadas com soluções de concentração inicial de 10, 25, 50, 100, 200, 300 e 400 mg Cr(III).L⁻¹ com pH inicial ajustado a 5,00 ± 0,05 (medidor de pH, modelo Orion 420A) com NaOH 0,1 M, preparadas em frascos de *erlenmeyer*. A suspensão de levedura (4.1.1) ou as drêches (4.1.2) foram adicionadas de forma a obter uma concentração de biossorvente entre 4 a 5 g peso seco.L⁻¹. O pH dos sistemas foi monitorizado no decorrer do ensaio. Paralelamente aos ensaios com soluções metálicas foram preparados ensaios em branco, que apenas diferiram dos primeiros por terem concentração inicial de Cr(III) = 0 mg.L⁻¹.

Ao longo do tempo recolheram-se amostras para posterior doseamento de Cr(III). As amostras foram preservadas de acordo com o descrito em 4.3. Nos ensaios realizados com levedura foram ainda recolhidas amostras para: i) quantificar os teores de Ca, K e Mg (4.5.2); ii) avaliar a libertação de materiais intra-celulares para o meio (4.5.3): estas amostras foram centrifugadas e analisadas imediatamente, sem serem submetidas a acidificação; iii) avaliar a viabilidade celular (4.5.7); iv) observar por microscopia electrónica de transmissão; e iv) analisar por espectroscopia de infravermelhos (4.5.6).

4.3.2 Dessorção de Cr(III)

Os ensaios de dessorção foram realizados apenas com levedura. As soluções de crómio foram preparadas à concentração inicial de 10, 25 e 50 mg Cr(III).L⁻¹ com pH inicial ajustado a 5,00 ± 0,05 com uma solução de NaOH 0,1 M.

A recuperação de Cr(III) a partir da levedura carregada com metal foi testada com soluções ácidas de HNO₃, H₂SO₄, HCl, CH₃COOH e Na₂CO₃ às concentrações de 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M; com soluções de EDTA (agente complexante) de 0,01, 0,05 e 0,1 M, e com água destilada.

4.3.2.1 Estudo do efeito do tempo de sorção e da razão S/L na recuperação de Cr(III)

Os ensaios foram preparados como o descrito em 4.3.1 retirando-se, para efeitos de análise de recuperação de Cr(III), 50 mL de amostra após 15 min, 30 min, 2 h e 24 h de incubação. A biomassa carregada foi separada da solução de Cr(III) por centrifugação a 3000 rpm por 3 min e incubada com a solução eluente. Os volumes de solução eluente testados foram de 50 mL – razão S/L de 4 g.L⁻¹, e de 25 mL – razão S/L de 8 g.L⁻¹. Após 30 min de incubação retiram-se amostras de 10 mL para tubos de ensaio de polietileno para posterior determinação da concentração de Cr(III).

4.3.2.2 Optimização do tempo de contacto entre a biomassa e o eluente

Em frascos *erlenmeyer* prepararam-se 100 mL de soluções de Cr(III) com concentração inicial de 10, 25 e 50 mg Cr(III).L⁻¹. Inocularam-se as soluções de metal com suspensão de biomassa (4 g.L⁻¹) e incubaram-se. Após 30 min de biossorção todo o conteúdo do *erlenmeyer* foi centrifugado. Parte do sobrenadante foi recolhido para doseamento da concentração de Cr(III) e o restante foi rejeitado. A levedura foi incubada com 50 mL de solução de eluente nas condições acima descritas.

Para avaliar a recuperação de Cr(III) nos eluentes recolheram-se amostras após 5 min, 15 min, 30 min e 1 h de dessorção. As amostras foram tratadas de acordo com o descrito em 4.3.

4.3.3 Ciclos de sorção-dessorção

Preparam-se as soluções de crómio em frascos de *erlenmeyer*, inocularam-se com a suspensão de levedura (4 g.L⁻¹) e incubaram-se. Após 30 min retiraram-se 300 mL de amostra que foi submetida a centrifugação para recolha da biomassa carregada de metal. A restante suspensão de solução de crómio-levedura voltou a ser incubada para se seguir a remoção de metal ao longo do tempo.

A biomassa com metal recolhida foi misturada com 150 mL da solução eluente (razão S/L = 8 g.L⁻¹) e incubada. Após 30 min a suspensão foi centrifugada. Parte do sobrenadante foi preservado para posterior análise a Cr(III), Ca, K e Mg, e a biomassa foi regenerada.

O método de regeneração adoptado foi o descrito por Wilhelmi e Duncan (1995), e consistiu em lavagens sucessivas da biomassa com uma solução de NaOH 0,1 M e água destilada seguidas de centrifugação (3 min, 3000 rpm) até se obter uma suspensão em água destilada com pH de 5,5 ± 0,1 (correspondente ao pH da suspensão de levedura inicial).

A biomassa regenerada foi inoculada em 300 mL de solução de crómio, incubada, e todo o processo foi repetido num total de 3 ciclos. Cada ciclo de dessorção é iniciado após 30 min de biossorção, seguindo-se a concentração de Cr(III), Ca, K e Mg em solução por análise de amostras de 10 mL recolhidas ao longo do tempo e preservadas de acordo com o anteriormente

descrito. A concentração de biomassa nas suspensões de metal-levadura foi avaliada por determinação do teor em sólidos totais.

4.4 Ensaio em sistema aberto

Os ensaios em sistema aberto foram realizados numa coluna em perspex de 3,2 cm de diâmetro interno e 39 cm de altura, com camisa térmica onde circula água a 30 °C, aquecida num banho com uma cabeça de aquecimento (modelo T-Lauda), sedimentador e recirculação externa da biomassa, conforme a representação apresentada na Figura 4.1.

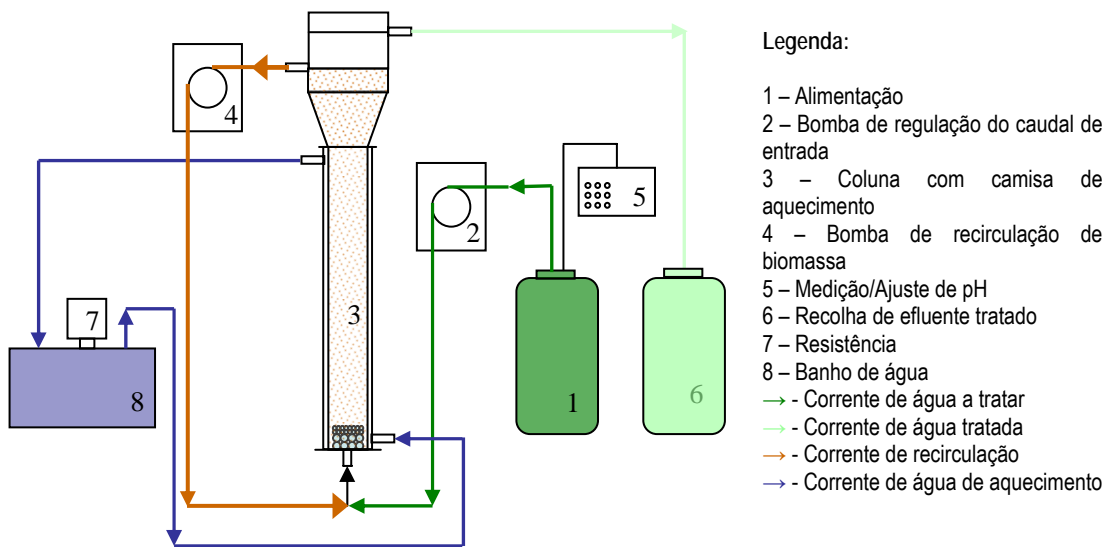


Figura 4.1 – Esquema representativo da instalação de remoção de cromo (III) em sistema aberto.



Figura 4.2 – Fotografia da instalação de remoção de cromo (III) em sistema aberto.

A coluna operou em fluxo ascendente, com alimentação da solução de metal e recirculação da biomassa efectuada por bombas peristálticas (modelo Reglo-Ismatec de 6 rolamentos e WATSON MARLOW 313U respectivamente). Na base da coluna foram colocadas duas camadas de esferas de vidro, a primeira composta por esferas de 1 cm de diâmetro e a segunda por esferas de 2 mm de diâmetro, para permitir uma melhor distribuição do fluxo. O volume útil do sistema, incluindo o decantador, é de 1150 mL sem enchimento, 1130 mL com a levedura e de 1050 mL com as drêches. Para o caudal médio utilizado, de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o tempo de retenção hidráulico correspondente é de 12,77, 12,56 e 11,67 h.

A preparação da instalação requer o enchimento da coluna com água destilada, iniciar o aquecimento do banho de água e a recirculação da água na camisa de aquecimento para elevar a temperatura até aos $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.1 Ensaios com levedura

Na coluna preparada conforme o descrito em 4.4, foram colocados o equivalente a 85 g de levedura fresca após o tratamento referido em 4.1.1, equivalendo a cerca de 15 g de levedura em peso seco. A bomba de recirculação de biomassa foi mantida a um caudal de recirculação (Q_r) de $150 \pm 3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, correspondendo ao funcionamento do sistema com uma razão de reciclo, calculada de acordo com a reequação (4.1) de 100. Depois de o sistema estabilizar no que diz respeito à altura de leito, iniciou-se a alimentação com solução de crómio de concentração inicial de 25 e $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ao caudal (Q) de $1,5 \pm 0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

$$R = \frac{Q_r}{Q} \quad \text{eq. (4.1)}$$

Os ensaios de remoção de crómio foram realizados para concentrações iniciais de 25 e $50 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{L}^{-1}$, realizando-se ainda ensaios de controlo sem o metal em estudo ($C_i = 0 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{L}^{-1}$) e sem biomassa ($C_i = 25$ e $50 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{L}^{-1}$). Em todos os ensaios realizados o pH da solução afluyente ao sistema foi ajustado a $5,00 \pm 0,05$ com NaOH 0,5 M sendo controlado e ajustado ao longo de todo o ensaio.

Os parâmetros monitorizados ao longo destes ensaios incluem o pH na corrente de entrada e de saída, a concentração de crómio, potássio, cálcio, magnésio, sólidos suspensos totais e libertação de compostos intracelulares na corrente de saída, e ainda a viabilidade das células no interior da coluna ao longo do tempo. Foram ainda observadas ao microscópio electrónico de varrimento (SEM) amostras de células recolhidas ao longo de ensaios com concentração inicial de 0 e $25 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{L}^{-1}$. Os ensaios foram mantidos até a concentração de Cr(III) na corrente de saída igualar a da corrente de entrada.

4.4.2 Ensaio com drêches

Na coluna preparada de acordo com o descrito em 4.4, colocaram-se 20 g de DCT ou 25 g de DST. Para manter o leito fluidizado a bomba de recirculação foi mantida a um caudal de 160 ± 5 mL.min⁻¹. A alimentação do sistema com a solução de Cr(III), de 50 mg.L⁻¹, iniciou-se após a estabilização da altura do leito na coluna, decorrendo a um caudal de $1,5 \pm 0,1$ mL.min⁻¹. Foram realizados ensaios de remoção de crómio para concentrações iniciais de 25 e 50 mg Cr(III).L⁻¹.

Os parâmetros monitorizados ao longo destes ensaios incluem: pH na corrente de entrada e a concentração de crómio na corrente de saída. Os ensaios foram mantidos até a concentração de Cr(III) na corrente de saída igualar a da corrente de entrada.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação da concentração de bioissorvente

A concentração de levedura na levedura fresca (g peso seco.g⁻¹ levedura fresca) foi avaliada por determinação dos sólidos totais. Esta determinação foi efectuada mensalmente e em triplicado.

A concentração de levedura na suspensão obtida a partir do procedimento descrito em 4.1.1, e nas soluções de Cr(III) utilizadas nos ensaios em sistema fechado (g peso seco.mL⁻¹), foi avaliada por determinação dos sólidos suspensos totais. As determinações foram efectuadas em triplicado. Estes valores serviram de base para calcular a quantidade de levedura a preparar para os ensaios (4.1.1) e o volume de suspensão de levedura preparada a inocular tanto nos ensaios em sistema fechado como em sistema aberto.

Nos ensaios em sistema aberto foi avaliada a perda de levedura do sistema por determinação dos sólidos suspensos totais na corrente de saída.

4.5.1.1 Método para a determinação de sólidos totais

Em cadinhos de porcelana previamente tarados pesaram-se cerca de 5 g de levedura fresca (balança analítica modelo Precisa 40 SM-200A), incubaram-se os cadinhos em estufa a 103 ± 2 °C e pesaram-se após atingirem a temperatura ambiente num exsiccador. Repetiu-se o procedimento de secagem-arrefecimento-pesagem até se obterem valores com variações inferiores a 4 %.

4.5.1.2 Método para a determinação de sólidos suspensos

As membranas filtrantes (Whatman GF/C, $\approx 1,2$ µm de poro) foram lavadas três vezes com 20 mL água destilada e colocadas em cadinhos de porcelana. Os conjuntos cadinho-filtro foram colocados na estufa a 103 ± 2 °C e tarados depois de arrefecerem à temperatura ambiente num exsiccador. Filtraram-se 20 mL de amostra, colocaram-se os cadinhos com filtro e amostra na estufa a 103 ± 2 °C e pesaram-se após atingirem a temperatura ambiente num exsiccador.

Repetiu-se o procedimento de secagem-arrefecimento-pesagem até se obterem valores com variações inferiores a 4 %.

4.5.2 Determinação da concentração de crómio, cálcio, potássio e magnésio

A concentração de Cr(III), Ca, K e Mg foi determinada por espectrofotometria de absorção atómica. Este método baseia-se na medida da quantidade de energia absorvida por um meio contendo átomos do elemento a determinar, no estado fundamental, quando colocados no percurso de um feixe de radiação de comprimento de onda apropriado, proveniente de uma fonte de intensidade constante.

4.5.2.1 Método

As condições de operação foram definidas de acordo com o manual do espectrofotómetro de absorção atómica (modelo Varian Spectra AA – 400) (Tabela 4.2), otimizando-se em cada utilização parâmetros como o alinhamento da lâmpada, a posição do queimador e o caudal de gases (ar/acetileno ou acetileno/protóxido de azoto). A calibração foi efectuada com soluções padrão preparadas de acordo com o descrito em 4.2.2, respeitando a gama de concentrações definida no manual e apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Condições de operação do espectrofotómetro de absorção atómica.

Elemento	Gases da Chama	Gama de concentração óptima (µg/mL)	Corrente da lâmpada (mA)	Comprimento de onda (nm)	Abertura da fenda (mm)
Cr(III)	Ar/Acetileno	1-100	7	428,9	0,5
Ca	Acetileno/Protóxido de azoto	0,01-3	10	422,7	0,5
K	Ar/Acetileno	1-6	5	769,9	1,0
Mg	Ar/Acetileno	0,15-20	4	202,6	1,0

4.5.3 Avaliação do efluxo de compostos intracelulares de baixo peso molecular

Compostos intracelulares como o ácidos nucleicos e proteínas apresentam características de absorção a comprimento de onda abaixo dos 400 nm, na gama do ultra-violeta (UV) (Marques, 2002). A presença de compostos intracelulares de baixo peso molecular pode ser avaliada pela realização de um espectro de varrimento na medida em que apresentam picos máximos de absorção a 260 – 280 nm (Marques, 2002; Soares *et al.*, 2002b).

4.5.3.1 Método

As amostras recolhidas foram centrifugadas (3 min a 3000 rpm), e submetidas a um varrimento entre 200 e 500 nm num espectrofotómetro (modelo Jasco V-560 UV/IVS). O branco foi preparado com água destilada.

4.5.4 Desfloculação da Levedura

4.5.4.1 Reagentes

i) Solução de desfloculação: NaCl 9 g.L⁻¹ a pH 4, preparada por dissolução NaCl em água destilada e ajustando o pH com uma solução de HCl 0,1 M.

4.5.4.2 Método

Diluiu-se 1 mL de amostra em 10 mL de água ultra-pura e adicionaram-se 100 µL desta solução a 1 mL de solução de desfloculação. A mistura foi agitada e centrifugada (5 min, 3000 rpm). Depois de rejeitar sobrenadante, o procedimento foi repetido com solução de desfloculação e finalmente com água ultra-pura, também em duplicado, para eliminar os vestígios da solução de lavagem.

4.5.5 Digestão das amostras

As amostras de suspensão de levedura e as amostras recolhidas nos ensaios realizados em sistema aberto foram submetidas a digestão ácida (com HNO₃ 75%) a elevada pressão e temperatura no digestor por microondas (modelo MW 600 – Aurora Instruments). Os programas de digestão utilizados foram os correspondentes ao método EPA 3051, adaptado à extracção de metais de sólidos, lamas e óleos, para as amostras de levedura fresca, e o método EPA 3015, adaptado a amostras líquidas, para as amostras recolhidas na corrente de saída da coluna. As características destes métodos, que já constam do *software* do equipamento, são resumidas na Tabela 4.3. As amostras digeridas foram recolhidas para balões volumétricos de 25,00 mL para perfazer o volume com água ultra-pura.

Tabela 4.3 – Especificações dos métodos de digestão utilizados para as amostras sólidas e líquidas.

Especificações	Método		
	EPA 3015		EPA 3051
Quantidade de amostra	5 mL		0,5 g
Volume de HNO ₃ 75%	5 mL		10 mL
	Fase 1	Fase 2	Fase 1
Temperatura (°C)	160	170	175
Pressão (psi)	0	0	0
Potência	1000	1000	1000
Rampa (min)	10	10	5,5
Pausa (min)	0	0	4,5
Limite de temperatura (°C)	200	200	200
Limite de pressão (psi)	200	200	200

4.5.6 Espectroscopia de infravermelho associada a transformadas de Fourier (FTIR)

Quando se pretende obter informação estrutural e analítica acerca das interações metal-biomassa as análises espectroscópicas de infravermelho FTIR e XPS (*X-ray photoelectron*) são muito úteis, além de envolverem metodologias de preparação das amostras simples (Figueira *et al.*, 1999). A espectroscopia de infravermelho tem demonstrado ser uma ferramenta útil no estudo de moléculas biológicas. A sua aplicação para a obtenção de informação sobre a estrutura e ligações em moléculas complexas tem-se revelado muito útil. A possibilidade de estudar a química da superfície de sólidos de uma forma não destrutiva através de análises XPS torna-a uma das ferramentas analíticas mais poderosas para os químicos. A utilização desta técnica permite, por exemplo, estudar a valência de um metal em proteínas contendo metais, ou a natureza de ligação de biomoléculas a superfícies metálicas (Figueira *et al.*, 1999).

As análises FTIR foram realizadas para avaliar qualitativamente os grupos funcionais que caracterizam a *S. cerevisiae* e às drêches (DST e DCT), bem como para a identificação dos grupos funcionais envolvidos na interação entre o Cr(III) e os vários biossorbentes.

4.5.6.1 Método

As amostras das biomassas iniciais e recolhidas após diferentes tempos de contacto com soluções de Cr(III) foram desidratadas a 60 °C, moídas até se transformarem numa massa homogénea. As pastilhas foram preparadas pela mistura de 0,0015 g de amostra com 0,1500 g de brometo de potássio desidratado (KBr Spectranal®, Riedel-deHaën 34919), seguidos de homogeneização num almofariz de ágata. A pastilha foi preparada numa prensa (modelo OL57 Manfredi) aplicando vácuo seguido de pressão a 200 bar por 5 min.

Os espectros de infravermelhos foram obtidos num espectrofotómetro FTIR (modelo BOMEM MB Séries). Os espectros foram obtidos definindo a gama de energia incidente entre 4000 e 500 cm^{-1} , realizando 5 varrimentos por amostra a uma velocidade de 21 varrimentos. min^{-1} com uma resolução do espectro de 4 cm^{-1} .

4.5.7 Determinação da viabilidade das leveduras

A viabilidade da *S. cerevisiae* foi avaliada utilizando o kit de viabilidade Live/Dead® Yeast Viability Kit (Molecular Probes, L-7009). Da aplicação deste método resulta que as células com pouca ou nenhuma actividade metabólica exibem fluorescência verde difusa, e as células metabolicamente desenvolvem estruturas intra-vacuolares compactas e fluorescentes de cor laranja ou vermelha (CIVS – *Citoplasmatic Intra Vacuolar Structures*). Os CIVS são produzidos em menos de 1 h, têm diâmetro aproximado de 0,5 a 0,7 μm e entre um a vários μm de comprimento. São observados a movimentarem-se livremente no espaço intra-vacuolar, onde se desenvolvem e aumentam de comprimento até ao seu movimento ser estrangido pela

membrana vacuolar. Têm fluorescência vermelha-alaranjada quando excitados com luz de comprimento de onda entre 470 e 590 nm. A formação dos CIVS é melhorada quando o meio de crescimento é removido antes da coloração. A detecção da fluorescência pode ser realizada com filtros de fluoresceína com excitação a 480 nm e emissão ≥ 530 nm (Molecular Probes, 2001).

A implementação deste método obrigou a uma fase inicial de otimização, durante a qual foram testados vários métodos de desfloculação e concentrações de corante. Tendo sido verificado que os métodos de desfloculação mais correntes (lavagem com EDTA 50 mM e lavagem com NaCl 15 g.L⁻¹ a pH 3) resultavam em interferências com o método, o procedimento adoptado foi aquele que permitiu a obtenção de melhores resultados de desfloculação sem interferir com o corante, o que consistiu na lavagem da biomassa em solução de NaCl 9 g.L⁻¹ a pH 4, seguindo-se duas lavagens com água ultra-pura. A aplicação do método foi ainda precedida da optimização do volume de amostra a submeter ao procedimento de coloração e da concentração da solução FUN[®] 1 a utilizar.

4.5.7.1 Reagentes

- i) Solução FUN[®] 1 – marcador fluorescente indicador de viabilidade, 10 mM. A concentração final da solução FUN[®] 1 na mistura com solução de glucose em tampão MOPS deve ser de 20 μ M. Assim foi preparada uma diluição da solução *stock* (10 mM) em água ultra-pura filtrada e esterilizada, à concentração final de 200 μ M.
- ii) Solução de glucose 2% em tampão MOPS pH 7,2 (solução GM), preparada dissolvendo a glucose em água ultra-pura filtrada em acrodiscos na proporção de 2 g.L⁻¹ e ajustando o pH a 7,2 com solução de tampão MOPS 10 mM. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min.

4.5.7.2 Método

As amostras de levedura recolhidas foram submetidas a desfloculação seguindo o método descrito em 4.5.4.2. Ressuspendeu-se o pellet obtido em 500 μ L de solução GM e adicionaram-se 50 μ L de solução FUN[®] 1 200 μ M. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos em local protegido da luz. Juntaram-se 150 μ L desta suspensão de levedura a cerca de 5 mL de água ultra-pura e submeteu-se a solução final a filtração através de uma membrana negra de policarbonato (Whatman). A membrana com as células foi colocada entre uma lâmina e uma lamela para posterior observação ao microscópio de óptico fluorescência (modelo ZEISS, Axioskop) usando o filtro UV de comprimento de onda adequado. Foram adquiridas imagens, que perfizessem um total de aproximadamente 300 células, através de uma câmara (modelo Zeiss AxioCam HRc) acoplada ao microscópio. A ampliação do adaptador do microscópio é de 0,63x.

4.5.8 Preparação das células de levedura para observação ao microscópio electrónico de varrimento (SEM)

4.5.8.1 Reagentes

- i) Etanol absoluto (Riedel-de Haën), a partir da qual se preparam soluções diluídas a 30, 50, 70, 80 e 90 % em água destilada.
- ii) Solução de tampão fosfato a pH = 7,2, preparada juntar 50,0 mL de solução de KH_2PO_4 0,1 M a 34,7 mL de solução de NaOH 0,1 M.
- iii) Solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato a pH 7,2, prepara por diluição da solução de glutaraldeído para microscopia electrónica a 25 % em água destilada (Electron Microscopy Sciences, ref^a 16220) na solução de tampão fosfato a pH 7,2.

4.5.8.2 Método

Para observação ao microscópio electrónico de varrimento foram utilizadas amostras recolhidas do interior da coluna (sistema aberto) recolhidas, no ensaio em branco, após 4, 27, 46, 76, 95 e 142 h, e para a concentração inicial de Cr(III) de 25 mg.L^{-1} , após 0,5, 4, 21, 51, 74, 93, 141, 166 e 216 h. Recolheram-se 5 mL de amostra, submetendo-a a filtração através de uma membrana (Gelman Science de poro $45 \mu\text{m}$) com o objectivo de reter as células de forma uniforme a um suporte, facilitando seu manuseamento ao longo do processo de preparação para observação ao microscópio electrónico de varrimento.

Imediatamente após a recolha das amostras precedeu-se à fixação das células submergindo-as numa solução de glutaraldeído a 3 % durante 15 min. Para eliminar a solução de glutaraldeído do pellet realizaram-se 3 lavagens de 20 min cada com a solução de tampão fosfato pH = 7,2. A desidratação células foi realizada por contacto com soluções de etanol absoluto em concentrações crescentes: i) etanol a 30 % - 10 min; ii) etanol a 50 % - 15 min; iii) etanol a 70 % - 15 min; iv) etanol a 80 % - 15 min; v) etanol a 90 % - 15 min; vi) Etanol a 100 % - 2x10 min e 1x 15 min. As membranas com as células desidratadas foram fixadas a suportes metálicos adequados à observação no microscópio electrónico de varrimento (modelo Leica, Cambridge S-360) e cobertas do ouro.

4.5.9 Preparação das células de levedura para observação ao microscópio electrónico de transmissão (TEM)

A microscopia de transmissão electrónica, associada a um equipamento de microanálise, e.g. EDS - *Electron Dispersive Spectroscopy*, pode fornecer informação importante para a determinação da distribuição da ligação metal-biomassa ao longo da estrutura celular (Figueira *et al.*, 1999).

As amostras preparadas para observação ao microscópio electrónico de transmissão foram obtidas num ensaio de remoção de Cr(III) em sistema fechado, com $C_i = 25 \text{ mg Cr(III).L}^{-1}$, recolhidas para os seguintes tempos de contacto com a solução de Cr(III): 0 h, 15 min, 2 h e 24h. Como controlo preparou-se para cada ensaio uma suspensão de leveduras em água destilada com as mesmas características do ensaio de remoção de metal, e retiram-se amostras para observação em TEM para os mesmos intervalos de tempo.

4.5.9.1 Reagentes

- i) Etanol absoluto (Riedel-de Haën), a partir da qual se preparam soluções diluídas a 30, 50, 70, 80 e 90 % em água destilada.
- ii) Solução de tampão fosfato a pH = 7,2, preparada juntar 50,0 mL de solução de KH_2PO_4 0,1 M a 34,7 mL de solução de NaOH 0,1 M.
- iii) Solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato a pH 7,2, prepara por diluição da solução de glutaraldeído para microscopia electrónica a 25 % em água destilada (Electron Microscopy Sciences) na solução de tampão fosfato a pH 7,2.
- iv) Kit para TEM (Kit Epon 812, SPI-CHEM), contendo NMA (Nadic Methyl Anidro), DDSA (Dodeceny Succinic Anidro), DMP 30 (2,4,6 – Tridimetilaminometil fenol) e a resina SPI-PON 812. Foi preparada a resina de rigidez média de acordo com as indicações do fabricante: para um recipiente de vidro pesaram-se 16,2 g de SPI-PON 812, 10,0 g de DDSA, 8,9 g de NMA. Misturar bem com uma vareta de vidro e juntar 0,6 g de DMP-30 (acelerador). Misturar lentamente para não introduzir bolhas de ar, durante cerca de 5 min.
- v) Óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences)

4.5.9.2 Método

A preparação das amostras foi realizada por adaptação do método descrito por Cross (1989). Submeteram-se 10 mL de amostra de suspensão de levedura a centrifugação (3 min a 3000 rpm) para formação do pellet. A fixação das células foi efectuada com a solução de glutaraldeído a 3 % em tampão fosfato a pH = 7,2 por 24 h a 4 °C, período ao fim do qual se observou a coloração amarela ao longo de todo o pellet. A solução de fixação foi removida após a centrifugação (3 min; 3000 rpm). Para eliminar a solução de glutaraldeído do pellet realizaram-se 3 lavagens, de 20 min cada, com tampão fosfato a pH = 7,2. A desidratação das células foi realizada por contacto com soluções de etanol absoluto em concentrações crescentes: i) etanol a 30 % - 10 min; ii) etanol a 50 % - 15 min; iii) etanol a 70 % - 15 min; iv) etanol a 80 % - 15 min; v) etanol a 90 % - 15 min; vi) etanol a 100 % - 2x10 min e 1x15 min.

A permeabilização das células para a infiltração com resina realizou-se com duas lavagens de 15 min com óxido de propileno. A Infiltração realiza-se colocando o pellet em contacto com misturas

de óxido de propileno em proporções crescentes de resina preparada conforme o procedimento acima descrito: i) 75 % óxido propileno:25 % resina – 1 h; ii) 50 % óxido propileno:50 % resina – 1,5 h; iii) 25 % óxido propileno:75 % resina – 1,5 h; e iv) 100 % resina – 12 h. Terminada a infiltração as amostras são vertidas para moldes e colocadas numa estufa a 60 °C por 48 h para a polimerização da resina.

Os blocos de resina com levedura foram cortados num ultramicrotomo, com espessuras entre 95 e 140 nm. Os cortes foram recolhidos para grelhas de cobre revestido de formvar 400 mesh (ref^a FF 400 – Cu). O contraste das amostras realizou-se colocando as grelhas em acetato de uranilo (20 min), e citrato de chumbo (15 min) sucedidos de lavagens com água destilada. As amostras contrastadas foram observadas num microscópio electrónico de transmissão (modelo Hitachi H 9000 – NA, 300 kV).

4.6 Lavagem do material

Para eliminar a possibilidade de contaminações, todo o material utilizado foi lavado com detergente, enxaguado com água da torneira, colocado num banho de ácido nítrico 0,1 M em água destilada por 24 h e enxaguado com água desionizada.

4.7 – Procedimentos de segurança e protecção ambiental

Os resíduos líquidos produzidos durante os ensaios foram recolhidos em recipientes de polietileno e tratados com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para precipitar o metal. O sobrenadante foi separado para um outro recipiente, tratado com HCl 1 M até pH neutro e descarregado. Os resíduos sólidos (levedura e drêches carregadas de metal) foram armazenados em contentores de polietileno para posterior tratamento adequado.

**CAPÍTULO 5 – Equilíbrio e cinética de sorção
e dessorção de Cr(III) na *S. cerevisiae* e nas
drêches**

CAPÍTULO 5 – Equilíbrio e cinética de sorção e dessorção de Cr(III) na *S. cerevisiae* e nas drêches

5.1 Objectivos

Neste capítulo pretende-se estudar o equilíbrio e a cinética de acumulação de Cr(III) na levedura *S. cerevisiae* e nas drêches, bem como o potencial de recuperação de metal ligado pela levedura, e a subsequente utilização da biomassa em sucessivos ciclos de sorção-dessorção. Para tal procedeu-se: i) à averiguação do modelo cinético que melhor descreve o comportamento do sistema de biossorção, para identificar o potencial mecanismo limitante da velocidade de acumulação de metal, como a difusão ou a quimiossorção; ii) à aplicação de modelos que quantificam as interações metal-biomassa, para determinar a sua capacidade máxima de acumulação de metal e permitir a sua comparação com outros biossorbentes; e ainda iii) à avaliação do efeito de várias soluções eluentes na recuperação de metal acumulado pela levedura e na capacidade de acumulação de metal em ciclos subsequentes.

Estes resultados constituem uma base fundamental ao desenvolvimento dos capítulos subsequentes, onde se pretende caracterizar o mecanismo de remoção deste metal e desenvolver um sistema aberto para a biorremediação de soluções aquosas de Cr(III).

Os valores apresentados correspondem, a valores médios obtidos em ensaios realizados em triplicado, cujo desvio padrão é inferior a 10 % do valor médio.

5.2 Estudos cinéticos

O equilíbrio da distribuição do sorbato entre o sorvente e a solução é importante para a determinação da capacidade máxima de sorção, por sua vez o estudo da cinética de sorção é significativa uma vez que permite prever a velocidade de remoção do contaminante e fornece uma abordagem importante para o mecanismo do processo (Chojnacka, 2005). Segundo (Volesky, 2001) a sorção um fenómeno rápido logo não é, em geral, limitante para a velocidade global dos processos de biossorção. A situação mais comum corresponde à transferência de massa intraparticular ser o passo limitante, controlando a velocidade de todo o processo de sorção, pelo que o tamanho das partículas e a sua estrutura são muito importantes para a biossorção.

Apesar de a adsorção de iões metálicos a sistemas de biomassa viva ser complexa e não estar completamente compreendida, é útil quantificar a sua cinética para melhor compreender os mecanismos envolvidos e comparar os efeitos dos vários factores ambientais (Gavrilescu, 2004). A análise de metais em células metabolicamente activas partilha alguns problemas técnicos e constrangimentos – a matriz é quimicamente complexa e pode variar significativamente em diferentes amostragens. A agravar esta situação, na análise de biomassa metabolicamente

activa, o conteúdo e distribuição de metais na biomassa varia significativamente ao longo do tempo. Isto é mais evidente quando se pretendem estudar os mecanismos de acumulação, efluxo a distribuição entre os diferentes componentes celulares – o transporte de metais pelos microrganismos vivos constitui a principal diferença relativamente a biomassa não viável (White e Gadd, 1995).

De acordo com Loukidou *et al.* (2004a) e (2004b) é comum que mais do que um fenómeno contribua simultaneamente para a performance do processo. Nestes casos, as extensas inter-relações entre as várias equações tornam o modelo de cinética global excessivamente complicado de aplicar. Os autores sugerem uma abordagem que permita simplificar este problema, assumindo que cada um dos processos domina sobre os outros em diferentes períodos do processo (tornando-se o passo limitante), estudando-os depois de forma independente. De entre os modelos cinéticos disponíveis, a escolha final deve recair sobre aquele que não só se ajusta melhor aos resultados experimentais, mas que também represente razoavelmente os fenómenos envolvidos (Loukidou *et al.*, 2004c).

Esta foi a abordagem seguida também neste trabalho. Os ensaios de acumulação de metal foram realizados em sistemas fechados bem agitados, para que o efeito da difusão externa possa ser considerado desprezável, e monitorizados durante o tempo necessário para atingir o estado estacionário, para depois ser avaliada a quantidade de metal acumulada ao longo do tempo. Os modelos cinéticos seleccionados para o ajuste aos resultados experimentais foram o modelo de Lagergren (equação 2.19) e o modelo de pseudo-segunda ordem (equação 2.26), que consideram a reacção química como o passo limitante, e o modelo de difusão intraparticular (equação 2.33).

5.2.1 Cinética de acumulação de Cr(III)

5.2.1.1 Cinética de acumulação de Cr(III) pela *Saccharomyces cerevisiae*

O sistema de bio-sorção em estudo consiste em misturas de suspensão de levedura, preparadas de acordo com o procedimento descrito em 4.1.1, com soluções sintéticas de Cr(III) a pH 5,00 ± 0,05, o valor óptimo para a acumulação de Cr(III) à *S. cerevisiae* (Ferraz e Teixeira, 1999). A este valor de pH, segundo o diagrama de especiação do Cr(III) apresentado na Figura 2.3, a espécie dominante é o ião $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, sendo negligenciável a presença de Cr^{3+} e $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$.

No decorrer dos ensaios o pH foi continuamente monitorizado, mas não ajustado, uma vez que se pretende avaliar o desempenho e o mecanismo de acumulação de uma biomassa viável, sendo expectável que ocorram fenómenos de efluxo de metabolitos e materiais intracelulares que interferem no pH do meio e na ligação a metais, numa situação semelhante à descrita por Marques *et al.* (2000), em que se verificou, nomeadamente, que esta situação beneficiou a capacidade de remoção de metais por rescaldos industriais de *S. cerevisiae*. Segundo Yun *et al.* (2001) estes ensaios representam o equilíbrio da acumulação de metal em função do pH final, ajudando a compreender a sua variabilidade com o pH. Uma vez que neste trabalho se pretende

desenvolver um sistema aberto para a biorremediação de águas contaminadas partindo de um inóculo de células viáveis, mas que não são suplementadas com fonte de carbono, podendo estar sujeitas a longos períodos de contacto com soluções metálicas, entendeu-se ser importante estudar o processo ao longo de vários dias de incubação.

A quantidade de metal acumulada (q) foi calculada de acordo com a equação 5.1, tendo por base o balanço mássico do sistema:

$$q = \frac{(C - C_i)V}{X} \quad \text{eq. (5.1)}$$

Onde C_i e C são, respectivamente, a concentração de metal em solução inicial e ao fim do tempo t (mg.L^{-1}), V é o volume de solução de metal (L), e X corresponde ao teor de sólidos totais da amostra (g).

O processo de bio-sorção de metais pesados pela *S. cerevisiae* é geralmente rápido. De uma forma geral a capacidade de bio-sorção e a eficiência de remoção aumenta com o tempo de contacto (Wang e Chen, 2006). Na Figura 5.1 e 5.2 apresentam-se, respectivamente, os resultados experimentais correspondentes à evolução da concentração e de acumulação de Cr(III) em solução ao longo do tempo, obtida para diferentes concentrações iniciais de metal. Dado que o sistema em estudo utiliza células viáveis, o tempo mínimo de monitorização foi de 96 h, de forma a garantir a avaliação de fenómenos activos mais lentos como a bioacumulação, que em ensaios curtos não teriam possibilidade de ser avaliados (Wang e Chen, 2006), e também para acompanhar o processo até que este atingisse o equilíbrio no que respeita ao pH e efluxo de catiões e materiais intracelulares.

É possível observar duas fases de equilíbrio da concentração de Cr(III) em solução: a primeira ocorre após 2 h para as duas concentrações iniciais mais baixas, e após 24 h para as restantes; a segunda, que só não se verifica no ensaio realizado a $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$, ocorre para tempos de incubação muito longos, cerca de 72 h para as concentrações iniciais de 25 e 50 mg.L^{-1} , e às 77 e 96 h para as concentrações iniciais de 100 e 200 mg.L^{-1} . A monitorização do pH revelou que as variações deste parâmetro verificadas até se atingir a primeira fase de equilíbrio foram em geral inferiores a 10 %, mas atingiram os 60 % após 96 h de incubação. A relação do pH na acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* será analisada com maior detalhe no Capítulo 6.

Vários autores descrevem a cinética de remoção de metais por biomassa microbiana como decorrendo em duas fases, sendo a primeira rápida, que pode envolver a adsorção física ou a troca iónica à superfície celular, e correspondendo a uma elevada percentagem de metal removido, e a segunda mais lenta, podendo durar horas ou dias, que pode envolver o transporte activo (dependente do metabolismo) dos metais através da membrana celular para o citoplasma e outros mecanismos de bio-sorção incluindo a microprecipitação, complexação, etc. (Donmez e Aksu, 2002). É desta forma que Zouboulis *et al.* (2004) interpretam a acumulação de Cr(VI) e Cd(II) a *Bacillus lateroporus* e *Bacillus licheniformis* em sistemas fechados.

Tal como mostra a Figura 5.2 a acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* observada na primeira fase também segue este padrão bifásico típico dos processos de acumulação de metais por biossorbentes, com uma fase inicial rápida, onde se verifica uma remoção de crómio, ao fim de 30 min de contacto, que varia entre 36, 37, 57, 74 e 94 % para as soluções de 200, 100, 50, 25 e 100 mg.L⁻¹, respectivamente, em relação à remoção total alcançada no final da primeira fase de equilíbrio, seguida de uma fase mais lenta.

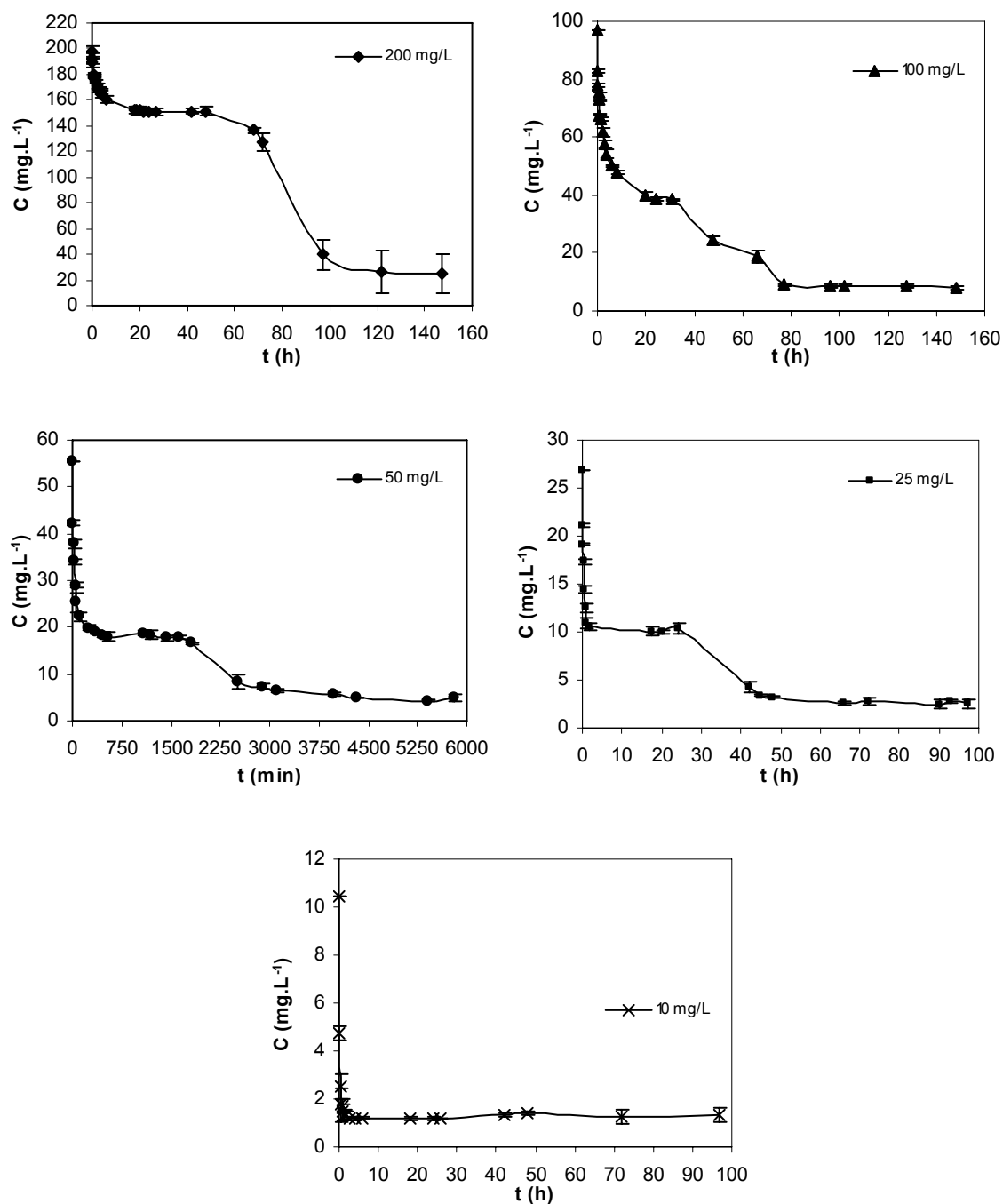


Figura 5.1 – Evolução da concentração de Cr(III) em solução ao longo do tempo de contacto com a suspensão de *S. cerevisiae*, para $C_i = 200, 100, 50, 25$ e 10 mg.L^{-1} .

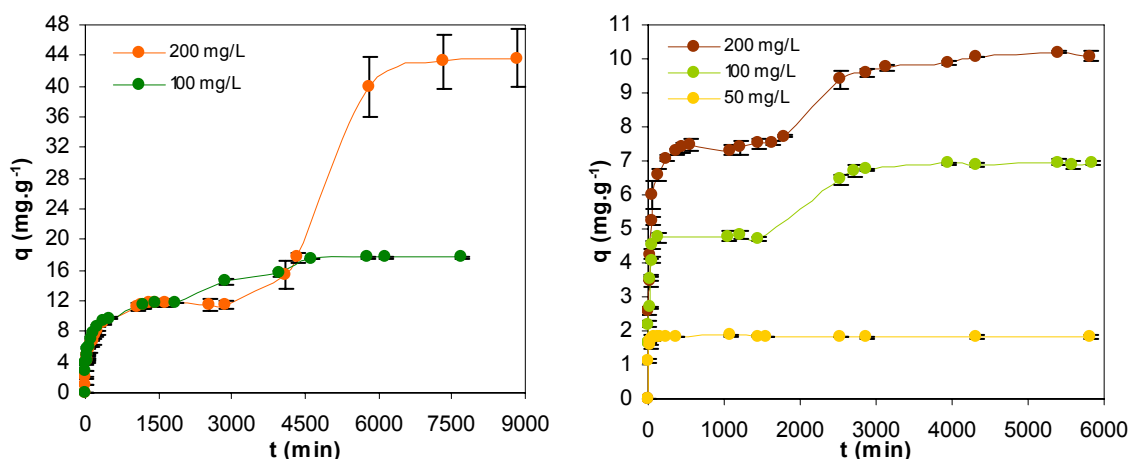


Figura 5.2 – Perfil de acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae*.

A biossorção de Pb a células vivas, em repouso e não viáveis do fungo *Phanerochaete chrysosporium* seguiu uma tendência similar, independente da concentração inicial de metal. Em todas as situações a acumulação aumentou rapidamente durante a primeira hora e permaneceu praticamente constante após 2 h de adsorção, sugerindo que a biossorção é rápida e atinge o equilíbrio ao fim de 2 h. Este comportamento indica que a sorção ocorre em duas fases: a primeira é a rápida ligação à superfície e a segunda é a lenta difusão intracelular, independente do metabolismo celular (Yetis *et al.*, 2000).

Também Goyal *et al.* (2003) verificaram que a remoção de Cr(VI) por células viáveis de *S. cerevisiae* decorreu em duas fases, a primeira delas foi rápida, atribuída pelos autores a adsorção física e troca iónica, e a segunda, correspondente à acumulação activa, foi muito mais lenta; o equilíbrio de adsorção ocorreu após 30-40 min, no final da fase rápida. A biossorção de Cr(III) pela alga castanha *Eklonia* ocorreu 95 % nas primeiras 12 h e atingiu o equilíbrio após 24 h (Yun *et al.*, 2001). A sorção de Cd(II) a *Chlorella vulgaris* é muito rápida nos primeiros 15 min de contacto, atingindo o equilíbrio ao fim de 60-120 minutos (Aksu, 2001).

O tempo atribuído à primeira fase de sorção passiva é geralmente muito curto, ocorrendo tipicamente entre 5 a 15 min depois do contacto sólido-líquido (Gavrilescu, 2004). Parvathi *et al.* (2007) verificaram que o tempo necessário para atingir o equilíbrio de sorção de Mn^{2+} à *S. cerevisiae* foi de 20 min, atribuindo o reduzido tempo de equilíbrio à elevada afinidade da superfície celular para o transporte de manganês. Na remoção de cádmio por células viáveis de *S. cerevisiae* recolhidas na fase exponencial de crescimento, Volesky *et al.* (1993) observaram uma remoção de 73% do metal em solução nos primeiros 3 minutos de contacto, e Palmieri *et al.* (2002) referem que nos primeiros 25 min se verificou 95 % da capacidade de biossorção total La^{2+} a *S. fluitans*.

A duração da segunda fase, sendo dependente do metabolismo, é mais dependente do estado de viabilidade celular havendo autores que relatam o estado de equilíbrio de adsorção de Cd^{2+} de soluções de 100 mg.L^{-1} a células não viáveis de duas estirpes de *S. cerevisiae* laboratoriais (ATCC 834 e ATCC 24858) após 1-2 horas de incubação, não havendo aumento considerável na quantidade de metal removida após 24 h, o que indica que não houve acumulação significativa de Cd na célula relacionada com o metabolismo (Park *et al.*, 2003). Chen e Wang (2007b) determinaram o tempo necessário para o equilíbrio de remoção de Cr^{3+} a células desidratadas de *S. cerevisiae* residuais de uma indústria cervejeira como sendo de 18 h, enquanto que para outros metais (Ag, Cs, Zn, Pb, Ni, Cu, Co, Sr, e Cd) foi de apenas 3h.

No que se refere à segunda fase de equilíbrio observada para tempos de contacto elevados, não existem disponíveis muitas referências que se possam utilizar como comparação, na medida em que na generalidade dos estudos de biossorção com biomassa microbiana o tempo dos ensaios raramente excede as 24 h. Marques (2002), que seguiu o perfil de biorremoção de Cu(II), Cd(II) e Pb(II) em soluções 1 mM por rescaldos de levedura provenientes da indústria cervejeira Centralcer ao longo de 96 h, registou a ocorrência de um comportamento de acumulação para todos os metais que também revela estabilizar após 24, mas que no caso do Cu^{2+} e do Cd^{2+} regista um aumento acentuado para longos tempos de contacto estabilizando após 96 de incubação. Esta situação foi explicada pelo papel dos componentes intracelulares libertados para o meio na remoção dos metais.

5.2.1.2 Cinética de acumulação de Cr(III) pelas drêches

O estudo de acumulação de Cr(III) às drêches incluiu a realização de ensaios ao material lavado com água, para remover resíduos de produtos da fermentação, e submetido a um tratamento alcalino com NaOH, uma vez que Low *et al.* (2000) conseguiram aumentar a capacidade de biossorção de Pb(II) e Cd(II) por este biomaterial pela aplicação de um tratamento idêntico. A designação abreviada dos materiais adoptada é de DST (Drêches Sem Tratamento) e DCT (Drêches Com Tratamento).

De acordo com Macheiner *et al.* (2003) a adição de alcális às drêches é responsável pelo inchamento cristalino da celulose, em resultado da quebra das pontes de hidrogénio das moléculas de glucose adjacentes na matriz de celulose, formando um material de baixa densidade. Os reagentes alcalinos diluídos ainda podem solubilizar algumas hemiceluloses, e.g. polissacáridos com um esqueleto de xilano com ligações β -1,4 e galactoglucomanos. Os glucomanos são insolúveis nestas condições.

Havendo uma forte dependência entre o pH da solução e a sorção de metais (Mack *et al.*, 2007), a fase inicial do estudo de biossorção de Cr(III) pelas drêches consistiu na determinação do pH óptimo de sorção deste sistema. Os resultados de acumulação de metal obtidos após 24 h de contacto com soluções de concentração inicial de Cr(III) de 50 e 100 mg.L^{-1} estão representados

na Figura 5.3. A gama de pH utilizada neste estudo foi entre 3,0 e 5,0, na qual o Cr(III) não precipita (Yun *et al.*, 2001).

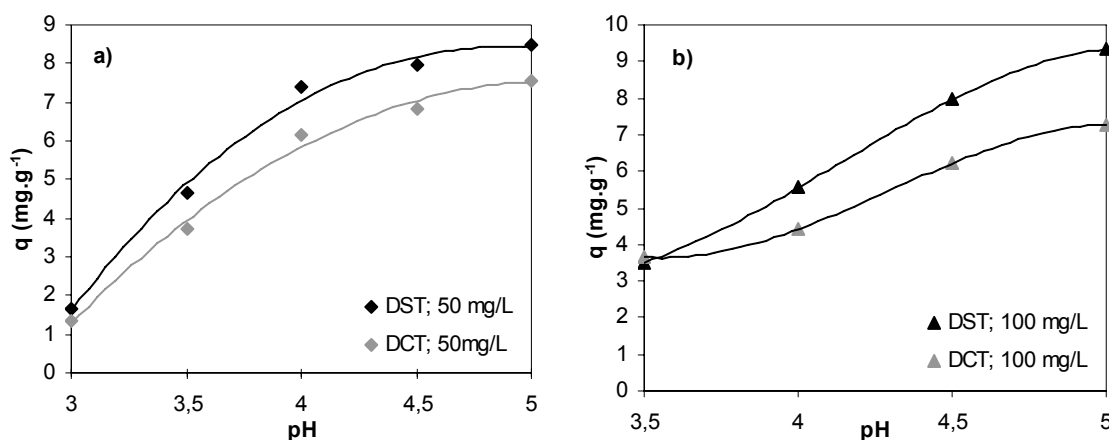


Figura 5.3 – Efeito do pH do meio na capacidade de acumulação de Cr(III) pelas drêches ($X = 5 \text{ g.L}^{-1}$). a) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$.

Para ambos os biossorbentes e concentrações iniciais de metal, verifica-se um aumento da capacidade de biossorção de Cr(III) com o aumento do pH da solução aquosa, atingindo o máximo a pH 5,0. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que geralmente a tendência é para que o aumento do pH seja acompanhado do aumento da capacidade de sorção da biomassa (Cossich *et al.*, 2004; Puranik e Paknikar, 1997).

O valor de pH óptimo determinado é o mesmo do sistema Cr(III)-suspensão de *S.cerevisiae*, e está em concordância com os resultados referidos por vários autores para este metal noutros sistemas de biorremediação. Bishnoi *et al.* (2007) também verificaram que o pH óptimo para a biossorção de Cr(III) à alga *Spirogyra* spp. é de 5,0. Mapolelo e Torto (2004) concluíram que a capacidade de biossorção de Cd(II), Cr(III), Cr(VI), Cu(II), Pb(II) e Zn(II) é dependente do pH, sendo o valor óptimo para o Cr(III) de 5,2. E Gardea-Torresdey *et al.* (2002) referem a gama de pH entre 5,0 e 6,0 como sendo a óptima para a ligação de Cr(III) a alfafa.

Low *et al.* (2000) afirmam não haver melhoria na sorção de Cd(II) e Pb(II) por drêches tratadas com NaOH 0,1 M para valores de pH do meio superiores a 4, mas verificaram uma diminuição da capacidade de acumulação de metais pelas drêches a pH inferior a 3,5. O efeito do pH na adsorção está relacionado com as condições iónicas dos grupos funcionais do biossorbente e a especiação e disponibilidade dos elementos metálicos em solução, particularmente as propriedades relacionadas com as suas reacções hidrolíticas (Kefala *et al.*, 1999). A pH baixo os ligandos da superfície dos biossorbentes sofrem um elevado grau de protonação, resultando numa carga global positiva (Mack *et al.*, 2007), situação que se inverte para valores de pH acima do ponto isoeléctrico.

O aumento da capacidade de remoção de metal a valores de pH mais elevados pode ser explicada: i) pela diminuição da protonação dos sítios de ligação, o que se reflecte numa maior carga negativa da superfície da biomassa, que por sua vez intensifica as forças electrostáticas envolvidas no processo de adsorção aumentando a quantidade de iões metálicos ligados; ii) o número total de sítios de ligação negativos disponíveis para a ligação a metais aumenta; iii) devido à menor concentração de protões livres em solução a competição entre protões e catiões metálicos diminui, facilitando a ligação dos metais (Kogej e Pavko, 2001).

Uma vez que os grupos funcionais mais relevantes na ligação a metais (carboxílicos, sulfonatos, fosfatos e amino) têm, de acordo com os valores apresentados na Tabela 2.2, pK_a inferior a 5, é de esperar que em soluções de pH desta ordem de grandeza se encontrem na forma aniónica. A extensão da dissociação destes grupos aumenta com o pH, resultando em mais sítios livres para a biossorção (Palmieri *et al.*, 2002). A eliminação de efeitos de repulsão também permite a ocorrência de interações electrostáticas entre as espécies catiónicas e a superfície da biomassa. Pelo contrário, a pH baixo estes sítios de ligação encontram-se ocupados por protões, dificultando a sua ligação ao crómio (Yun *et al.*, 2001). Nos ensaios subsequentes, com respeito ao estudo cinético e de equilíbrio de Cr(III) às drêches, o pH das soluções de metal foi ajustado a 5,0 e monitorizado ao longo do processo. Os resultados obtidos para a evolução da concentração e acumulação de Cr(III) nas drêches são apresentados respectivamente nas Figuras 5.4 e 5.5.

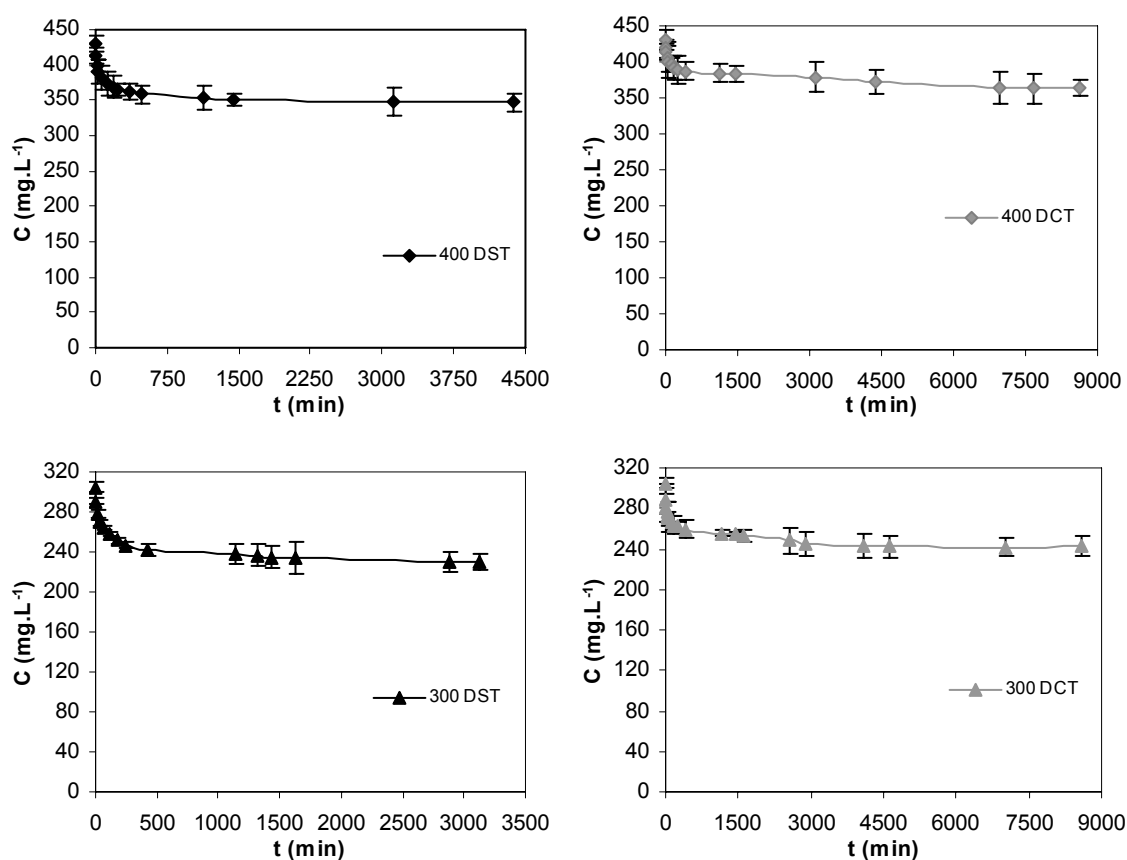


Figura 5.4 - Evolução da concentração de Cr(III) em solução ao longo do tempo de contacto com DST e DCT, para $C_i = 400, 300, 200, 100, 50$ e 25 mg.L⁻¹.

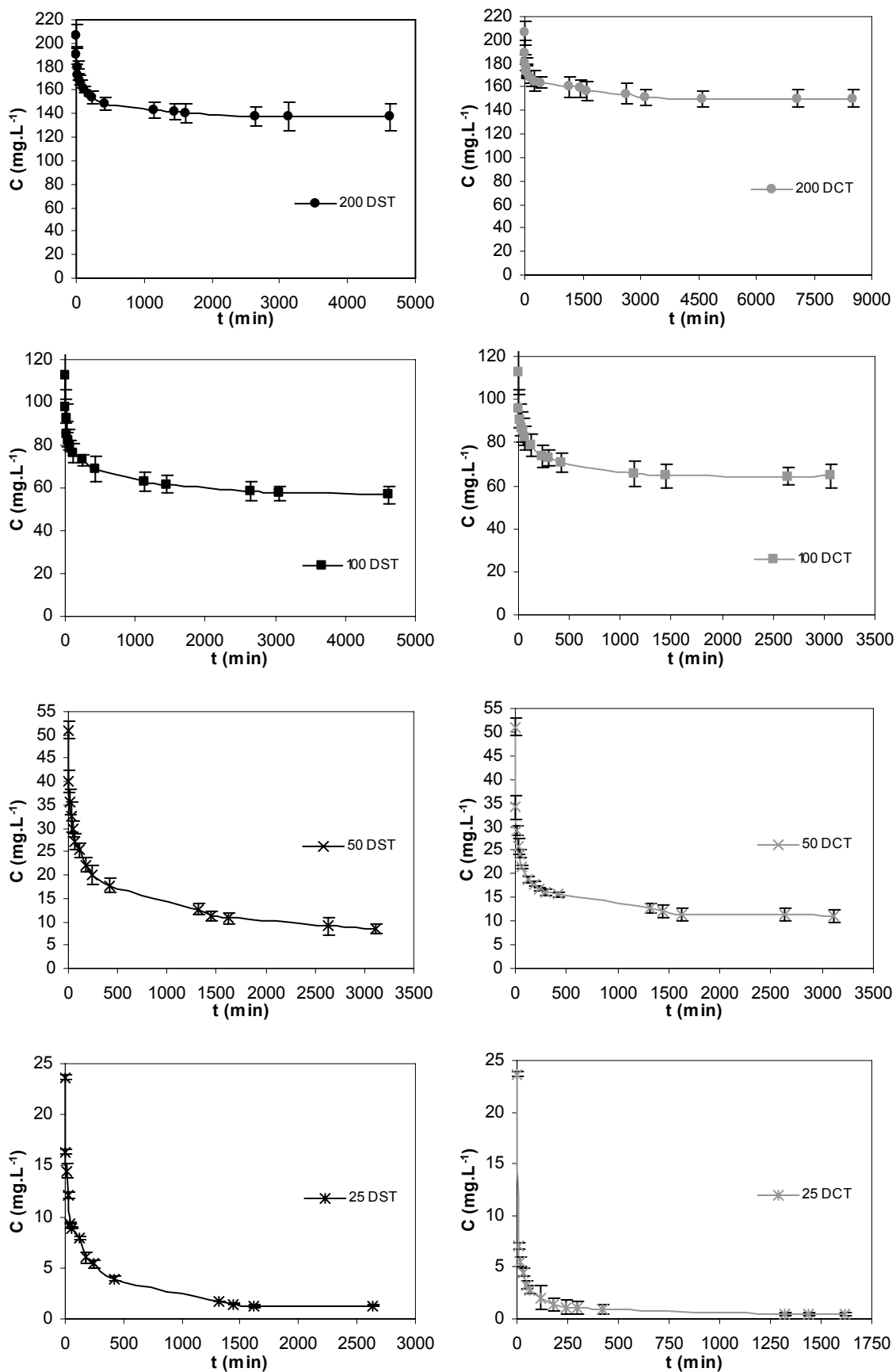


Figura 5.4 (continuação) – Evolução da concentração de Cr(III) em solução ao longo do tempo de contacto com DST e DCT, para $C_i = 400, 300, 200, 100, 50$ e 25 mg.L⁻¹.

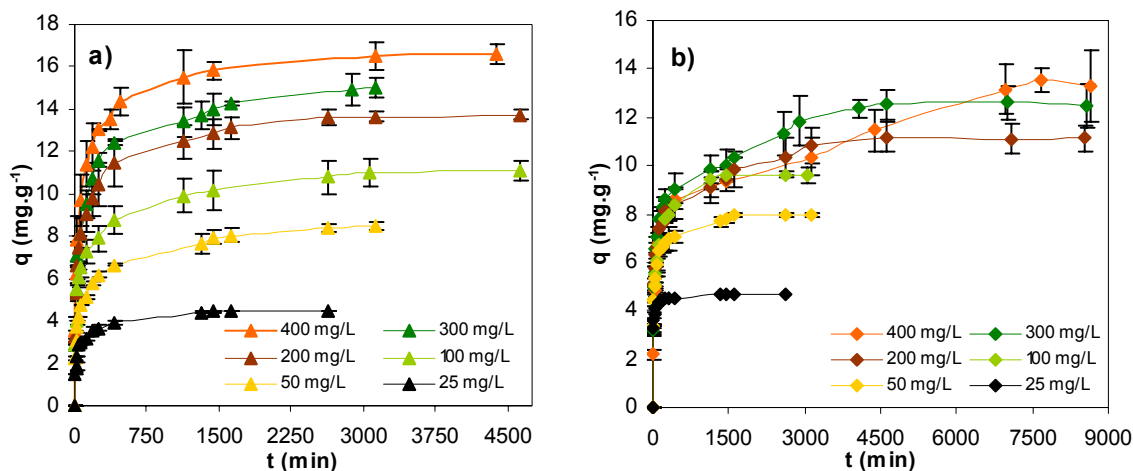


Figura 5.5 – Perfil de acumulação de Cr(III) pelas drêches: a) DST; b) DCT.

O perfil de concentração de Cr(III) observado também revela um comportamento típico de sistemas de bio-sorção, com uma acumulação de metal inicial rápida, seguida de uma mais lenta até atingir o equilíbrio que ocorre, para as drêches sem tratamento após 27 h ($C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$) a 52 h para as restantes concentrações iniciais, e para as drêches submetidas a tratamento alcalino, após 24 h de contacto para $C_i = 25, 50$ e 100 mg.L^{-1} , 77 h para $C_i = 200$ e 300 mg.L^{-1} , e apenas depois de 128 h de contacto para a solução de 400 mg.L^{-1} . Esta segunda fase de bio-sorção mais lenta deve estar associada a limitações difusionais que passam a governar a velocidade global do processo.

É ainda possível verificar que tanto para a *S. cerevisiae* (Figura 5.2) como para as drêches a quantidade de metal acumulada aumenta com o aumento da concentração inicial de metal, de acordo com o expectável. A acumulação de metais aumenta com o aumento da concentração inicial se a concentração de biomassa for mantida constante (Wang e Chen, 2006). A concentração inicial de metal contribui como uma importante força motriz para ultrapassar todas as resistências à transferência de massa do metal entre a fase sólida e a fase líquida (Gulnaz *et al.*, 2005), traduzindo-se num aumento da bio-sorção (Aksu, 2002; Donmez e Aksu, 2002). Os autores demonstram este efeito pelo valor de Cu(II) acumulado a *Cladophora crispata* (q_e) calculado para as diferentes concentrações iniciais de metal, verificando que este valor aumenta com o aumento de C_i . Segundo Loukidou *et al.* (2004c) a capacidade de adsorção de Cr(VI) a *Aeromonas caviae* é largamente melhorada quando a concentração inicial de metal aumenta, sendo o efeito mais marcante do que com qualquer outro parâmetro.

5.2.1.3 Ajuste ao modelo de difusão intraparticular

Apesar de vários factores poderem afectar a sorção, o tempo de contacto, o pH, a temperatura, a concentração de sorvente, a natureza do soluto e a sua concentração, o modelo cinético é definido apenas com base no efeito dos parâmetros observáveis na velocidade global. Estes incluem a concentração inicial de metal, a temperatura, a dose de sorvente e a natureza do soluto (Ho e Mckay, 2000).

A cinética de adsorção lida com a velocidade a que a sorção ocorre, sendo a velocidade definida pela variação de uma determinada quantidade de sorbato que é adsorvida por unidade de tempo. A ordem da reacção, que na lógica das reacções químicas está directamente relacionada com os mecanismos da reacção (van Hullebusch *et al.*, 2004), e a sua velocidade têm de ser calculadas com base em ensaios experimentais (Ho, 2004b). Uma vez que nos ensaios realizados com a levedura a concentrações iniciais de metal mais elevadas, e em particular nos ensaios realizados com as drêches para toda a gama de concentrações, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é ≥ 24 h, é de esperar um papel importante da difusão intraparticular na definição da velocidade global da sorção de Cr(III). Assim, começou-se por fazer o ajuste dos resultados experimentais ao modelo de difusão intraparticular apresentado na equação (2.33) para avaliar o seu contributo na velocidade de sorção.

Na Figura 5.6 apresentam-se os resultados experimentais para os três biossorventes em estudo. O ajuste foi realizado considerando os valores experimentais obtidos até ser atingido o equilíbrio, e no caso da *S. cerevisiae* apenas foi considerada a primeira fase de equilíbrio pelo facto de não ser expectável que a acumulação que ocorre para os tempos de contacto mais elevados tenha a mesma natureza daquela que ocorre até às 24 h, onde se prevê que ocorra a quimiossorção às paredes das leveduras.

A Figura 5.6 evidencia que a representação gráfica de q vs. $t^{0.5}$ dá origem a curvas com uma natureza dupla que revela, numa fase inicial, um declive mais acentuado indicando uma cinética mais rápida, e posteriormente uma recta de menor declive. A mesma tendência foi observada por Taty-Costodes *et al.* (2003) na sorção de Cd(II) e Pb(II) a serrim de *Pinus sylvestris* para as diferentes concentrações iniciais de metal, Keskinan *et al.* (2004) na adsorção de Pb(II), Cu(II) e Zn(II) a *Ceratophyllum demersum*, uma planta aquática, Singh *et al.* (2001) na sorção de Ni(II) e Cr(VI) à cianobactéria *Microcystis* e por Ho *et al.* (1996) na sorção de Ni(II) e Cu(II) a turfa. Segundo os autores este comportamento indica que existe mais do que um fenómeno de difusão a afectar o processo, representando a parte inicial da curva a difusão no filme, e a secção linear subsequente a difusão intraparticular.

Comparando a fase do processo em que a difusão intraparticular começa e ser significativa com um parâmetro adimensional α destinado a definir um grau de conversão para o processo, normalizando a concentração de metal em solução no tempo t , C_t , em relação a valores de referência (C_i e C_e), definido pela equação (5.2) (Loukidou *et al.*, 2004b), constata-se que esta fase ocorre para valores de α superiores a 0,601, 0,659 e 0,672 para a *S. cerevisiae*, DST e DCT respectivamente.

$$\alpha = \frac{C_i - C_t}{C_i - C_e} \quad \text{eq. (5.2)}$$

Desta forma identifica-se uma sensibilidade da acumulação de Cr(III) pela levedura à difusão intraparticular para graus de conversão mais baixos.

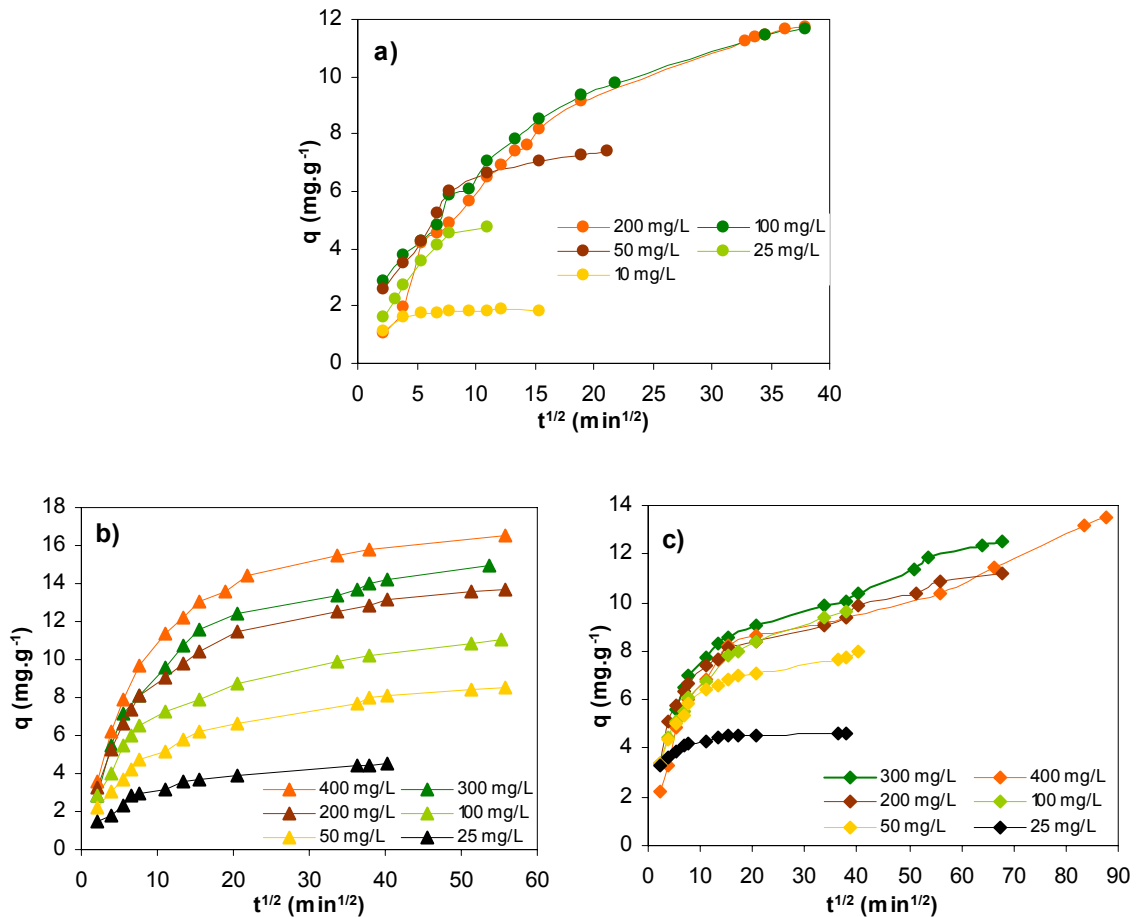


Figura 5.6 – Ajuste dos resultados experimentais ao modelo cinético de difusão intraparticular: a) *S. cerevisiae*; b) DST; c) DCT.

A partir do declive da recta equivalente à fase mais lenta da acumulação de metal foi possível calcular as constantes de difusão intraparticular, k_d , cujos valores são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Constantes de difusão intraparticular calculadas para os sistemas de sorção de Cr(III) a *S. cerevisiae*, DST e DCT.

C_i (mg.L ⁻¹)	Biossorvente					
	<i>S. cerevisiae</i>		DST		DCT	
	k_d (mg.g ⁻¹ .min ^{-1/2})	r^2	k_d (mg.g ⁻¹ .min ^{-1/2})	r^2	k_d (mg.g ⁻¹ .min ^{-1/2})	r^2
400	-	-	0,0857	0,8930	0,0832	0,9862
300	-	-	0,0730	0,9719	0,0781	0,9842
200	0,175	0,9826	0,0634	0,9559	0,0621	0,9806
100	0,136	0,9848	0,0816	0,9430	0,0804	0,9905
50	0,0699	0,9648	0,0643	0,9918	0,0415	0,9925
25	0,0021	0,9307	0,0342	0,9733	0,00672	0,9576
10	0,0186	0,8932	-	-	-	-

É possível verificar que a difusão intraparticular assume um papel semelhante nas DST e DCT para as concentrações iniciais a partir de 100 mg.L⁻¹, e que para os três biossorventes, mas sobretudo na *S. cerevisiae*, se observa a tendência de os valores de k_d aumentarem com o aumento da concentração inicial de Cr(III), o que vem de encontro ao esperado pois demonstra que o contributo da difusão intraparticular é mais significativo.

Singh *et al.* (2001) também verificaram que o aumento da concentração inicial de Ni(II) resultou no aumento da constante de difusão intraparticular, explicando os resultados pela equação 5.3:

$$K_d = C_i^n \quad \text{eq. (5.3)}$$

que descreve o aumento de k_d como o aumento de C_i , e onde n assume o valor 0,5 quando a difusão intraparticular é a etapa limitante da sorção.

O facto de este fenómeno ser particularmente significativo para as concentrações mais elevadas de metal no sistema de sorção com a levedura pode estar relacionado com a formação de flocos, que se reflecte num atraso da penetração de metal até ao seu interior. Para além disso, a possibilidade de estar envolvida a acumulação intracelular de Cr(III) pela *S. cerevisiae* reforça o maior peso da difusão intraparticular no processo pois requer a difusão do metal através da parede e da membrana citoplasmática que pode necessitar de um mecanismo de transporte específico. Os baixos valores de k_d registados para as soluções de $C_i = 10$ e 25 mg.L⁻¹ podem dever-se ao facto de, estando ainda longe da saturação e havendo ainda um grande número de sítios de ligação disponíveis, a quimiossorção ser o mecanismo mais relevante para o processo de acumulação de metal, e também porque se verificou que nestas soluções, tal como se verificou para a suspensão de levedura em água preparadas nas mesmas condições, há uma tendência gradual para a desfloculação.

Na tentativa de explicar o facto de a cinética de acumulação de metais à alga *Spirulina* sp. viva ser mais lenta do que a da mesma alga não viável, Doshi *et al.* (2007) abordam como explicação a existência de bioacumulação nas células viáveis, que para além de contribuir para uma maior capacidade de acumulação de metais por parte destas algas envolve a difusão do metal da superfície da célula para a membrana citoplasmática através de um sistema de transporte que envolve enzimas, pelo que a difusão através das diferentes camadas que constituem o exterior da célula controlam o processo de adsorção.

No entanto em nenhum dos sistemas em estudo se verificou o caso de estas rectas passar na origem, o que de acordo com Singh *et al.* (2006) e Unlu e Ersoz (2006) indica que a difusão não é o único passo limitante envolvido no processo de sorção. Desta forma, e sendo já expectável o envolvimento de mais do que um fenómeno da definição da velocidade global da sorção, os resultados experimentais foram ainda ajustados a modelos que consideram a reacção química na definição da sua cinética.

5.2.1.4 Ajuste a modelos de reacção química

Dada a importância que os grupos funcionais da superfície dos biossorbentes têm na biossorção, já abordada e desenvolvida no capítulo 2, é de esperar que as reacções químicas como a troca iónica e a formação de ligações covalentes entre os iões de crómio e a *S. cerevisiae*, DST e DCT assumam papel determinante na velocidade global de sorção, justificando-se a tentativa de ajuste dos resultados experimentais a modelos cinéticos que assumem a reacção química como sendo a etapa limitante do processo. De entre estes modelos, os mais frequentemente utilizados são o modelo de pseudo-primeira ordem (Lagergren) e pseudo-segunda ordem (Chojnacka, 2005). Este último baseia-se no pressuposto de que a sorção química envolvendo a partilha ou troca de electrões entre o sorvente e o sorbato é o passo limitante da velocidade do processo (Ho *et al.*, 2001).

Ho e Mckay (2000) com o objectivo de apresentarem o modelo que representa a sorção de metais divalentes a turfa assumiram que o processo segue uma reacção de pseudo-segunda ordem. Para desenvolver este modelo os autores afirmam que é necessário assumir que o processo segue a equação de Langmuir pelo facto de: i) se formar uma monocamada de metal à superfície do sorvente; ii) a energia de sorção para cada ião é igual e é independente da percentagem de cobertura da superfície; iii) a sorção ocorre só em sítios localizados e não envolve interacções entre os iões; iv) a velocidade de sorção é quase negligenciável em comparação com a velocidade inicial de sorção. Os autores ainda afirmam que a velocidade da reacção de pseudo-segunda ordem pode depender da quantidade de metal na superfície do sorvente e da quantidade de metal sorvido no equilíbrio (que pode ser função da temperatura, da concentração inicial de metal, da dose de sorvente, e da natureza da interacção soluto-sorvente).

Os valores dos parâmetros cinéticos calculados com base no ajuste dos modelos cinéticos de Lagergren e pseudo-segunda ordem aos valores experimentais (considerados até ao equilíbrio),

nomeadamente das constantes cinéticas (k_1 e k_2), os coeficientes de correlação do ajuste, a quantidade de metal acumulado no equilíbrio (valores experimentais e calculados), e os desvios percentuais da quantidade de metal retida pelo bioissorvente para o ajuste do modelo de pseudo-segunda ordem (calculados de acordo com a equação (5.3)) são apresentados na Tabela 5.4.

$$\Delta q(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(q_{t,exp} - q_{t,calc}) / q_{t,exp}]^2}{n-1}} \quad \text{eq. (5.4)}$$

com n representando o número de pontos, $q_{t,calc}$ a quantidade de metal retida pelo bioissorvente calculada para o tempo t (mg.g^{-1}), e $q_{t,exp}$ a quantidade de metal retida pelo bioissorvente ao fim do tempo t obtida experimentalmente (mg.g^{-1}).

Conforme é possível verificar por comparação dos coeficientes de correlação de ambos os modelos, é o modelo cinético de pseudo-segunda ordem que melhor ajusta os resultados experimentais para os três bioissorventes em estudo. Ainda é possível constatar que a quantidade de Cr(III) acumulada calculada por este modelo também se aproxima muito do valor experimental. No entanto o desvio entre os valores de acumulação de metal ao longo do tempo obtidos experimentalmente, e os calculados assumem valores entre os 22 e os 28,7 % para as drêches sem tratamento, entre 13 e 43,7 % para as drêches com tratamento, e para a *S. cerevisiae* os valores mais relevantes verificam-se às concentrações iniciais de 100 e 200 mg.L^{-1} , correspondendo a 25,2 e 15,3 % respectivamente. Estes desvios devem-se essencialmente às diferenças entre os valores teóricos e experimentais relativos ao período inicial do processo, verificando-se que para tempos de contacto mais longos os valores se aproximam bastante, sendo inclusivamente as previsões dos valores de metal acumulado no equilíbrio, muito próximos dos reais.

Na sorção de Cd(II) e Pb(II) por drêches submetidas a um tratamento alcalino, Low *et al.* (2000) verificaram que o equilíbrio foi atingido em menos de 2 h, e que a aplicação do modelo cinético de pseudo-segunda ordem ajusta bem a sorção de ambos os metais. O mesmo se verifica em vários outros estudos que comparam a aplicabilidade de vários modelos cinéticos em sistemas de bioissorção.

Aksu (2001) verificou que a alga *Chlorella vulgaris* adsorve grandes quantidades de Cd(II) nos primeiros 15 min de contacto, atingindo o equilíbrio após 60-120 minutos, e ajustou os modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem aos resultados experimentais para a $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ a várias temperaturas. Para o modelo de pseudo-primeira ordem verificaram que os valores experimentais se desviaram consideravelmente dos teóricos a partir dos 60 min, e os valores do coeficiente de correlação para todas as temperaturas foi baixo, concluindo que este modelo cinético não se ajusta a este sistema de bioissorção. Aplicando o modelo de cinética de pseudo-segunda ordem obtiveram bons coeficientes de correlação para toda a gama de temperaturas ($> 0,998$) e valores de q_e teóricos próximos dos experimentais, assumindo que este modelo cinético dá uma boa correlação aos dados experimentais.

Tabela 5.2 - Parâmetros calculados para o ajuste dos modelos cinéticos de Lagergren e pseudo-segunda ordem aos valores experimentais de acumulação de Cr(III) a DST, DCT e *S. cerevisiae*, até ao equilíbrio.

Biossorvente	C_i (mg.L ⁻¹)	Modelo								$q_{e,exp}$ (mg.g ⁻¹)	Δq (%)
		Lagergren				Pseudo-segunda ordem					
		K_1 (min ⁻¹)	$q_{e,calc}$ (mg.g ⁻¹)	r^2	K_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	h (mg.g ⁻¹ .min ⁻¹)	$q_{e,calc}$ (mg.g ⁻¹)	r^2			
<i>S. cerevisiae</i>	200	3,07x10 ⁻³	8,38	0,9595	8,24x10 ⁻⁴	0,126	12,36	0,9981	11,71	15,3	
	100	2,97x10 ⁻³	7,42	0,9886	1,27x10 ⁻³	0,176	11,79	0,9932	11,67	25,2	
	50	3,02x10 ⁻³	1,62	0,5512	8,70x10 ⁻³	0,493	7,53	0,9998	7,50	10,6	
	25	4,02x10 ⁻³	1,01	0,5903	2,40x10 ⁻²	0,562	4,84	0,9999	4,75	9,4	
	10	5,21x10 ⁻²	0,65	0,9736	1,87x10 ⁻¹	0,654	1,87	0,9999	1,82	2,1	
Drêches sem tratamento (DST)	400	1,85x10 ⁻³	7,52	0,8951	1,12x10 ⁻³	0,309	16,64	0,9903	16,49	23,7	
	300	1,49x10 ⁻³	7,51	0,9564	9,62x10 ⁻⁴	0,219	15,07	0,9985	15,01	25,3	
	200	1,79x10 ⁻³	6,89	0,9577	1,28x10 ⁻³	0,242	13,75	0,9991	13,65	24,6	
	100	1,29x10 ⁻³	5,30	0,9591	1,52x10 ⁻³	0,184	11,02	0,9985	11,01	28,7	
	50	1,43x10 ⁻³	4,40	0,9733	1,70x10 ⁻³	0,124	8,54	0,9984	8,50	27,6	
	25	2,72x10 ⁻³	2,02	0,9705	5,91x10 ⁻³	0,122	4,54	0,9993	4,47	22,1	
Drêches com tratamento (DCT)	400	3,92x10 ⁻⁴	7,84	0,9114	3,22x10 ⁻⁴	0,0562	13,22	0,9875	13,54	43,7	
	300	7,98x10 ⁻⁴	6,39	0,9454	6,93x10 ⁻⁴	0,106	12,38	0,9939	12,52	36,6	
	200	7,99x10 ⁻⁴	4,98	0,9315	1,01x10 ⁻³	0,124	11,04	0,9959	11,36	35,6	
	100	2,90x10 ⁻³	4,58	0,9698	2,60x10 ⁻³	0,246	9,74	0,9983	9,61	25,9	
	50	1,89x10 ⁻³	2,49	0,8930	4,72x10 ⁻³	0,298	7,94	0,9993	7,95	21,6	
	25	3,59x10 ⁻³	0,61	0,8871	3,09x10 ⁻²	0,671	4,66	1,0000	4,64	13,0	

Da mesma forma, Ho *et al.* (2004) no estudo de sorção de Pb(II) a fetos de árvore, Benguella e Benaissa (2002) no estudo de sorção de Cd(II) a quitina, Chojnacka (2005) no estudo de sorção de Cr(III) a cascas de ovos, Unlu e Ersoz (2006) no estudo de sorção de Cu(II), Pb(II) e Cd(II) a esporos de *L. clavatum*, Taty-Costodes *et al.* (2003) no estudo de sorção de Cd(II), e Pb(II) a serrim de *Pinus sylvestris*, e van Hullebusch *et al.* (2004) no estudo de sorção de Co(II) e Ni(II) a grânulos anaeróbios, ao confrontarem o ajuste dos dois modelos cinéticos aos resultados experimentais concluíram que os sistemas de biossorção seguem a cinética de pseudo-segunda ordem. Doshi *et al.* (2007) estudaram a cinética de sorção Cr(III), Cr(VI), Cu(II) e Ni(II) a *Spirulina* sp. viável e não viável e verificaram que no primeiro caso o modelo de pseudo-segunda ordem foi o que melhor descreveu os resultados experimentais, enquanto que com a biomassa não viável

isso só ocorreu para o Cr(VI), sendo os resultados experimentais de sorção de Cr(III), Cu(II) e Ni(II) melhor ajustados pelo modelo de pseudo-primeira ordem.

Donmez e Aksu (2002) ajustaram os resultados experimentais da biossorção de Cr(VI) a duas estirpes da microalga *Dunaliella* ao modelo cinético de pseudo-segunda ordem, verificando que os elevados coeficientes de correlação obtidos e o ajuste adequado entre os valores de q_e calculados e os obtidos experimentalmente indicam uma boa aplicabilidade deste modelo. Da mesma forma Ho *et al.* (2001), Ho *et al.* (2004), e Ozer *et al.* (2004) verificaram que os resultados experimentais de acumulação de Pb(II) a fetos de árvore e a turfa, e Cu(II) a *Cladophora crispata* são bem descritos por este modelo.

Na generalidade dos estudos anteriormente citados, o tempo necessário para ser atingido o equilíbrio é consideravelmente inferior ao do presente trabalho, variando de 20 min (Doshi *et al.*, 2007) para uma concentração inicial de metais de cerca de 20 mg.L⁻¹, a 6-7 h (Benguella e Benaissa, 2002) para C_i até 200 mg.L⁻¹, pelo que não é de esperar um contributo tão significativo da difusão intraparticular e logo uma cinética melhor descrita por um modelo que considera a reacção química a etapa limitante. Já no caso do estudo da sorção de Cr(VI) e Cu(II) a quitina, quitosano e *Rhizopus arrhizus* realizado por Sag e Aktay (2002) o tempo necessário ao equilíbrio das soluções mais concentradas de Cr(VI) e Cu(II), até 250 e 180 mg.L⁻¹ respectivamente, foi de 24 h. Verifica-se que o ajuste pelo modelo de pseudo-segunda ordem também apresenta desvios em relação aos pontos experimentais mais significativos para os tempos de contacto mais baixos. No entanto esses desvios não foram contabilizados e os autores concluem, que da comparação dos modelos de pseudo-primeira ordem, primeira ordem (Bhattacharya e Venkobachar), pseudo-segunda ordem e Elovich, é o modelo de pseudo-segunda ordem que melhor descreve os resultados experimentais.

O facto de o ajuste pelo modelo de pseudo-segunda ordem atribuir um maior peso aos valores de tempo de contacto mais elevados, e uma vez que já foi anteriormente verificado o envolvimento da difusão intraparticular na acumulação de Cr(III) à *S. cerevisiae*, DST e DCT, em especial para as concentrações iniciais mais elevadas, e sendo de esperar que o seu contributo para a velocidade global do processo seja precisamente para os tempos de contacto mais longos, realizou-se um novo ajuste aos resultados experimentais por ambos os modelos considerando agora apenas os pontos iniciais, correspondentes à primeira porção linear das curvas de difusão apresentadas na Figura 5.6. Os tempos de contacto considerados variam entre 120 e os 420 min para as drêches, e entre os 60 e os 180 min para a *S. cerevisiae*, dependendo da concentração inicial de metal. Sendo frequentemente referido que o modelo de Lagergren se ajusta melhor aos pontos experimentais para o período inicial da sorção, adoptou-se o mesmo procedimento para este modelo na tentativa de verificar se desta forma os resultados são melhor descritos por este modelo comparativamente ao de pseudo-segunda ordem. Os parâmetros calculados estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Parâmetros calculados para o ajuste dos modelos cinéticos de Lagergren e pseudo-segunda ordem aos valores experimentais de acumulação de Cr(III) a DST, DCT e *S. cerevisiae*, correspondentes à primeira fase linear da curva de difusão.

Biossorvente	C_i (mg.L ⁻¹)	Modelo								$q_{e,exp}$ (mg.g ⁻¹)	Δq (%)
		Lagergren				Pseudo-segunda ordem					
		K_1 (min ⁻¹)	$q_{e,calc}$ (mg.g ⁻¹)	r^2	K_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	h (mg.g ⁻¹ .min ⁻¹)	$q_{e,calc}$ (mg.g ⁻¹)	r^2			
<i>S. cerevisiae</i>	200	5,18x10 ⁻³	9,77	0,9214	2,77x10 ⁻³	0,208	8,67	0,9849	11,71	9,5	
	100	4,67x10 ⁻³	8,44	0,9703	4,84x10 ⁻³	0,348	8,49	0,9767	11,67	20,9	
	50 ^{a)}	2,11x10 ⁻²	5,64	0,9863	1,09x10 ⁻²	0,526	6,94	0,9631	7,50	15,7	
	25	4,29x10 ⁻²	4,15	0,9811	1,25x10 ⁻²	0,379	5,50	0,9921	4,75	7,0	
	10 ^{b)}	5,21x10 ⁻²	0,65	0,9736	1,87x10 ⁻¹	0,654	1,87	0,9999	1,82	2,1	
Drêches sem tratamento (DST)	400	5,15x10 ⁻³	10,76	0,9280	3,47x10 ⁻³	0,665	13,84	0,9972	16,49	10,9	
	300	4,79x10 ⁻³	10,18	0,9416	3,55x10 ⁻³	0,533	12,26	0,9932	15,01	11,0	
	200	4,40x10 ⁻³	8,43	0,9001	4,85x10 ⁻³	0,584	10,97	0,9966	13,65	11,7	
	100	1,10x10 ⁻²	8,24	0,9651	1,20x10 ⁻²	0,695	7,60	0,9912	11,01	10,1	
	50	5,15x10 ⁻³	5,76	0,8507	1,53x10 ⁻²	0,475	5,57	0,9954	8,50	11,9	
	25	7,11x10 ⁻³	2,71	0,8027	2,76x10 ⁻²	0,325	3,43	0,9954	4,47	12,6	
Drêches com tratamento (DCT)	400	1,93x10 ⁻³	9,40	0,8049	3,97x10 ⁻³	0,329	9,10	0,9974	13,54	14,4	
	300	3,98x10 ⁻³	7,93	0,8443	8,47x10 ⁻³	0,653	8,78	0,9976	12,52	11,3	
	200	3,95x10 ⁻³	6,43	0,8055	1,22x10 ⁻²	0,791	8,04	0,9990	11,18	9,1	
	100	6,40x10 ⁻³	5,72	0,9101	1,40x10 ⁻²	0,723	7,18	0,9948	9,61	13,4	
	50	6,67x10 ⁻³	3,76	0,8836	1,51x10 ⁻²	0,724	6,93	0,9983	7,95	12,7	
	25	1,19x10 ⁻²	1,16	0,8990	7,16x10 ⁻²	1,39	4,41	0,9994	4,64	8,6	

^{a)} Verifica-se neste caso um aumento de Δq

^{b)} Não se recalcularam os valores dos parâmetros dado que a contribuição da difusão intraparticular foi considerada pouco significativa (o equilíbrio foi alcançado ao fim de 2 h de contacto)

Verifica-se agora, que as velocidades iniciais de sorção calculadas são mais elevadas, o que se traduz, de uma forma geral, em desvios entre os valores experimentais e teóricos mais baixos. No entanto, pelo facto de o modelo prever uma aproximação ao equilíbrio mais rápida, os valores de q_e previstos afastam-se mais dos reais.

Pela análise dos valores das constantes cinéticas de segunda ordem e da velocidade inicial de sorção apresentadas na Tabela 5.3, verifica-se que em todos os sistemas o valor de k_2 aumenta com a diminuição da concentração inicial de Cr(III). A sorção de Cd(II) em quitina estudada por Benguella e Benaissa (2002) e a sorção de Cr(VI) e Cu(II) em quitina, quitosano e *Rhizopus arrizus* estudada por Sag e Aktay (2002), demonstraram a mesma tendência de variação de k_2 com a concentração inicial de metal, verificando-se que a concentração de equilíbrio é alcançada mais depressa nas soluções mais diluídas. Da mesma forma Ozer *et al.* (2004), no estudo da sorção de Cu(II) a *Cladophora crispata*, e Chojnacka (2005) no estudo da sorção de Cr(III) a casca de ovo verificaram este comportamento, explicando-o pelo facto de o aumento da concentração de metal em solução parece reduzir a difusão de iões metálicos para a camada limite e aumentar a difusão no sólido.

Vasudevan *et al.* (2003) descrevem a cinética de sorção de Cd(II) a *S. cerevisiae* (levedura de padeiro não viável) como apresentando 4 etapas distintas, visíveis à medida que se aumenta a concentração inicial de metal em solução. A fase inicial de transferência de massa externa foi muito rápida, restrita aos primeiros minutos do processo, e corresponde à primeira fase identificada. As três fases subsequentes encontraram-se claramente separadas por patamares em função de C_i , correspondendo a concentrações de saturação crescentes, de modo que só para $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ foi observada a quarta fase. Ajustaram dados das últimas 3 fases ao modelo cinético de pseudo-segunda ordem verificaram uma boa correlação entre os dados experimentais e os previstos pelo modelo. Os valores de k_2 , que segundo os autores podem ser assumidos como uma medida do coeficiente de difusão intraparticular, diminuíram de acordo com a ordem: Fase II > Fase III > Fase IV.

A Figura 5.7 mostra a representação gráfica do ajuste linear dos resultados experimentais pelo modelo de pseudo-segunda ordem para o período inicial da acumulação de Cr(III) aos três bio-sorventes, e nas Figura 5.8 e 5.9 estão representados os valores experimentais de acumulação de metal ao longo do tempo bem como as respectivas curvas calculadas pelo ajuste do mesmo modelo cinético. Para a levedura apresentam-se os pontos experimentais e o respectivo ajuste até ao equilíbrio, sendo possível verificar a proximidade entre ambos para o período inicial e o afastamento para os tempos de contacto mais elevados. Para as drêches apresentam-se apenas os pontos experimentais até às primeiras 8 h de ensaio pois a representação até ao equilíbrio prejudicava a leitura do gráfico por demorar mais tempo a ser alcançado. Ainda assim já é possível verificar que nos últimos pontos representados já existe algum desvio em relação aos valores de q_t previstos pelo modelo.

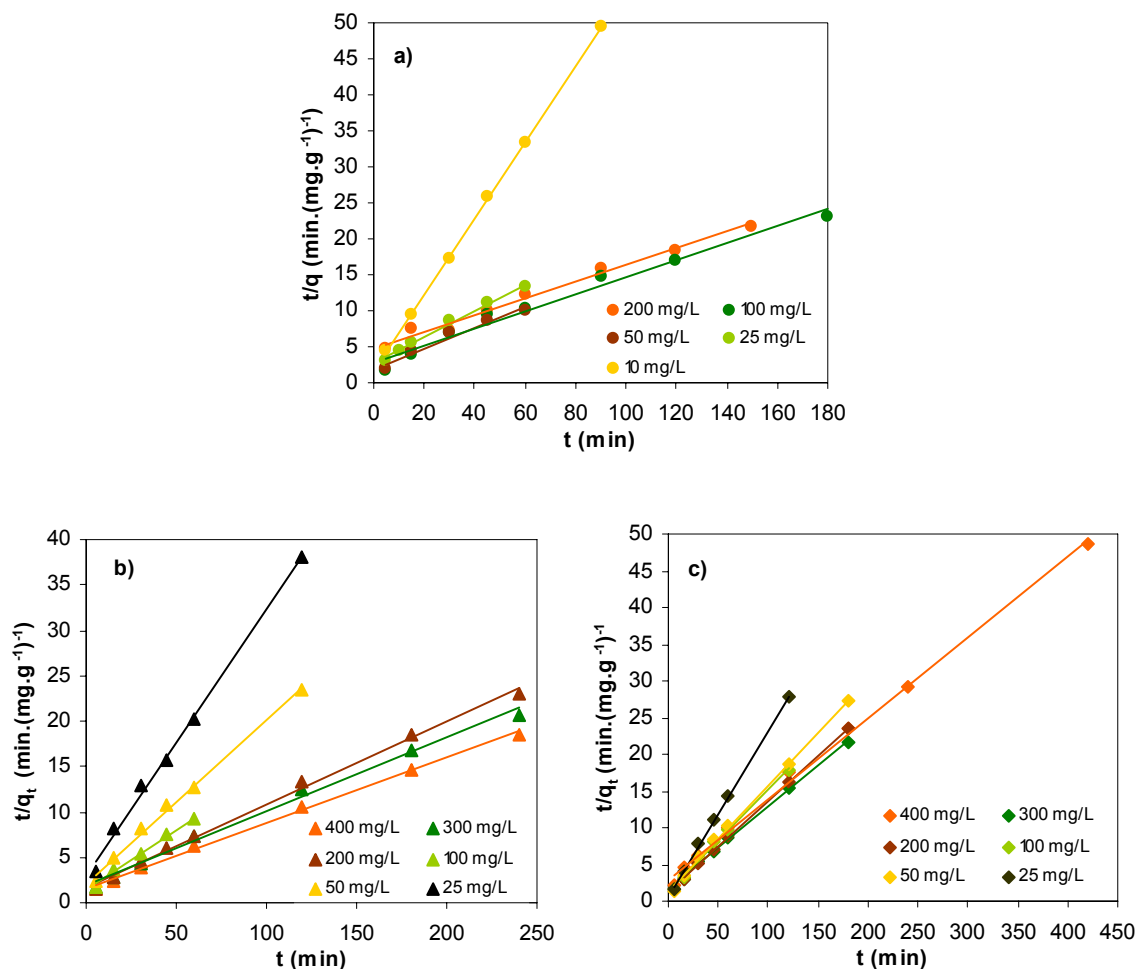


Figura 5.7 – Ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem aos resultados experimentais de remoção de Cr(III): a) *S. cerevisiae*; b) DST; c) DCT.

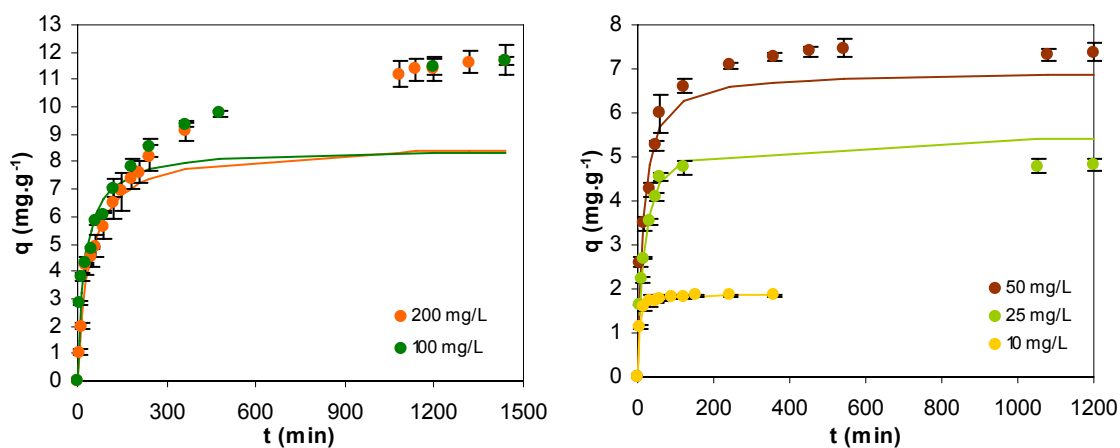


Figura 5.8 – Acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* ao longo do tempo. Ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem.

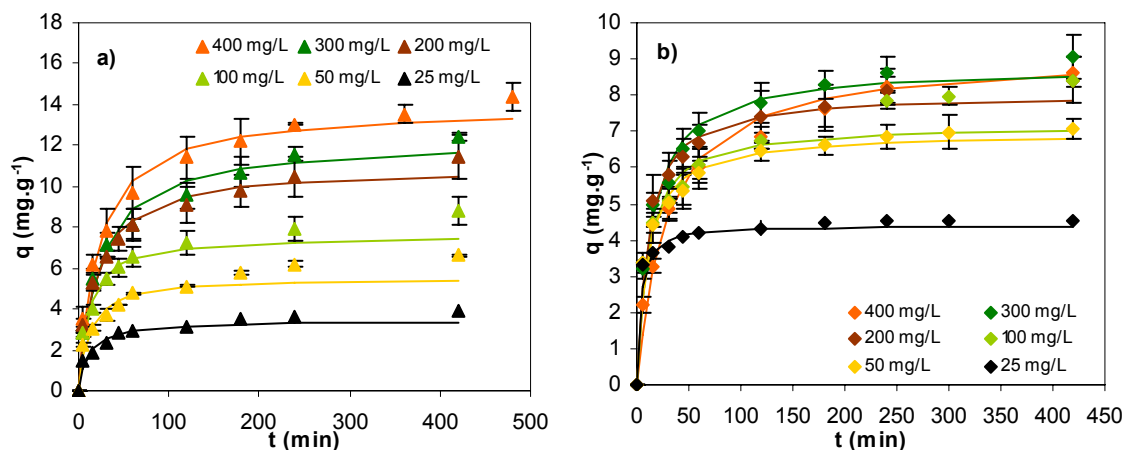


Figura 5.9 – Acumulação de Cr(III) pelas drêches ao longo do tempo: a) DST; b) DCT. Ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem.

A ajuste dos resultados experimentais de acumulação de Cr(III) aos três bio-sorventes em estudo aos modelos cinéticos aponta para um mecanismo inicialmente dominado pela quimiossorção, um fenómeno rápido que nestes sistemas se verifica ser bem descrito pelo modelo cinético de pseudo-segunda ordem, e para uma segunda fase onde a difusão, ainda que não seja o único mecanismo envolvido, assume um contributo importante na definição da velocidade global do processo de sorção. O facto de esta contribuição ser mais notória para tempos de contacto mais longos pode ser justificada pela maior ocupação dos sítios de ligação do metal à biomassa que também tornam a ligação química mais lenta.

Loukidou *et al.* (2004a) e (2004b) testaram vários modelos de cinética de difusão (externa e intraparticular), verificando que o processo de sorção de Cr(VI) e Cd(II) a *Aeromonas caviae* é um processo complexo: o modelo de difusão intraparticular testado, ajustou bem os resultados experimentais ao longo de todo o ensaio, mas também um cenário que considera um mecanismo inicialmente dominado por interacções químicas, seguido de difusão externa também se adequou aos requisitos de ajuste. Assim, afirmam que a bio-sorção de Cd e Cr(VI) é melhor descrita considerando mais do que um modelo, acontecendo o mesmo com a sorção da maioria dos metais pesados. Afirmam que esta abordagem é contrária à correntemente utilizada, em que se adopta por um modelo cinético único que, é aceite se se verificar uma boa correlação com os resultados experimentais.

5.3 Equilíbrio de sorção de Cr(III) na *S. cerevisiae* e nas drêches

As isotérmicas representam a relação de equilíbrio entre a acumulação de metal pelo sorvente e a concentração de metal final na solução aquosa, exprimindo a capacidade de sorção do bio-sorvente (Yun e Volesky, 2003). Apesar de os modelos empíricos não reflectirem as questões relacionadas com o mecanismo da sorção, fornecem informação útil sobre a

capacidade de acumulação de um bioissorvente e permitem estabelecer diferenças de desempenho entre vários materiais (Benguella e Benaissa, 2002; Yun *et al.*, 2001).

As isotérmicas convencionais têm de ser realizadas ao mesmo pH de equilíbrio final (Vieira e Volesky, 2000). A quantidade de metal ligado a um bioissorvente depende não só da concentração de iões metálicos livres em solução mas também do pH da suspensão e da concentrações de outros iões na fase aquosa que podem competir pelos mesmos sítios de ligação. Assim, a caracterização da contribuição do pH para o equilíbrio de sorção é necessária para a compreensão do mecanismo de bioissorção do metal (Kefala *et al.*, 1999).

Desta forma para efeitos de aplicação dos modelos de isotérmicas de equilíbrio para a *S. cerevisiae* foram considerados os valores de metal acumulado no final da primeira fase de equilíbrio pois corresponde durante esse período as variações de pH não são muito significativas. A quantidade de metal removido verificada para tempos de contacto muito longos (até às 96 h) é consideravelmente superior à da primeira fase, mas envolve a ocorrência de fenómenos que alteram as condições de pH das soluções metálicas pelo que a aplicação dos modelos de equilíbrio considerados não é correcta. Os resultados experimentais foram ajustados pelos modelos de Freundlich e de Langmuir através do ajuste linear. As equações daí resultantes são respectivamente:

$$\frac{C_f}{q_e} = \frac{1}{q_{\max}b} + \frac{1}{q_{\max}} C_f \quad \text{eq. (5.5)}$$

$$\ln q = \ln K_F + \frac{1}{N} \ln C_e \quad \text{eq. (5.6)}$$

As Figuras 5.10 e 5.11 mostram os ajustes aos resultados experimentais pela forma linearizada dos modelos considerados, e na Tabela 5.4 apresentam-se os valores relativos aos parâmetros dos modelos de Freundlich e Langmuir para os três bioissorventes, bem como os valores previstos para a quantidade de Cr(III) acumulada para a concentração final de 10 e 200 mg.L⁻¹ (q_{10} e q_{200}).

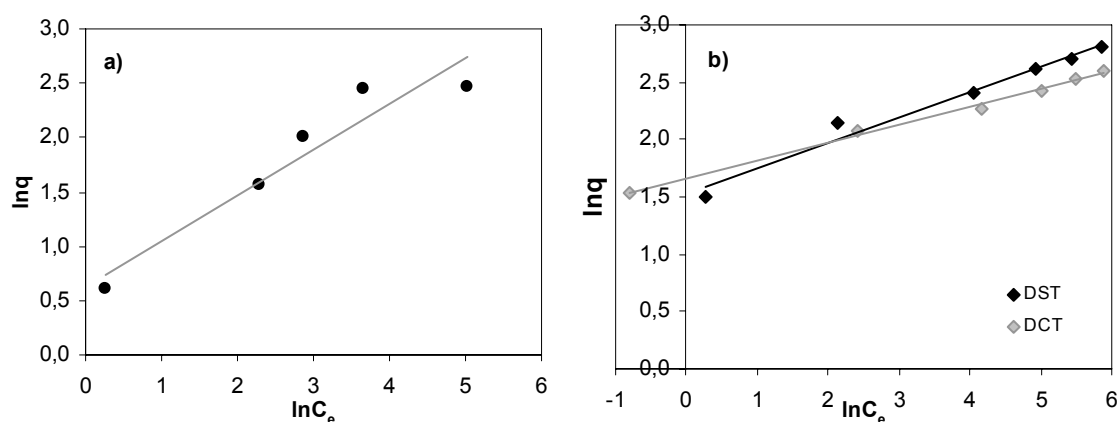


Figura 5.10 – Ajuste do modelo de Freundlich linearizado aos resultados experimentais: a) *S. cerevisiae*; b) drêches.

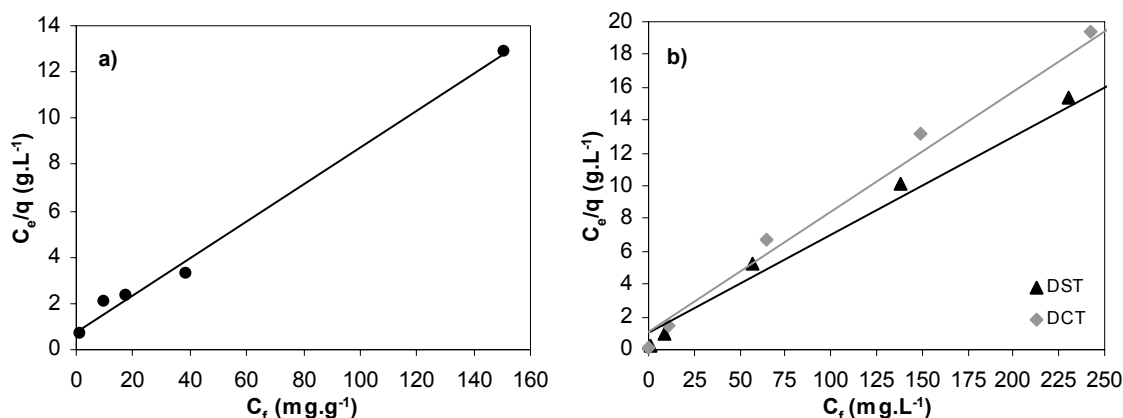


Figura 5.11 – Ajuste do modelo de Langmuir linearizado aos resultados experimentais: a) *S. cerevisiae*; b) drêches.

Tabela 5.4 – Parâmetros dos modelos de Freundlich e de Langmuir obtidos a partir do ajuste aos resultados experimentais da sorção de Cr(III) a *S. cerevisiae*, DST e DCT.

Biossorvente	Modelo de Freundlich			Modelo de Langmuir				
	K_F ($\text{mg}^{1-1/N} \cdot \text{L}^{1/N} \cdot \text{g}^{-1}$)	N	r^2	q_{max} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	b ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)	r^2	q_{10} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Q_{200} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
<i>S. cerevisiae</i>	1,88	2,37	0,9111	12,57	0,100	0,9936	6,29	11,98
DST	4,59	4,52	0,9758	16,68	0,0592	0,9911	6,20	15,38
DCT	5,27	6,41	0,9944	13,64	0,0667	0,9921	5,45	12,68

Os coeficientes de correlação calculados a partir do ajuste linear aos dados experimentais por ambos os modelos apresentam valores mais elevados para o modelo de Langmuir (Tabela 5.4) para a *S. cerevisiae* e DST. No caso das drêches submetidas a tratamento alcalino verifica-se que do ajuste pelo modelo de Freundlich resulta um coeficiente de correlação ligeiramente superior, mas sendo ambos superiores a 0,99 considera-se o modelo de Langmuir para descrever o equilíbrio da sorção de Cr(III) aos três biossorventes em questão.

A Figura 5.12 mostra os resultados experimentais correspondentes à quantidade de Cr(III) acumulada no equilíbrio ajustados pelo modelo de Langmuir. Os parâmetros deste modelo reflectem a natureza do sorvente e podem ser utilizados para comparar a performance de biossorção (Davis *et al.*, 2000), permitindo então comparar o desempenho dos três biossorventes, não só entre eles mas também com vários outros, nomeadamente os apresentados na Tabela 1.2, no que respeita à capacidade máxima de sorção.

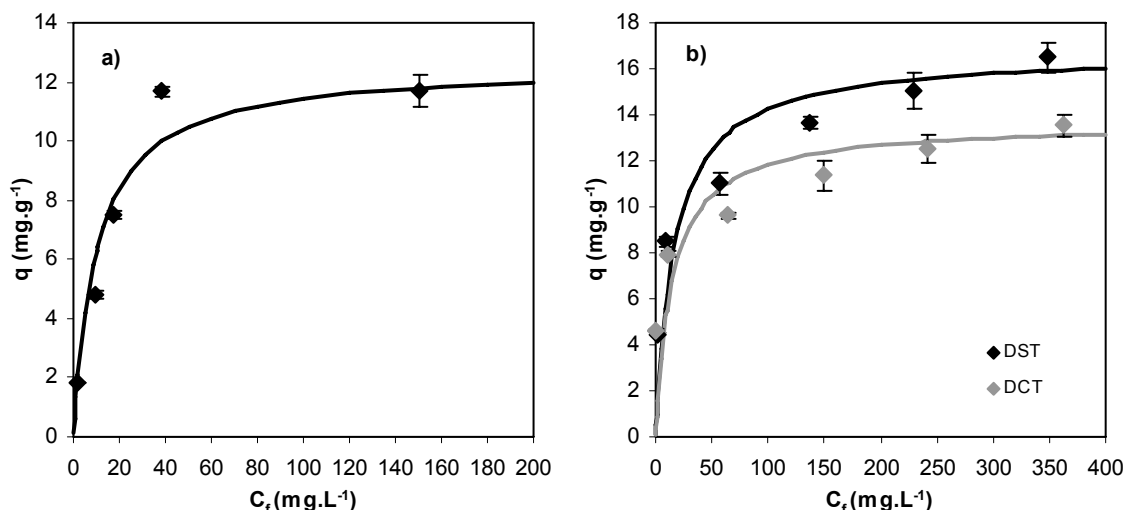


Figura 5.12 – Isotérmicas de equilíbrio de bioadsorção de Cr(III): a) *S. cerevisiae*; b) drêches ($\text{pH}_i = 5$; $X = 5 \text{ g.L}^{-1}$). Ajuste do modelo de Langmuir aos resultados experimentais.

Ainda que a constante q_{max} do modelo de Langmuir dependa das condições experimentais como o pH e a temperatura, constitui uma boa medida de comparação entre diferentes sorventes para o mesmo sorbato. Outro factor importante na avaliação do desempenho do sorvente é o declive inicial da isotérmica, uma vez que indica a afinidade entre o sorvente e o metal a baixas concentrações de metal, o que na equação de Langmuir é avaliado pela constante de afinidade, b (Sheng *et al.*, 2004b). Um valor elevado para o parâmetro b indica um acentuado declive inicial da isotérmica, o que reflecte uma elevada afinidade entre o bioadsorvente e o sorbato (Davis *et al.*, 2000). Estes valores dão a informação necessária para prever a eficiência de remoção dos metais pelo bioadsorvente e para estimar a quantidade de bioadsorvente necessária para remover uma dada quantidade de iões metálicos de uma solução aquosa (Benguella e Benaissa, 2002).

Assim, no que respeita à capacidade máxima de acumulação de metais, conforme é possível verificar pela análise dos parâmetros apresentados na Tabela 5.4, as drêches sem tratamento são o bioadsorvente com capacidade de acumular uma maior quantidade de Cr(III) ($16,68 \text{ mg.g}^{-1}$), seguidas pelas drêches com tratamento alcalino ($13,64 \text{ mg.g}^{-1}$) e pela *S. cerevisiae* ($12,57 \text{ mg.g}^{-1}$). É no entanto de realçar que na segunda fase do equilíbrio a levedura chega a atingir uma acumulação de 40 mg.g^{-1} após 96 h de contacto com a solução de crómio de concentração inicial 200 mg.g^{-1} , pelo que é de esperar que a capacidade de remoção de Cr(III) prevista por este modelo esteja subestimada.

O tratamento alcalino realizado às drêches resulta numa diminuição da capacidade máxima de acumulação de metal. Segundo Farinella *et al.* (2007) a ligação de iões metálicos a adsorventes lenhocelulósicos ocorre através de grupos funcionais como os carboxílicos, amino ou fenólicos. As alterações químicas e estruturais resultantes do tratamento alcalino podem interferir na quantidade e disponibilidade destes sítios de ligação resultando numa menor capacidade de

bio-sorção das DCT. Este resultado é contrário ao publicado por Low *et al.* (2000) onde a capacidade de acumulação de Cd(II) e Pb(II) por drêches submetidas a um tratamento com NaOH 0,5 M idêntico ao realizado neste trabalho foi superior em comparação com a das drêches sem tratamento. Uma possível explicação para esta diferença pode advir das diferenças entre o papel individual dos grupos funcionais envolvidos na ligação aos diferentes metais. Considerando a classificação dos metais apresentada na Tabela 2.1, verifica-se que o Cr(III) está incluído na Classe A (metais fortes), cuja preferência para estabelecer ligações com ligandos em grupos funcionais segue a ordem $O > N > S$. Já o Cd(II) aparece classificado como um metal fraco (Classe B), que segue a ordem de preferência de ligação inversa, e o chumbo como um metal de transição. Assim os efeitos do tratamento alcalino nos grupos funcionais das drêches parecem beneficiar a ligação do bio-sorvente a metais da classe B e de transição, e pelo contrário, prejudicar a ligação a metais da Classe A.

A comparação do desempenho de diferentes materiais deve ser feita para as mesmas concentrações de equilíbrio do metal em solução. Geralmente comparam-se os valores de q_{10} e q_{200} representando concentrações residuais de metal baixas e elevadas (Holan e Volesky, 1994). Os valores apresentados na Tabela 5.4 indicam que a *S. cerevisiae* apresenta o valor q_{200} mais baixo (11,98 mg.g⁻¹), seguida das DCT (12,68 mg.g⁻¹) e, com o valor mais elevado as DST (15,38 mg.g⁻¹). Esta tendência está em concordância com os valores já discutidos para q_{max} , o que era de esperar uma vez que correspondem a uma zona da isotérmica próxima da saturação.

No entanto, para os valores de q_{10} constata-se que é a levedura que apresenta o valor mais elevado (6,29 mg.g⁻¹), seguida das DST (6,20 mg.g⁻¹) e finalmente das DCT (5,45 mg.g⁻¹). Uma vez que este parâmetro avalia a capacidade de bio-sorção para concentrações de metal mais baixas, é natural que reflecta a mesma tendência do parâmetro b , indicativo da afinidade do sorbato para o sorvente. Nos sistemas de sorção em estudo verifica-se que os respectivos valores aumentam pela seguinte ordem: DST < DCT < *S. cerevisiae*. Assim, é a levedura que revela ter mais apetência para o tratamento de águas residuais com baixas concentrações de metal. Apesar de as DCT apresentarem um valor de b superior ao das DST (0,667 e 0,592 L.g⁻¹, respectivamente), o que lhe confere uma maior afinidade para o Cr(III), essa vantagem ocorre para concentrações de metal inferiores a 10 mg.L⁻¹.

Considerando tanto o valor de q_{max} como o de b , as drêches submetidas ao tratamento alcalino não revelam vantagens relativamente às drêches sem tratamento. O pré-tratamento resulta inclusivamente numa pior capacidade de acumulação de Cr(III) em praticamente toda a gama de concentrações iniciais de metal, não justificando os custos de processamento que lhe associados. Estes resultados levaram a que não se prosseguisse o estudo do potencial de utilização das DCT como bio-sorventes para soluções aquosas de Cr(III).

Do que é possível verificar por comparação da capacidade máxima de acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* e pelas DST com outros bio-sorventes listados na Tabela 1.2, e tendo em consideração que com nenhum deles foram realizados pré-tratamentos químicos, conclui-se que

ambos podem ser considerados promissores para a aplicação ao tratamento de águas contaminadas com Cr(III).

5.4 Dessorção do Cr(III) ligado a *S. cerevisiae*

A literatura refere-se à biossorção como sendo um processo reversível (Palmieri *et al.*, 2002). Os estudos de sorção e dessorção de metais fornecem alguma informação sobre o mecanismo de biossorção envolvido, ou seja, a forma como o metal se liga à biomassa (Volesky, 2001). Este conhecimento é essencial para a compreensão do processo de biossorção e serve de base para as considerações quantitativas de estequiometria que constituem os fundamentos para a modelação matemática do processo (Gavrilescu, 2004).

Neste sentido, foi decidido estudar a dessorção do Cr(III) acumulado pela levedura *S. cerevisiae*, que constituindo um sistema de sorção por um microrganismo viável, que pode envolver mecanismos de acumulação de metal mais complexos do que as drêches é, provavelmente, mais susceptível a sofrer alterações do seu desempenho em resultado de danos sofridos pela fase de eluição (*e.g.* por perda de viabilidade).

A dessorção do metal acumulado depende das propriedades físicas e da composição química da superfície do microrganismo, bem como do tipo e da concentração do agente de dessorção (Lopez *et al.*, 2002). Assim a regeneração do biossorvente pode ser levada a cabo pela sua lavagem com uma solução adequada, cujo tipo e força dependerá da forma como o metal está ligado. A identificação da solução mais adequada corresponde apenas ao início do trabalho. Assim, de forma a contribuir com informação que permita ajudar na compreensão do mecanismo envolvido na acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae*, os ensaios de dessorção foram realizados com soluções eluentes de diferentes naturezas e propriedades químicas, seleccionadas para permitir a análise da influência do pH, da troca iónica e a formação de complexos, no equilíbrio de dessorção. Estas incluíram água destilada, agentes com potencial de reacção de troca iónica competitiva (sais de cálcio e sódio), agentes com capacidade de troca de protões, ácidos minerais (HCl, H₂SO₄ e HNO₃) e ácidos orgânicos (CH₃COOH), agentes complexantes (EDTA), e ainda agentes com iões carbonato e bicarbonato.

5.4.1 Optimização da razão S/L

Uma dessorção eficiente do metal dá origem a uma solução de eluato concentrada, que facilitará a recuperação do metal. Também é desejável a total regeneração do biossorvente, minimizando a quantidade de metal residual ligado, para que seja possível a realização de vários ciclos de sorção-dessorção utilizando o mesmo material (Aldor *et al.*, 1995), mantendo as suas características o mais próximo possível das originais, sem diminuição da capacidade de acumulação e sem alterações ou danos físicos (Volesky, 2001).

A obtenção de uma solução de metal recuperado concentrada depende da razão sólido/líquido (S/L), definida como a massa de biossorvente carregado de metal e o volume de eluente, utilizada na fase de eluição. Este é um parâmetro que importa otimizar, sendo desejável utilizar o menor volume de eluente possível (elevada razão S/L) para se obter uma solução concentrada de metal no final (Davis *et al.*, 2000). Na Figura 5.13 apresentam-se as eficiências de dessorção de Cr(III) obtidas após 15 min de contacto entre a *S. cerevisiae* e as soluções de crómio de concentrações iniciais de 10, 25 e 50 mg.L⁻¹ para os vários eluentes em estudo. Foram testadas a razão S/L de 4 e 8 g.L⁻¹, equivalentes a proporções de solução a de metal inoculada e eluente de 1:1 e 2:1 respectivamente. No ensaio realizado com água destilada não foi detectado Cr(III), pelo que esses resultados não foram considerados na construção da Figura 5.13.

A eficiência de recuperação de Cr(III) foi calculada a partir da equação (5.7):

$$\text{Eficiência de recuperação de Cr(III)} = \frac{q_d}{q} \times 100 \quad \text{eq. (5.7)}$$

Na qual q_d representa o coeficiente de dessorção (mg.g⁻¹), calculado de acordo com a equação (5.8)

$$q_d = \frac{C_{f,el} V_{el}}{m} \quad (5.8)$$

onde $C_{f,el}$ é a concentração de metal no eluente (mg.L⁻¹), V_{el} o volume de eluente (L) e m a massa de biossorvente (g) (Palmieri *et al.*, 2002).

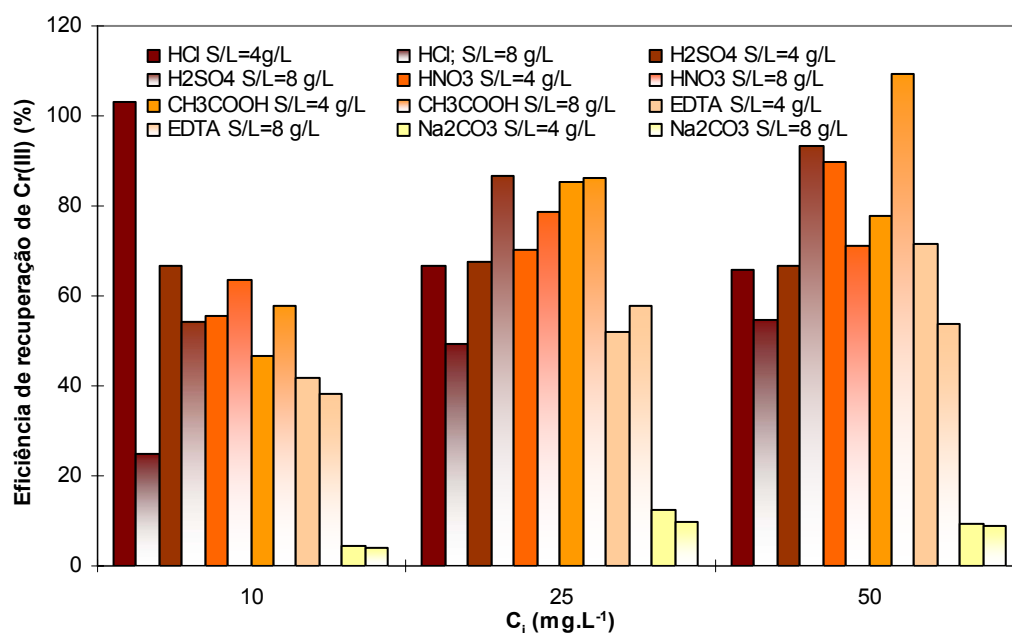


Figura 5.13 – Eficiência de recuperação de Cr(III) para razão S/L de 4 e 8 g/L (tempo de sorção = 15 min; concentração dos eluentes = 0,1 M; 0,01 M para EDTA).

Davis *et al.* (2000) estudaram a eficiência da dessorção de Cu(II) de *S. filipendula* I com HCl 0,1 e dois sais de cálcio 1 %: CaCl₂ e Ca(NO₃)₂ para razões S/L entre 1 e 10 g.L⁻¹, verificando que no caso do HCl a recuperação é independente da razão S:L na gama estudada, mas para os sais de cálcio o aumento da razão S/L traduziu-se na redução de metal recuperado até 50 % (para S/L = 10 g.L⁻¹). Os resultados da Figura 5.13 evidenciam que neste caso o HCl é, pelo contrário, o eluente mais susceptível ao aumento da razão S/L, sendo esse efeito mais notório no ensaio realizado com a concentração inicial de metal de 10 mg.L⁻¹. Dadas as vantagens associadas ao menor consumo de eluente, à obtenção de uma solução mais concentrada em metal, e ao facto de se verificar para alguns eluentes o aumento da eficiência de recuperação aumentando a razão S/L, concluiu-se que a adopção da razão S/L de 8 g.L⁻¹ conduz a bons resultados de recuperação de Cr(III) para os eluentes em estudo (Ferraz *et al.*, 2000).

É ainda possível verificar que a eficiência de recuperação de Cr(III) com Na₂CO₃ é muito baixa comparativamente aos restantes agentes de dessorção testados, pelo que não foi utilizado nos ensaios subsequentes. Os resultados obtidos nos ensaios de dessorção com as diferentes soluções eluentes seleccionadas podem ser analisados considerando a influência do pH, a troca iónica e a formação de complexos no equilíbrio de dessorção. As limitações observadas na eficiência de dessorção com a solução de Na₂CO₃ podem estar associadas ao aumento do pH daí resultante. Aldor *et al.* (1995), que também verificaram uma eficiência de recuperação de Cd(II) da alga *Sargassum* sp com K₂CO₃ concluíram que os complexos formados entre o carbonato e o Cd²⁺ não são suficientemente fortes para desestabilizar os complexos formados entre o metal e a biomassa a valores de pH elevados. Da mesma forma Saeed e Iqbal (2003) estudaram a dessorção de Cd(II) a partir de cascas de grão (*Cicer arietinum*) verificando que o carbonato de sódio, o bicarbonato de sódio, o citrato de sódio e o cloreto de potássio são fracos agentes de dessorção, justificando a dessorção ineficiente com os agentes alcalinos pela precipitação do metal a pH elevado e/ou pela formação de complexos metálicos alcalinos que são retidos na biomassa.

5.4.2 Selecção do melhor tempo de contacto entre a *S. cerevisiae* e as soluções de Cr(III)

O estudo da optimização do tempo de contacto entre a levedura e as soluções metálicas foi realizado para os seguintes tempos de sorção: 15 min, 30 min, 2 h e 24 h, para as concentrações iniciais de Cr(III) de 10, 25 e 50 mg.L⁻¹. Na Figura 5.14 mostram-se as eficiências de recuperação de Cr(III) obtidas para as concentrações de eluentes de 0,1, 0,5 e 1,0 M, e para o EDTA 0,01, 0,05 e 0,1 M.

Verifica-se que as eficiências de recuperação variam de forma inversamente proporcional ao tempo de sorção, sendo mais elevadas para o menor tempo de sorção ensaiado (15 min). Se por um lado, após este curto tempo de contacto entre a *S. cerevisiae* e a solução de Cr(III) a acumulação de metal é ainda baixa (Figura 5.2), aumentando-o para tempos que beneficiam a remoção de Cr(III) da solução resulta na diminuição da sua recuperação na fase de eluição para valores abaixo dos 10 % após 24 h de sorção à excepção do ácido sulfúrico 0,5 e 1,0 M e do

ácido nítrico 1,0 M. Esta tendência, que evidencia uma forte dependência da eficiência da eluição com o tempo de sorção, pode estar relacionada com a acumulação intracelular de íons de crómio que, contribuindo para aumentar a capacidade máxima de acumulação de metal, o tornam no entanto indisponível para a dessorção.

Estes resultados indicam, então, que este processo de bioacumulação, que tanto pode estar associado ao metabolismo celular como ocorrer por difusão para o interior da célula (Gadd, 1990), deve ser evitado pela redução do tempo de sorção, quando se tiver por objectivo a recuperação do Cr(III). Para circunstâncias que necessitem de uma situação de compromisso entre a maximização da remoção de Cr(III) de solução mantendo a sua recuperação em valores aceitáveis, identificou-se como sendo ideal definir o tempo de sorção em 30 min. Após este período a acumulação de metal atinge quase 80 % do valor alcançado às 24 h, do qual é possível recuperar cerca de 40 % com a maioria dos eluentes testados (Ferraz *et al.*, 2004).

Comparando os três gráficos apresentados na Figura 5.14 é ainda possível observar que para os tempos de sorção mais curtos, a concentração inicial de metal parece afectar a recuperação de metal, em particular quando se utilizam os eluentes mais diluídos. Este facto é claramente observado para o H₂SO₄, HCl (0,1 e 0,5M), e o CH₃COOH 0,1 M, com os quais se verificou um aumento da recuperação de Cr(III) com o aumento de C_i. Para o EDTA não se observou qualquer correlação entre a concentração inicial das soluções de Cr(III) e a recuperação de metal.

Este efeito da concentração inicial de metal na eficiência da sua dessorção pode ser explicado pela ocorrência de sorção em multicamadas à superfície da biomassa, que é favorecida pelo aumento de C_i, tornando mais fácil a dessorção das camadas de metal mais externas, logo a recuperação de metal a partir de soluções iniciais mais concentradas (Bux *et al.*, 1995), ou por diferenças de afinidade para os sítios de ligação do metal. Kratochvil *et al.* (1998) que também observaram uma tendência semelhante ao estudarem a dessorção de Cr(VI) da alga marinha *Sargassum* sp. referem que em soluções mais diluídas o metal liga-se preferencialmente a sítios de ligação com os quais tem mais afinidade, seguindo-se a ligação a sítios para os quais têm menor afinidade quando a concentração inicial aumenta. Sendo mais difícil inverter a ligação dos metais aos sítios de maior afinidade, também a sua recuperação se torna menos eficiente, ainda que os resultados mostrem que neste sistema de biosorção, recorrendo aos eluentes mais concentrados, ou ao agente complexante EDTA, este efeito se torne menos evidente.

Também para os tempos de sorção mais longos o efeito da concentração inicial de metal na eficiência de recuperação de Cr(III) se torna menos evidente, invertendo-se até a tendência anteriormente verificada para alguns eluentes, e.g. com H₂SO₄ 1,0 M registou-se uma recuperação de 40,9, 14,9 e 16,8 % para as concentrações iniciais de 10, 25 e 50 mg.L⁻¹. Eventualmente esta inversão da tendência anteriormente observada deve-se ao facto de o maior gradiente de concentração provocar uma maior acumulação intracelular de metal que dificulta a sua eluição.

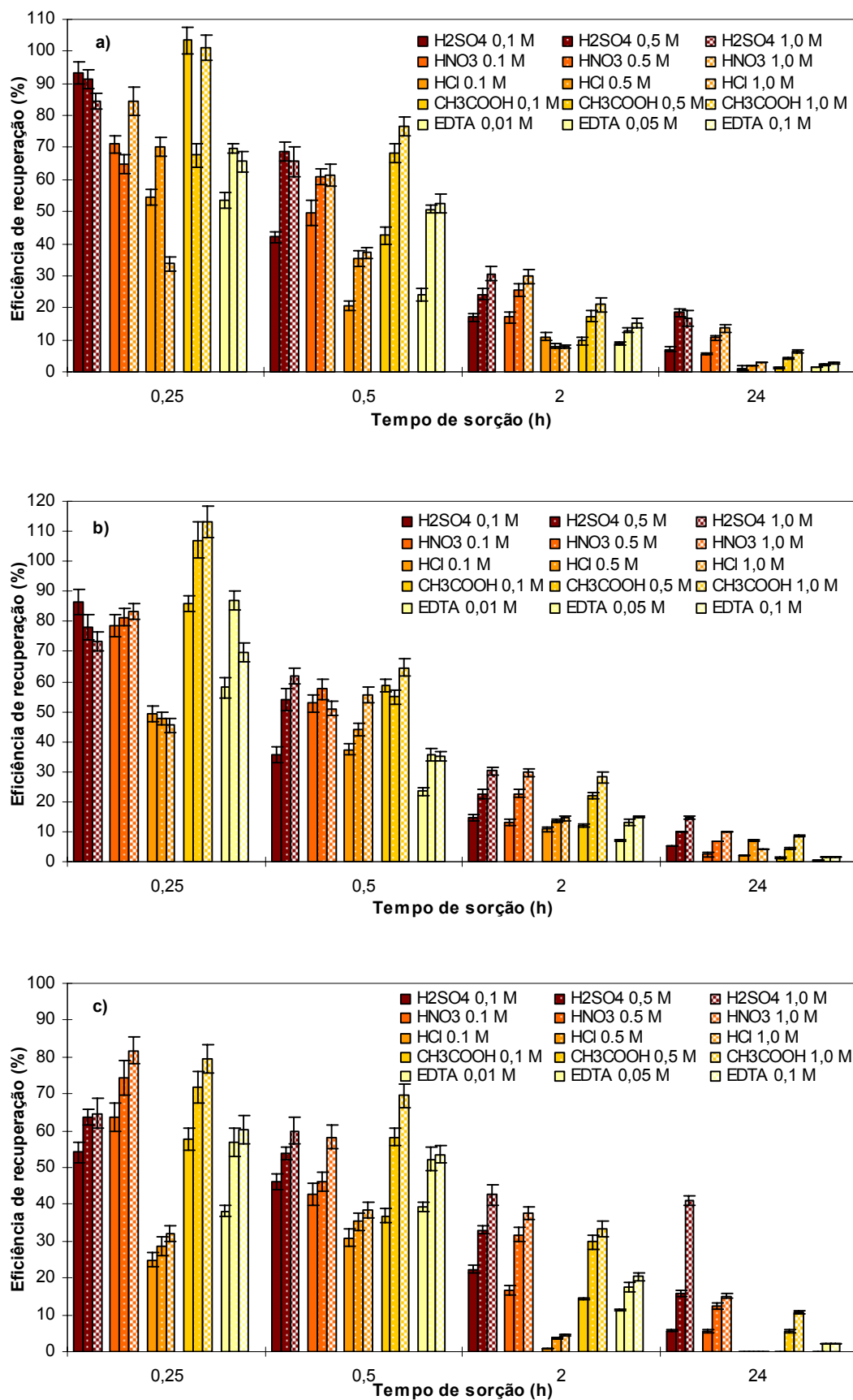


Figura 5.14 – Eficiência de recuperação de Cr(III) em função do tempo de sorção: a) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; c) $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$.

5.4.3 Optimização do tempo de contacto entre a biomassa e o eluente

Na maioria dos trabalhos publicados o tempo de dessorção é muito variável, chegando a ser de 24 h. Os longos períodos de exposição podem potenciar os danos dos ácidos na biomassa prejudicando o seu desempenho em múltiplos ciclos de sorção-dessorção (Leung *et al.*, 2000). O tempo necessário para a dessorção também foi considerado um parâmetro relevante para ser avaliado, na medida em que é importante na optimização da operação do sistema em ciclos de sorção-dessorção e evita que ocorram danos desnecessários no biossorvente decorrentes de tempos de exposição excessivamente longos com os eluentes. Os gráficos da Figura 5.15 mostram a eficiência de dessorção obtida com as diferentes soluções eluentes para diferentes tempos de contacto com a biomassa carregada de metal (tempo de sorção = 30 min).

Os resultados apresentados na Figura 5.15 revelam que de uma forma geral, e tal como era previsto, a eficiência de dessorção aumenta com o tempo de contacto com as soluções eluentes, sendo a tendência observada independente da concentração de eluente e da concentração inicial de metal. No entanto esta melhoria de desempenho é mais evidente para o EDTA e o CH₃COOH, e menos notória para os ácidos minerais H₂SO₄, HNO₃ e HCl. Para este último verifica-se até que a recuperação máxima é atingida logo após 5 min de contacto.

Das Figuras 5.14 e 5.15 é ainda possível concluir que a eficiência da eluição aumenta com a concentração do eluente. A maior recuperação alcançada com a utilização de soluções ácidas mais concentradas sugere que está envolvido um processo de troca iónica, entre os protões e os iões metálicos (Ajmal *et al.*, 2001). Os resultados experimentais apontam para um efeito mais significativo para o incremento de 0,1 para 0,5 M do que entre 0,5 e 1,0 M, indicando um comportamento que indicia a possibilidade de se atingir a saturação da troca iónica com os protões, sendo suficiente, para a maioria dos casos, a utilização de soluções 0,5 M para atingir a recuperação máxima possível.

A taxa de dessorção é dependente dos iões metálicos, da microestrutura da parede celular e da força de ligação. O biossorvente não deve sofrer danos durante a adsorção, a dessorção, nem durante a regeneração, de forma a permitir a sua reutilização (Wilhelmi e Duncan, 1996). Atendendo a que a utilização de soluções ácidas pode danificar a biomassa comprometendo a sua reutilização em ciclos de sorção-dessorção subsequentes, é recomendável o recurso à concentração da solução ácida utilizada o mais baixo possível (Bag *et al.*, 2000), e que de acordo com Wilde e Benemann (1993) o pH ideal para a eluição corresponde ao valor para o qual não se verifica biossorção. Tendo-se identificado esse limite a pH 2 para este sistema num estudo prévio (Ferraz e Teixeira, 1999), optou-se por testar, nos ensaios subsequentes apenas a concentração de ácidos mais baixa (0,1 M).

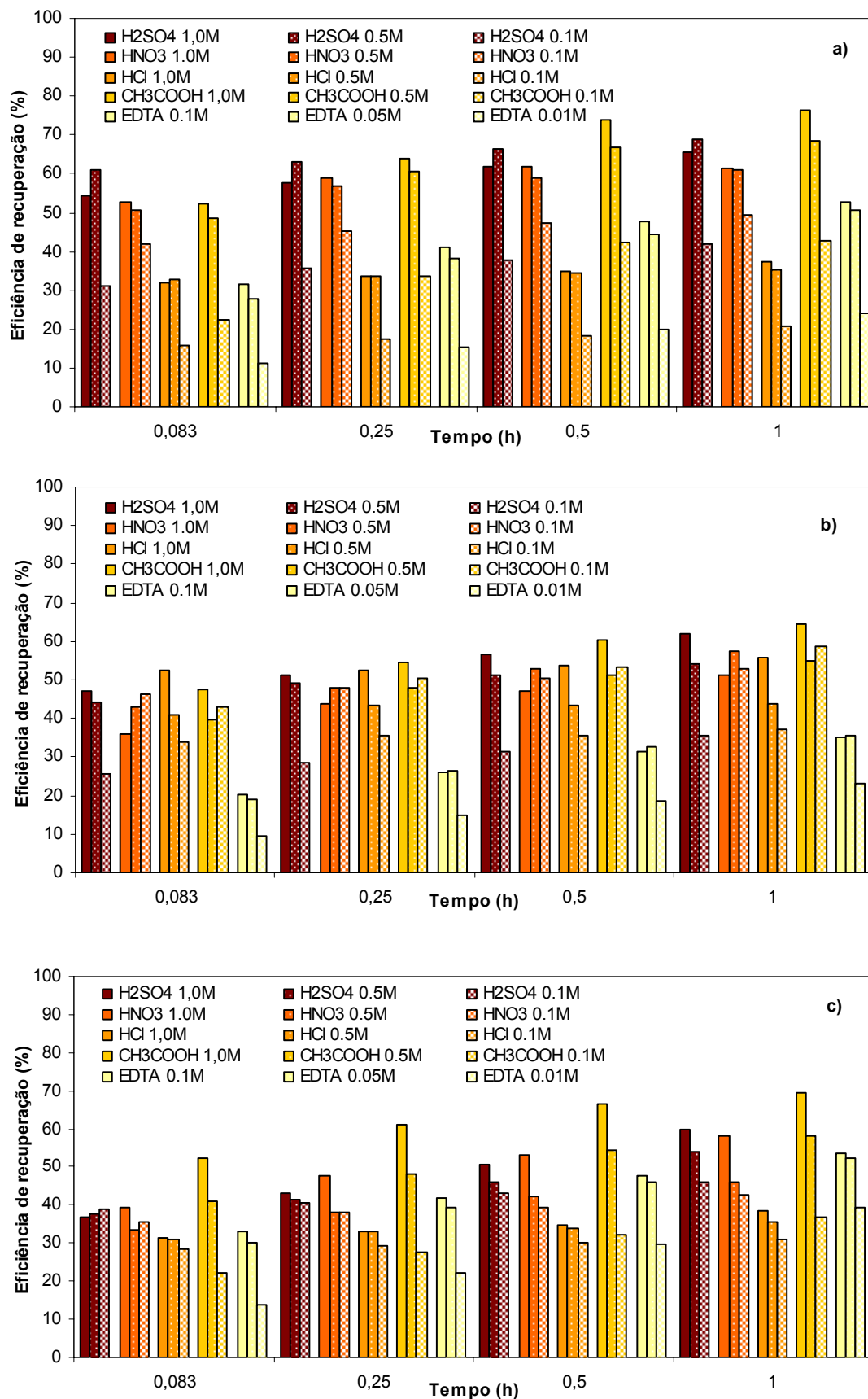


Figura 5.15 – Eficiência de recuperação de Cr(III) em função do tempo de contacto com o eluente: a) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; b) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; c) $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$.

Davis *et al.* (2000) testaram a dessorção de Cu(II) de *Sargassum filipendula* I com HCl, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 considerando este último o melhor agente de dessorção, pois a lavagem da biomassa carregada com HCl 0,1 e 1 M, ainda que tenha provocado a libertação de todo o metal, tornou a biomassa ficou mais frágil e provocou uma alteração da sua cor (passou de castanha a preta, em particular com a solução ácida mais concentrada). Assim, o HCl foi considerado um excelente eluente, mas pode provocar danos na biomassa que eventualmente resultam na diminuição da capacidade de acumulação de metal no ciclo seguinte.

De entre os eluentes testados as soluções de EDTA e HCl foram aquelas que demonstraram eficiências de recuperação de Cr(III) mais baixas, ainda que para a concentração mais baixa considerada (0,01 M para o EDTA e 0,1 M para o HCl) as diferenças não sejam tão marcantes. A eficiência da utilização de agentes complexantes como dessorventes é determinada pela constante de estabilidade entre o ligando complexante e o ião metálico. Se o seu valor for superior ao da constante dos sítios de ligação da superfície da biomassa e os iões metálicos, estes tendem a ligar-se ao agente complexante tornando a dessorção eficaz. Para os agentes que actuam por troca iónica com um ião que compete com o metal, a força do agente de dessorção é definida pela capacidade de competição entre os iões metálicos e outros catiões presentes nos sítios activos de ligação na superfície da biomassa (Leung *et al.*, 2000).

Atendendo às propriedades químicas do EDTA este comportamento parece indicar uma tendência moderada do crómio para formar complexos com este agente complexante comparativamente com a ligação estabelecida entre o metal e os sítios de ligação da biomassa, propriedade que é reforçada pela cinética mais lenta observada na dessorção com este eluente. Uma vez que as soluções de EDTA foram preparadas em concentrações mais baixas do que as soluções ácidas, o seu pior desempenho pode ser justificado por essa razão. No entanto comparando os resultados obtidos para a solução de EDTA mais concentrada (0,1 M), equivalente à concentração mais baixa das soluções ácidas, verifica-se que ainda assim apenas para a concentração de Cr(III) inicial de 50 mg.L^{-1} se obtêm eficiências superiores para o EDTA, o que corrobora a questão já abordada de que nestas circunstâncias a ligação do metal também ocorre a sítios de ligação para os quais tem menor afinidade, e neste caso a constante de formação de complexos do Cr(III) com o EDTA é superior. Não sendo este agente de dessorção considerado economicamente competitivo quando comparado com outros eluentes (Bux *et al.*, 1995), podendo ainda verificar-se dificuldade de recuperar o metal da solução de EDTA devido à elevada estabilidade dos seus complexos com o metal (Yu e Kaewsarn, 2001), também não foi considerado nos estudos de sorção-dessorção em ciclos sucessivos.

Estando reconhecida a importância da troca iónica na bio-sorção, a dessorção dos metais pesados pode ser realizada por inversão do equilíbrio de troca iónica para libertar o metal ligado à biomassa (Palmieri *et al.*, 2002). Vários estudos referem a realização da dessorção de metais a partir de biomassa carregada utilizando soluções ácidas com elevada eficiência (Aldor *et al.*, 1995; Kratochvil e Volesky, 1998a; Palmieri *et al.*, 2002; Suhasini *et al.*, 1999). Em geral a libertação de metais bio-sorvidos através de acidificação reflecte a sua ligação a grupos

carboxilato e sulfonato no material da parede celular da biomassa (Davis *et al.*, 2000). À medida que a concentração de protões aumenta, a ligação ocorre primeiro aos grupos carboxilato formando ligações covalentes. No entanto, nem todos os sítios criados pela remoção de protões podem ser eficientes para a remoção de metal. Assim os protões irão, presumivelmente, ligar-se a sítios que não estavam inicialmente ocupados por metal (Aldor *et al.*, 1995). Chu *et al.* (1997) verificaram que a capacidade do HCl a pH 2 remover Cd(II) adsorvido a *Sargassum baccharia* é de cerca de 80 %, atribuindo-a parcialmente à troca iónica mas também à dessorção que pode ocorrer pela capacidade do ácido dissolver determinados grupos de polissacáridos da superfície da biomassa.

A utilização de ácidos fortes para recuperar o Cr(III) ligado à levedura *S. cerevisiae* permite o recurso a tempos de eluição mais curtos dada a prontidão com que ocorre a troca iónica entre os protões e os iões metálicos, atingindo-se rapidamente o equilíbrio. Assim, o tempo de contacto com o eluente considerado adequado para garantir uma elevada recuperação resultando em danos mínimos para a biomassa, foi de 30 min.

Yu e Kaewsarn (2001) ainda realizaram ensaios de cinética da dessorção de Cu^{2+} da alga *Durvillaea potatorum*. Os resultados indicam que a dessorção é rápida, com a maioria dos iões metálicos a serem dessorvidos ao fim de 40 min de agitação, e atingindo o equilíbrio ao fim de 1 h de contacto. A taxa de dessorção dos primeiros 5 min foi superior à taxa entre os 5 e os 30 min, o que pode ser atribuído ao comportamento de dessorção do bioissorvente relativamente ao pH da solução.

5.4.4 Ciclos de sorção-dessorção

As soluções utilizadas como eluentes nos ensaios onde se realizaram três ciclos de sorção-dessorção foram, pelos motivos discutidos anteriormente, os três ácidos minerais HCl, HNO_3 e H_2SO_4 , e o ácido orgânico CH_3COOH , todos à concentração de 0,1M. Os resultados relativos à acumulação de metal nos três ciclos de sorção (q), e à dessorção (q_d), assim como a eficiência que lhes está associada, estão representados na Figura 5.16.

Comparando a eficiência de recuperação obtida com os diferentes eluentes, verifica-se que é o ácido sulfúrico aquele que dá origem à dessorção mais elevada: 52, 43 e 35 % respectivamente no primeiro, segundo e terceiro ciclo, seguindo-se o ácido nítrico (40, 42 e 30 %), o ácido clorídrico (34, 29 e 22 %) e por fim o ácido acético (28, 39 e 24 %). Atendendo à força e natureza destes ácidos, os resultados desviam-se do expectável na medida em que era previsível: i) um pior desempenho do ácido acético, que sendo um ácido fraco apresenta um valor de pH mais elevado à mesma concentração dos restantes ácidos; ii) uma eficiência de dessorção com ácido sulfúrico superior, pelo facto de ser diprótico; e iii) uma eficiência de dessorção do HCl comparável à dos restantes ácidos minerais fortes uma vez que os valores de pH das soluções utilizadas são próximos dos destas restantes soluções (Tabela 5.5). O HCl também é o ácido geralmente utilizado em diversos estudos que se dedicam à recuperação de metais acumulados

a biossorventes, sendo considerado um bom eluente. O facto de, no segundo ciclo, se verificar um aumento da eficiência de recuperação de Cr(III) pela solução de CH₃COOH 0,1 M pode dever-se à eluição de parte do metal que não tinha sido dessorvido no final do primeiro ciclo.

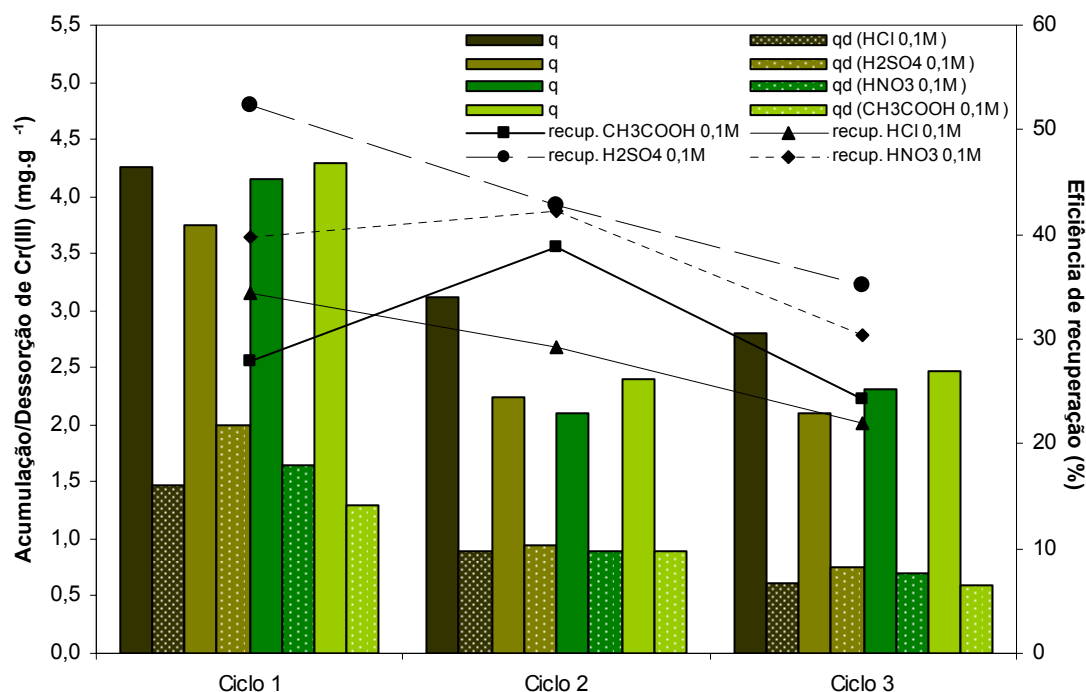


Figura 5.16 – Cr(III) acumulado e recuperado em três ciclos de consecutivos de sorção-dessorção. Duração dos ciclos: 30 min.

O facto de não se conseguir com a eluição, remover por completo o Cr(III) ligado à *S. cerevisiae*, mas observar-se que a biomassa, quando reinicia um novo ciclo de sorção, continua a acumular iões metálicos para valores próximos dos do primeiro ciclo, pode atribuir-se à não saturação da biomassa na fase de sorção, pois só está em contacto com a solução metálica por 30 min, permitindo-lhe ter sítios de ligação livres no início de cada ciclo.

Como se pode observar pelos valores apresentados na Tabela 5.5 a manipulação da biomassa envolvida na sua utilização em ciclos sucessivos de sorção-dessorção, conduz a perdas de material correspondentes a uma média de 17,5 % avaliadas em peso seco. Para tal pode contribuir não só a agressão provocada pela solução ácida mas também o tratamento de regeneração da biomassa, efectuada com lavagens com água e adição de NaOH 0,1 M até ser restabelecido o pH original da suspensão de levedura ($5,99 \pm 0,07$). O sobrenadante removido destas lavagens foi sucessivamente analisado quanto ao seu teor em crómio, verificando-se que não contribui para a dessorção, confirmando que o metal que não é eluído pelas soluções ácidas permanece ligado à biomassa. A perda de biomassa pode ser responsável pela diminuição da

capacidade de acumulação de metal nos ciclos seguintes, sendo importante tentar minimizá-la quando se tem em vista a regeneração e reutilização da biomassa. Saeed e Iqbal (2003) estudaram a reutilização de casca de grão (*Cicer arietinum*) na remoção de Cd em vários ciclos de bio-sorção-dessorção com HCl. Ao longo dos ciclos observaram-se perdas de biomassa, num total de 39,10 % ao fim dos 6 ciclos, responsáveis pela diminuição da eficiência de bio-sorção de cerca de 100 % para 57,2 % no final dos 6 ciclos.

Na fase de dessorção também se verificou uma tendência para as leveduras desflocularem, o que pode torná-las mais susceptíveis aos tratamentos químicos para além de comprometer a eficiência da sua separação da fase líquida sem a necessidade de adição de floculantes.

Tabela 5.5 – Valores de pH da suspensão de biomassa nas várias soluções eluentes (valor médio dos três ciclos, medidos no início da fase de dessorção), e valor médio da perda de biomassa resultante da fase de dessorção.

	H ₂ SO ₄	HNO ₃	HCl	CH ₃ COOH
pH	1,09	1,02	1,06	3,31
Perda de biomassa (% de peso seco)				
2º ciclo	17	18	16	27
3º ciclo	17	16	17	11

A perda de biomassa pode ser atribuída a danos físico-químicos na estrutura da matriz da biomassa. O longo período de agitação e a utilização de HCl como agente de dessorção pode contribuir tanto para a degradação química como para a quebras mecânicas provocadas por danos químicos na estrutura do sorvente (Saeed e Iqbal, 2003). Lee e Volesky (1997) afirmam que a aplicação de pré-tratamentos à biomassa e também o próprio processo de bio-sorção em si conduzem à perda de 10-20 % da massa da alga do género *Sargassum*. No processo de dessorção utilizando ácidos perde-se entre 5 a 15 % de massa, e no pré-tratamento com NaOH as perdas atingem 39 %. Segundo Xie *et al.* (1996) esta situação poderia ser minimizada pela imobilização da biomassa. No estudo da bio-sorção de urânio a *Sargassum fluitans* numa coluna de leito fixo, Yang e Volesky (1999a) utilizaram uma solução de HCl 0,1 N para a eluição do metal, verificando que a dessorção completa e uma perda de biomassa inferior a 5 % em massa.

De forma a avaliar o efeito do tratamento ácido na acumulação de Cr(III) à *S. cerevisiae* em períodos de sorção mais longos, depois de cada fase de eluição e regeneração da biomassa seguiu-se a acumulação de metal por 24 h. A Figura 5.17 mostra que o tratamento ácido tem um impacte negativo no primeiro período da bio-sorção, que se traduz numa cinética de remoção de metal da solução mais lenta e menos intensa do que a verificada no primeiro ciclo. Este efeito pode ser atribuído a alterações da estrutura celular e modificações nos sítios de ligação, ou até

pelo facto de os sítios com maior afinidade para a ligação aos iões metálicos estarem ocupados pela acumulação resultante dos ciclos anteriores. Apesar disso, para períodos de sorção mais longos, verifica-se que é possível atingirem-se valores de acumulação de Cr(III) equivalentes aos do primeiro ciclo, à excepção do ensaio realizado com H₂SO₄, onde se observou que a biomassa depois de submetida à dessorção apenas acumulou 77 % do valor original. Pelo contrário, o tratamento de dessorção com HCl e CH₃COOH superou a acumulação de Cr(III) respectivamente em 7 e 4 % relativamente aos valores do primeiro ciclo após 22 h de sorção. De forma semelhante, Aldor *et al.* (1995) verificaram que o tratamento de *Sargassum fluitans* com HCl 0,1 M e 1 M no segundo ciclo de sorção aumentou a remoção de Cd em 20 %, e Yu e Kaewsarn (2001) referem que de entre os vários eluentes testados (HCl, H₂SO₄, HNO₃, EDTA, CaCl₂, K₂CO₃, Na₂CO₃, NaHCO₃, NH₄Cl, CH₃COOH e NaCl) para a dessorção de Cu²⁺ da alga marinha *Durvillaea potatorum* o HCl foi aquele que deu melhores resultados em termos de eficiência de regeneração e efeitos na capacidade de adsorção do bioissorvente.

Na dessorção de Pb²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ de *Mucor rouxii* o HNO₃ provou ser um eluente mais eficiente do que o NaCl e CaCl₂ (mais de 90 % de eluição) (Yan e Viraraghavan, 2003). Estes autores estudaram a capacidade de utilização da biomassa em 5 ciclos fazendo a eluição com HNO₃ e a regeneração com água desionizada ou NaOH. Verificaram que fazendo a regeneração da biomassa apenas com água desionizada havia alguma perda de capacidade de remoção de metais mas, pelo contrário, fazendo a regeneração com NaOH a remoção foi ainda superior à do primeiro ciclo, indicando que a biomassa pode ser sujeita a tratamento alcalino repetidamente sem perder as suas propriedades de adsorção. A regeneração caustica diminui a protonação e substitui os iões sódio nos grupos funcionais. Estes iões são posteriormente facilmente deslocados pelos metais pesados.

Chu *et al.* (1997) testaram a adsorção-dessorção com HCl em cinco ciclos consecutivos, realizando a lavagem da biomassa apenas com água desionizada entre cada ciclo, verificando uma diminuição progressiva da capacidade de remoção até ao mínimo de 44 % da remoção inicial no 5º ciclo. A redução gradual da capacidade de acumulação de ciclo para ciclo indica que os sítios de ligação da superfície da biomassa ou foram destruídos ou foram morfológicamente alterados pelo HCl, o que se confirma também pela diminuição da massa de bioissorvente de ciclo para ciclo (30 % no total dos 5 ciclos).

Estes dados parecem apontar para o facto de o método de regeneração influenciar o desempenho do bioissorvente quando é aplicado em ciclos sucessivos de sorção-dessorção, sendo os bons resultados obtidos neste estudo associados à adição de NaOH 0,1 M à suspensão da levedura e que o facto de esta retomar o seu pH original restabelece a capacidade máxima de acumulação de Cr(III), ainda que de uma forma mais lenta.

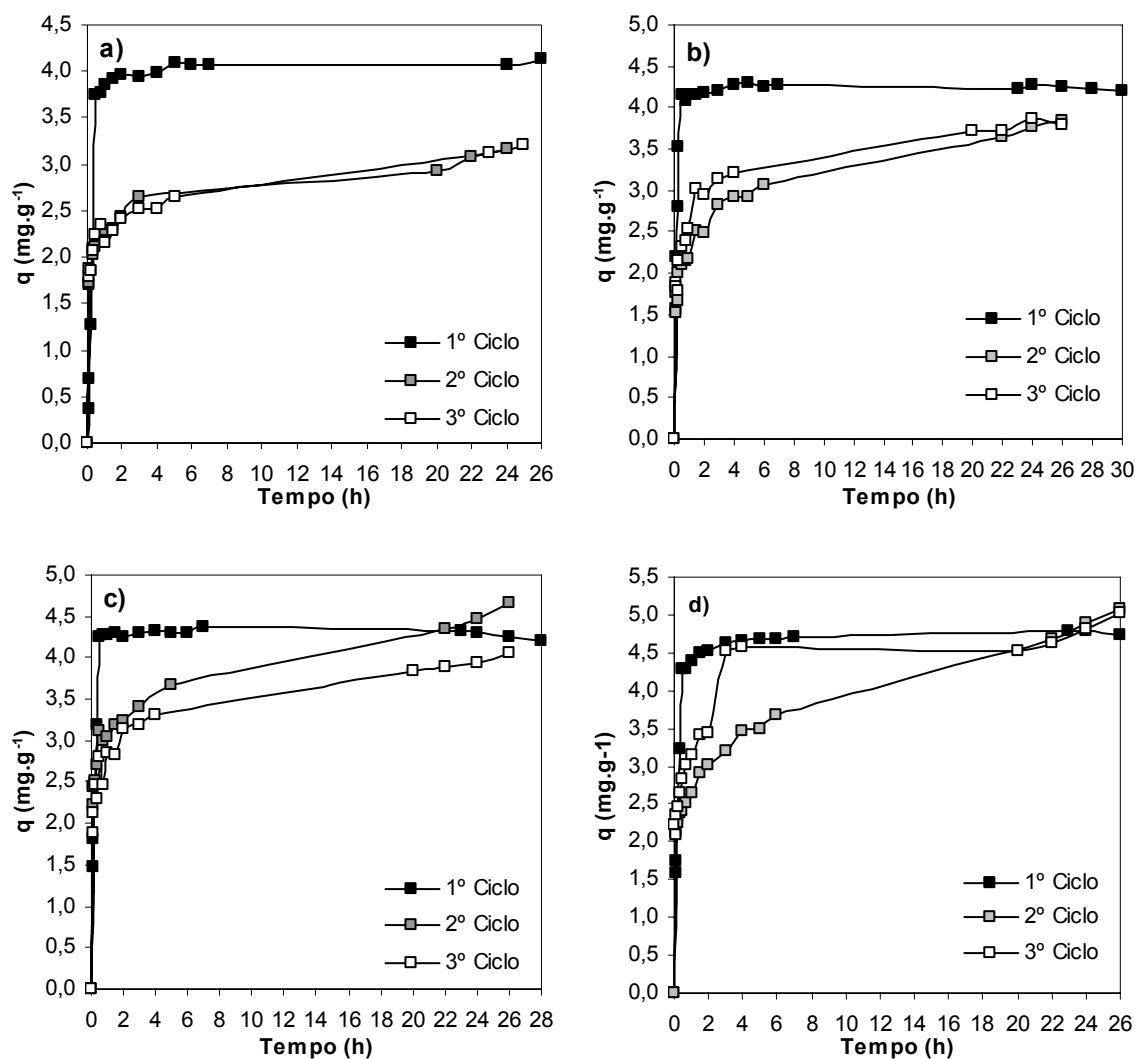


Figura 5.17 – Perfil de acumulação de Cr(III) para três ciclos de sorção-dessorção (tempo de sorção antes da fase de sorção = 30 min): a) H_2SO_4 ; b) HNO_3 ; c) HCl ; d) CH_3COOH .

5.5 Comparação com outros sistemas de biossorção

São vários os estudos que referem a recuperação total ou quase total dos metais a partir dos biossorbentes carregados, sendo em geral a utilização de ácidos minerais como agentes de dessorção aquela que prevalece. Pode referir-se a recuperação total de Cu^{2+} a partir da alga *Chlorella vulgaris* imobilizada com HCl 0,1 M (Tam *et al.*, 1998), a recuperação de 85 % do Cu^{2+} ligado a *S. cerevisiae* com H_2SO_4 1M, 80 % com HCl 1 M e 80,5 % com HNO_3 1 M (Wilhelmi e Duncan, 1996), a recuperação de total do Cd^{2+} ligado a *Sargassum fluitans* com H_2SO_4 , HCl e HNO_3 0,1 M (Aldor *et al.*, 1995), a recuperação total de Ag^+ de *Aspergillus niger* com HNO_3 0,1 N (Akhtar *et al.*, 1995) e a recuperação de 80 % do Cd^{2+} ligado a *Sargassum bacularia* com HCl (a pH 2), e quase completa com EDTA 3,24 mM (Chu *et al.*, 1997).

No entanto, os vários estudos que envolvem a dessorção de Cr(III) referem-se em geral a este processo como sendo menos eficiente ou mais lento comparativamente a outros metais. Bag *et al.* (2000) testaram HCl e HNO₃ 0,5 e 1 M como eluentes de Cr(III) adsorvido a *S. cerevisiae* imobilizada, recuperando 78 e 96 % de Cr(III) utilizando, respectivamente, HCl 0,5 e 1 M, e recuperando 67 e 72 % utilizando HNO₃ 0,5 e 1 M, utilizando um volume de eluente na proporção de 1:10 em relação à solução de metal. Comparando a dessorção de Cr³⁺ de lamas activadas utilizando soluções de HCl e CH₃COOH 0,2 N verifica-se que a primeira é um melhor agente de dessorção, o que se justifica por ser um ácido forte (pH = 0,75) e o segundo um ácido fraco (pH = 2,78). Em relação aos restantes metais em estudo (Cd, Cr(VI), Cu, Ni e Zn) o crómio trivalente apresentou valores de recuperação consideravelmente mais baixos (Bux *et al.*, 1995). Park *et al.* (2004) estudaram a dessorção de Cr(III) da alga castanha *Ecklonia* com H₂SO₄ 1 M. A dessorção foi lenta, e a eficiência de recuperação do metal foi inferior a 90 % após 168 h de contacto. Os autores constataam que a eficiência e a velocidade de dessorção do Cr(III) é em geral inferior à de metais divalentes como o Cd, Ni, Zn e Pb.

A maior dificuldade associada à dessorção do crómio pode resultar do facto de a sua biossorção seguir mecanismos diferentes dos outros metais (Melo e D'Souza, 2004; Sharma e Forster, 1996) ou estar associada às propriedades físico-químicas deste metal (Park *et al.*, 2004). De acordo com a classificação da Tabela 2.1 o Cr³⁺ aparece classificado como um metal forte (Classe A), aos quais se atribui um carácter predominantemente iónico nas suas ligações aos sítios de ligação da biomassa. No entanto, as espécies de Cr(III) que surgem em solução (e.g. Cr(OH)²⁺ a pH 5) podem ter propriedades químicas diferentes que originam um carácter covalente mais forte nas ligações à biomassa tornando a dessorção mais difícil.

5.6 Conclusões

Neste capítulo foi estudada a cinética e o equilíbrio de acumulação de Cr(III) pela levedura *S. cerevisiae* e pelas drêches submetidas a um tratamento alcalino (DCT) e sem qualquer tipo de tratamento (DST), bem como a dessorção do crómio ligado à levedura utilizando várias soluções eluentes. As principais conclusões são:

- i) O comportamento da sorção de Cr(III), no que respeita à velocidade e capacidade de acumulação, é dependente da concentração inicial de metal e da natureza do biossorvente;
- ii) A abordagem que considera um modelo cinético único para descrever os resultados experimentais ao longo de toda a gama de tempo de contacto não se coaduna com estes sistemas de sorção. O ajuste aos resultados experimentais pelo modelo cinético de difusão intraparticular revela que este fenómeno, não sendo a etapa limitante, assume um papel importante na definição da velocidade global da sorção de Cr(III), em particular para os tempos de contacto mais elevados. A influência da difusão intraparticular é maior para as concentrações de metal mais elevadas e em especial para a *S. cerevisiae* o que pode estar associado à formação de flocos, uma vez que a porosidade do sorvente afecta a difusão superficial (Ho *et al.*,

2000). Para o período inicial do processo, onde se verifica uma rápida acumulação do Cr(III), os resultados experimentais apresentam bons coeficientes de correlação e desvios percentuais em geral abaixo dos 12 % para o ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem.

iii) Uma cinética rápida tem uma elevada importância prática, na medida em que vai permitir a utilização de reactores de menor volume, garantindo elevada eficiência e economia (Loukidou *et al.*, 2004c). Deste ponto de vista verifica-se que os três bioissorventes têm valores para a constante cinética de pseudo-segunda (k_2) da mesma ordem de grandeza: entre $1,87 \times 10^{-1}$ a $2,77 \times 10^{-1} \text{ g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para a *S. cerevisiae*, respectivamente para as C_i de 10 e 200 mg.L^{-1} ; entre $3,47 \times 10^{-3}$ e $2,76 \times 10^{-2} \text{ g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para as DST e entre $3,97 \times 10^{-3}$ e $7,16 \times 10^{-2} \text{ g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para as DCT, respectivamente para soluções de C_i de 25 e 400 mg.L^{-1} .

iv) A fase inicial do processo de sorção, sendo bem descrita pelo modelo cinético de pseudo-segunda ordem, permite aferir que a quimiosorção, que pressupõe a troca iónica e a ligação covalente entre o Cr(III) e os sítios de ligação da biomassa, é dominante neste período.

v) O modelo de Langmuir é o que melhor se ajusta aos resultados experimentais relativos às isotérmicas de sorção, verificando-se que as DST são o bioissorvente com capacidade máxima de acumulação de metal mais elevada ($q_{max} = 16,68 \text{ mg.g}^{-1}$), enquanto que a *S. cerevisiae* tem a maior afinidade para o Cr(III) ($b = 0,100$) sendo o bioissorvente mais indicado para aplicação de tratamento em águas pouco concentradas (e.g. polimento final no tratamento de águas)

vi) A acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae* apresenta ainda uma segunda fase de equilíbrio, que não é ajustada pelos modelos de Freundlich nem de Langmuir, responsável pela acumulação de uma quantidade considerável de metal, que ocorre para tempos de contacto longos (entre 77 a 96 h) e à qual está associado um aumento do pH do meio, e que será investigada em maior profundidade no capítulo que se segue.

vii) Segundo Yan e Viraraghavan (2003) são a capacidade de bioissorção da biomassa e a possibilidade da sua reutilização que vão decidir o seu potencial de aplicação como bioissorvente. sendo em geral a adição de uma solução diluída de um ácido mineral forte, suficiente para afectar o equilíbrio da bioissorção e libertar os metais (Palmieri *et al.*, 2002). No entanto a eficiência de recuperação do Cr(III) ligado à *S. cerevisiae* não é encorajadora para este propósito. Uma vez que este panorama se enquadra com outros resultados publicados para a recuperação de Cr(III), e considerando que entre a adsorção física e a quimiosorção, a dessorção é mais fácil para a primeira (Bux *et al.*, 1995) e as diferenças das propriedades químicas entre os metais, a explicação para a maior irreversibilidade da sorção do Cr(III) pode estar associada a diferenças no mecanismo de ligação e ao carácter covalente mais forte.

viii) O tempo de contacto entre a *S. cerevisiae* e a solução de Cr(III) tem uma grande influência na eficiência de recuperação do metal, diminuindo à medida que o tempo de sorção aumenta. Este facto limita a acumulação de Cr(III) a períodos inferiores aos necessários para ser atingido o equilíbrio, reduzindo a eficiência de remoção de metal da solução. Assim é importante avaliar a necessidade da recuperação do Cr(III) e a regeneração da biomassa para definir as condições de

operação de um destes sistemas de sorção. Sendo a levedura um tipo de biomassa facilmente disponível e a custo reduzido, poderá privilegiar-se a maior remoção de metal da solução aquosa em detrimento da sua regeneração, no caso de o custo de transporte não ser significativo. No caso contrário poderá ser necessário recorrer a vários reactores em série com tempos de retenção de 30 min, para conseguir cumprir as metas legais para a qualidade da água tratada e ainda assim conseguir a recuperação do Cr(III) e a reutilização da biomassa em vários ciclos.

ix) De entre os agentes de dessorção testados os ácidos minerais parecem ser os mais indicados, na medida em que demonstram ser mais eficientes (em particular quando comparados com o Na_2CO_3) e permitem a recuperação do metal mais facilmente do que o EDTA que forma complexos com os metais. No que respeita à reutilização da biomassa em ciclos de sorção-dessorção o H_2SO_4 foi o eluente que originou o pior desempenho da *S. cerevisiae* nos 2º e 3º ciclos sendo desaconselhado para este efeito. Uma vez que existe a potencialidade de se formarem nitratos decorrentes da utilização de HNO_3 como eluente, o que torna a sua utilização menos atractiva (Aldor *et al.*, 1995), e que o HCl é considerado o reagente mais económico para além da sua utilização não ter afectado negativamente a biossorção nos ciclos que se seguiram à sua utilização, este parece ser o eluente mais indicado para a recuperação do Cr(III) e a regeneração da *S. cerevisiae* para ser utilizada em ciclos de sorção-dessorção.

CAPÍTULO 6 – Caracterização do mecanismo de interacção metal-biomassa

CAPÍTULO 6 – Caracterização do mecanismo de interacção metal-biomassa

6.1 Objectivos

Neste capítulo aborda-se a acumulação de Cr(III) à *S. cerevisiae* e às drêches, não do ponto de vista quantitativo, mas na perspectiva do estudo dos fenómenos que acompanham este processo, e.g. alterações do pH do meio e efluxo de cationes, bem com as alterações químicas e fisiológicas dos bioissorventes, com o desígnio de apurar o mecanismo envolvido, uma vez que o seu conhecimento e compreensão são fundamentais ao desenvolvimento de sistemas de bioissorção à escala real.

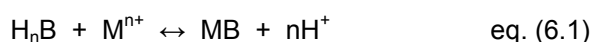
Sendo de esperar um mecanismo mais complexo para a interacção do crómio com a *S. cerevisiae*, utilizada nestes ensaios no seu estado viável, a sorção de Cr(III) a partir de soluções de concentração inicial entre 10 e 200 mg.L⁻¹ foi monitorizada no que respeita à: i) evolução do pH do meio; ii) libertação de cationes (Ca²⁺, K⁺ e Mg²⁺); iii) saída de material intracelular; e iv) viabilidade das células. Para caracterizar os grupos funcionais característicos dos bioissorventes, e que participam na sorção de Cr(III), procedeu-se ao estudo do espectro de infravermelho (FTIR) à *S. cerevisiae* e às DST antes e depois do contacto com soluções de metal. Por fim realizaram-se preparações de levedura com diferentes tempos de contacto com soluções de Cr(III) para observar por microscopia electrónica de transmissão, na tentativa de identificar a localização do metal acumulado.

6.2 Efeito do pH

A explicação da variação do pH no processo de bioissorção é útil para identificar o mecanismo de bioissorção de metais (Wang e Chen, 2006). O pH do meio além de ser um dos parâmetros que mais afecta a bioissorção, pela influência na carga da superfície da biomassa (negativa para valores de pH acima do ponto isoeléctrico) e na especiação do metal (Sheng *et al.*, 2004b), também é referido por vários autores como sofrendo variações decorrentes do fenómeno de bioissorção *per se*. No sentido de avaliar a relação entre o pH do meio e a acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae*, a sua evolução foi monitorizada ao longo do tempo em soluções de concentração inicial entre 0 mg.L⁻¹ (ensaio em branco) e 200 mg.L⁻¹. O pH das soluções iniciais foi ajustado a 5,00 ± 0,05 com NaOH 0,1 M no início dos ensaios. Não foi adicionada qualquer solução tampão ao meio para evitar a ocorrência de reacções desconhecidas entre estas e os iões metálicos (Mehta *et al.*, 2002). O pH da suspensão de levedura residual de produção de cerveja (4.1.1) é ácido, tendo sido determinado o valor de 5,99 ± 0,07. Os resultados experimentais apresentados ao longo do capítulo correspondem a valores médios obtidos em ensaios realizados em triplicado.

Na Figura 6.1 apresentam-se os resultados experimentais relativos à evolução do pH e da acumulação de Cr(III) ao longo do tempo de sorção. A comparação com o ensaio em branco permitem avaliar a influência da presença do metal na variação deste parâmetro. No início do processo verifica-se que nas soluções de $C_i = 50, 100$ e 200 mg.L^{-1} ocorre uma descida do pH do meio, cuja intensidade aumenta com a concentração de metal, que não se observa no ensaio realizado sem crómio nem nas soluções de 10 e 25 mg.L^{-1} . Uma vez que no ensaio em branco não ocorre acidificação do meio, é possível associá-la à biossorção de Cr(III) à *S. cerevisiae*. O facto de nas duas soluções de metal mais diluídas também não ter sido detectada esta variação de pH pode dever-se ao intervalo de tempo da monitorização ter sido demasiado espaçado pois na solução de $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ só se registou até aos 15 min de contacto. Segundo Volesky e Holan (1995) a biossorção de metais geralmente conduz à acidificação da solução, pelo que o comportamento verificado nas soluções mais concentradas é o comum aos sistemas de biossorção.

A mesma tendência de acidificação do meio verificada no início dos ensaios de sorção é relatada por vários autores: Yang e Volesky (1999b) na biossorção de Cd(II) em *Sargassum* protonada; Kratochvil *et al.* (1998) na biossorção de Cr(III) em *Sargassum*; Palmieri *et al.* (2002) na sorção de lantânio na alga *Sargassum fluitans*, verificando a descida do pH inicial de 4,0 para 3,7; Yetis *et al.* (2000) para a biossorção de Pb(II) em *Phanerochaete chrysosporium*, verificando que o pH inicial de 5 e 6, à medida que a biomassa tende para a saturação, evolui para valores próximos de 4; Chubar *et al.* (2003) que, na biossorção de Cu^{2+} em cortiça, também identificaram este efeito como sendo mais acentuado nas soluções mais concentradas em metal e para valores de pH inicial mais elevados, e ainda que o pH no equilíbrio é dependente do metal; e Tobin e Roux (1998) na biossorção de Cr(III) por *Mucor meihi*, onde a pH 4 a concentração de H^+ aumentou o equivalente à descida de 0,5 unidades de pH, correspondendo à libertação de aproximadamente $0,04 \text{ mmol H}^+$ por grama de biomassa, tendo a libertação de protões diminuído ligeiramente com o aumento da acumulação de crómio. A justificação dos autores para a ocorrência deste fenómeno é a troca iónica entre os protões da superfície da biomassa e os iões metálicos, traduzida pela equação (6.1).



onde M representa o metal, n a sua carga e B os sítios de ligação na biomassa (Chubar *et al.*, 2003).

A análise das alterações de pH ao longo da biossorção do Cr(III) tem ainda de considerar a hidrólise dos iões Cr^{3+} em soluções aquosas descrita pela equação (2.1) que pode explicar a descida de pH pela remoção dos iões $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ da solução provocando o deslocamento no sentido de uma maior libertação de protões (Cossich *et al.*, 2004). Ainda que a ligação de crómio à biomassa ocorra por troca iónica, a hidrólise do metal dificulta a definição da sua estequiometria através das alterações do valor do pH do sistema, pois os protões participam em várias reacções em simultâneo (Kratochvil *et al.*, 1998). Estes autores estudaram o mecanismo

de remoção de Cr(III) utilizando biomassa tratada com Ca em ensaios sem ajuste de pH, avaliando a remoção de crómio e a libertação de Ca^{2+} , verificando que a acumulação de 1 mol de Cr(III) envolve, em média, a libertação de 1,1 mol de Ca^{2+} (estequiometria média de 1:1), concluindo que 90 % do Cr(III) foi biossorvido na forma de catiões divalentes (provavelmente $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$) e os restantes 10 % eventualmente removidos na forma trivalente (Cr^{3+}).

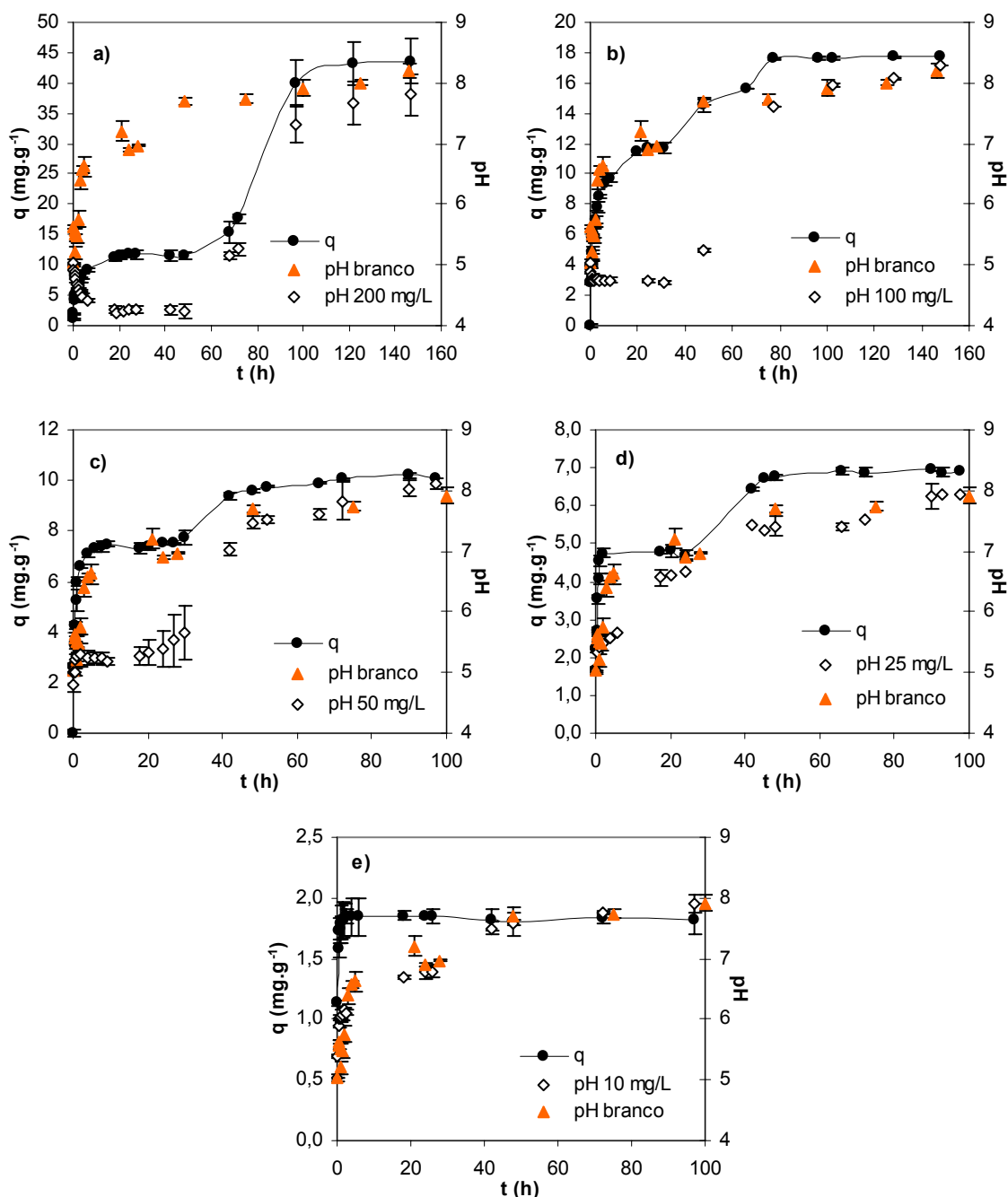


Figura 6.1 – Evolução do pH e da acumulação de Cr(III) em função do tempo de contacto: comparação com o ensaio em branco.

De acordo com a equação (6.1) as alterações de pH desfavorecem o processo de sorção devido ao efeito de competição entre o catião metálico e os prótons para os sítios de ligação da biomassa (Chubar *et al.*, 2003) e porque diminui o número de sítios de ligação aniônicos disponíveis (Yang e Volesky, 1999b), e.g. a valores de pH baixos os grupos carboxílicos não estão dissociados não podendo ligar-se as catiões metálicos em solução, ainda que possam intervir em reacções de complexação.

Conforme mostra a Figura 6.1, nos sistemas de biossorção em estudo a acidificação do meio apenas ocorre até aos 15 min de contacto com a solução de 50 mg.L^{-1} , após o que se mantém a valores próximos de 5,3 até às 24 h, invertendo-se então a tendência, para um aumento gradual do pH do meio até aos valores alcançados no ensaio em branco. Para as concentrações iniciais de 100 e 200 mg.L^{-1} a descida de pH mantém-se até às 24 h, estabiliza até às 48 h, período a partir do qual o pH assume igualmente a evolução de aumentar até alcançar os valores registados no ensaio em branco. Nestas soluções a libertação de prótons resultante da hidrólise dos iões Cr^{3+} parece ter uma maior influência no pH do meio que, talvez devido à maior concentração de metal, não é compensada pela presença da levedura. Pelo contrário, nas soluções de $C_i = 10$ e 25 mg.L^{-1} o perfil de pH dos sistemas aproximou-se muito do do ensaio em branco, parecendo apenas haver alguma influência da presença do metal na sua evolução até às 18 h do ensaio a $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$. Assim, o efeito interferente associado à acidificação do meio em resultado da troca iónica com prótons da biomassa não será prejudicial à biossorção de Cr(III) pela *S. cerevisiae*, só se fazendo sentir nas primeiras 48 h de contacto nas soluções de 100 e 200 mg.L^{-1} , sendo eventualmente possível nestes dois casos aumentar a acumulação de Cr(III) na fase inicial da biossorção pela *S. cerevisiae* mantendo o pH das soluções a 5,0.

Os resultados indicam ainda que o fenómeno de troca iónica ocorre rapidamente quando a levedura é colocada em contacto com a solução de Cr(III), correspondendo ao mecanismo que inicia o fenómeno de biossorção. Assim se explica que nos ensaios de dessorção anteriormente realizados a eficiência de recuperação de metal após 15 min de contacto seja a mais elevada, pois correspondem ao deslocamento reacção descrita na equação (6.1) no sentido inverso, realizada em meio com excesso de prótons.

Comparando agora a evolução do pH com a acumulação de Cr(III) pelas leveduras é possível observar uma correspondência entre o estabelecimento da primeira fase de equilíbrio e uma estabilização do pH do meio, para o qual correspondem os valores de 4,3, 4,7, 5,3 e 5,6 respectivamente para as concentrações de 200, 100, 50 e 25 mg.L^{-1} , e posteriormente, em paralelo com o aumento do valor deste parâmetro para valores idênticos ao do sistema sem metal, a acumulação de Cr(III) também sofre um incremento (à excepção da solução de $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$ onde a C_{eq} , após 2 h de contacto, era já bastante reduzida: $1,31 \text{ mg.L}^{-1}$). O pH medido às 97 h de sorção é de 7,3, 8,0, e 8,1, nos ensaios realizados a $C_i = 200, 100, 50 \text{ mg.L}^{-1}$ e de 7,9 para $C_i = 25, 10$ e 0 mg.L^{-1}

Confrontando o perfil de pH das várias soluções de Cr(III) com o do ensaio em branco, é possível concluir que o aumento de pH verificado resulta da adição da suspensão de levedura às soluções

aquosas, podendo ser atribuída à presença de metal o atraso na sua evolução até atingir valores próximos de 8, que se constata aumentar com o aumento de C_i .

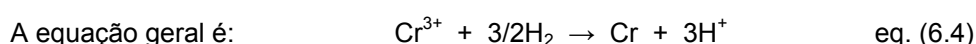
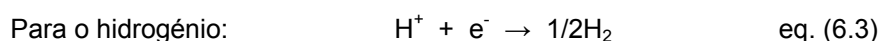
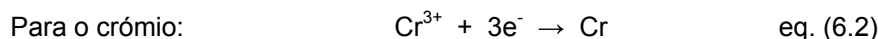
Diversos estudos relatam, de forma idêntica, o aumento do pH do meio em sistemas de bioadsorção. Davis *et al.* (2000) verificaram que com a biomassa não protonada de *Sargassum vulgare*, *Sargassum fluitans* e *Sargassum filipendula* I, quando em contacto com soluções de Cd(II) e Cu(II), necessitaram da adição de ácido durante as 3 primeiras horas de sorção para manter o pH a 4,5, havendo tendência para o aumento do pH até 5,5 nas soluções de menor concentração de metal. Niu e Volesky (2000) verificaram uma tendência para o aumento do pH do meio durante a bioadsorção de AuCN_2^- . Yan e Viraraghavan (2003) observaram que usando biomassa viável de *Mucor rouxii* o pH final dos ensaios era superior ao pH inicial, explicando o facto pela tendência de, em condições anaeróbias, a biomassa tender a neutralizar o pH do meio quando este é inferior a 7. Tsezos *et al.* (1995) observaram incrementos no valor de pH do meio após as 24 h dos ensaios de bioadsorção de Ag^+ e Ni^{2+} realizados com várias estirpes microbianas. Barros *et al.* (2007) também descrevem a bioadsorção de Cr(III) por lamas activadas em colunas de fluxo ascendente como demonstrando uma tendência para aumento do pH de 5,5 para 8,9. Na remoção de Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} de soluções aquosas por uma estirpe de *S. cerevisiae* residual de uma indústria cervejeira foi igualmente identificado um aumento do pH das soluções, após 96 h de incubação com a biomassa original, para valores entre 7,5 e 8 (Marques *et al.*, 2000).

As explicações para o aumento do pH associado à bioadsorção são diversas. De acordo com Srinath *et al.* (2002) quando se utilizam células vivas em condições não tamponadas, como no caso do presente estudo, a ocorrência de reacções redox entre as células e a solução provocaram um aumento do pH. No estudo da sorção de Cr(VI) por *Bacillus coagulans* os autores verificaram que, pelo contrário, a utilização de células não viáveis não provocou grandes alterações no pH do meio. O aumento do pH pode ser tido como uma indicação de que o processo de bioadsorção envolve iões H^+ ou a libertação de alguns iões como carbonatos que podem provocar alguma alcalinidade. Os óxidos e hidróxidos de metais em sistemas naturais coordenam-se com moléculas de água formando hidróxidos insolúveis adquirindo propriedades ácido-base muito importantes para o processo de adsorção e complexação, onde se podem ligar com os iões metálicos e outros iões em solução (Barros *et al.*, 2007).

Os metais pesados provocam alterações de permeabilidade na parede celular microbiana, permitindo que catiões como o potássio saiam da célula e sejam substituídos por protões aumentando o pH do meio. Uma vez que a superfície celular é aniónica está provavelmente rodeada de protões que, sendo substituídos por catiões metálicos, provocam a acidificação do meio. Assim o facto de se verificar o fenómeno inverso, tornando-se o pH mais alcalino nas 24 h que se seguiram à incubação da *S. cerevisiae* em soluções de Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Zn(II) pode ser interpretado como uma resposta aos danos da parede celular provocada pelos metais (Engl e Kunz, 1995). Segundo Marques *et al.* (2000) a tendência de aumento de pH das soluções de Cu(II), Cd(II) e Pb(II) quando em contacto com a biomassa não é uma consequência da

bioremoção mas da presença do biossorvente na solução que decorre da adição de células viáveis a soluções com teores sais dissolvidos reduzidos. O desequilíbrio osmótico daí resultante pode provocar um efluxo de produtos intracelulares alcalinos com o conseqüente aumento de pH.

O potencial redox também afecta a especiação e a solubilidade dos metais (Blackwell *et al.*, 1995). Segundo Tsezos *et al.* (1995) outro possível mecanismo para a biossorção de metais é a redução dos iões metálicos, resultando na presença de cristais elementares na biomassa. A possibilidade de ocorrência de redução é avaliada pelo potencial redox: os valores de potencial de redução electroquímica têm de ser conhecidos na gama de pH e concentrações em estudo.



O potencial (E) é dado pela equação de Nernst:

$$E = E^0 - \frac{0,05916}{n} \log Q \quad \text{eq. (6.5)}$$

onde E^0 é o potencial normal de redução, n é o nº de electrões transferido e Q é função da actividade dos produtos e reagentes. Fazendo a seguinte aproximação:

$$Q = \frac{[\text{Cr}][\text{H}^+]^3}{[\text{Cr}^{3+}](P_{\text{H}_2})^{3/2}} \quad \text{eq. (6.6)}$$

E substituindo a eq. (6.6) na eq. (6.5) obtém-se:

$$E = E^0 - \frac{0,05916}{n} \log \left[\frac{[\text{Cr}][\text{H}^+]^3}{[\text{Cr}^{3+}](P_{\text{H}_2})^{3/2}} \right] \quad \text{eq. (6.7)}$$

Com $[\text{Cr}] = 1$ e $P_{\text{H}_2} = 1$ atm:

$$E = E^0 - \frac{0,05916}{n} \left(\text{pH} + \frac{1}{3} \log[\text{Cr}^{3+}] \right) \quad \text{eq. (6.8)}$$

A eq. (6.8) permite calcular o potencial de redução para a gama de concentrações e pH de interesse. Sendo o potencial normal de redução do $\text{Cr}^{3+} = -0,74$ V, a reacção apresentada na equação (6.2) ocorre espontaneamente no sentido inverso. Aplicando a equação (6.8) às condições de pH e concentração de crómio utilizados nos ensaios realizados, verifica-se que o valor do potencial apresenta sempre valores negativos, indicando que a redução do ião metálico na biomassa não é favorecida, excluindo a possibilidade de formação de cristais de Cr elementar em resultado da interacção com a *S. cerevisiae*.

O aumento do pH nos sistemas de biossorção de Pb(II) por *Fucus vesiculosus* observada para concentrações iniciais superiores a 250 mg.L^{-1} resultou em isotérmicas em forma de "S", reflectindo a "melhoria" da sorção resultante da formação de hidróxidos (Holan e Volesky, 1994).

Valores de pH elevados resultam geralmente numa acumulação de catiões superiores devido à menor solubilidade dos metais. A microprecipitação de metais insolúveis pode ocorrer perto da neutralidade, complicando os esforços para elucidar o mecanismo de ligação do metal à biomassa, uma vez que tipicamente são os mecanismos de complexação/coordenação que dominam (Davis *et al.*, 2000). No entanto, se do ponto de vista do estudo do processo de sorção, a ocorrência de microprecipitação complica a análise de resultados, do ponto de vista da aplicação do processo ele pode ser desejável uma vez que aumenta a imobilização de metal (Holan e Volesky, 1994). Adicionalmente o aumento da concentração de hidróxidos na suspensão de biomassa, para valores de pH entre 6 e 7, pode ainda activar sítios de ligação adicionais nas paredes celulares, como os grupos fosfato monoester de açúcares ou fosfolípidos, cujo pK_a varia de 6,11 a 6,75 (Kefala *et al.*, 1999). No estudo da biossorção de Cd(II) em *Actinomyces* estes autores ajustaram o pH do meio a 7, valor a partir do qual pode começar a ocorrência de microprecipitação de Cd, afirmando que a $pH < 9$ não se verificou precipitação espontânea, apesar de não excluírem a hipótese da formação de compostos hidroxilados em torno de complexos de nucleação no interior da parede da estrutura da biomassa. As espécies hidrolisadas dimerizam através de um processo de condensação. A sequência de ambas as reacções resulta geralmente na formação de hidroxó-polímeros coloidais e, à medida que o pH continua a aumentar, à formação de precipitados metálicos.

Marques *et al.* (1999) estudaram a sorção de Cu(II), Cd(II) e Pb(II) a duas estirpes de levedura de cerveja residuais de indústrias cervejeiras, uma floculante (*S. cerevisiae*) e a outra não floculante (*S. carlsbergensis*). Ajustaram o pH das soluções metálicas entre 4,5 e 8. Após 96 h de contacto sem correcção do pH, o seu valor final variou entre 7,0 e 8,5. Para distinguir a sorção e a precipitação, os autores realizaram ensaios com a levedura não floculante a pH controlado na gama entre 4,5 e 5, verificando que nestas condições não houve sorção de Cd(II), e a sorção de Cu(II) foi reduzida em 50 %. A remoção de Pb só foi reduzida em menos de 10 %.

No sistema Cr(III)-*S. cerevisiae* também é notória a melhoria do desempenho da remoção de metal com o aumento do pH do meio, sendo ainda necessário esclarecer se este fenómeno se deve ao aparecimento de novos grupos funcionais com propriedades de ligação a Cr(III), à precipitação de crómio na forma de hidróxidos ou à ligação do metal a compostos intracelulares libertados devido ao aumento da permeabilidade da parede celular na sequência do choque osmótico a que as células são sujeitas. O aumento da capacidade de acumulação de Cr(III) pela levedura tem no entanto como desvantagem a necessidade de tempos de retenção muito elevados, e ainda pode inviabilizar a dessorção do metal dada a tendência anteriormente observada de a eficiência de recuperação diminuir com o aumento do tempo de sorção.

6.3 Efluxo de catiões

Tem sido generalizadamente assumido que a biossorção de metais pesados ocorre através de um mecanismo específico de troca iónica. Admite-se que a sorção envolve a substituição de prótons, catiões alcalinos e alcalino-terrosos entre outros, por catiões metálicos. As evidências

apresentadas assentam na relação estequiométrica entre os catiões removidos e os catiões libertados para solução (Schneider *et al.*, 2001). Vários estudos revelam que a sorção de iões metálicos é acompanhada da libertação de espécies iónicas para o meio (Kratochvil *et al.*, 1997). A libertação de K^+ , H^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} é a mais estudada, sendo inclusivamente referida em alguns casos a existência de uma relação estequiométrica entre a libertação de iões e a acumulação de metais (Blackwell *et al.*, 1995). Kratochvil *et al.* (1998) afirmam que a ligação de metais metálicos catiónicos a algas se processa por troca iónica: os grupos funcionais ácidos da biomassa ligam-se aos catiões metálicos da solução, libertando protões e/ou catiões metálicos leves como os iões Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} .

No presente trabalho, paralelamente ao estudo da evolução do pH nas soluções de Cr(III) foi monitorizada a libertação dos iões K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} para as concentrações iniciais de metal de 10, 25, 50, 100 e 200 $mg.L^{-1}$, comparando-a com a de um ensaio realizado nas mesmas condições mas sem metal. Procedeu-se ainda à caracterização da levedura na suspensão adicionada às soluções de metal, preparada de acordo com o descrito em 4.1.1, e ao sobrenadante da suspensão no que respeita aos teores destes três metais leves (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 – Caracterização da suspensão de *S. cerevisiae* e do respectivo sobrenadante.

	ST ($g.L^{-1}$)	SVT ($g.L^{-1}$)	Cinzas ($g.L^{-1}$)	K	Ca	Mg
Suspensão de <i>S. cerevisiae</i>	51,88±3,90	46,70±3,09	5,66±1,80	23,50±3,56 ($mg.g^{-1}$)	2,08±0,44 ($mg.g^{-1}$)	1,38±0,35 ($mg.g^{-1}$)
Sobrenadante				30,16±2,89 ($mg.L^{-1}$)	9,65±0,05 ($mg.L^{-1}$)	7,16±0,18 ($mg.L^{-1}$)

Os teores de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} determinados no sobrenadante da suspensão de levedura utilizada como inóculo das soluções de metal foram utilizados para calcular a respectiva concentração na mistura solução metálica-inóculo para o instante $t = 0$, para correcção dos valores determinados a partir de então. A composição da *S. cerevisiae* na suspensão indica que o catião mais abundante é o potássio ($600,1 \mu mol.g^{-1}$), seguindo-se o magnésio ($56,78 \mu mol.g^{-1}$) e o cálcio ($51,89 \mu mol.g^{-1}$). Os valores obtidos para os teores de K^+ e Mg^{2+} , apesar de seguirem a ordem relativa indicada por Blackwell *et al.* (1998), apresentam valores mais baixos comparativamente aos publicados por Blackwell e Tobin (1999) para levedura de cerveja fresca, verificando-se o inverso para o ião Ca^{2+} : 620, 225 e $< 4 \mu mol.g^{-1}$ respectivamente. Estas diferenças podem dever-se ao facto a determinação deste trabalho ter sido realizada à levedura em suspensão, já submetida a três fases de lavagem com água destilada e centrifugação, sendo provável a perda destes catiões durante estas manipulações. Já o teor em cálcio, bastante superior na levedura utilizada neste estudo, pode ser atribuído à sua propriedade floculante, pelo papel de cofactor que estes iões desempenham na activação da capacidade de floculação das leveduras (Teixeira *et al.*, 1995).

No estudo da libertação de iões Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} de *Sargassum fluitans* para água destilada a diferentes valores de pH entre 1 e 7, Lee e Volesky (1997) verificaram que a pH 1 a quantidade

total de iões libertados foi superior na biomassa nativa ($2,27 \text{ mmol.g}^{-1}$) relativamente à biomassa sujeita a 5 lavagens com água destilada ($1,64 \text{ mmol.g}^{-1}$). Os autores afirmam que a fracção dos diferentes metais que permanece na biomassa após a lavagem corresponde provavelmente à fracção que está ligada a grupos carboxílicos, hidroxilo e/ou sulfato, classificando a ordem de afinidade destes iões para a biomassa como sendo: $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$. Neste contexto será de esperar que o aumento da concentração dos metais leves em solução seja indicativo de um mecanismo de troca iónica que é, para os catiões monitorizados no presente trabalho, mais favorável ao ião potássio seguido pelo magnésio e pelo cálcio. Os resultados experimentais relativos à evolução da libertação de K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} e a acumulação de Cr(III) são apresentados nas Figuras 6.2 a 6.6. Verifica-se que em todos os ensaios, incluído naquele realizado na ausência de Cr(III) ocorre a libertação dos três metais leves.

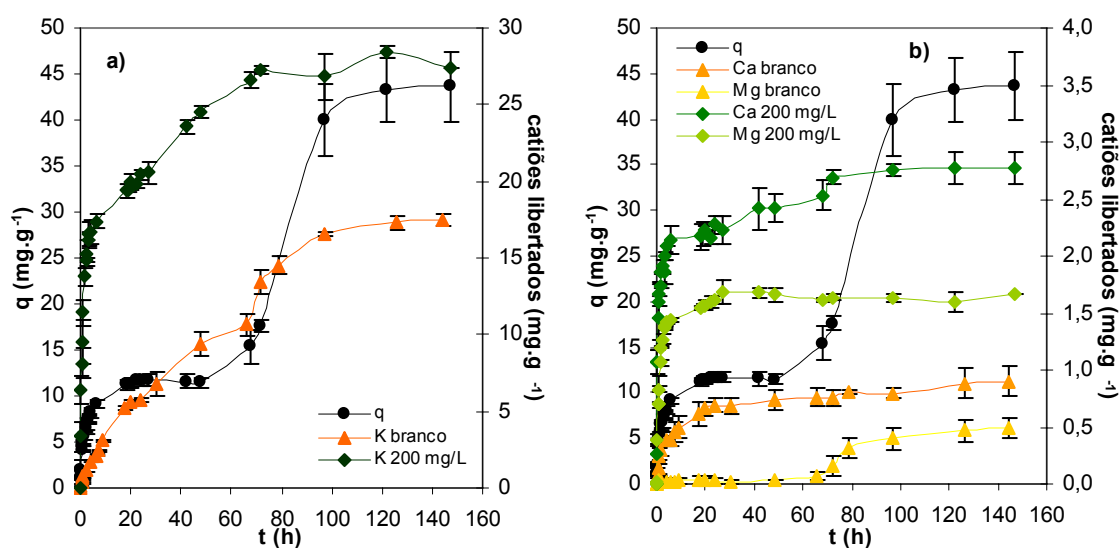


Figura 6.2 – Efluxo de cations da *S. cerevisiae* durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 200 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .

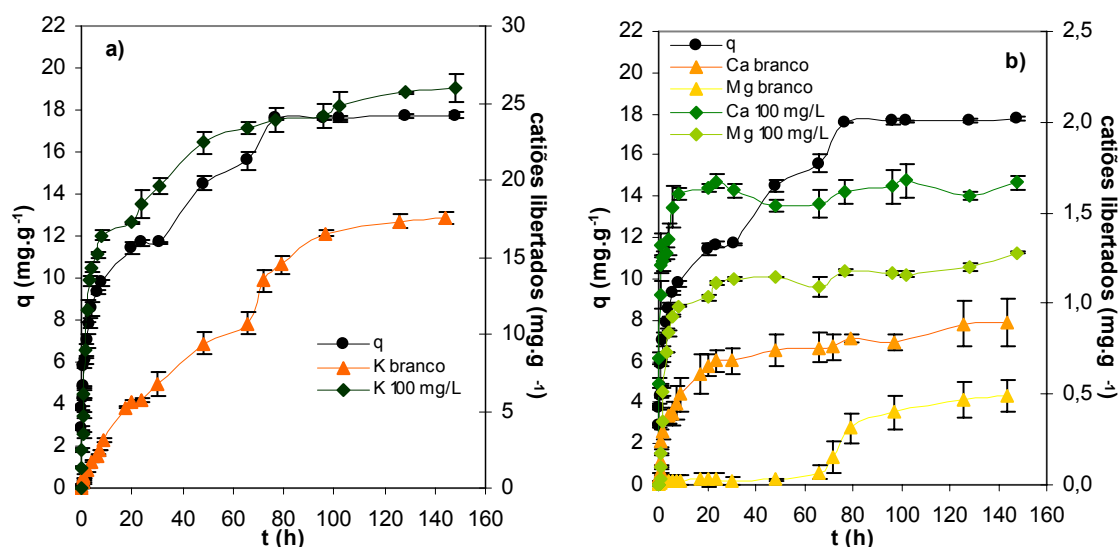


Figura 6.3 – Efluxo de cations da *S. cerevisiae* durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .

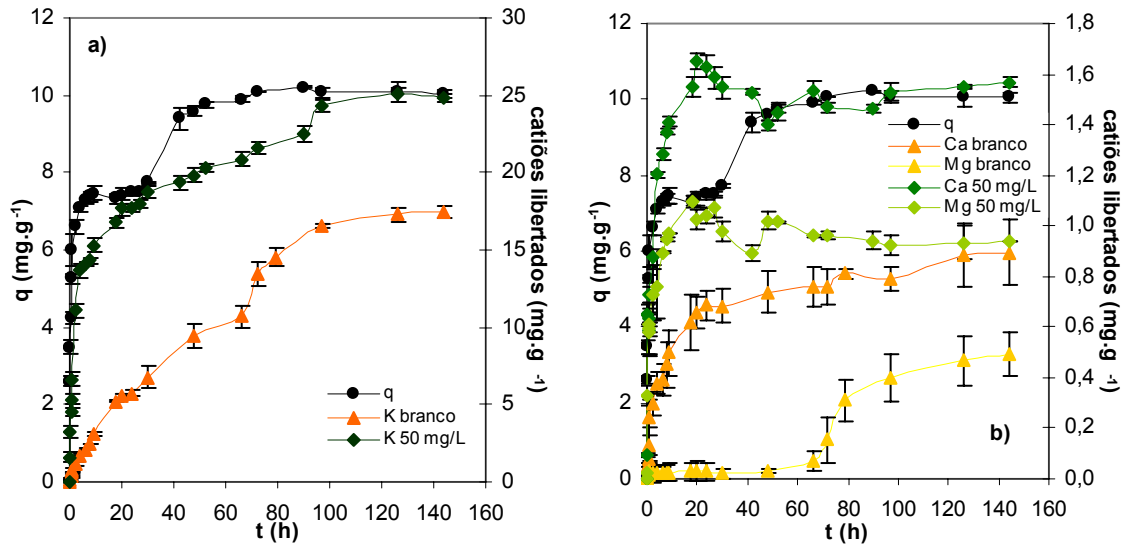


Figura 6.4 – Efluxo de cationes da *S. cerevisiae* durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .

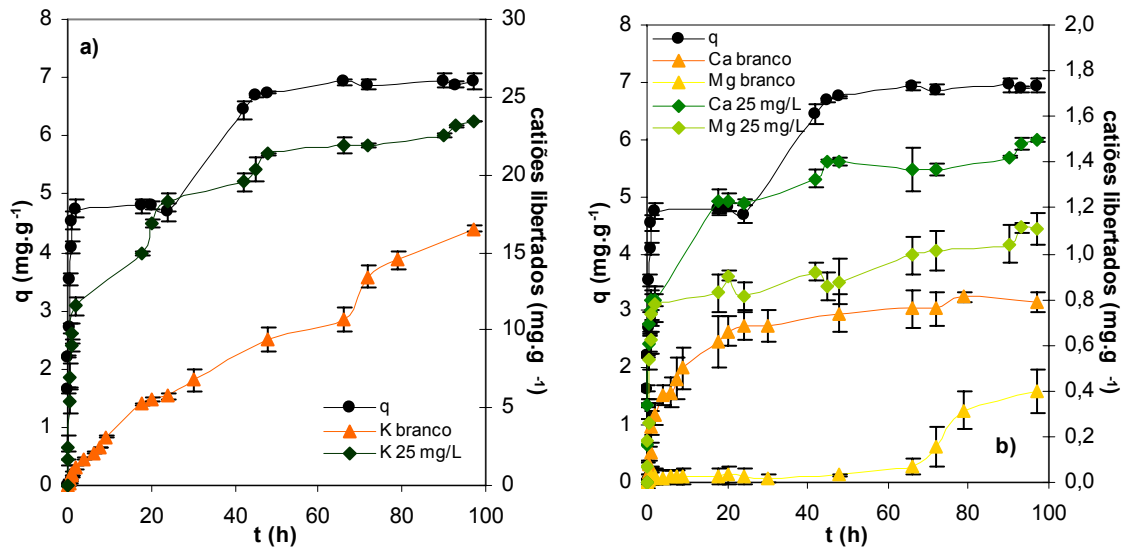


Figura 6.5 – Efluxo de cationes da *S. cerevisiae* durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .

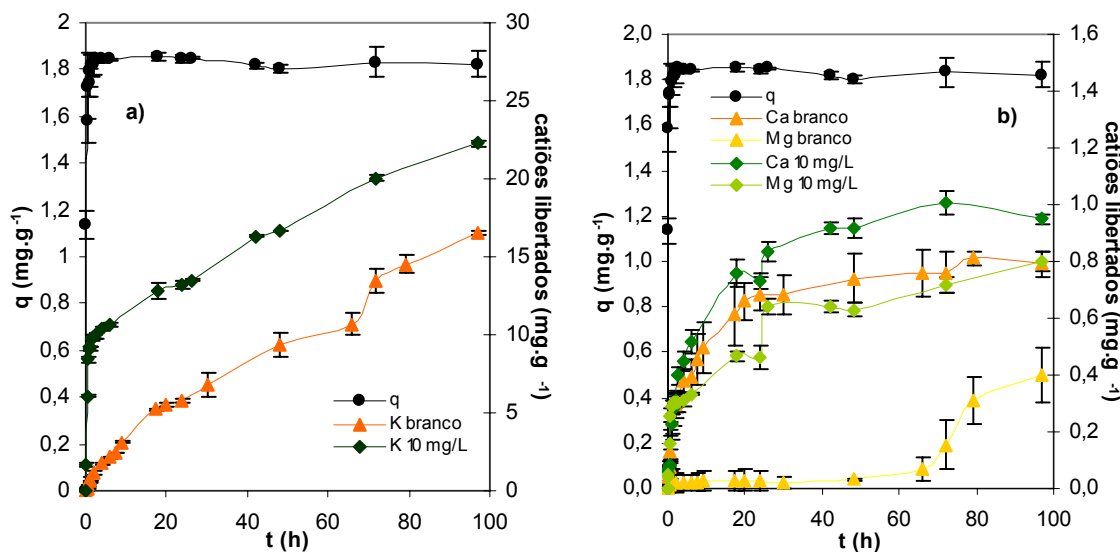


Figura 6.6 – Efluxo de cationes da *S. cerevisiae* durante a acumulação de Cr(III) numa solução de $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$: a) K^+ ; b) Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Tal como se pode observar pelas Figuras 6.2 a 6.6 o efluxo de cationes K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , ainda que ocorra também no ensaio em branco, é superior nos sistemas que contêm Cr(III), pelo que se pode concluir que a presença de metal potencia a saída destes cationes das células. Um outro efeito decorrente da presença do Cr(III) é a libertação mais rápida dos cationes, traduzida pelo declive inicial mais abrupto observado nos sistemas com metal. Este efeito é particularmente visível para o Mg^{2+} , cuja presença em solução, no ensaio em branco, só começa a ser significativa a partir das 72 h de incubação. Uma vez que, na *S. cerevisiae*, este catione se localiza predominantemente no vacúolo (Avery e Tobin, 1992), o atraso do seu efluxo na ausência de Cr(III) pode ser sinónimo de que a integridade da membrana deste organelo se mantém durante um período de ensaio mais longo nestas condições. Quantitativamente, o efluxo é superior para o potássio, o que era expectável considerando que também é o catione mais abundante nas células.

Comparando a evolução da efluxo de cationes com a acumulação de Cr(III) verifica-se que a tendência para os primeiros é a de um aumento rápido da sua concentração em solução, seguido de um incremento mais lento. Em especial, no caso do Ca^{2+} e do Mg^{2+} , os valores tendem a estabilizar ao fim de 24 h. Assim não se verifica uma correlação entre estes fenómenos e a acumulação de Cr(III) observada na segunda fase de equilíbrio.

Segundo Suh *et al.* (1999a) a acumulação de metais pela *S. cerevisiae* é geralmente acompanhado pela libertação de K^+ , o que pode ser parte integral do mecanismo fisiológico de manutenção do balanço iónico ou pode ser um sintoma da ruptura da membrana celular e da morte celular. Estes autores estudaram a acumulação de Pb^{2+} a células viáveis de *S. cerevisiae*. Os ensaios foram realizados sem controlo do pH e a quantidade máxima de Pb(II) acumulada foi de 1,1 mmol/g ao fim de 120 h. O padrão de efluxo de cationes observado diferiu do apresentado neste estudo para a cumulação de Cr(III), o que pode estar associado a diferenças no

mecanismo de acumulação de Pb(II) e de Cr(III) à *S. cerevisiae*: a libertação de K^+ aumentou rapidamente nas primeiras 24 h, mantendo-se constante a partir daí, correspondendo à libertação de $0,15 \text{ mmol } K^+ \cdot g^{-1}$. Por outro lado o Mg^{2+} foi continuamente libertado até ao máximo de $0,08 \text{ mmol/g}$ e a libertação de Ca^{2+} foi muito baixa. Uma vez que o Pb^{2+} se acumula intracelularmente na *S. cerevisiae*, os autores concluem que estes metais leves são libertados da parede celular, da membrana celular e do interior das leveduras, sugerindo que a troca catiónica desempenha um papel importante na sua acumulação quando os sítios de ligação estão no interior da célula.

O facto de no ensaio em branco também ter ocorrido um efluxo considerável de catiões pode resultar de as células utilizadas como inóculo serem colocadas apenas em água destilada ou água destilada + metal, sem qualquer suplemento de sais minerais ou nutrientes além dos libertados pela lise celular. Estas condições de stresse osmótico e de carência de nutrientes, simultaneamente com o facto de a origem das células ser a de um meio de fermentação alcoólica, onde o etanol tem um efeito de permeabilização das células (Marques, 2002), pode contribuir para a maior susceptibilidade da membrana plasmática resultando na difusão de catiões intracelulares para o meio externo. As células incubadas com as soluções de Cr(III) têm um efeito de stresse acrescido devido ao efeito de toxicidade exercido pelo metal, que pode conduzir à morte e lise celular, contribuindo para o aumento das concentrações de K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} no meio, e também pelo efeito de peroxidação lipídica dos ácidos gordos insaturados induzida pelos metais, que contribui para a permeabilização da membrana celular (Masia *et al.*, 1998), pelo que é de esperar que o efluxo de catiões seja superior nestas condições, o que corrobora os resultados apresentados. Blackwell e Tobin (1999) referem a perda de K^+ como característica da acumulação de metais pesados, sendo utilizada como um indicador da toxicidade dos metais para as células, e que o aumento de efluxo deste catião favorece mais a acumulação de iões divalentes pelo aumento do potencial da membrana.

O efluxo de catiões associado à biossorção de metais é referido em trabalhos de vários investigadores, surgindo ainda tentativas de encontrar relações estequiométricas que justifiquem o processo de troca iónica. Blackwell *et al.* (1995) referem que a acumulação de Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Li^+ , Zn^{2+} e Sr^{2+} induziu a libertação de catiões da *S. cerevisiae*. Brady e Tobin (1995) verificaram a saída de Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+ da biomassa de *Rhizopus arrhizus* em resultado da sorção de Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} . Davis *et al.* (2003b) referem que foi observado um aumento da libertação de iões Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Na^+ da alga *Ascophyllum nodosum* em soluções de cobalto, comparativamente à libertação dos mesmos iões em soluções sem metal, verificando uma relação estequiométrica de 2:3 entre a libertação de Ca^+ e a remoção de Co^{2+} na alga pré-tratada com $CaCl_2$ e HCl, concluindo que a troca iónica era o principal mecanismo envolvido.

Schiewer e Volesky (1995) ao realizarem ensaios de biossorção de Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} com a alga marinha *Sargassum*, constataram que adicionando a biomassa sem pré-tratamento às soluções metálicas, ocorria um aumento de pH e a libertação de metais leves, atribuindo o fenómeno à troca iónica, na qual a libertação de metais leves equilibrava a acumulação de protões e metais pesados. Ginisty *et al.* (1998) prevêm o mecanismo de troca iónica envolvido na biossorção de

Co(II) a *Pseudomonas halodenitrificans* pela quantidade de íons libertados pela biomassa durante a biossorção. Esta iguala o desaparecimento de Ca^{2+} da fase sólida durante a biossorção de Co^{2+} , quando comparada com ensaios em branco realizados na ausência de metal, verificando-se uma troca estequiométrica entre os íons para concentrações de equilíbrio inferiores a 1 mM. Para concentrações superiores, a biomassa continua a remover Co^{2+} até atingir a saturação, mas a concentração de Ca^{2+} permanece constante.

Blackwell e Tobin (1999) verificaram que na acumulação de Cd(II) por *S. cerevisiae* na ausência de glucose, a libertação líquida de K^+ , o catião com os níveis citoplasmáticos mais elevados entre os três analisados (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), não foi perceptível durante a primeira hora de incubação, enquanto que na presença de glucose foi imediata, e a quantidade total de K^+ libertada neste ensaio foi superior ao que decorreu na ausência de fonte de C (aproximadamente $325 \mu\text{mol.g}^{-1}$, cerca de 50 % do teor inicial, contra $200 \mu\text{mol.g}^{-1}$, ao fim de 5 h). Os autores justificam esta diferença pela quantidade de Cd(II) acumulada intracelularmente por mecanismos activos de decorrem na presença de glucose. A quantidade de K^+ ligado é muito baixa (< a 2 % do total), indicando que este ião é essencialmente solúvel e não está ligado em associação a material celular sólido, localizando-se maioritariamente no vacúolo (70 %). O sequestro de Cd(II) teve um impacte nos níveis subcelulares de K^+ superior aos de Mg^{2+} . Ainda que não tenha sido observada uma libertação líquida de Mg^{2+} (cerca de 90 % ficou retido na célula), verificaram-se alterações dos seus níveis nos compartimentos subcelulares: o Mg^{2+} citoplasmático aumentou, enquanto que a quantidade vacuolar e a fracção ligada diminuíram, o que pode ser uma indicação de que o cádmio desestabiliza o Mg^{2+} ligado. A perda de K^+ da fracção citoplasmática e vacuolar foi atribuída pelos autores à resposta dos efeitos tóxicos do Cd(II) e às consequentes lesões na membrana plasmática, e a reduzida libertação de Ca^{2+} e Mg^{2+} , induzida pela acumulação de Cd^{2+} sugere que os íons metálicos não se ligam a sítios previamente ocupados por estes íons. Não há evidência de um balanço estequiométrico entre a libertação de K^+ e a acumulação de Cd^{2+} .

Para caracterizar a natureza da acumulação de Sr^{2+} independente do metabolismo Avery e Tobin (1992) investigaram a troca de Mg^{2+} , Ca^{2+} e H^+ decorrentes da biossorção deste metal a duas estirpes de *S. cerevisiae*, uma laboratorial e outra obtida numa indústria cervejeira. Verificaram que, para as células vivas não metabolizáveis (incubadas na ausência de glucose), o Ca^{2+} foi o catião libertado em maior quantidade pela estirpe de colecção (60 %), seguido pelos íons H^+ (21 %) e Mg^{2+} (19 %). A troca de Sr^{2+} por estes catiões não foi estequiométrica, e a carga total libertada na adsorção do Sr^{2+} foi apenas de 45 % da carga total removida. Na estirpe industrial o catião libertado em maior quantidade foi o Mg^{2+} , não sendo também observável uma estequiometria entre a acumulação de Sr^{2+} e a libertação dos catiões estudados. O aumento da concentração de Sr^{2+} de 100 para 1000 μM resultou num aumento da libertação dos catiões na estirpe industrial. Para ambas as biomassas verificou-se que na ausência de glucose os níveis de Ca^{2+} e Mg^{2+} do citoplasma diminuiriam, mas não os do vacúolo. Já na presença de glucose o estímulo à acumulação intracelular de Sr^{2+} resultou no decréscimo dos níveis de Mg^{2+} do citoplasma (mas não de Ca^{2+}) e também uma diminuição do conteúdo de Mg^{2+} do vacúolo.

A análise correspondente a uma eventual relação estequiométrica entre a acumulação de Cr(III) e o efluxo de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} é apresentada na Tabela 6.2. Uma vez que o efluxo também ocorre em soluções sem metal, os valores apresentados foram corrigidos relativamente ao efluxo verificado no ensaio em branco, traduzindo apenas a libertação de cátions resultante da presença do metal em solução.

Tabela 6.2 – Razão entre a libertação de cátions libertados e o crómio acumulado. Valores corrigidos relativamente ao ensaio em branco.

		Concentração da solução de Cr(III) (mg.L ⁻¹)					
		Tempo de sorção (h)	200	100	50	25	10
Razão K:Cr ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$)	0,5		2,47	0,97	1,30	2,50	6,21
	2		2,80	1,96	1,99	2,90	6,34
	4		2,43	1,96	2,24		6,21
	24		1,67	1,44	2,12	3,54	5,37
	48		1,75	1,19	1,45	2,35	5,34
	72		1,04	0,79	1,08	1,64	4,77
	97		0,34	0,57	1,02	1,33	4,18
Razão Ca:Cr ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$)	0,5		0,42	0,29	0,15	0,23	0,0021
	2		0,31	0,17	0,11	0,14	0,012
	4		0,27	0,15	0,15		0,048
	24		0,18	0,11	0,16	0,15	0,033
	48		0,19	0,07	0,09	0,13	0,13
	72		0,14	0,06	0,09	0,11	0,18
	97		0,06	0,06	0,09	0,13	0,11
Razão Mg:Cr ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$)	0,5		0,35	0,012	0,30	0,25	0,18
	2		0,39	0,15	0,23	0,21	0,33
	4		0,37	0,21	0,22		0,34
	24		0,29	0,20	0,29	0,33	0,50
	48		0,30	0,16	0,22	0,26	0,71
	72		0,18	0,12	0,17	0,21	0,66
	97		0,066	0,093	0,11	0,16	0,47
Razão (K+Ca+Mg):Cr ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$)	0,5		3,24	1,27	1,76	2,98	6,39
	2		3,50	2,28	2,33	3,24	6,68
	4		3,07	2,32	2,62		6,60
	24		2,14	1,75	2,58	4,02	5,90
	48		2,24	1,43	1,76	2,73	6,18
	72		1,36	0,97	1,34	1,97	5,60
	97		0,47	0,73	1,22	1,61	4,77

A relação entre a libertação de iões K^+ e a acumulação de crómio não indica a existência de uma relação estequiométrica. Ainda que a tendência verificada fosse a de um maior efluxo de K^+ com o aumento de C_i , em termos percentuais da libertação observada na primeira fase de equilíbrio relativamente ao final de 97 h de incubação, verifica-se que a quantidade de potássio libertada se

relaciona mais com o tempo de incubação do que com a acumulação de Cr(III), com valores de 76 % para $C_i = 100$ e 200 mg.L^{-1} e 73,1 % para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ (todos com o equilíbrio às 24 h de incubação), e 49,3 e 44,3 % respectivamente para as concentrações iniciais de 25 e 10 mg.L^{-1} , que atingem o equilíbrio às 2 h. No que respeita à segunda fase de remoção de Cr(III), é possível constatar que a perda de K^+ pelas leveduras ao fim de 97 h se aproxima do conteúdo total deste catião nas células, variando entre $569,5 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ na solução de 10 mg.L^{-1} a $686,3 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ na de 200 mg.L^{-1} sendo eventualmente sinal de que as células sofreram danos em larga extensão e que é mais provável que a saída de K^+ da biomassa seja resultado da permeabilização da membrana e a difusão no sentido do gradiente de concentração, do que da troca iónica com iões $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$.

White e Gadd (1995) estudaram o efluxo de K^+ resultante da exposição da levedura *S. cerevisiae* a Zn^{2+} , verificando que este fenómeno se iniciou logo após a adição de um pouco de solução de ZnCl_2 à biomassa. Concluíram que a cinética de efluxo de K^+ é independente da concentração de Zn^{2+} , ainda que o efluxo máximo seja fortemente dependente dela, aumentando com a concentração. Ainda que não haja certeza se a libertação de K^+ aumenta devido à morte celular ou se é a perda de viabilidade que resulta da libertação de K^+ , existe claramente uma relação entre a viabilidade celular e o efluxo de K^+ (Suh *et al.*, 1999a), pelo que o estudo da viabilidade da *S. cerevisiae* também ajudará a esclarecer a relação entre o efluxo deste catião e a acumulação de crómio.

Relativamente aos iões Ca^{2+} e Mg^{2+} já se verifica, para a primeira fase de equilíbrio, uma maior proximidade entre os coeficientes estequiométricos apresentados na Tabela 6.2 para as soluções de diferentes concentrações iniciais, o que paralelamente à tendência de estabilização observada para esse mesmo período pode ser indicativo da ocorrência de um mecanismo de troca iónica entre estes catiões e o $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ ainda que não seja suficiente para um balanço de cargas nulo.

Para as soluções de $C_i = 50, 100$ e 200 mg.L^{-1} , no equilíbrio, as percentagens de libertação Ca^{2+} relativamente às 97 h foram respectivamente de 100, 100 e 83 %, e para o Mg^{2+} foram de 100, 95,1 e 99,2 %. Este comportamento é compatível com o mecanismo provável que compreende a ocorrência de quimiossorção no período inicial do contacto da solução metálica com a *S. cerevisiae*, durante a qual pode dar-se a troca iónica do crómio com os iões Ca^{2+} e Mg^{2+} , seguindo-se a bioacumulação intracelular. Nas soluções mais diluídas o efluxo destes iões no equilíbrio não corresponde a valores próximos dos totais: 33 e 53 % de Ca^{2+} e 38 e 70 % para 10 e 25 mg.L^{-1} respectivamente, o que pode ser explicado pelo facto de a acumulação de Cr(III) para estas concentrações iniciais não estar ainda próxima da saturação da biomassa.

6.4 Efluxo de material intracelular

A influência da toxicidade dos metais nos microrganismos reflecte-se em parte através do efeito que exercem na estrutura e função da membrana celular (White e Gadd, 1995). Durante a acumulação de metais a biomassa microbiana tem sido descrita a perda de viabilidade das

células e a libertação de iões K^+ , H^+ , Ca^{2+} , e Mg^{2+} , bem como de compostos orgânicos (Soares *et al.*, 2002b). A possível libertação de várias substâncias biológicas e vestígios de meio nutriente da biomassa para a solução com metais pode induzir a sua complexação, hidrólise ou precipitação e assim reduzir a concentração de iões metálicos livres em solução (Kogej e Pavko, 2001). Tendo sido observado o efluxo de catiões das células ao longo da incubação em água e nas soluções metálicas e sendo provável a ocorrência de danos na membrana plasmática, que diminuindo a sua eficiência como barreira semi-permeável permitem a saída de componentes intracelulares para o meio extracelular (Marques, 2002), o sobrenadante dos sistemas de biossorção foi analisado por espectroscopia de UV/Visível na gama entre 200 a 500 nm para pesquisar a presença compostos que absorvem radiação nesta gama de comprimento de onda.

Os espectros de varrimento obtidos para as amostras recolhidas ao longo de 144 h em água e soluções de crómio entre 10 e 200 $mg.L^{-1}$ são apresentados na Figura 6.7, que mostra o aparecimento de um pico correspondente aos 260 nm, com intensidade crescente com o aumento do tempo de incubação até às 48-72 h de incubação, observando-se ainda, nas soluções de 50, 100 e 200 $mg.L^{-1}$ o aparecimento de um segundo pico a 320 nm após esse período. Lee e Lewis (1968), citado por Marques (2002) identificaram a libertação de compostos azotados que absorvem radiação a 260 nm, constituídos essencialmente por aminoácidos, ADP e NAD, em suspensões de *S. carlsbergensis* em água e soluções diluídas de glucose.

Marques (2002), num sistema aberto de sorção de Cu(II) a células de *S. cerevisiae* imobilizadas em PUR-5000, descreve um comportamento idêntico ao do presente trabalho, com o aumento da absorvância a 260 nm ao longo do tempo de ensaio, até às 96 h, iniciando o incremento da concentração compostos intracelulares no meio. Também Soares *et al.* (2002b) avaliaram ao longo de 60 min a libertação fosfato inorgânico e compostos com absorção a 260 nm resultantes da sorção de Cu(II), Cd(II) e Pb(II) a uma estirpe laboratorial de *S. cerevisiae*, verificando que só o primeiro deu origem à libertação de quantidades significativas destes compostos. A absorvância a 260 nm aumentou com o tempo de contacto com a solução de Cu até um máximo correspondente a 40 min de contacto, e o efluxo de fosfato inorgânico seguiu o mesmo padrão. Os compostos com absorvância a 260 nm, maioritariamente moléculas que contêm azoto derivadas de nucleótidos, cuja libertação resulta provavelmente de lesões selectivas na membrana plasmática da levedura eventualmente devido a alterações nos lípidos da membrana em resultado da peroxidação induzida pelo Cu(II).

No entanto, Soares *et al.* (2002b) não detectaram a presença de proteínas libertadas pelas leveduras, sugerindo que não ocorre lise celular de forma significativa. Os autores verificaram, pelos parâmetros de complexação calculados (capacidade de complexação e constante de estabilidade) que apenas os ligandos orgânicos solúveis podem competir com as células para a ligação aos metais pesados. A ocorrência deste fenómeno diminui a quantidade total de metal acumulado pelas leveduras, reduzindo a eficiência de remoção dos metais pelas células o que é particularmente importante quando se considera a biorremediação de águas ou solos utilizando células vivas.

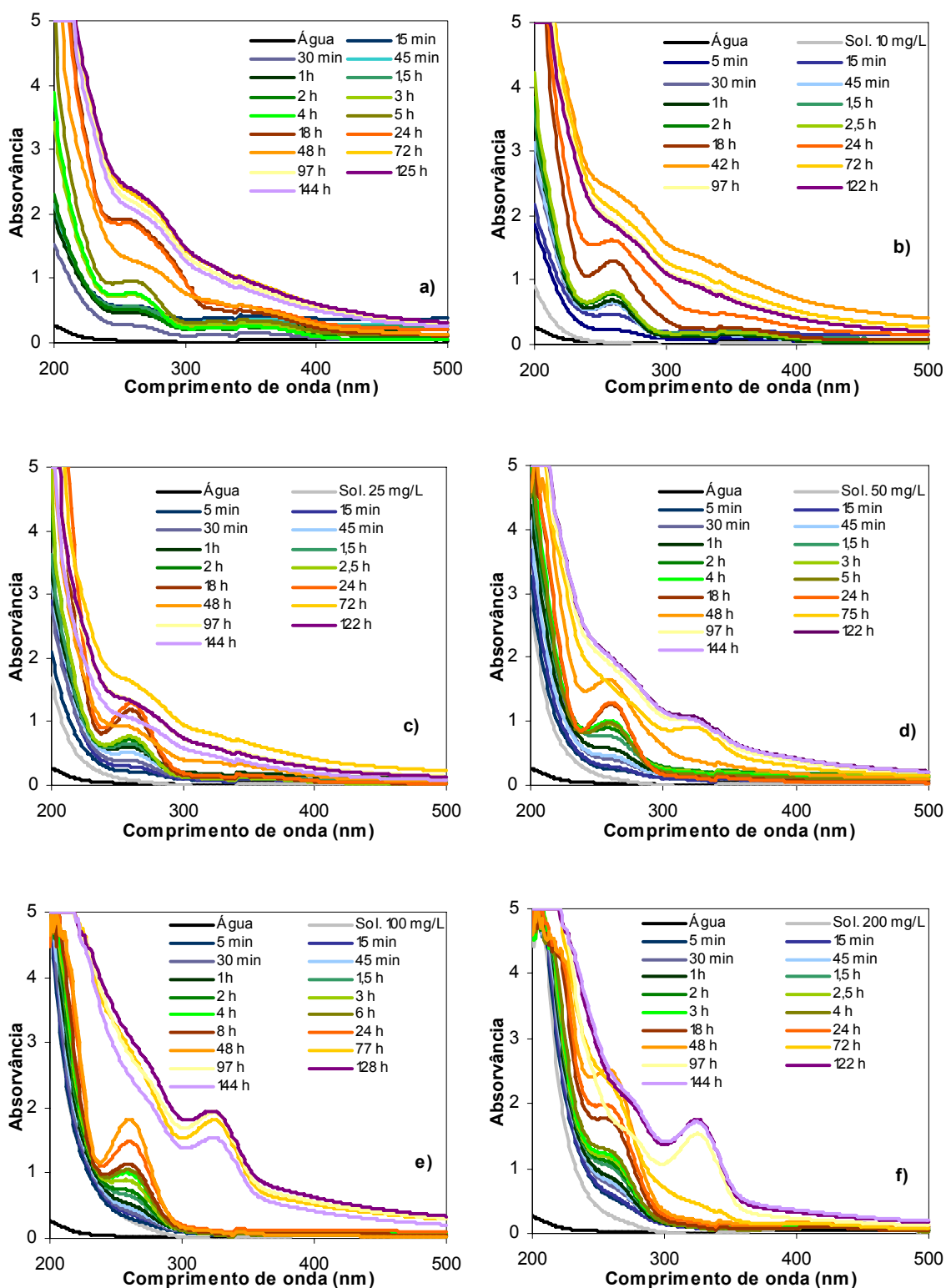


Figura 6.7 – Espectro de varrimento na zona UV-visível de amostras recolhidas para vários tempos de sorção: a) Ensaio em branco; b) $C_i = 10 \text{ mg.L}^{-1}$; c) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; d) $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$; e) $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$; f) $C_i = 200 \text{ mg.L}^{-1}$.

Riordan e Mchale (1998) submeteram as células de *S. cerevisiae* residuais de uma indústria de cerveja a um tratamento de homogeneização, que envolve a ruptura celular, seguido de lavagem, observando que a capacidade máxima de remoção diminuiu, contrariando o expectável devido ao aumento de área superficial do biossorbente para a ligação ao metal. Estes resultados indicaram que a remoção de algum material dissolvido e/ou na forma de pequenas partículas contribuem muito significativamente para o processo global de remoção de chumbo, existindo assim outro mecanismo para além da biossorção. Realizando ensaios de diálise, os autores concluíram que a libertação de material das células tem uma contribuição significativa na remoção de Pb(II) por precipitação. As substâncias envolvidas neste fenómeno são indicadas como sendo materiais de baixo peso molecular, como fosfatos, carbonatos/bicarbonatos e também substâncias de maior peso molecular como proteínas e ácidos nucleicos. Os autores concluem então que a remoção de Pb(II) pela levedura resulta da combinação de biossorção e precipitação.

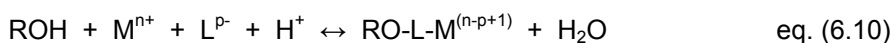
De acordo com estes factos, pode colocar-se em questão se a ligação do Cr(III) ocorre efectivamente às células de *S. cerevisiae* ou aos produtos intracelulares libertados durante os ensaios, sendo difícil, com os resultados disponíveis, avaliar esta situação. Já no caso dos compostos com absorção a 320 nm, apenas observada para tempos de incubação superiores a 75 h, a correlação que se verifica entre o seu aparecimento e a ocorrência da segunda fase de remoção de crómio da solução sugere que o metal se liga aos compostos intracelulares libertados neste período, que no entanto não foram identificados.

A libertação destes compostos pode estar associada à perda de viabilidade e à lise celular, fenómeno que, de acordo com Ngwenya (2007), tem implicações importantes para os metais assimilados na sub-superfície celular. Por um lado os metais são libertados novamente para a solução quando a célula se desintegra, e por outro, os produtos da lise, maioritariamente proteínas, ácidos nucleicos, polissacáridos e lípidos, também têm capacidade de complexar metais em solução competindo com a superfície celular para a adsorção de metais. Dependendo do pH, os produtos da lise podem co-adsorver com os metais via complexação superficial ternária (composto de 3 unidades), contribuindo para melhorar a adsorção de metais. Este autor verificou um aumento de adsorção de Zn(II) durante a lise celular da bactéria *Enterobacter* sp., que pode surgir da formação de compostos ternários superficiais entre as moléculas orgânicas dissolvidas e o Zn(II) ou, alternativamente, da resposta passiva ao aumento de pH observado, excluindo a hipótese de precipitação superficial por não terem sido observados precipitados de metal na superfície celular por SEM.

Segundo Ngwenya (2007) para partículas com carga dependente do pH pode ocorrer um melhoramento da adsorção de metal na presença de ligandos orgânicos, pela formação de dois tipos de complexos ternários à superfície. Nos complexos ternários de superfície do tipo A, os iões metálicos co-adsorvem com o ligando através da formação de uma ponte entre a superfície carregada e o ligando com a carga idêntica, que pode ser representado por:



Nesta equação n e p são as cargas do catião e do anião respectivamente. Em geral a carga negativa da superfície celular e do ligando é provável que ocorra apenas a pH perto da neutralidade ou alcalino. Assim, a formação de complexos do tipo A só contribui com um pequeno aumento da adsorção de catiões metálicos a pH baixo. Os complexos ternários do tipo A melhoram principalmente a adsorção do ligando não sendo provável que melhorem a adsorção de metal para valores superiores ao do sistema de metal puro, uma vez que a complexação do ligando do metal reduz a carga geral positiva do metal. Os complexos ternários do tipo B formam-se quando o ligando orgânico serve de ponte entre uma superfície neutra ou de carga positiva e um catião:



A ocorrência de uma ou ambas as reacções pode explicar a ligação do Cr(III) aos compostos intracelulares libertados pela *S. cerevisiae*, contribuindo para melhorar a eficiência da remoção do metal das soluções, ainda que possam ser os responsáveis pelos diminutos níveis de dessorção verificados para tempos de sorção superiores a 30 min, mesmo aquando da utilização de ácidos minerais concentrados.

6.5 Viabilidade celular

A viabilidade da biomassa no decorrer de ensaios de remoção de metais é importante quando se considera a acumulação dependente de metabolismo. A sobrevivência dos microrganismos na presença de metais depende das suas propriedades bioquímicas e estruturais, da adaptação fisiológica e/ou genética, da modificação ambiental da especiação do metal, e ainda da disponibilidade e toxicidade do metal (Blackwell *et al.*, 1995). Os metais pesados têm a capacidade intrínseca de afectarem negativamente a actividade microbiana. As proteínas e outros biopolímeros capazes de complexar os metais podem ser desnaturadas, resultando na inibição, diminuição da viabilidade e até na morte e lise celular (Yetis *et al.*, 2000).

Neste trabalho, para completar o estudo da relação entre a acumulação de crómio à *S. cerevisiae* e o efluxo de catiões e perda de compostos intracelulares, também foi considerado importante avaliar as alterações ao nível da fisiologia das células nas condições adversas a que foram submetidas. Assim foi determinada a viabilidade celular ao longo do tempo de contacto com as soluções de crómio com concentrações entre 25 e 200 mg.L⁻¹.

A evolução da viabilidade celular com o tempo é apresentada na Figura 6.8, verificando-se que a presença de metal é bastante nociva para as leveduras. Na suspensão de leveduras preparada como inóculo para as soluções de metal e o ensaio em branco, a viabilidade inicial das leveduras era de 74,7 %. Nas soluções de 100 e 200 mg.L⁻¹ a viabilidade às duas horas de incubação já é muito reduzida, passando a nula no intervalo de monitorização que se seguiu, às 6 h. Para as concentrações de 25 e 50 mg.L⁻¹, depois de uma acentuada mortalidade celular logo após 30 min de incubação, ainda se verificou uma quantidade residual (< 5 %) de células viáveis mesmo após 48 h de contacto com as soluções metálicas. No ensaio em branco, nos 30 min iniciais a

viabilidade cai para cerca de 57 % do seu valor inicial, aumentando de seguida para se manter em valores próximos dos 50 % até às 75 h, período a partir do qual vai diminuindo até atingir 0 % às 174 h de incubação.

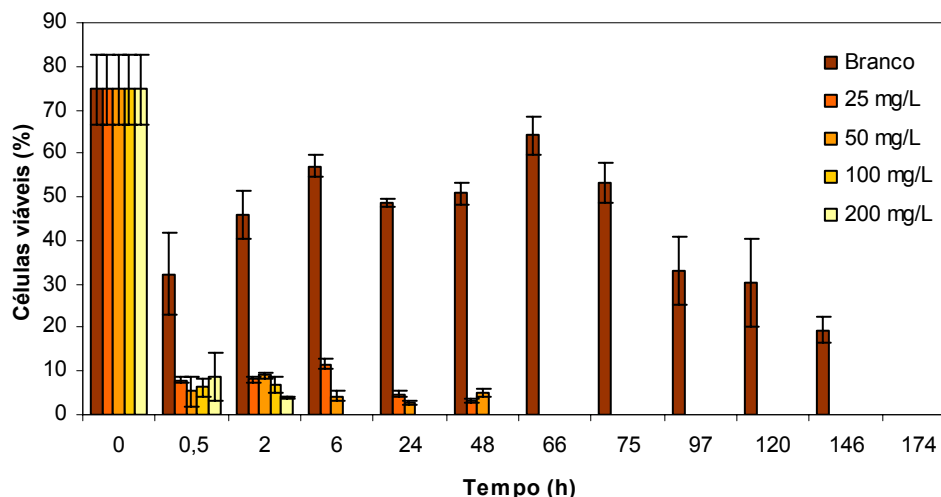


Figura 6.8 – Evolução da viabilidade das células de *S. cerevisiae* ao longo do tempo de sorção.

Considerando que o meio não tem nutrientes que forneçam carbono e energia às células para manter as suas funções celulares e assegurar a reprodução, esperava-se um menor período de sobrevivência por parte das leveduras, mesmo na ausência de Cr(III). No entanto, dadas as condições de stresse a que as células estão sujeitas e considerando o efluxo de minerais e compostos intracelulares de baixo peso molecular anteriormente identificados que indiciam a ocorrência de lise celular, a sobrevivência e reprodução da cultura pode ser assegurada pela respiração endógena. Na biossorção de Pb(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) por *Mucor rouxii*, Yan e Viraraghavan (2003) verificaram igualmente que apesar de não ter sido adicionado substrato, a biomassa se manteve activa durante algum tempo, possivelmente devido à respiração endógena. No caso das soluções de $C_i = 25$ e 50 mg.L^{-1} a manutenção de células viáveis até às 48 h pode ser explicada pelo facto de a concentração residual de Cr(III) em solução ser reduzida para valores toleráveis pelas células, mantendo-se, na solução mais concentrada, em valores abaixo dos 8 mg.L^{-1} no final do período em questão. O limite de tolerância mínimo ao Cr(III) médio de várias estirpes bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sp.*, *E. coli*, entre outras, foi de $1,2 \text{ mM}$ ($62,4 \text{ mg.L}^{-1}$), verificando-se que o Cr(III) tem um efeito moderado no crescimento bacteriano (Hassen *et al.*, 1998).

A rápida diminuição inicial da viabilidade celular no ensaio em branco, seguida de uma aparente recuperação pode explicar-se em parte por se verificar crescimento celular em resultado da respiração endógena, mas também pode resultar de uma sobre-estimativa de células viáveis para os longos tempos de incubação, inerente ao método utilizado na avaliação da viabilidade celular, uma vez que os valores são relativos à amostra recolhida e não reporta ao número de

células total inicial. Ocorrendo lise celular a contagem do número total de células no sistema diminui na medida em que não aparecem coradas de verde, e assim, proporcionalmente o número de células viáveis aumenta servindo para inflacionar a viabilidade. Este mesmo erro pode ocorrer nos sistemas com metal.

As Figuras 6.9 a 6.11 mostram imagens de células de levedura adquiridas utilizando uma objectiva de ampliação 40x ou 100x, um adaptador de ampliação 0,63x, com uma câmara Zeiss Axiocam HRc. A observação das imagens permite identificar por um lado um efeito de desfloculação com o aumento do tempo de contacto, o aparecimento de células danificadas e vestígios de material celular junto dos focos.

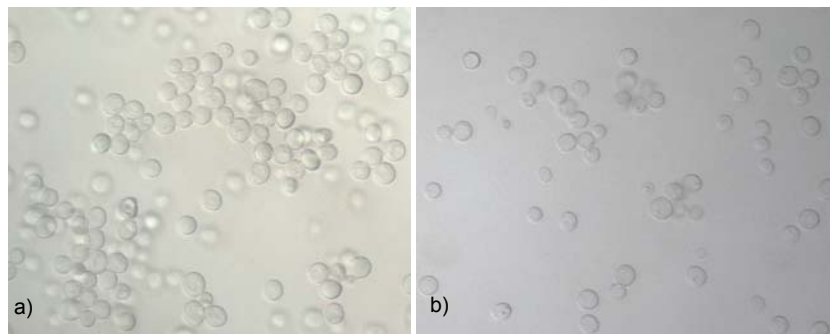


Figura 6.9 – Flocos de leveduras: ensaio em branco ($C_i = 0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$): a) 3h; b) 24 h (objectiva 40x).

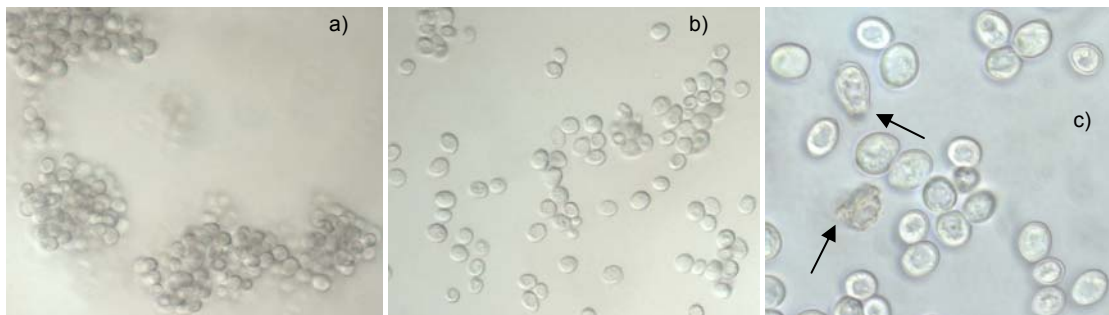


Figura 6.10 – Flocos de leveduras: $C_i = 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$: a) 3h; b) 24 h (objectiva 40x); c) 24 h (objectiva 100x).

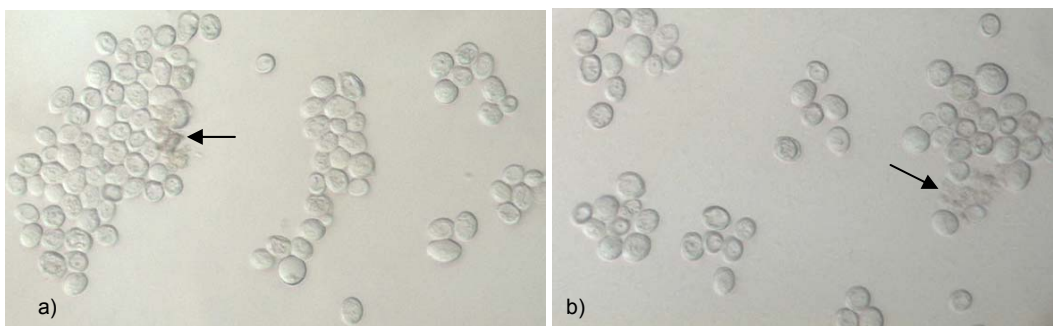


Figura 6.11 – Flocos de leveduras: $C_i = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$: a) 24 h; b) 48 h (objectiva 40x).

Nas Figuras 6.12 a 6.14 apresentam-se imagens, adquiridas nas condições anteriormente referidas, das células não viáveis, coradas de verde, e das células viáveis, apresentando estruturas CIVS laranja.

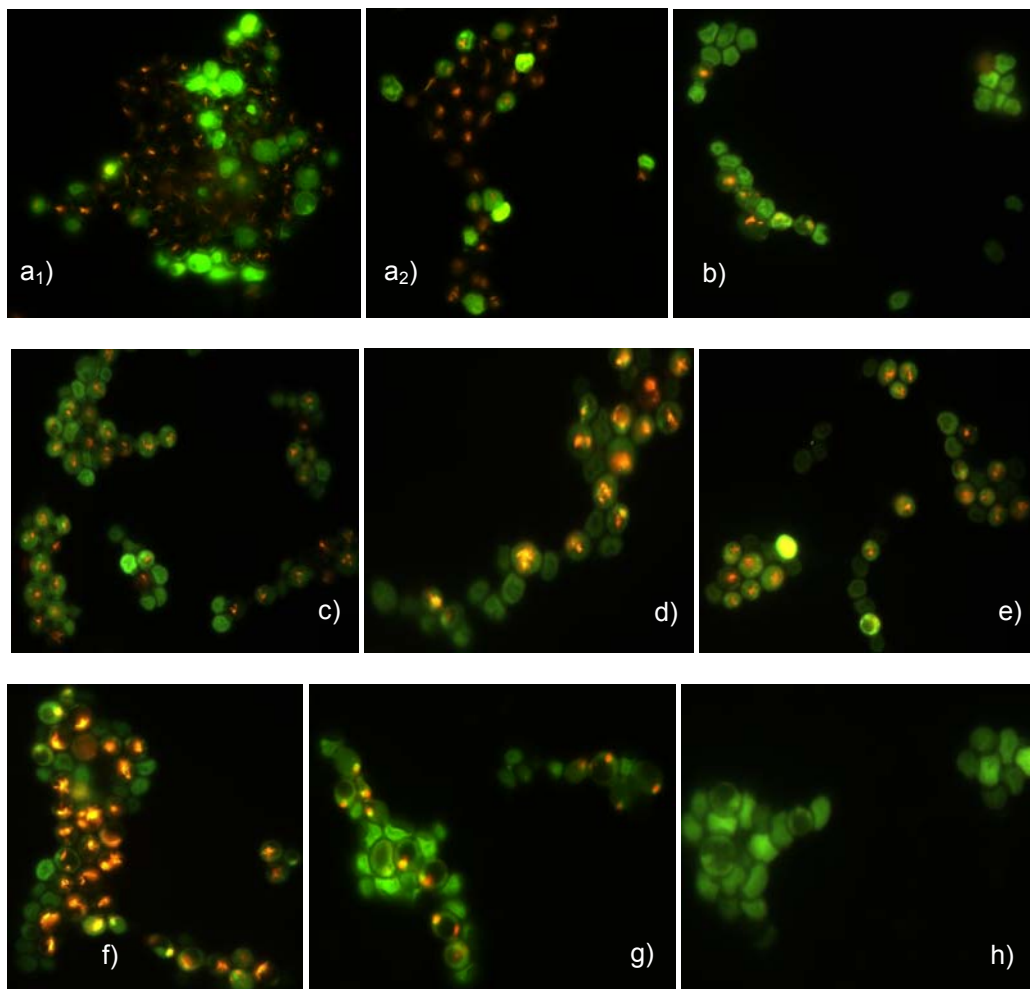


Figura 6.12 – Flocos de leveduras: a₁) e a₂) amostra inicial ($t = 0$); b) 30 min; c) 2 h; d) 24 h; e) 48 h; f) 75 h; g) 97 h; h) 174 h (objectiva 100x).

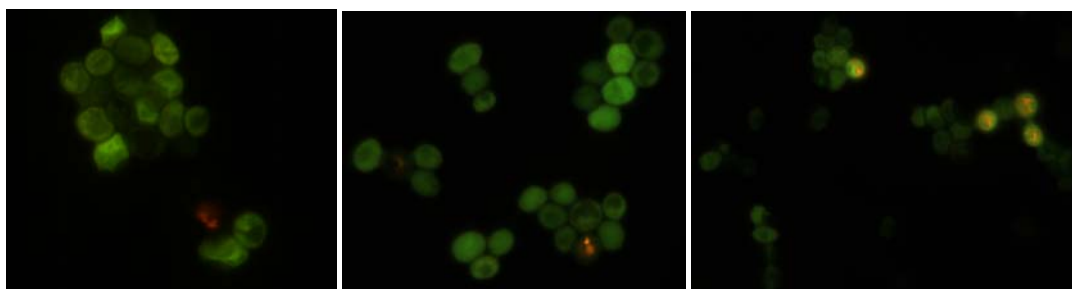


Figura 6.13 – Flocos de leveduras: $C_i = 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$: a) 30 min; b) 2 h; c) 24 h (objectiva 100x).

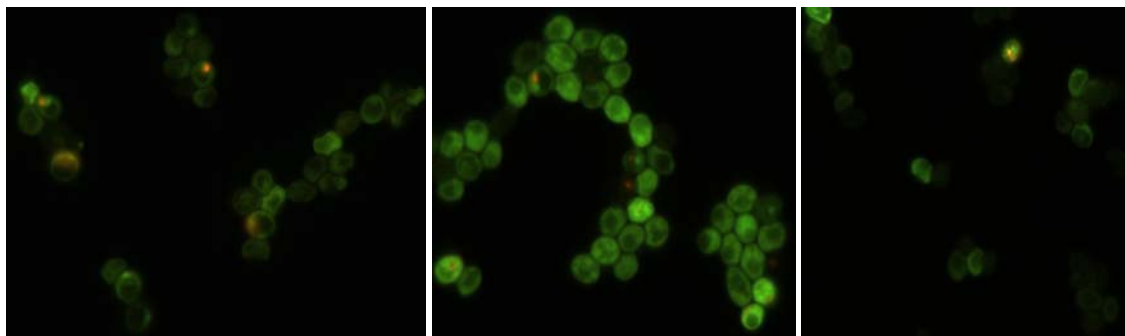


Figura 6.14 – Flocos de leveduras: $C_i = 100 \text{ mg.L}^{-1}$: a) 30 min; b) 2 h; c) 24 h (objectiva 100x).

Considerando que a acumulação intracelular dependente do metabolismo é inibida, entre outros factores, pela ausência de uma fonte de carbono (Gadd, 1990), e que a viabilidade das células de *S. cerevisiae* nas soluções com Cr(III) diminui para valores inferiores a 10 % logo após 30 min de incubação, não é provável que a fase de acumulação de metal lenta observada seja devida a acumulação intracelular activa, associada ao metabolismo celular. Sendo a parede celular o primeiro local óbvio onde ocorre o efeito de toxicidade dos metais, podem ocorrer danos devido à perda de solutos celulares móveis conduzindo ao aumento de permeabilidade da célula a material externo (Blackwell *et al.*, 1995). Quando a concentração de iões metálicos extracelular é superior à intracelular, estes podem penetrar nas células através da parede e membrana celular por difusão livre. Os iões metálicos também podem entrar na célula se a parede tiver sofrido ruptura por forças naturais (*e.g.* autólise) ou artificiais (*e.g.* força mecânica, tratamento alcalino, etc.) (Wang e Chen, 2006).

De acordo com Gadd (1990) em alguns casos, em particular quando a toxicidade é elevada, a acumulação intracelular pode ser antes uma consequência do aumento da permeabilidade da membrana e da consequente exposição a mais sítios de ligação no interior da célula. Se para a primeira fase de acumulação de Cr(III) os resultados disponíveis não permitem distinguir a sorção às células e a acumulação intracelular, da ligação aos compostos intracelulares libertados, na segunda fase as evidências apontam para a ligação do metal aos compostos que absorvem a 320 nm..

Soares *et al.* (2002a) também referem não ser provável que o aumento da acumulação de Cu(II) por *S. cerevisiae* após 10 min de contacto com uma solução 0,2 mM Cu^{2+} ocorra por um mecanismo dependente do metabolismo, uma vez que foi observada uma elevada letalidade e um aumento da permeabilidade da membrana, provavelmente em consequência de lesões na membrana celular após 10 min de contacto. Os autores atribuem o aumento de acumulação de cobre ao resultado da exposição de mais grupos funcionais do interior da célula. A biossorção de Pb^{2+} pela *S. cerevisiae* foi estudada por Suh *et al.* (1999a). Ao fim de 30 min as observações por SEM mostram que aparece Pb^{2+} na parede e na membrana celular mas não no citoplasma das células. À medida que o tempo de exposição aumenta o metal penetra no interior das células e a

plasmólise das células foi frequentemente observada após 24 h de contacto. Os autores afirmam que apesar de a viabilidade celular ter sido significativamente reduzida após 24 h, a acumulação de Pb^{2+} continuou até às 140 h, concluindo que esta fase do mecanismo de acumulação de chumbo é independente do metabolismo celular.

O efeito da presença de metais na viabilidade celular e a relação do seu estado fisiológico na acumulação de metais é igualmente abordada por outros autores. Soares *et al.* (2002b) estudaram a evolução da viabilidade da levedura *S. cerevisiae* NCYC 1190 durante a acumulação de Cu(II), Cd(II) e Pb(II), tendo observado uma perda de viabilidade consideravelmente mais rápida na solução de Cu(II) do que a observada no contacto com soluções dos outros metais à mesma concentração. Os autores calcularam o tempo ao fim do qual se verificou uma redução de 50 % e 90 % da viabilidade da população original chegando a valores de LT_{50} de < 1, 40 e 59 min, e de LT_{90} de 2, 270 e 1050 min para o Cu(II), Cd(II) e Pb(II) respectivamente. A viabilidade da levedura *Candida utilis* fresca (75,3 % de humidade) e desidratada (entre 10 e 20 % de humidade) exposta a uma solução de Cr(VI) de 10 mg.L^{-1} durante 18 h foi avaliada por (Rapoport e Muter, 1995). As células frescas passaram de uma viabilidade de 100 % a $t = 0$ para 85 % a $t = 18$ h. As células com 10 % de teor de humidade mantiveram a viabilidade inicial, de cerca de 30 %, inalterada ao longo das 18 h; e nas células com teor de humidade de 14 e 20 % com viabilidade inicial de 15 e 35 % respectivamente, apresentaram ao fim de 18 h cerca de 50 % de células viáveis.

Blackwell *et al.* (1998) verificaram que a viabilidade da levedura *S. cerevisiae* exposta a manganês depende directamente da razão Mg:Mn e não do conteúdo intracelular de Mn(II). A toxicidade a este metal torna-se crítica para valores de razão Mg/Mn inferiores a 2. Quando esta razão é superior a 3 mantêm 90 % ou mais da sua viabilidade após 6 h de incubação com Mn(II). O magnésio tem um papel essencial na estabilização de estruturas moleculares e de biomoléculas, intervindo nos mecanismos de reparação celular, nomeadamente após a exposição a metais. Uma vez que no presente trabalho se verificou que na ausência de Cr(III) o efluxo de Mg^{2+} ocorre tardiamente em comparação com os sistemas com metal, sendo mais significativa a partir da 72 h, esta também pode ser uma justificação para a manutenção da viabilidade das leveduras por períodos mais longos. De facto a Figura 6.8 mostra que no ensaio em branco é das 75 h em diante que a viabilidade celular começa a diminuir progressivamente até valores nulos.

6.6 Caracterização química da superfície dos biossorventes por espectroscopia de infravermelho

Em geral as paredes celulares bacterianas são polielectrólitos que interagem com os iões em solução para manter a electroneutralidade. Os mecanismos através dos quais os iões metálicos se ligam à superfície celular incluem interacções electrostáticas, forças de van der Waals, ligação covalente, interacções redox, precipitação extracelular e alguma combinação destes processos

(Gavrilescu, 2004). As interações estequiométricas, tanto por troca iônica como por complexação, ocorrem entre os íons metálicos e os grupos funcionais como os fosfodiéster, fosfatos e carboxílicos (glicosídeos) e amino (amino- e péptido-glicosídeos ou proteínas) dos polímeros que constituem a parede celular (Volesky, 1986), sendo a sua identificação mais um contributo para esclarecer o mecanismo envolvido na interação metal-biossorvente. A espectroscopia de infravermelho é frequentemente utilizada para detectar alterações na frequência de vibrações moleculares, oferecendo excelentes informações sobre a natureza das ligações presentes, permitindo a identificação de diferentes grupos funcionais da superfície celular (Murphy *et al.*, 2007). A análise dos espectros de infravermelho permite uma caracterização qualitativa da natureza da superfície do biossorvente, tornando possível identificar picos característicos de grupos funcionais, que podem ser relacionados com propriedades de ligação a metais pesados (Loukidou *et al.*, 2004c), sendo comum o recurso a este método analítico com este fim (Figueira *et al.*, 1999; Gardea-Torresdey *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2007; Niu e Volesky, 2000; Padmavathy *et al.*, 2003; Sheng *et al.*, 2004b).

A análise qualitativa dos principais grupos funcionais da *S. cerevisiae* e das drêches, com e sem tratamento alcalino, foi então realizada por espectroscopia de infravermelho, onde estes são identificados pelas respectivas bandas de absorção a um número de onda que lhe é característico, em resultado da vibração molecular que ocorre por efeito da absorção de energia a um comprimento de onda específico. Comparando os espectros dos biossorventes antes e depois do contacto com as soluções de Cr(III) poderá ser possível identificar os grupos funcionais envolvidos na interação com o metal.

Cada composto orgânico tem um espectro característico que pode ser utilizado como a sua impressão digital. O tipo de vibração que a absorção de energia provoca distingue-se em vibrações de distensão, simétrica ou assimétrica, e vibrações de flexão, sendo as primeiras geralmente mais úteis na atribuição de picos a grupos funcionais específicos. Estas distensões podem dividir-se em quatro regiões, a das ligações simples a hidrogénio ($3700-2500\text{ cm}^{-1}$), a das ligações triplas ($2300-2000\text{ cm}^{-1}$), a das ligações duplas ($1900-1500\text{ cm}^{-1}$) e a das ligações simples, que não de H ($1400-650\text{ cm}^{-1}$). Na região entre 1650 e 650 cm^{-1} ainda aparecem os picos relativos às vibrações de flexão, mas raramente é possível associar um destes picos a um grupo específico (<http://www.le.ac.uk/chemistry/pdf/teachersworkshops.pdf>).

Na Tabela 6.3 são apresentados alguns dos grupos funcionais orgânicos e de grupos inorgânicos que podem fazer parte dos biossorventes em estudo, bem como o número de onda do pico que lhe corresponde.

Tabela 6.3 – Bandas de absorção de infravermelho características de alguns grupos funcionais.
 Adaptado de <http://www.spectroscopynow.com/FCKeditor/UserFiles/File/specNOW/eac10815.pdf>.

Origem	Número de onda (cm ⁻¹)	Correspondência
O-H	3645-3600 (estrito)	Grupo –OH não ligado, distensão O-H
O-H	3645-3630	Álcool primário, distensão O-H
O-H	3570-3200 (largo)	Grupo –OH, distensão da ligação –H
N-H	3510-3460 e 3415-3380	Amina primária aromática, distensão N-H
N-H	3400-3380 e 3345-3325	Amina primária alifática, distensão N-H
=N-H	3360-3310	Amina secundária alifática, distensão N-H
=N-H	3350-3320	Compostos imino, distensão N-H
C=O	2100-1800	Carbonilos metálicos de transição
C-H	2970-2950/2880-2860	Ligação C-H de alcanos saturados, distensão C-H
C-H	2820-2810	Metoxi, distensão C-H (CH ₃ -O-)
S	2600-2550	Tióis, distensão S-H
C=O	1750-1725	Éster
C=O	1740-1725/2800-2700	Aldeídos
C=O	1725-1700	Ácido carboxílico, distensão C=O
C=O	1725-1705	Cetona
C=C	1680-1620	Distensão C=C
C=O	1660-1650	Carbonilo conjugado com anéis aromáticos, distensão C=O
N-H	1650-1590	Amina primária, distensão N-H
N-H	1650-1550	Amina secundária, distensão N-H
-C=N-	1690-1590	Iminas de cadeia aberta
C=C-C	1615-1580	Distensão dos anéis aromáticos
C=O	1680-1630	Amida
C=O	1610-1550/1420-1300	Carboxilato (COO ⁻)
	1560-1540/1380-1350	Compostos azotados alifáticos
	1490-1410/880-860	lão carbonato
	1420-1370/1200-1180	Sulfatos orgânicos
	1380-1350/840-815	lão nitrato
	1365-1340/1200-1100	Sulfonatos
	1350-1250	Fosfato orgânico, distensão P=O
	1260	Alongamento C-O do COOH
C-N	1210-1150	Amina terciária, distensão C-N
C-O	≈ 1200 ^a	Fenol, distensão C-O
C-N	1190-1130	Amina secundária, distensão C-N
C-O-C	1150-1050	Éter com substituição alquila, distensão C-O
C-O-C	1140-1070	Éter cíclico, distensão C-O
	1130-1080/680-610	lão sulfato
	1100-1000	lão fosfato
C-N	1090-1020	Amina primária, distensão C-N
C-O	≈ 1050 ^a	Álcool primário, distensão C-O
	1050-990	Fosfatos alifáticos, distensão P-O-C
S	710-685	Tiol ou tioéter, CH ₂ – S-, distensão C-S
S	705-570	Dissulfuretos, distensão C-S
S	620-600	Dissulfuretos, distensão S-S

^a – centro aproximado da gama de frequência do grupo

Nas Figuras 6.15 a 6.18 apresentam-se os espectros de infravermelho correspondentes aos bioissorventes originais e após o contacto com soluções de Cr(III), sendo possível verificar, pelo número de picos que aparecem, que ambos os materiais têm uma natureza complexa, dificultando a interpretação do espectro. A Figura 6.15 evidencia as diferenças ao nível de composição química das drêches originais e sujeitas ao tratamento alcalino previamente à bioissorção. Em ambos os espectros surgem picos de absorção na região a 1050 cm^{-1} , que tanto podem corresponder à distensão C-O de álcoois primários como à distensão C-N de aminas primárias. Destacam-se ainda o pico a 1735 cm^{-1} , característico da distensão C=O do grupo carbonilo de cetonas, éteres, aldeídos e ácidos carboxílicos, e o pico a 1650 cm^{-1} que pode ser atribuído à distensão C=O do grupo carbonilo conjugado com anéis aromáticos, encontrados na lenhina (Brás, 2005). Os picos a 2920 e 2850 cm^{-1} correspondem à distensão C-H em cadeia alifáticas, que podem corresponder à celulose, lenhina ou hemicelulose. A banda larga na região entre 3600 e 3200 cm^{-1} pode atribuir-se à distensão -H de grupos hidroxilo da celulose, lenhina ou hemicelulose, e à distensão N-H em aminas primárias (Tarley e Arruda, 2004).

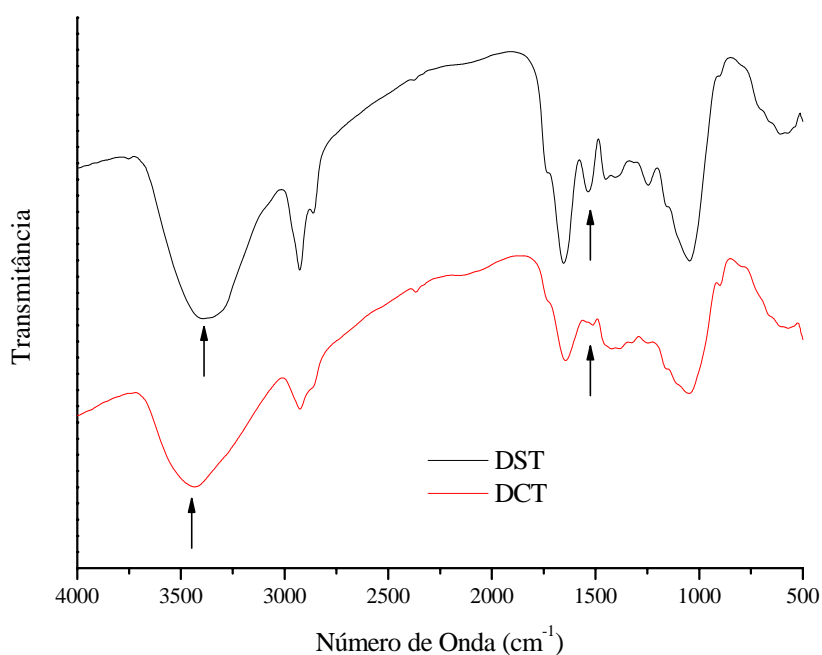


Figura 6.15 – Comparação do espectro de infravermelho das drêches sem tratamento e com tratamento, antes do contacto com soluções de Cr(III).

As setas da Figura 6.15 indicam as diferenças identificadas nos picos de absorção dos dois tipos de drêches, evidenciando as alterações ao nível da estrutura química do bioissorvente resultante do tratamento alcalino. A banda entre 3600 e 3200 cm^{-1} aparece mais larga e deslocada para a números de onda superiores nas DCT, o que pode indicar alterações nos grupos hidroxilo em álcoois e fenóis ou em ligações NH dos constituintes das drêches. A segunda alteração surge no desaparecimento do pico a 1540 cm^{-1} , onde os compostos azotados alifáticos absorvem energia,

na região que Padmavathy *et al.* (2003) classificam como sendo a das proteínas. Low *et al.* (2000) estudaram o efeito do tratamento químico com NaOH em drêches na sorção de Cd(II) e Pb(II). Os autores analisaram o teor proteico das drêches sem tratamento químico e tratadas com NaOH, registando valores de 3,05 % e 2,26 % respectivamente. Uma vez que o tratamento alcalino aumentou a eficiência da sorção de Cd(II) de 69,6 % para 95,6 %, e a eficiência da sorção de Pb(II) de 62,0 % para 77,8 %, concluíram que as proteínas não são os componentes das drêches mais relevantes na sorção destes metais. No caso do Cr(III), atendendo a que foram as drêches sem tratamento que demonstraram a maior capacidade de acumulação, pode concluir-se que as proteínas eliminadas, responsáveis pelas alterações do espectro já discutidas, têm um papel significativo da sua bio-sorção.

Relativamente às diferenças na composição química das drêches resultante da bio-sorção, verifica-se pela análise das Figuras 6.16 e 6.17 que não há alterações significativas decorrentes do contacto com soluções de Cr(III) de $C_i = 50$ e 200 mg.L^{-1} por 48 h. A manutenção da composição da superfície da biomassa, no que respeita aos grupos funcionais que lhe são característicos, mostra que neste caso a bio-sorção não passa pela formação de ligações covalentes entre o crómio e a biomassa.

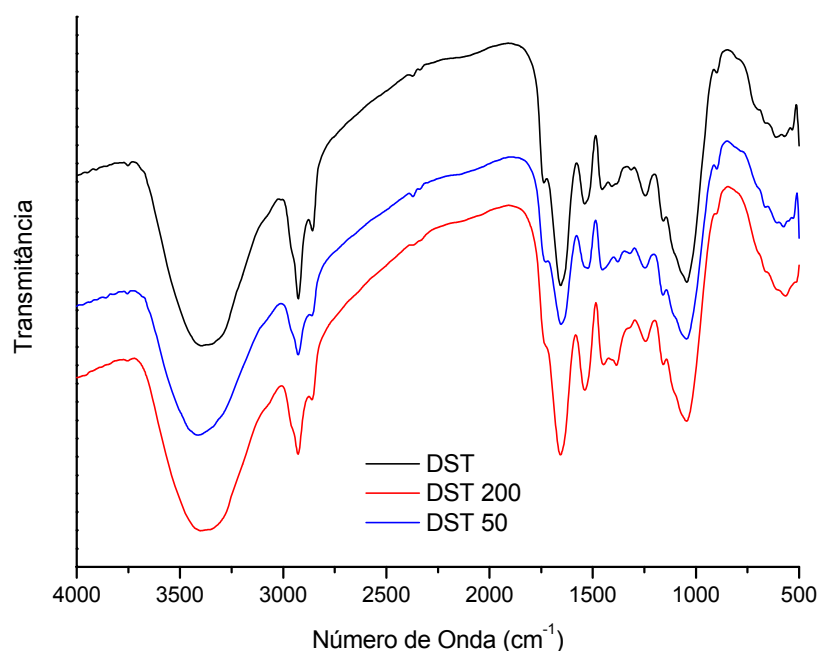


Figura 6.16 – Espectros de infravermelho das drêches sem tratamento sem contacto com soluções de Cr(III), e após 48 h em contacto com soluções de 50 e 200 mg.L^{-1} .

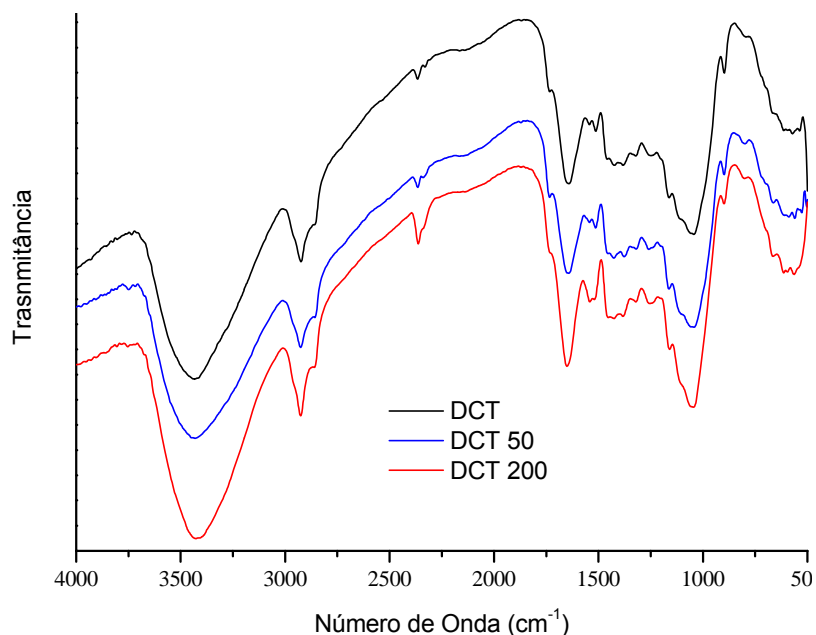


Figura 6.17 – Espectros de infravermelho das drêches com tratamento sem contacto com soluções de Cr(III), e após 48 h em contacto com soluções de 50 e 200 mg.L⁻¹.

As principais bandas de absorção do espectro de infravermelho da *S. cerevisiae* correspondem a açúcares e péptidos, que ocultam as bandas de absorção dos restantes componentes. Uma vez que a dos iões metálicos aos microrganismos está relacionada com o oxigénio ou azoto dos grupos funcionais dos biopolímeros da parede celular (peptidoglicanos), a interação do metal com a biomassa pode ser investigada por FTIR (Lin *et al.*, 2005). Os espectros de infravermelho obtidos para a *S. cerevisiae*, realizados numa amostra da suspensão inicial, numa amostra recolhida de um ensaio sem Cr(III) após 75 h de incubação, e após 1 h e 24 h de contacto com soluções metálicas de concentração inicial de 10, 25 e 50 mg.L⁻¹ em crómio, apresentados na Figura 6.18, têm semelhanças com os espectros das drêches, indicando que há grupos funcionais comuns aos dois biossorbentes, sendo a maioria dos picos coincidente com os descritos por Padmavathy *et al.* (2003) para o espectro da levedura de padeiro. Estes autores identificaram os picos por regiões do espectro que atribuíram a grupos de moléculas orgânicas: a dos açúcares entre 790-1180 cm⁻¹, a das proteínas entre 1400-1700 cm⁻¹, a dos ácidos nucleicos de 1200-1290 cm⁻¹.

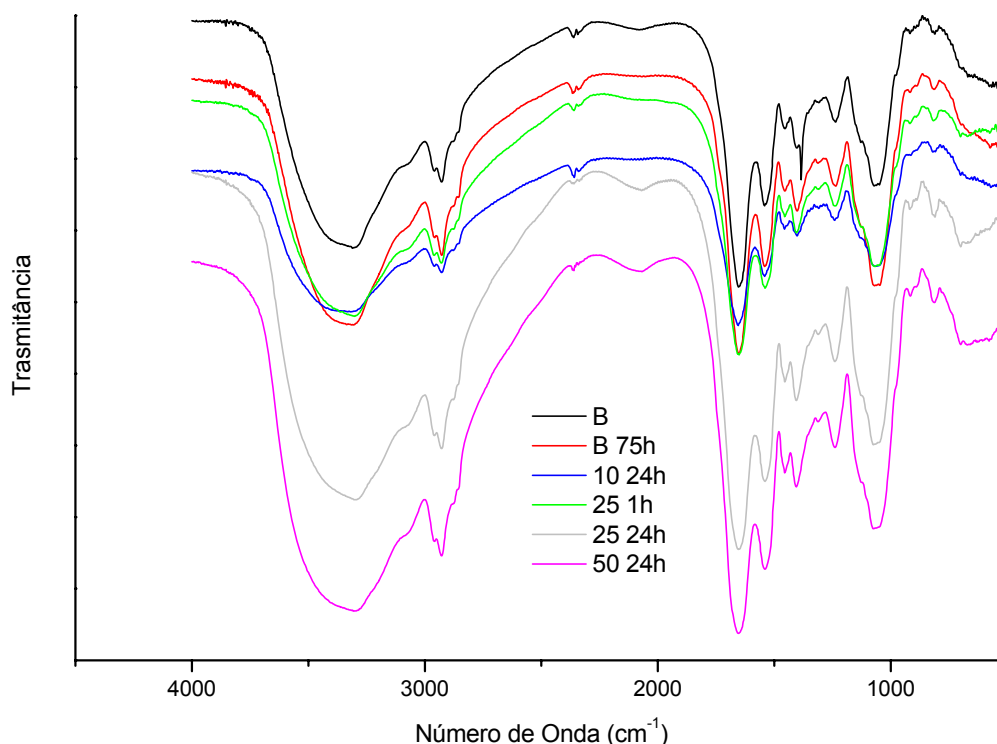


Figura 6.18 – Espectros de infravermelho da *S. cerevisiae* sem contacto com soluções de Cr(III) ($t = 0$ e $t = 75$ h), e após o contacto com soluções de 10 e 25 e 50 mg.L⁻¹ neste metal por diferentes períodos.

Em todas as amostras analisadas surgem, na região dos açúcares, picos a 1050, 1070 e 1130 cm⁻¹, que podem corresponder à distensão C-O de álcoois primários e à distensão C-N de aminas (primárias o de 1070 cm⁻¹ e secundárias o de 1130 cm⁻¹). De acordo com Loukidou *et al.* (2004c), o pico de distensão da ligação C-O entre 1000 e 1100 cm⁻¹ representa a componente de carboidratos da parede celular, isto é o oxigénio nos anéis de glucose e manose. Na região das proteínas são visíveis picos a 1400, 1450, 1540 e 1650 cm⁻¹. As bandas a 1070 e 1650 cm⁻¹ correspondem às ligações C-O e C=O dos grupos carbonilo e carboxilo. Padmavathy *et al.* (2003) associaram a banda de absorção a 1652 cm⁻¹ à distensão do grupo carbonilo (C=O) da banda I da amida conjugada com a deformação NH, e a banda a 1540 cm⁻¹ com a presença da banda II de uma amida secundária provocada pela distensão N-H e C-N, que representam a fracção proteica da parede celular (Brady *et al.*, 1994b). Na região dos ácidos nucleicos apenas se identifica um pico a 1240 cm⁻¹. Os picos largos entre 3800 e 2500 cm⁻¹ são devidos a grupos –OH e –NH e a pontes de hidrogénio. A banda larga com um máximo entre 3300 e 3360 cm⁻¹, dependendo das amostras, pode ser atribuída à presença de grupos hidroxilo, que estão ligados por pontes de H com grupos NH- das amidas secundárias (grupos (R-NHCOCH₃)) da quitina (Padmavathy *et al.*, 2003).

Não sendo visíveis diferenças significativas nos espectros das várias amostras de levedura, pode concluir-se que, tal como com as drêches, as interacções entre o Cr(III) e a biomassa não conduzem a alterações químicas na sua superfície, pelo que não é provável que ocorra a formação de ligações covalentes entre o metal e a biomassa. Considerando que o Cr(III) é classificado como um metal forte (classe A) a sua ordem de preferência para a ligação a átomos dadores de electrões em ligandos biológicos é: $O > N > S$, o que pode envolver grupos HO^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , COO^- em ligações de carácter predominantemente iónico (Kogej e Pavko, 2001; Tsezos *et al.*, 1996). Gardea-Torresdey *et al.* (2002) afirmam que o Cr(III) se liga aos grupos carboxilato preferencialmente através de complexos em ponte.

6.7 Microscopia Electrónica de Transmissão e análises EDS

As amostras de *S. cerevisiae* preparadas para observação por TEM foram preparadas com levedura em contacto com uma solução de Cr(III) 25 mg.L^{-1} , ao fim de 15 min, 2 h e 24 h e, como controlo, com a suspensão de levedura utilizada como inóculo. Os cortes das diferentes amostras foram divididos em dois grupos: um foi submetido ao procedimento de contraste, com soluções de acetato de uranilo e citrato de chumbo, e o outro não foi observado sem contraste. As análises EDS realizaram-se em regiões da parede e do interior das células, com o objectivo de identificar os locais de ligação e acumulação de Cr(III) pela *S. cerevisiae*.

A Figura 6.19 mostra os espectros EDS realizados na parede e no interior de uma célula de *S. cerevisiae* da suspensão inicial. Os picos que surgem nos espectros são semelhantes em ambos os locais da célula, evidenciando-se os picos correspondentes ao C e ao O. Os picos de Pb e U devem-se às soluções de contraste utilizadas, e o Cu à grelha de suporte dos cortes das amostras. Este padrão repete-se em todos os espectros de amostras sujeitas ao contraste.

Nas Figuras 6.20 e 6.21, correspondentes aos espectros EDS de células com 15 min e 2 h de contacto com a solução de Cr(III), não se observam alterações relativamente ao espectro da biomassa original. No entanto, na grelha com cortes da amostra de levedura com 2 h de incubação, sem contraste, foi possível distinguir no interior de algumas células, zonas mais escuras. Dado que os pontos de maior densidade electrónica equivalem a zonas de acumulação de elementos mais pesados, e que estas amostras não tinham sido sujeitas a contraste, o único elemento pesado provável era o Cr(III). A presença deste elemento foi confirmada pela análise EDS a esse local da célula (Figura 6.22 a)). Neste espectro aparecem ainda picos que associam a presença de P, Ca, K e Zn ao local onde se concentra o crómio. O espectro EDS a um local do citoplasma no exterior da zona de elevada densidade electrónica (Figura 6.22 b)) já não evidencia a presença de Cr nem P, Ca, K ou Zn. Esta observação permite concluir que após 2 h de contacto com uma solução de Cr(III) de 25 mg.L^{-1} ocorreu acumulação intracelular deste metal, e que este se concentra em zonas específicas do citoplasma das leveduras onde também se encontram outros metais. A presença de fósforo indicia que nestas zonas estão envolvidos grânulos de fosfato.

As zonas escuras, de maior densidade electrónica, não foram observadas em todas as células. Uma vez que o crómio se concentra em determinadas zonas do interior da célula e que os cortes têm entre 95 a 140 nm de espessura, equivalendo a uma fina porção da célula, é provável que o aparecimento destas zonas dependa do local onde a célula foi cortada.

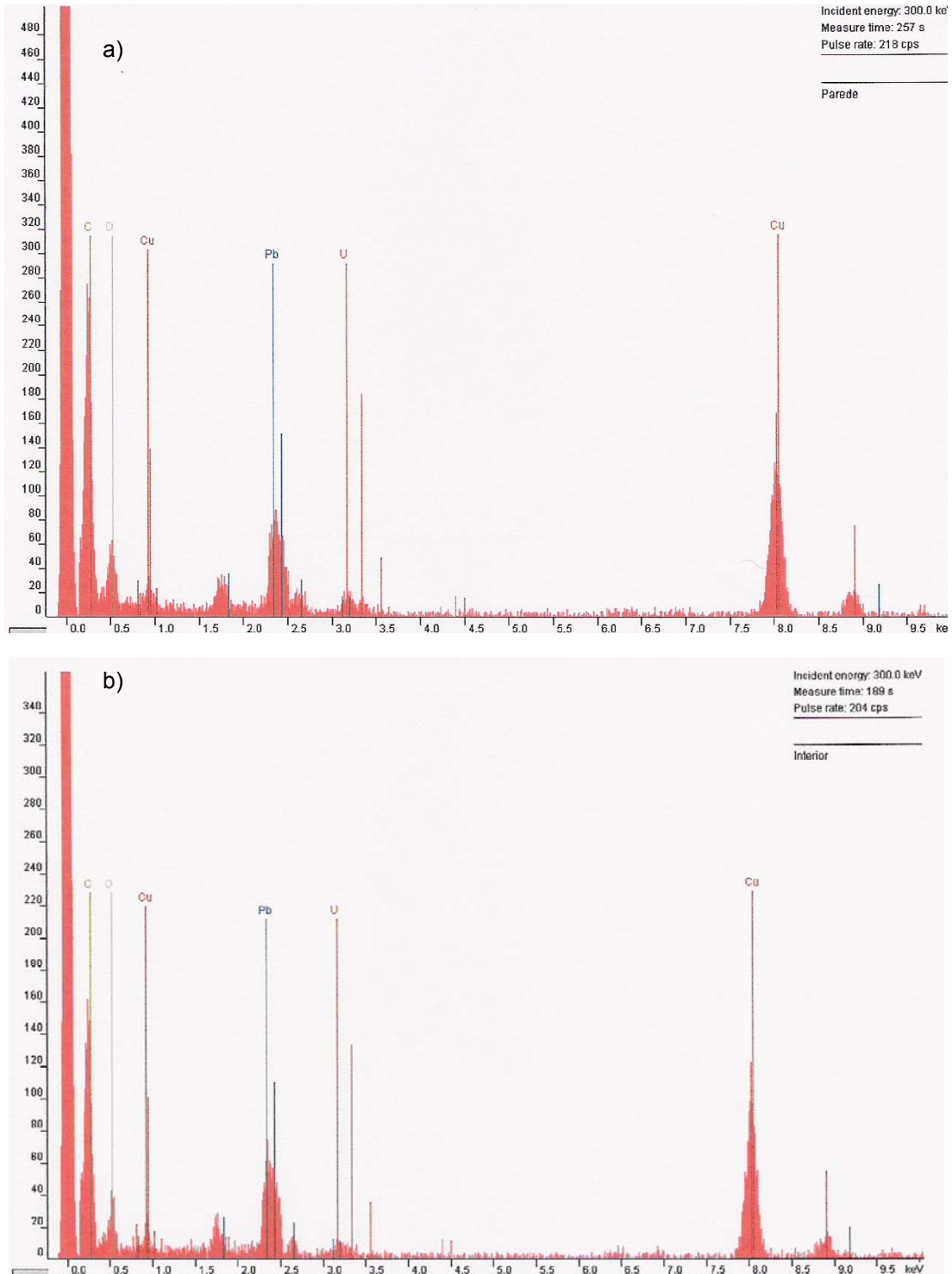


Figura 6.19 – Espectros EDS de uma célula de *S. cerevisiae* da suspensão de levedura utilizada como inóculo: a) parede celular; b) interior da célula.

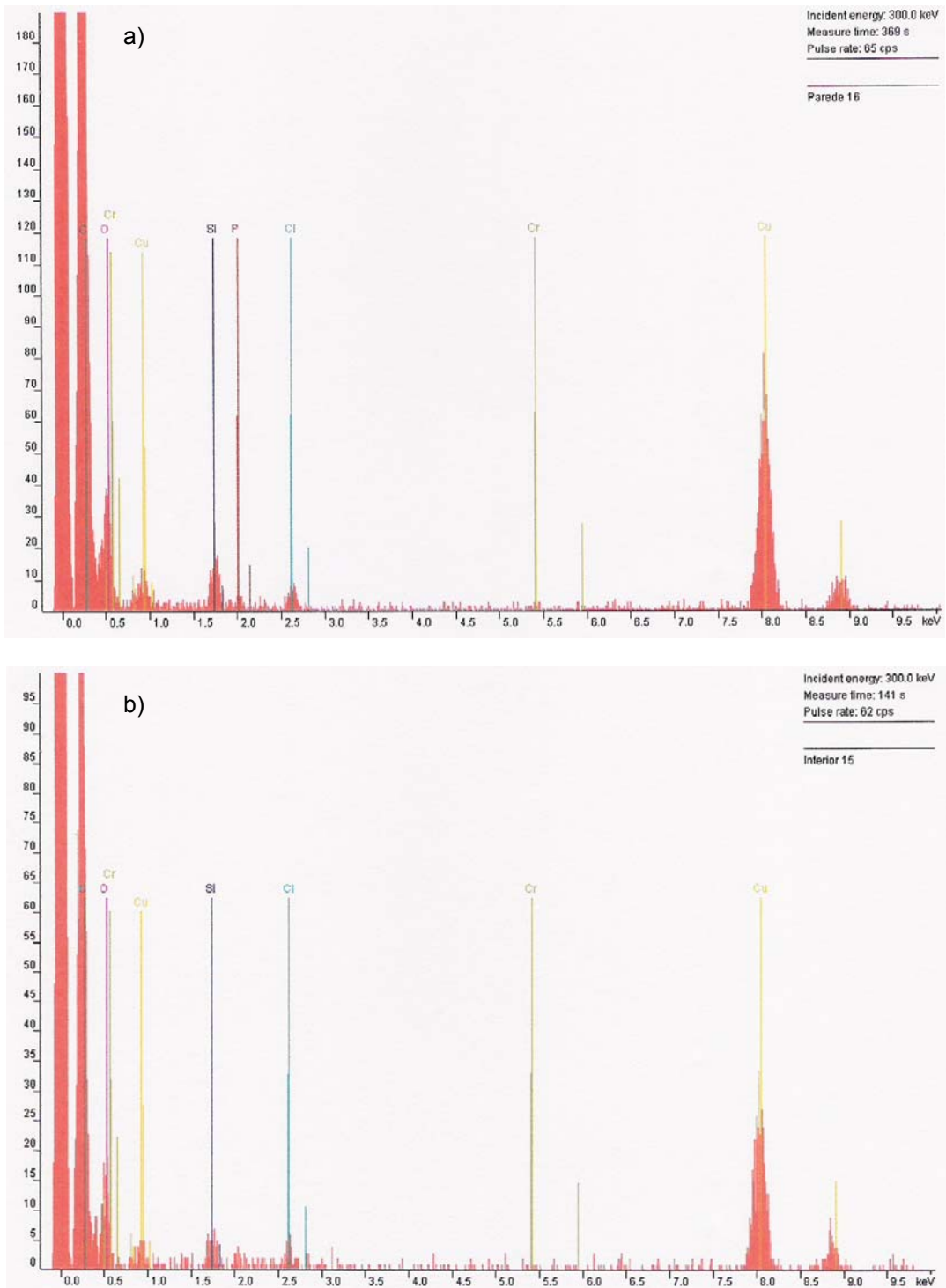


Figura 6.20 – Espectros EDS de uma célula de *S. cerevisiae* com 15 min de contacto com uma solução de Cr(III), sem contraste: a) parede celular; b) interior da célula.

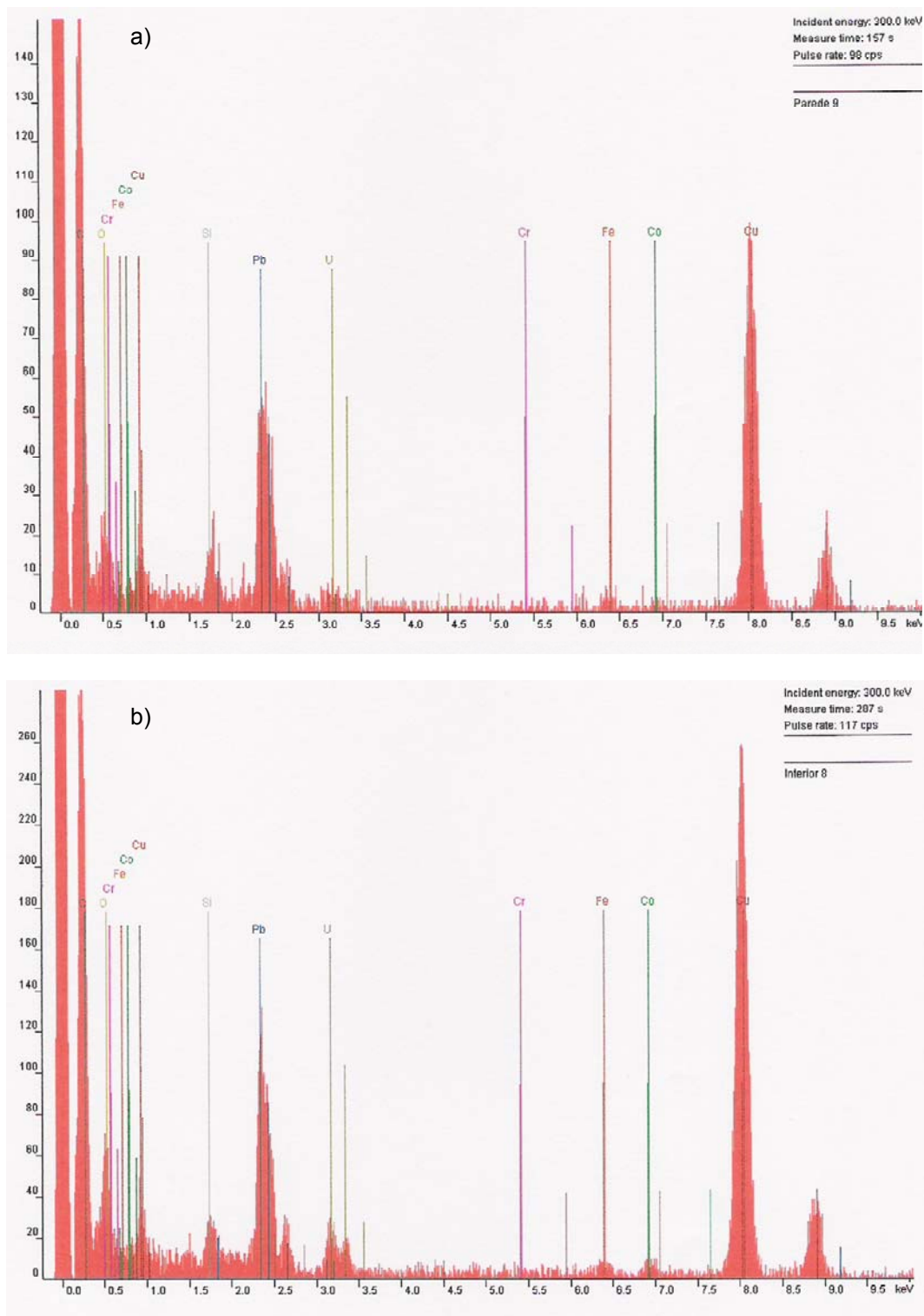


Figura 6.21 – Espectros EDS de uma célula de *S. cerevisiae* com 2 h de contacto com uma solução de Cr(III), com contraste: a) parede celular; b) interior da célula.

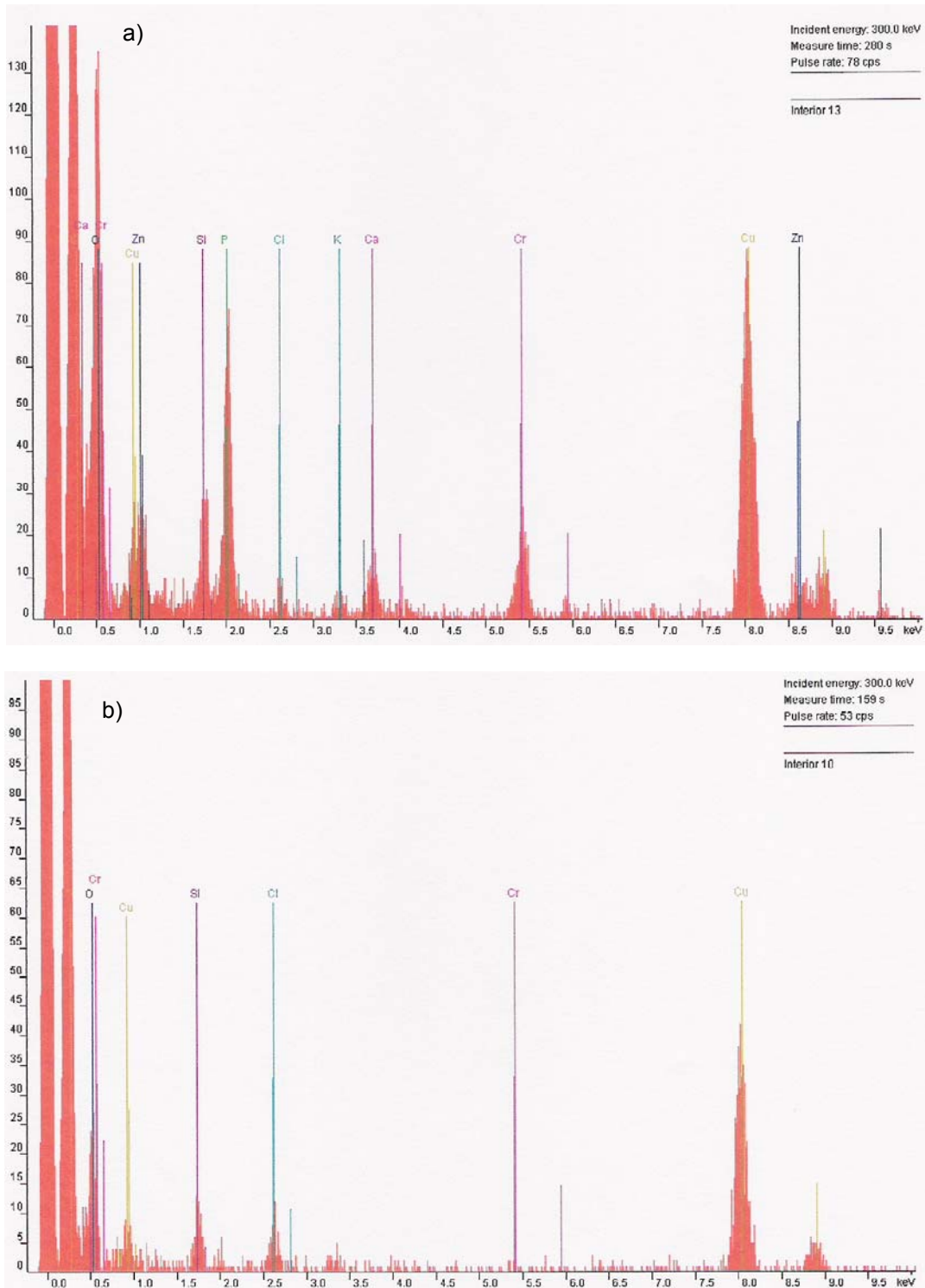


Figura 6.22 – Espectros EDS de uma célula de *S. cerevisiae* com 2 h de contacto com uma solução de Cr(III), sem contraste: a) zona de elevada densidade electrónica; b) interior da célula, sem elevada densidade electrónica.

Também nas amostras de células com 24 h de contacto com a solução de Cr(III) apenas foram identificadas zonas de elevada densidade electrónica nas amostras sem contraste. O motivo da ausência deste metal pode ser, para além do anteriormente apresentado relativo à localização destas zonas, a existência de interferências com as soluções utilizadas neste procedimento. Da mesma forma, a ausência de Cr(III) da parede celular de todas as amostras analisadas pode ser justificar-se pelo excessivo manuseamento das células, envolvendo lavagens sucessivas por exemplo com soluções de etanol, que podem conduzir à dessorção do metal.

No espectro da Figura 6.23 c) aparecem igualmente os picos que identificam a presença de K e P na zona de elevada densidade electrónica onde o crómio se acumula, mas já não se identificam os picos de Ca nem Zn. A ausência de Ca explica-se pelo seu efluxo da célula às 24 h, depois de ter sido substituído pelos iões $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$.

Volesky *et al.* (1993) verificaram, em observações por TEM e análise dos espectros EDAX a células viáveis de *S. cerevisiae* recolhidas na fase exponencial de crescimento expostas a Cd(II), que o metal se acumulou predominantemente em vacúolos, não sendo aparentes alterações nos organelos das células ao fim de 15 h. A análise EDAX também identificou, paralelamente ao Cd, picos de P o que pode indicar que o metal está depositado na forma de fosfato de cádmio, o que pode resultar da actividade fosfatase da célula. Os depósitos de fosfato de cádmio não foram observados no exterior das células e também não estavam presentes em todas as células. Também Suh *et al.* (1998a) estudaram a acumulação de Pb^{2+} por *S. cerevisiae* recorrendo a TEM. Verificaram que após 3 min havia metal depositado à superfície da parede celular e da membrana celular, concluindo que a parede celular não constitui uma barreira à penetração dos iões Pb^{2+} . Após 50 min observaram a acumulação de metal na membrana e na parede celular mas não no citoplasma. Só ao fim de 2 h de contacto foi identificado metal no citoplasma. Karamushka e Gadd (1999) revelam a ausência de alterações em células de *S. cerevisiae* exposta a ouro observadas por TEM, mas observaram zonas de elevada densidade electrónica em preparações não contrastadas de células expostas ao metal.

Kogej e Pavko (2001) descrevem a presença de estruturas cristalinas com elevada densidade electrónica na superfície externa da parede celular das células expostas a solução de Pb(II), observadas em imagens obtidas por TEM, que podem ser assumidas como precipitados de chumbo. Tsezos *et al.* (1997) fizeram observações por TEM de várias amostras de biomassa bacteriana colocadas em contacto com metais pesados por 24 h, com o objectivo de localizar os sítios de bioadsorção dos metais. Os autores identificaram áreas de elevada densidade electrónica no interior das células onde, pela análise EDAX, se confirmou a presença dos metais.

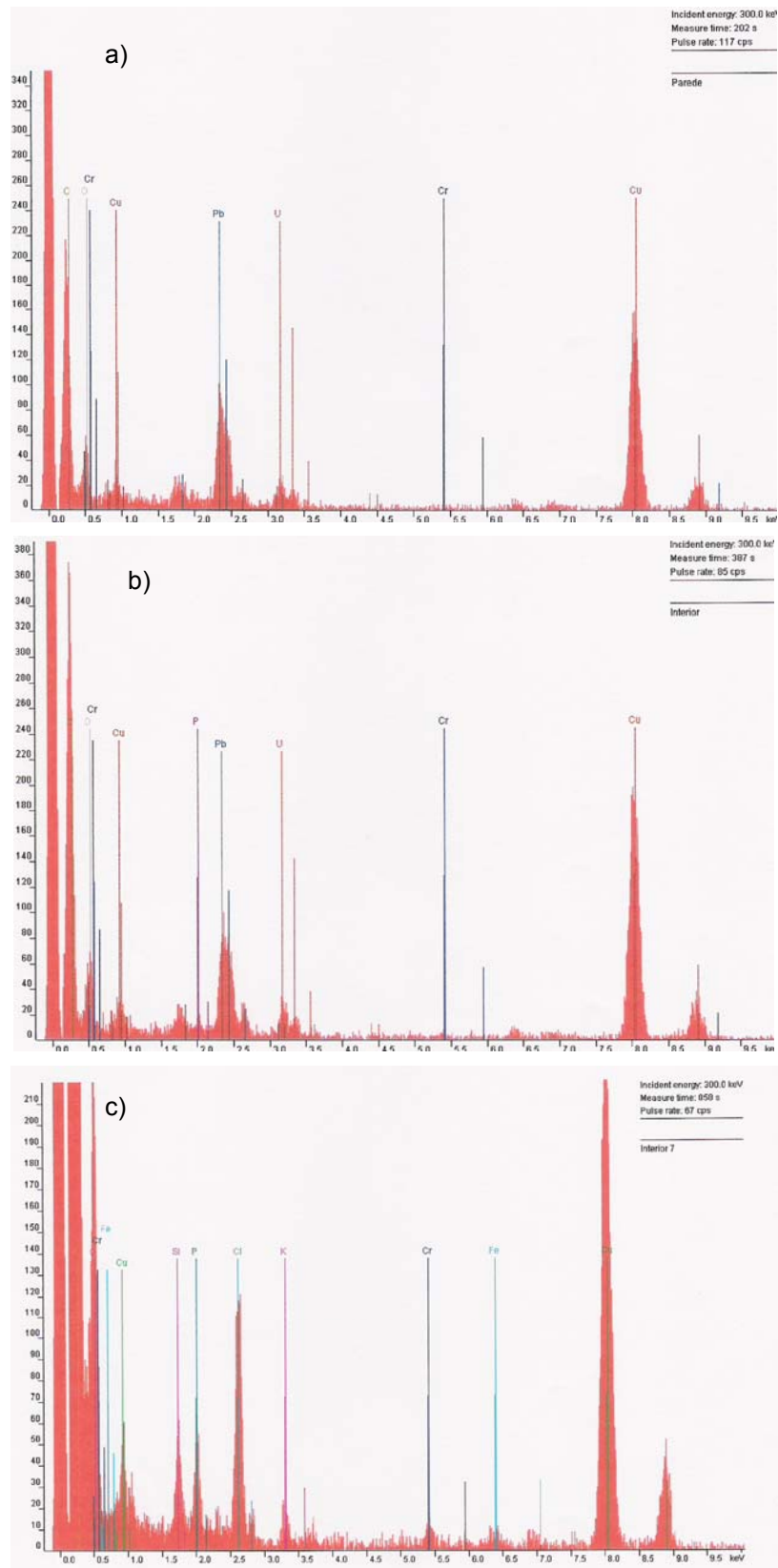


Figura 6.23 – Espectros EDS a uma célula de *S. cerevisiae* com 24 h de contacto com uma solução de Cr(III): a) parede celular, com contraste; b) interior da célula, com contraste; c) interior da célula, sem contraste.

6.8 Conclusões

Do estudo da evolução do pH, efluxo de catiões e material intracelular, e da viabilidade celular, nos sistemas de sorção Cr(III)-*S. cerevisiae* e da caracterização da superfície das leveduras e das drêches, e das observações realizadas a preparações de levedura exposta a soluções de Cr(III) por TEM, é possível concluir que:

i) A adição de suspensão de *S. cerevisiae* a água destilada resulta na subida do pH do meio, efluxo de K^+ , Ca^{2+} , e numa fase mais tardia Mg^{2+} , e efluxo de compostos intracelulares azotados com absorvância a 260 nm. Estas alterações explicam-se pela inoculação das leveduras ocorrer num meio sem fontes de C e pobre em sais dissolvidos, onde as células reagem no sentido de equilibrar o choque osmótico a que são sujeitas. A rápida perda de viabilidade inicial ($\approx 60\%$ nos 30 min iniciais) pode resultar destes fenómenos, sendo a recuperação posterior e a manutenção de células viáveis até às 146 h de incubação justificada pela respiração endógena e manutenção dos níveis de Mg^{2+} próximos dos da biomassa inicial até às 75 h de incubação.

ii) A presença de Cr(III) altera o padrão da evolução dos fenómenos acima descritos provavelmente, numa fase inicial, em consequência dos seus efeitos ao nível da permeabilidade da membrana celular, e.g. por desnaturação de proteínas e peroxidação de lípidos, e numa fase posterior pela ocorrência de lise celular. O efluxo de catiões e compostos intracelulares de baixo peso molecular é acentuado e acelerado na presença de metais, daí ser expectável a perda de viabilidade também mais acentuada observada nestas condições. No caso do pH a tendência de alteração para valores ligeiramente alcalinos é, pelo contrário, mais lenta na presença de Cr(III), o que pode ser explicado pela ocorrência de troca iónica com protões da biomassa e/ou pela libertação de protões em resultado da reacção de hidrólise dos iões Cr^{3+} , e/ou pela ligação do Cr(III) a compostos alcalinos libertados pelas células. A rápida subida do pH observada a partir das 24-48 h de incubação pode estar relacionada com a ocorrência de lise celular, que também dá origem ao aparecimento de compostos com absorvância a 320 nm e à acumulação de quantidades adicionais de metal.

iii) No que respeita ao tipo de interacção do Cr(III) com os biossorventes, a descida de pH observada no período inicial de contacto com as soluções de metal, excepto nas soluções de 10 e 25 $mg.L^{-1}$ talvez porque o intervalo de recolha de amostras não foi suficientemente curto ou porque a saída de compostos alcalinos se sobrepõe a este efeito, e a cinética e estequiometria do efluxo de Mg^{2+} e Ca^{2+} indiciam a ocorrência de um mecanismo de troca iónica entre os iões $Cr(OH)^{2+}$ e os referidos catiões. A acumulação intracelular de Cr(III) por mecanismos dependentes do metabolismo não é provável para períodos superiores a 30 min, uma vez que a viabilidade celular cai para valores inferiores a 10 % ao fim desse tempo de incubação. Atendendo ao efeito de permeabilização da membrana celular, potenciada pelo Cr(III) e pelo contacto das leveduras com etanol, a presença de metal no interior das células, visível nas observações realizadas no microscópio electrónico de transmissão em amostras com 2 e 24 h de contacto com uma solução de Cr(III), deve ocorrer por difusão passiva do metal.

iv) A confirmação da entrada de metal para o interior das leveduras vem consolidar a hipótese adiantada no capítulo anterior de que a recuperação do Cr(III) acumulado para períodos de contacto superiores a 30 min é dificultada pela ocorrência de acumulação intracelular, sendo de evitar tempos de sorção longos quando se pretende recuperar o metal e regenerar a biomassa.

v) Os espectros de infravermelho realizados à *S. cerevisiae* e às drêches (DST e DCT), denotam uma natureza complexa das respectivas superfícies, e demonstram a presença de vários grupos funcionais que podem intervir nas interações com os metais, nomeadamente grupos carboxílicos de carboidratos e proteínas, amino, amida e hidroxilos. A inexistência de alterações dos espectros após o contacto com soluções de Cr(III) é um sinal de que não ocorrem alterações na estrutura química dos bioissorventes, concluindo-se que a natureza das interações do Cr(III) com os bioissorventes têm origem em atrações electrostáticas, em resultado da carga superficial ser negativa ao pH a que decorreram os ensaios, e têm um carácter predominantemente iónico como se previa pelo facto de este metal ser classificado como sendo forte (classe A). As diferenças visíveis no espectro das DCT, relativamente ao material inicial, indicam alterações na sua fracção proteica, permitindo relacioná-las com a perda de capacidade de acumulação de Cr(III) das drêches após o tratamento alcalino.

vi) No interior das células é notória a concentração de Cr(III) em determinados locais do citoplasma onde também aparece P e outros metais (K, Ca e Zn), sendo provável que correspondam a grânulos de fosfato, que ao precipitarem os metais, contribuem como mecanismo de defesa aos seus efeitos nocivos.

vii) A saída de componentes intracelulares, verificada desde o início do processo, também é potenciada pela maior permeabilidade da membrana celular e contribui, para o meio extracelular, com compostos azotados que por sua vez têm propriedades de complexação de metais. A ligação de crómio a estes componentes não foi pesquisada, pelo que não é possível distinguir, com os resultados disponíveis, a ocorrência deste fenómeno da sorção superficial e da acumulação intracelular. No entanto a baixa eficiência da dessorção do Cr(III) mesmo para tempos de contacto de 30 min, pode estar relacionada com este fenómeno. Uma vez que se identificou uma interacção predominantemente iónica com a superfície da parede celular, mas por outro lado não se verificou a expectável reversibilidade da ligação do Cr(III) pelo contacto com soluções ácidas e com compostos complexantes, a explicação para o metal se manter na fase sólida pode ser a formação de complexos de elevada estabilidade com os componentes intracelulares libertados. Já a segunda fase de acumulação de Cr(III), verificada para elevados tempos de incubação, acompanhada da subida do pH do meio e do aparecimento de compostos com absorvência a 320 nm pode associar-se à lise celular, com a ligação do Cr(III) residual da primeira fase de equilíbrio a estes novos compostos libertados.

vii) Estas evidências corroboram o mecanismo proposto pela análise cinética da acumulação de Cr(III), onde se evidenciaram duas fases: a primeira onde a velocidade de acumulação de metal é definida pela quimiossorção, agora associada à troca iónica, e a segunda onde a difusão revela

ter um papel importante, que tanto pode corresponder à difusão de Cr(III) para o interior da célula como a difusão de material intracelular para o meio extracelular onde também se liga ao metal.

viii) A libertação de materiais intracelulares dificulta a análise do processo de biossorção e diminui a eficiência de sorção da *S. cerevisiae*, mas contribui significativamente para o desempenho global do processo de remoção de Cr(III) das soluções aquosas, pelo que não deve ser menosprezado, podendo até ser explorado em ensaios de longa duração, quando não é relevante a recuperação do metal ligado.

CAPÍTULO 7 – Desenvolvimento de um sistema aberto para o tratamento de soluções aquosas com Cr(III)

CAPÍTULO 7 – Desenvolvimento de um sistema aberto para o tratamento de soluções aquosas com Cr(III)

7.1 Objectivos

O presente capítulo trata a aplicação da *S. cerevisiae* e das drêches num sistema aberto constituído por uma coluna de leito expandido. A concepção de sistemas de adsorção em colunas requer o conhecimento da capacidade máxima de adsorção e a previsão do perfil de concentração em função do tempo de operação, ou seja a curva de *breakthrough* da solução a tratar (Malkoc e Nuhoglu, 2006). Assim, depois de caracterizar a cinética e o equilíbrio de acumulação de Cr(III), e de aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de acumulação do metal aos bioissorventes, pretende-se finalmente estudar o respectivo desempenho em sistema aberto. Este estudo envolveu a análise das curvas de *breakthrough* de metal obtidas com os três bioissorventes para as concentrações iniciais de 25 e 50 mg.L⁻¹, e a sua comparação com os resultados previstos por um modelo que resulta da aplicação da equação do modelo de Langmuir à equação de balanço mássico de um reactor contínuo perfeitamente agitado. Paralelamente, para reforçar a caracterização das interações entre o Cr(III) e a *S. cerevisiae*, procedeu-se à monitorização da evolução do pH do meio, libertação de cations (Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+}), saída de material intracelular e da viabilidade das células, e ainda se efectuaram observações de preparações de células por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e análises de raios-X à superfície da células com o intuito de identificar alterações morfológicas nas leveduras e localizar a deposição de metal na superfície celular.

A operação do sistema com a levedura necessitou de uma fase de optimização inicial face ao efeito das condições ambientais (e.g. ausência de adição de fonte de carbono e nutrientes) e hidrodinâmicas nas propriedades floculantes da levedura. O funcionamento do sistema sem que ocorresse a compactação da levedura, e conseqüentemente se formassem canais preferenciais, e a manutenção dos flocos durante longos tempos de ensaio foi alcançado operando com um elevado caudal de recirculação: $150 \pm 3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O decantador no topo da coluna impede a lavagem dos flocos do interior do sistema, mas não garante a retenção de células livres.

Nos ensaios com drêches optou-se por manter as condições operacionais do sistema o mais próximas possíveis das utilizadas com a levedura, sendo apenas ajustado o caudal de recirculação a $160 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para manter a fluidização das partículas. Os resultados apresentados correspondem aos valores médios obtidos na realização de três ensaios independentes.

7.2 Análise do desempenho do sistema aberto na remoção de Cr(III)

Dadas as características físicas da *S. cerevisiae*, para a manutenção dos flocos no interior do sistema aberto sem que se desse a compactação da biomassa e a formação de canais preferenciais, foi adoptada a recirculação externa do meio a partir do decantador. A utilização de

uma elevada razão de recirculação: 100 no caso da levedura, e 106,7 no caso das drêches, resultou na fluidização do leito de enchimento da coluna, tanto no caso da *S. cerevisiae* como das drêches, passando a ser considerado como um leito expandido, e as condições hidrodinâmicas desenvolvidas deverão ser próximas das de um reactor contínuo perfeitamente agitado. Nestas condições hidrodinâmicas a concentração de Cr(III) à saída pode ser prevista pela equação do balanço mássico ao sistema:

$$V_r \frac{dC_e}{dt} = FC_i - FC_e - \frac{dq}{dt} X \quad \text{eq. (7.1)}$$

Onde V_r corresponde ao volume do reactor (L), C_e a concentração de metal à saída do sistema (mg.L^{-1}), F o caudal de alimentação ao reactor ($0,09 \text{ L.h}^{-1}$), q a quantidade de Cr(III) acumulada pela biomassa e X a quantidade de biomassa no sistema (g.L^{-1}).

Na ausência de biomassa o último termo da eq. (7.1) é nulo, pelo que a sua solução é dada por:

$$C_e = C_i(1 - e^{-\frac{1}{\theta}t}) \quad \text{eq. (7.2)}$$

Com θ correspondendo ao tempo de retenção hidráulico (h). A Figura 7.1 mostra a concentração de Cr(III) à saída do sistema aberto, comparando os resultados experimentais obtidos ensaios realizados em duplicado para as concentrações iniciais de 25 e 50 mg.L^{-1} . O desvio percentual entre os valores experimentais e os calculados pela equação (7.3) é respectivamente de 8,7 % e 9,2 %.

$$\Delta C(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(C_{\text{exp}} - C_{\text{calc}}) / C_{\text{exp}}]^2}{n-1}} \quad \text{eq. (7.3)}$$

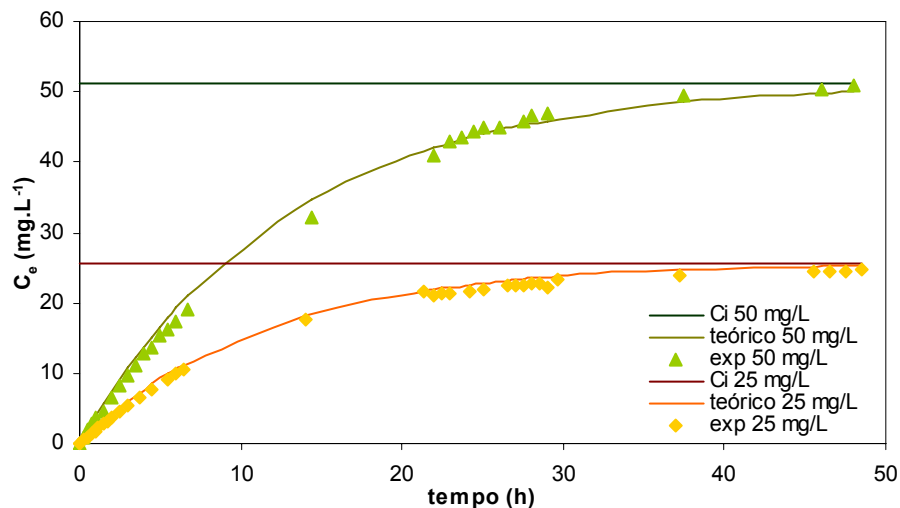


Figura 7.1 – Concentração de Cr(III) na corrente de saída do sistema aberto: comparação dos valores experimentais com os teóricos, considerando o regime hidráulico de um reactor contínuo perfeitamente agitado.

De acordo com estes resultados, considerou-se que o regime hidrodinâmico do sistema aberto pode ser aproximado ao de um reactor contínuo perfeitamente agitado, pelo que recorreu à equação (2.41), tal como Veglio *et al.* (2000) e Reddad *et al.* (2003), para a previsão do seu desempenho no tratamento de soluções de concentração inicial de Cr(III) de 25 e 50 mg.L⁻¹ utilizando como enchimento *S. cerevisiae* floculante, residual de uma indústria de cerveja, ou drêches.

Substituindo na equação (2.41) os parâmetros do modelo de Langmuir calculados no capítulo 5 para os três biossorventes obtêm-se as seguintes equações, respectivamente para a *S. cerevisiae* (eq. (7.4)), DST (eq. (7.5)) e DCT (eq. (7.6)):

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{F(C_i - C_e)}{1,13 \left(1 + \frac{125,7X(t)}{(C_e + 10,0)^2} \right)} \quad \text{eq. (7.4)}$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{F(C_i - C_e)}{1,05 \left(1 + \frac{7044}{(C_e + 16,9)^2} \right)} \quad \text{eq. (7.5)}$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{F(C_i - C_e)}{1,05 \left(1 + \frac{4090}{(C_e + 15,0)^2} \right)} \quad \text{eq. (7.6)}$$

A solução das equações (7.4), (7.5) e (7.6) foi obtida utilizando o *software* MATLAB versão Student 5.3, considerando como condição inicial $C_e = 0$ para $t = 0$.

7.2.1 Remoção de Cr(III) de soluções aquosas pela levedura *S. cerevisiae* em sistema aberto

Uma vez que nos ensaios com *S. cerevisiae* se verificaram perdas de biomassa ao longo do tempo, em parte devido à desfloculação, X , a concentração de biomassa no sistema, é função do tempo de operação. A função $X(t)$ foi obtida através do ajuste linear e polinomial dos dados de monitorização da concentração de sólidos totais na corrente de saída. As equações de ajuste obtidas para as concentrações iniciais de metal de 25 e 50 mg.L⁻¹ e os respectivos coeficientes de correlação aparecem na Figura 7.2.

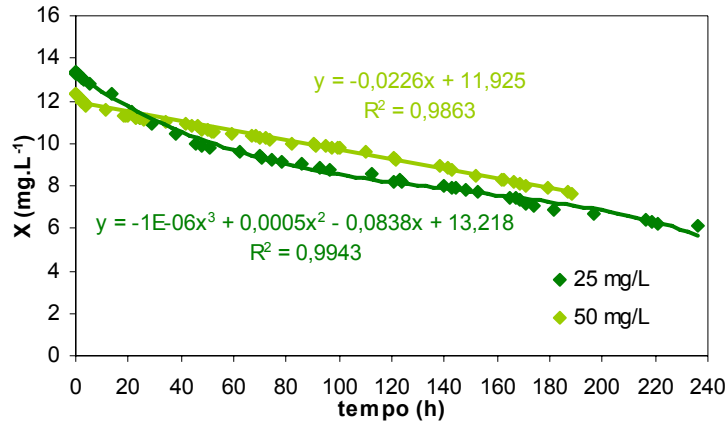


Figura 7.2 – Evolução da concentração de *S. cerevisiae* no interior do sistema aberto para as concentrações iniciais de Cr(III) de 25 e 50 mg.L⁻¹.

As Figuras 7.3 e 7.4 apresentam as curvas de breakthrough de Cr(III) para a alimentação do sistema com soluções de metal de 25 e 50 mg.L⁻¹, obtidas para a operação sem enchimento e com a levedura e ainda a previsão resultante da aplicação da equação (7.4). Verifica-se que até às 24 h de operação, apesar de ocorrer acumulação de Cr(III) pelo sistema, o seu desempenho fica aquém do previsto pelo modelo. A partir desse período a eficiência de acumulação de metal no sistema aumenta consideravelmente, resultando na diminuição da razão C/C_i para valores inferiores a 0,1 às 69,5 h, nos ensaios com $C_i = 25$ mg.L⁻¹, e às 59,5 h, nos ensaios com $C_i = 50$ mg.L⁻¹, valor que se mantém até às 100 h de operação em ambos os casos.

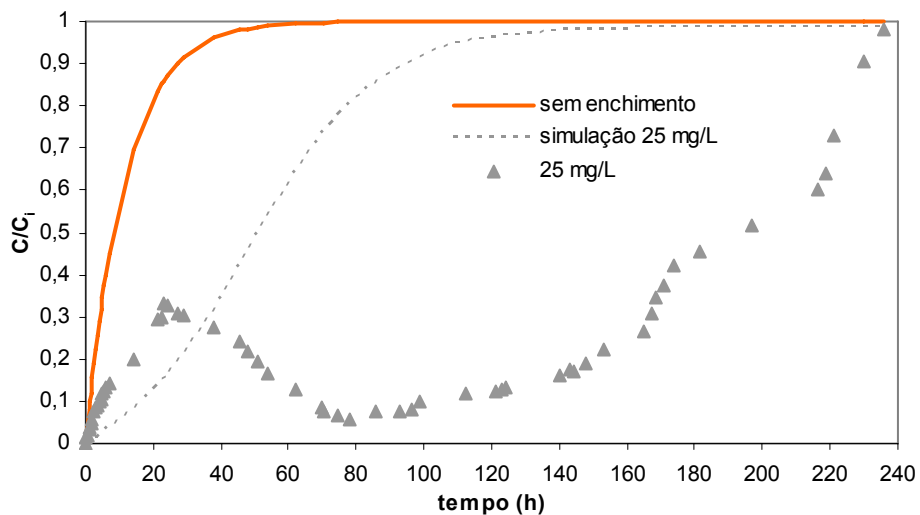


Figura 7.3 – Curva de *breakthrough* de Cr(III) para $C_i = 25$ mg.L⁻¹ considerando o sistema aberto sem enchimento, os valores obtidos pela simulação com a equação (7.4) e os valores experimentais.

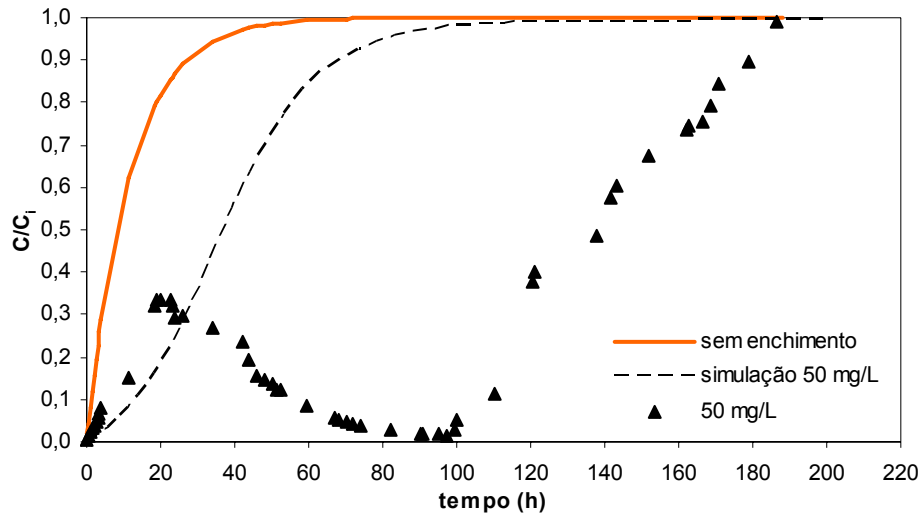


Figura 7.4 – Curva de *breakthrough* de Cr(III) para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ considerando o sistema aberto sem enchimento, os valores obtidos pela simulação com a equação (7.4) e os valores experimentais.

A área abaixo da curva que representa a concentração de metal adsorvida (C_{ads} , mg.L^{-1}) vs. t , pode ser utilizada para calcular a quantidade total de metal adsorvido e a capacidade máxima da coluna (Malkoc e Nuhoglu, 2006). No presente trabalho a quantidade de Cr(III) acumulada no sistema $m_{acumulado}$ (mg), foi calculada pelo balanço mássico de metal traduzido na equação 7.7, onde a massa total de metal não retido pelo sistema (m_e) foi considerada como correspondendo à área abaixo da curva C vs. t apresentada na Figura 7.5:

$$m_i = m_e + m_{acumulado} \quad \text{eq. (7.7)}$$

$$m_{acumulado} = C_i V_{alim} - F \int_0^t C_e dt \quad \text{eq. (7.8)}$$

$$V_{alim} = Ft - V_r \quad \text{eq. (7.9)}$$

Onde m_i e m_e representam a massa de metal na corrente de entrada e de saída (mg) e V_{alim} o volume de solução de Cr(III) alimentada ao sistema (L), que por sua vez foi calculada pela equação (7.9). O integral da equação 7.8 foi calculado pela aplicação da regra dos trapézios para intervalos não uniformes. Os valores de acumulação de metal calculados para os valores médios de três ensaios e para as previsões traduzidas nas curvas das Figuras 7.3 e 7.4 são apresentados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 – Valores calculados para a quantidade de Cr(III) acumulada pelo sistema aberto com *S. cerevisiae* e para a previsão do modelo traduzido na equação 7.4.

C_i (mg.L ⁻¹)	$m_{\text{acumulado}}$ (mg)	
	Previsão (eq. 7.4)	Experimental
25	127,8	456,8
50	143,1	571,8

A quantidade de metal acumulada pelo sistema aberto com *S. cerevisiae* equivale a uma eficiência de remoção de 69,8 e 64,6 % para as concentrações iniciais de 25 e 50 mg.L⁻¹, correspondendo a um incremento de 3,6 e 4 vezes relativamente à previsão do modelo considerado. Esta discrepância, juntamente com as diferenças observadas, em todo o período de ensaio, entre a concentração de Cr(III) à saída do sistema aberto previstas pelo modelo e os valores experimentais (Figuras 7.3 e 7.4), permitem concluir que o modelo utilizado não é adequado para a previsão do desempenho do sistema. Constatou-se ainda que os valores de capacidade de acumulação da *S. cerevisiae*, calculados considerando a quantidade inicial de levedura: 34,24 e 46,26 mg.g⁻¹, são superiores ao q_{max} calculado no Capítulo 5 pelo ajuste dos resultados experimentais da isotérmica de equilíbrio ao modelo de Langmuir. No entanto estes valores aproximam-se do obtido por Ramirez *et al.* (2007) num estudo de acumulação de Cr(III) e Cr(VI) numa coluna de leito fixo constituído por *S. cerevisiae* residual de uma indústria de cerveja imobilizada em rocha vulcânica, de 48 mg.g⁻¹ para o Cr(III) para um caudal de entrada de 15 mL.min⁻¹ e C_i (Cr(III)) = 300 mg.L⁻¹ a pH 4,34.

Além do aumento da capacidade de acumulação de Cr(III) pelo sistema ter aumentado com a concentração inicial de metal, as Figuras 7.3 e 7.4 ainda revelam que, de acordo com o esperado, o tempo necessário para atingir a saturação da coluna diminui quando a concentração de metal aumenta. Uma diferença de concentração elevada origina uma levada força motriz para o processo de adsorção o que pode explicar a maior capacidade de adsorção da coluna a concentrações mais elevadas (Malkoc e Nuhoglu, 2006).

Face aos resultados apresentados e discutidos nos Capítulos 5 e 6, onde ficou clara a ocorrência de um fenómeno de interação entre a levedura e o Cr(III) que envolve compostos intracelulares libertados para o meio extracelular, também as diferenças no comportamento do sistema aberto poderão justificar-se pela ocorrência dos mesmos fenómenos. As figuras 7.5 e 7.6 mostram a evolução do pH e da concentração de Cr(III), K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ na corrente de saída do sistema na ausência de metal e nos ensaios com $C_i = 25$ e 50 mg.L⁻¹. A tendência observada em todos os ensaios é a de um aumento da concentração dos catiões até um valor máximo, a partir do qual vai diminuindo progressivamente até ao final do ensaio, comportamento que pode ser atribuído ao efluxo de catiões resultante das diferenças de pressão osmótica e da perda de viabilidade e lise celular, e a posterior lavagem do sistema. Tal como nos ensaios realizados em sistemas fechados a intensidade do efluxo é superior nos ensaios realizados na presença de metal, em consequência da sua toxicidade.

O pico de libertação de K^+ é coincidente nos ensaios às três concentrações de Cr(III), cerca de 14 h após o seu início, antecedendo o ponto de concentração máxima de metal na corrente de saída prévia à inversão da sua tendência, bem como o pico de libertação de compostos orgânicos intracelulares (Figura 7.7), ambos ocorrendo às 20 h. Já no caso da libertação de Mg^{2+} e Ca^{2+} os picos do ensaio em branco ocorreram mais cedo do que nos ensaios com metal, respectivamente às 4 e 5,5 h. Nos ensaios com $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e 50 mg.L^{-1} a libertação máxima de Ca^{2+} ocorreu às 7 e 12 h, e a de Mg^{2+} aproximou-se do pico de crómio, respectivamente às 24 e 19 h.

A Tabela 7.2 apresenta a quantidade total de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} libertada, $m_{libertada}$ (mg), nos ensaios às três concentrações de metal, calculada pela equação (7.10), onde o valor numérico do integral foi calculado aplicando a regra dos trapézios para intervalos não uniformes.

$$m_{libertada} = F \int_0^t C_{out} dt \quad \text{eq. (7.10)}$$

Onde C_{out} é a concentração dos catiões na corrente de saída do sistema aberto (mg.L^{-1}).

Tabela 7.2 - Quantidade de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} libertada no sistema aberto com *S. cerevisiae*.

C_i (mg.L^{-1})	$m_{libertada}$ (mg)		
	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
0	$149,8 \pm 15,5$	$10,1 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,3$
25	$188,1 \pm 3,5$	$39,5 \pm 0,7$	$12,4 \pm 1,8$
50	$267,9 \pm 8,5$	$37,6 \pm 1,4$	$13,6 \pm 2,1$

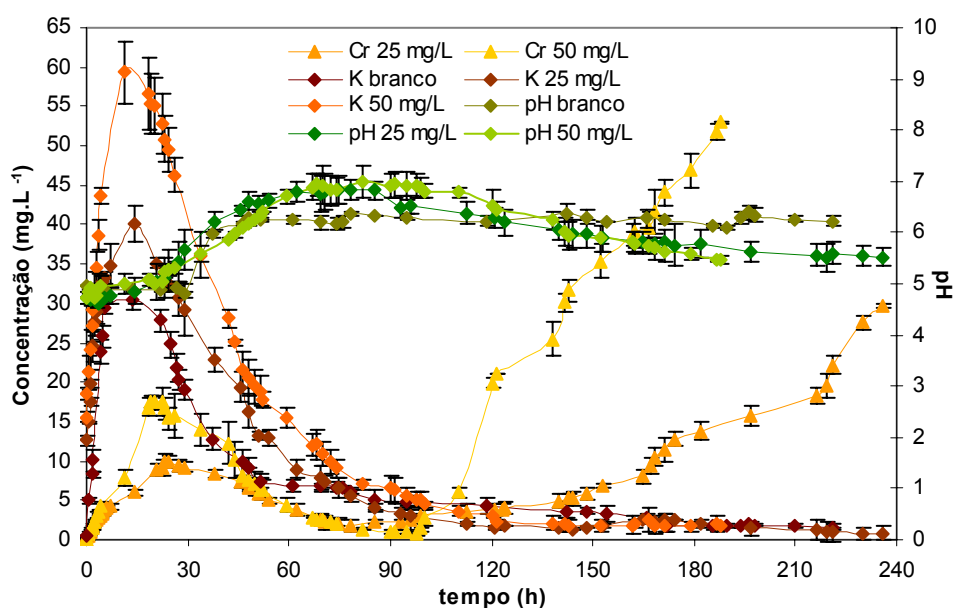


Figura 7.5 – Perfil de pH e de concentração de Cr(III) e K na corrente de saída do sistema aberto para as concentrações iniciais de metal de 0, 25 e 50 mg.L^{-1} .

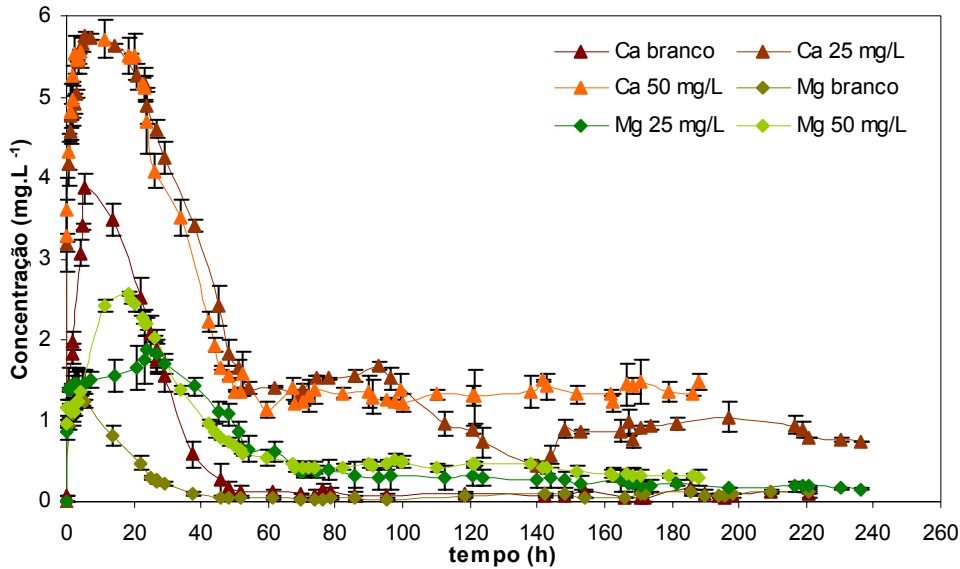


Figura 7.6 – Perfil de concentração de Ca e Mg na corrente de saída do sistema aberto para as concentrações iniciais de metal de 0, 25 e 50 mg.L⁻¹.

Observando os valores da Tabela 7.2 verifica-se que o efluxo de K⁺ aumenta com a concentração de Cr(III) o que, dada a coincidência com a libertação de compostos intracelulares, podendo estar associado apenas à sua difusão passiva para o meio extracelular em consequência do efeito de toxicidade do metal e a permeabilização da membrana celular. No caso do Ca²⁺ e do Mg²⁺ identifica-se um incremento do efluxo nos ensaios realizados com Cr(III) relativamente ao ensaio em branco, mas existe uma proximidade entre as quantidades libertadas tanto a 25 como a 50 mg.L⁻¹. Este perfil, apesar de não indicar uma relação estequiométrica que possa ser atribuída à troca iónica, pode ser um sinal de que ambos os iões estão envolvidos no mecanismo de interacção com o metal.

A evolução do pH do meio (Figura 7.5) também revela uma tendência dependente da concentração de Cr(III), sendo os valores alcançados superiores nos ensaios realizados na presença de metal. Para um pH das soluções de entrada de $5,00 \pm 0,05$, verifica-se um efeito de acidificação na corrente de saída, mantendo-se os valores de pH a cerca de 4,7 até às 20 h nos ensaios com metal, e 4,9 no ensaio em branco. Após esta fase inicial em que o pH se mantém estável talvez porque a acidificação resultante da hidrólise do metal e a troca iónica com iões H⁺ da superfície da biomassa equilibram a tendência de aumento do pH associada à libertação de compostos intracelulares alcalinos, segue-se uma fase de aumento de pH até valores próximos da neutralidade que pode ser devida ao efluxo desses componentes. O valor máximo atingido, de 6,29 para $C_i = 0 \text{ mg.L}^{-1}$, 6,84 para $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e 6,88 para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ ocorreu, respectivamente às 48, 70 e 67 h de ensaio. Na ausência de metal o pH da corrente de saída estabilizou a aproximadamente este valor até ao final do ensaio, enquanto que na presença de Cr(III) o patamar apenas se manteve até cerca das 100 h, diminuindo progressivamente para valores de cerca de 5,5 no seu final.

A Figura 7.7 mostra o espectro de varrimento entre 200 e 500 nm da corrente de saída do sistema aberto. À semelhança do sistema fechado detecta-se a presença de compostos intracelulares azotados com absorvância a 260 nm, constituídos essencialmente por proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, pela comparação do espectro de varrimento obtido no sistema fechado para a solução de 50 mg.L^{-1} (Figura 6.7 d)) e o apresentado na Figura 7.7, verifica-se que a intensidade do pico a 260 nm, indicativa da concentração dos solutos ainda que neste caso sem um carácter quantitativo, revela um atraso na libertação dos compostos intracelulares no sistema aberto: no sistema fechado após 5 h de incubação o pico de absorvância a 260 nm é já de cerca de 1, enquanto que para o mesmo tempo de operação do sistema aberto é ainda inferior a 0,57, só sendo atingidos valores de absorvância daquela ordem de grandeza para $t \geq 11,5 \text{ h}$.

As razões para este desfasamento podem ser: i) o maior stresse a que a levedura é submetida no início do ensaio nos sistemas fechados comparativamente com os sistemas abertos, pelo facto de nos primeiros a levedura ser colocada em soluções com a concentração máxima de metal, ficando desde logo submetida a um ambiente desfavorável com o efeito de toxicidade máximo e, pelo contrário, no sistema aberto a levedura ser colocada em água destilada e a concentração de Cr(III) aumentar progressivamente; e ii) o efeito de lavagem e diluição dos compostos intracelulares em questão do interior do sistema aberto, enquanto que no sistema fechado ocorre continuamente a sua acumulação no meio extracelular.

Os resultados de viabilidade celular apresentados na Figura 7.8 também validam o menor efeito tóxico dos metais no sistema aberto, uma vez que neste caso mesmo após 26 h de operação dos sistema com 25 e 50 mg.L^{-1} de Cr(III) ainda restam 43,1 e 23,7 % de células viáveis, mantendo-se vestígios de viabilidade na população até às 140 h de operação. É no entanto importante a ressalva de que os resultados de viabilidade, devido ao método utilizado na sua determinação, reportam ao número de células no momento da amostragem e não ao número de células iniciais. Uma vez que a Figura 7.9 evidencia a diminuição da concentração de biomassa no interior do sistema no decorrer dos ensaios, verificando-se uma perda de 60,5 % da biomassa inicial no ensaio em branco, 54,5 % para $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$, e 38,3 % para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, os valores da Figura 7.8 estão na realidade inflacionados face às condições iniciais, devendo apenas ser considerados em termos relativos.

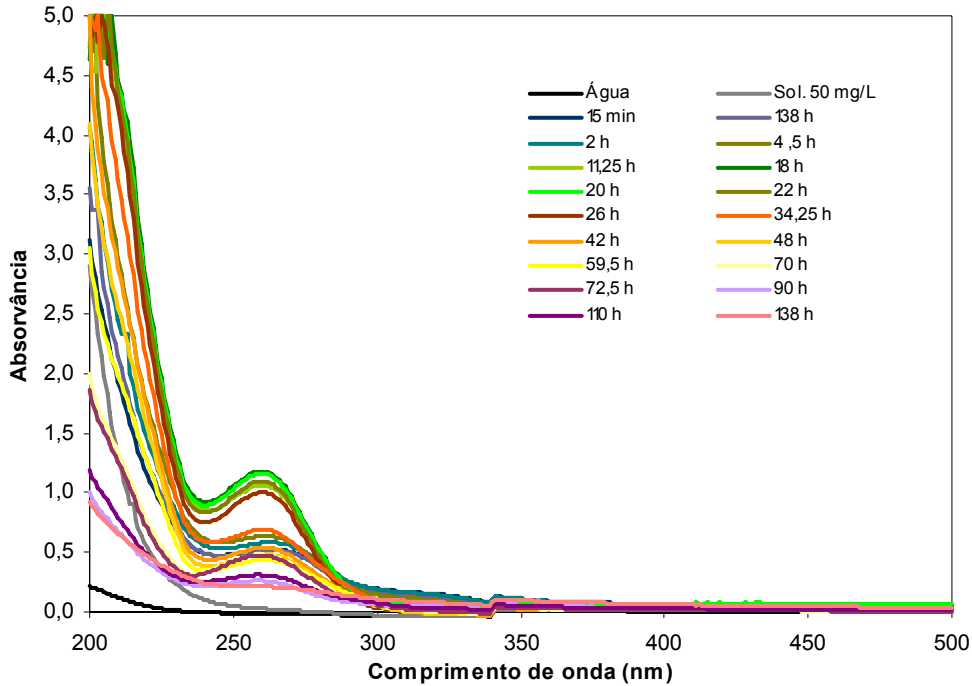


Figura 7.7 – Espectro de varrimento na zona UV-visível de amostras recolhidas na corrente de saída do sistema aberto num ensaio realizado com uma solução de Cr(III) de 50 mg.L⁻¹.

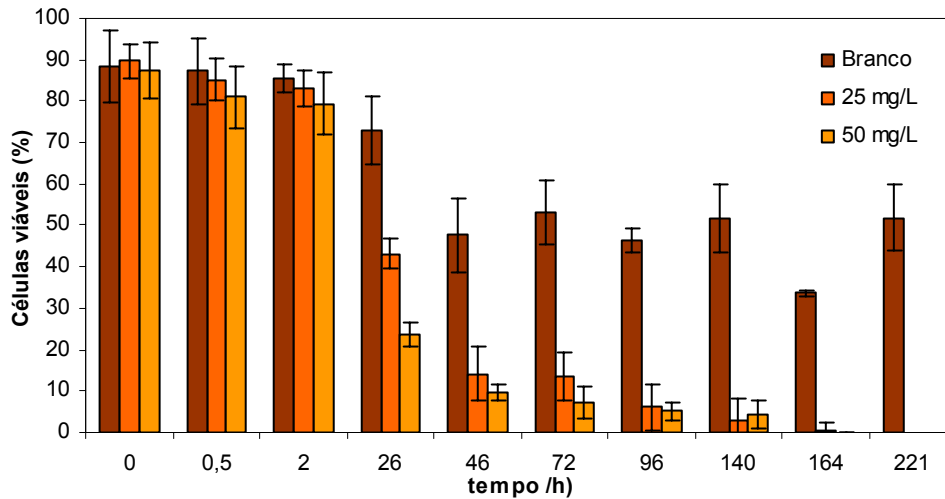


Figura 7.8 – Evolução da viabilidade das células de *S. cerevisiae* ao longo do tempo no sistema aberto, para as concentrações iniciais de 0, 25 e 50 mg.L⁻¹.

Conforme se pode constatar pela Figura 7.9, a perda de biomassa do sistema ocorre de forma mais intensa na ausência de metal. De facto nestes ensaios verificou-se uma maior desfloculação da levedura, com um conseqüente aumento do teor em sólidos totais na corrente de saída, bem como um menor tamanho médio dos flocos. As imagens de flocos de levedura

recolhidos do interior da coluna apresentadas na Figura 7.10, adquiridas com uma câmara Sony AVC-D5CE CCD acoplada a um microscópio modelo Olympus SZ 4045 TR, na fase inicial e final de um ensaio à concentração inicial de 25 mg Cr(III)/L e na fase final de um ensaio realizado na ausência de Cr(III) comprovam a capacidade de floculação da *S. cerevisiae* mesmo para longos tempo apesar da diminuição do seu diâmetro. No entanto, perto do final dos ensaios (165/166 h), verifica-se que a dimensão dos flocos é superior nos ensaios realizados na presença de metal.

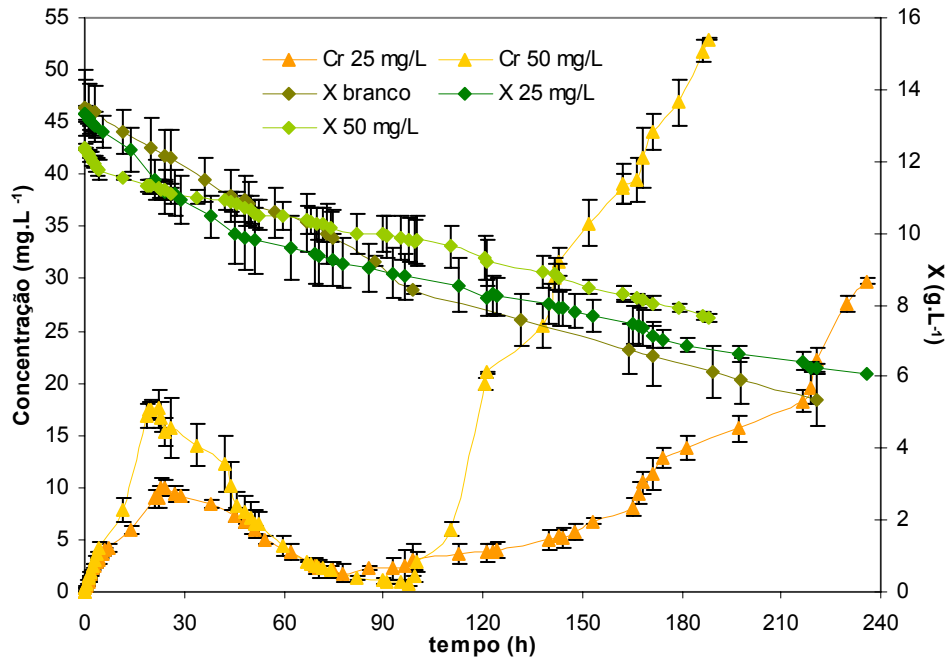


Figura 7.9 – Perfil de concentração de Cr(III) na corrente de saída do sistema aberto e evolução da concentração de biomassa no seu interior, para as concentrações iniciais de metal de 0, 25 e 50 mg.L⁻¹.

A possibilidade de ocorrer a troca iónica entre os iões de crómio e cálcio e magnésio, já abordada no Capítulo 6 é agora mais sustentada não só pelo facto de o perfil do seu efluxo de aproximar à da acumulação de Cr(III) na fase inicial do ensaio, afastando-se do comportamento observado no ensaio em branco, como pela melhor manutenção dos flocos na presença de metal poder estar relacionada com a substituição do Cr(III) pelo cálcio na estabilização dos flocos formados pela *S. cerevisiae*.

As células de leveduras floculantes produzem proteínas superficiais, as lectinas, que se sabe serem activadas e possuírem sítios de ligação específicos para o Ca²⁺ (Avery e Tobin, 1992), podendo haver ocupação dos metais a estes sítios de ligação. De forma idêntica, Soares et al. (2002a) apontam como uma das razões para a maior capacidade de acumulação de metais por estirpes floculantes de levedura a presença de sítios de ligação adicionais atribuídos às lectinas, proteínas superficiais características da estirpe floculante, que se ligam a resíduos de

polissacáridos numa interacção onde os iões Ca^{2+} têm como provável função garantir a sua correcta conformação. Segundo estes autores é possível que outros catiões divalentes possam desempenhar o mesmo papel, aumentando a capacidade de ligação a metais pelas estirpes floculantes, tendo verificado que metais divalentes como o Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} induziram a floculação rápida da levedura *S. cerevisiae*, e quase na mesma intensidade que os iões Ca^{2+} .

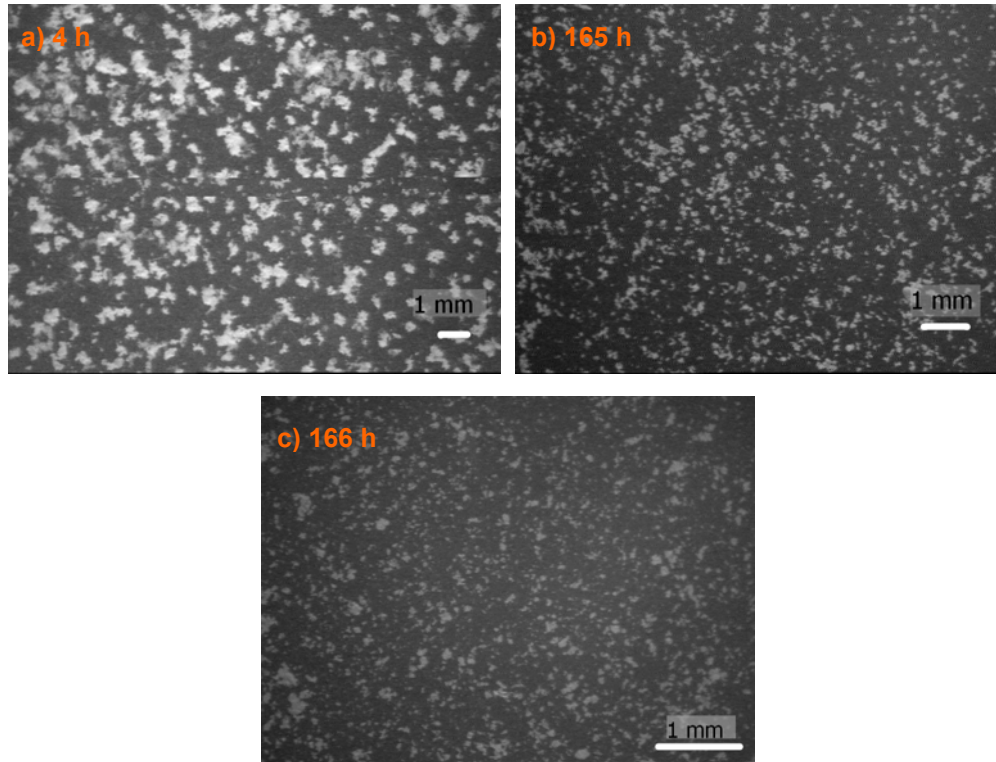


Figura 7.10 – Imagens de flocos de levedura obtidas ao fim de: a) 4 h; e b) 165 h de operação do sistema aberto, para a concentração inicial de Cr(III) de 25 mg.L^{-1} , e c) 166 h de operação no ensaio em branco.

Comparando os perfis acima descritos com o da acumulação de Cr(III) no sistema, é de destacar a correspondência entre: i) a subida do pH do meio com o início da fase onde a concentração de Cr(III) e a libertação de compostos intracelulares com absorvância a 260 nm na corrente de saída começam a diminuir (cerca das 20 h); e ii) o início da fase de diminuição do pH do meio com o aumento da concentração de metal na corrente de saída. Estes resultados vêm reforçar a ideia de que a ligação do Cr(III) aos componentes intracelulares libertados assume o papel mais importante no mecanismo de interacção deste sistema.

Nas primeiras 20 h de operação do sistema aberto a acumulação de metal deve ocorrer essencialmente por mecanismos de troca iónica, que resulta na acidificação do meio e a libertação mais intensa de metais leves como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} , e a acumulação intracelular. A partir desse período a eficiência de remoção de Cr(III) do sistema aumenta muito para além dos valores previstos, verificando-se no entanto que a diminuição da viabilidade celular não é, como

seria de esperar, acompanhada do aumento da saída de compostos intracelulares com absorvância a 260 nm. O facto de se verificar a diminuição destes componentes na corrente de saída na fase em que a acumulação de Cr(III) é máxima revela que estes são retidos no interior do sistema ligados ao crómio. A ausência de compostos com absorvância a 320 nm na corrente de saída pode dever-se ao mesmo motivo ou mesmo à inexistência do seu efluxo, uma vez que nos sistemas fechados só foram detectados para C_i a partir de 50 mg.L^{-1} várias horas depois de não haver células viáveis no sistema.

O facto de o desempenho do sistema mesmo na fase inicial de operação, não corresponder à previsão do modelo que resulta da aplicação da equação de Langmuir à equação do seu balanço mássico, pode estar relacionado com as diferenças no perfil de concentração de compostos intracelulares associadas ao seu modo de operação. Nos sistemas fechados, utilizados para a realização das isotérmicas de sorção e cálculo dos parâmetros da equação de Langmuir, a levedura fica desde logo em contacto com a solução de Cr(III) à concentração máxima o que pode induzir um efluxo mais rápido ao mesmo tempo que os compostos libertados vão sendo sucessivamente acumulados no meio extracelular desde o início do ensaio. Por outro lado no sistema aberto, além ser expectável que os danos celulares e a libertação de compostos intracelulares ocorram mais tardiamente pelo facto de o choque de metal ser menor, também ocorre a lavagem e diluição dos compostos com absorvância a este comprimento de onda no seu interior.

Com o objectivo de pesquisar o tipo de deposição de Cr(III) associada ao aumento de pH do meio para valores próximos da neutralidade e ao efluxo de componentes extracelulares, foram preparadas amostras de *S. cerevisiae*, retiradas do interior da coluna em ensaios realizados a $C_i = 0$ e 25 mg.L^{-1} a vários tempos de operação, para observação por microscopia electrónica de varrimento (Figuras 7.11 e 7.12). Por comparação entre as imagens obtidas foi possível identificar, nas amostras de levedura que teve contacto com crómio e para tempos de operação superiores a 74 h, a existência de depósitos à superfície das células. Em algumas amostras foram adquiridas para além das imagens comuns, obtidas por electrões secundários e que permitem observar a topografia da amostra, imagens por electrões retrodifundidos, que evidenciam diferenças ao nível da sua composição. Nestas imagens os elementos de maior número atómico são evidenciados com mais brilho. Uma vez que nas amostras em questão o Cr(III) é o elemento mais pesado, foi nas zonas mais brilhantes das imagens da Figura 7. 11 f) e 7.12 b) e e), coincidentes com os depósitos já descritos, que se realizaram as análises de raios X. Os espectros obtidos (Figura 7.13) indicam de que são constituídos maioritariamente por crómio, demonstrando que a precipitação do Cr(III) é um dos fenómenos envolvidos na sua interacção com a *S. cerevisiae*.

Apesar de os depósitos de crómio localizados na superfície celular só terem sido identificados nas amostras recolhidas a partir das 74 h de ensaio não invalida a hipótese de também se formarem para tempos mais curtos, mas pelo facto de estarem presentes em menor quantidade podem ter sido eliminados em grande extensão na fase de preparação da amostra dificultando a sua identificação.

Benguella e Benaissa (2002) em imagens obtidas por SEM de quitina recolhida após o contacto com soluções de Cd(II), identificaram pequenos nódulos espalhados pela superfície do biossorvente, ausentes nas amostras de quitina que não tinha estado em contacto com a solução de metal. O espectro obtido por EDAX revelou a presença de Cd(II) nestes nódulos. Estes resultados levaram os autores a confirmar a sorção de Cd(II) à quitina, identificando a localização do metal essencialmente à superfície da biomassa, e demonstrando que as limitações do processo são de natureza química, sendo a reacção não de adsorção mas de precipitação superficial.

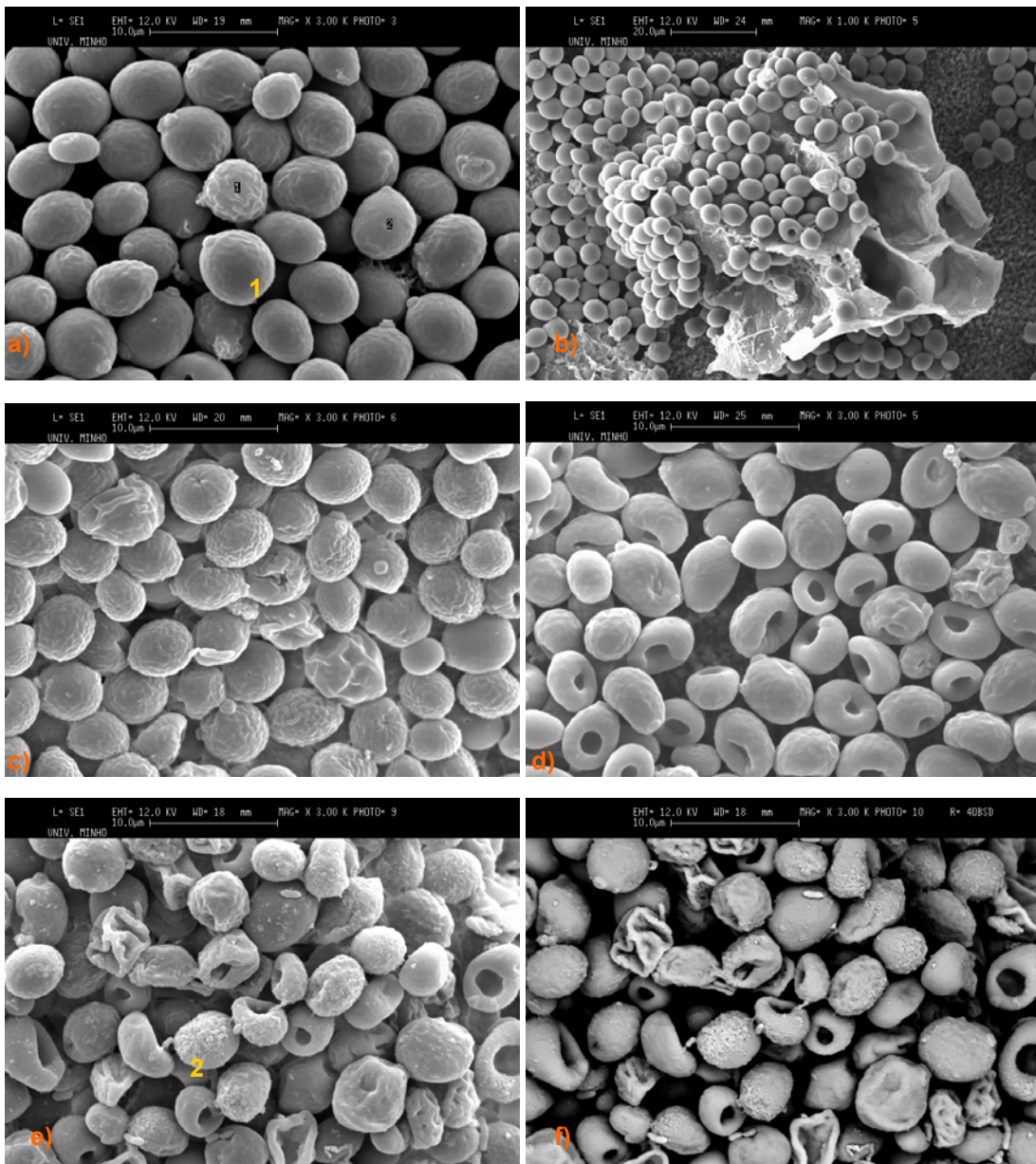


Figura 7.11 – Imagens de preparações de *S. cerevisiae* recolhidas do interior da coluna ao longo do tempo obtidas por SEM: a) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 0,5 \text{ h}$; b) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 4 \text{ h}$, leveduras e drêche; c) $C_i = 0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 27 \text{ h}$; d) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 21 \text{ h}$; e) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 74 \text{ h}$; f) Imagem igual a e) obtida por electrões retrodifundidos, $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 74 \text{ h}$.

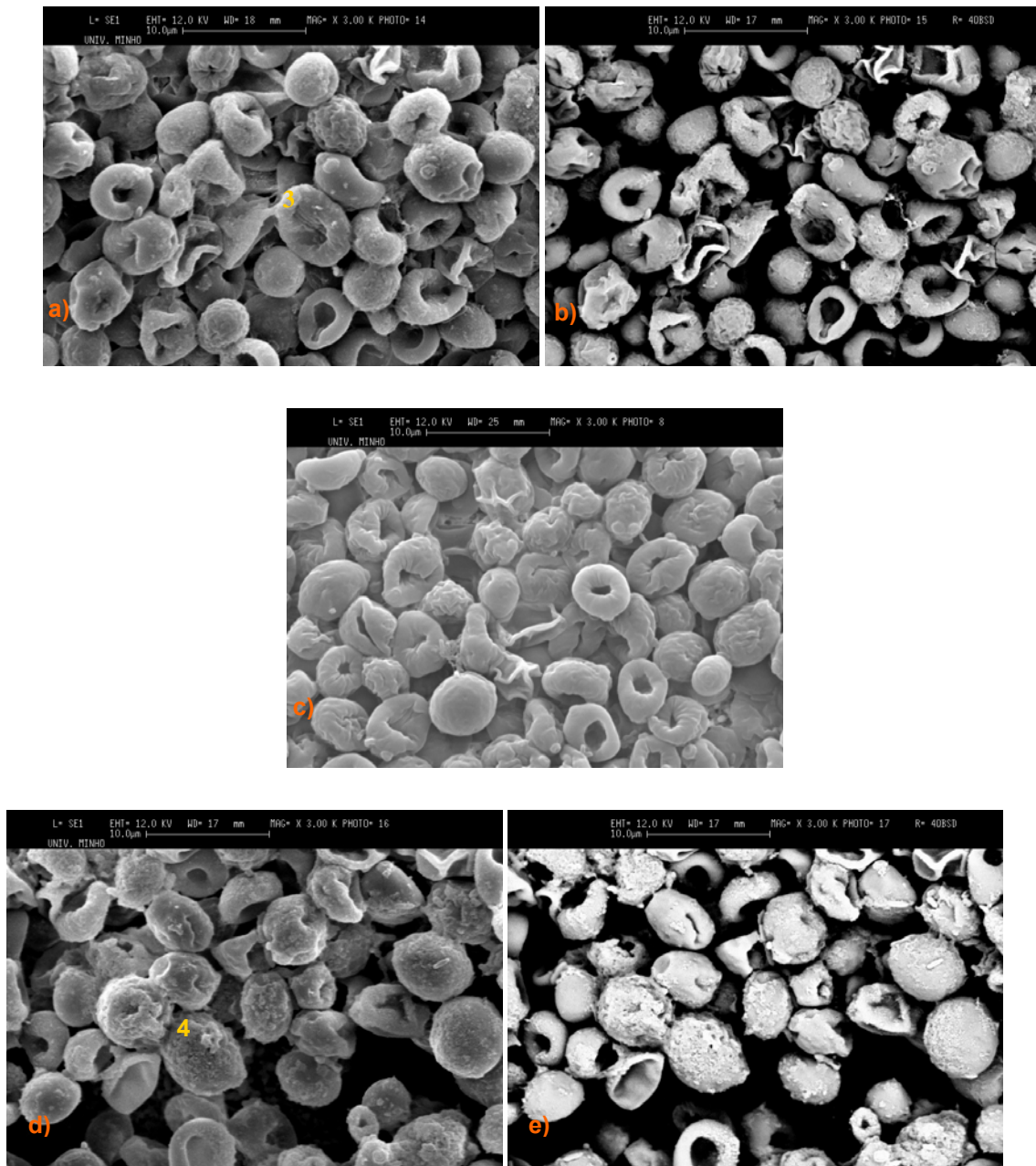


Figura 7.12 – Imagens de preparações de *S. cerevisiae* recolhidas do interior da coluna ao longo do tempo obtidas por SEM: a) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 93 \text{ h}$; b) Imagem igual a a) obtida com electrões retrodifundidos, $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 93 \text{ h}$; c) $C_i = 0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 91 \text{ h}$, d) $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 141 \text{ h}$; e) Imagem igual a d) obtida por electrões retrodifundidos, $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 141 \text{ h}$.

Os locais assinalados com 1, 2, 3 e 4 nas Figuras 7.11 a) e e) e 7.12 a) e d) foram submetidos a análise de raios X, indicando a presença de Cr. Os respectivos espectros são apresentados na Figura 7.13.

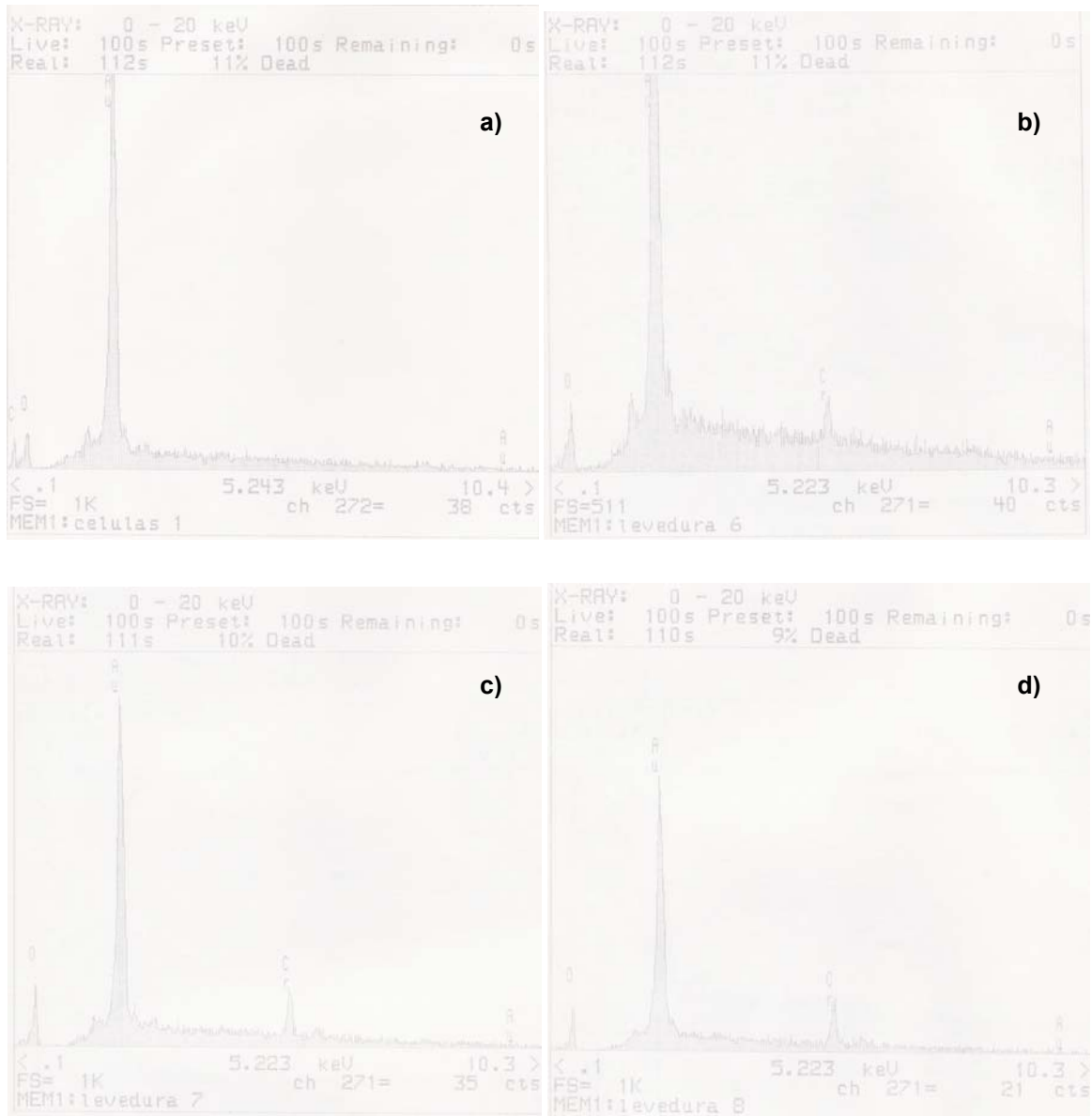


Figura 7.13 – Espectros obtidos por análise de raios X aos locais das leveduras indicados por: a) 1 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 0,5 \text{ h}$; b) 2 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 74 \text{ h}$; c) 3 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 93 \text{ h}$; e d) 4 – $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $t = 141 \text{ h}$, nas Figuras 7.11 e 7.12.

A precipitação e a biossorção são fenómenos que por vezes se sobrepõem sendo difícil avaliar a contribuição individual de cada um para a imobilização do metal (Valls e de Lorenzo, 2002). A biossorção, por si só, pode não ser um tratamento eficiente para águas residuais com matrizes iónicas complexas e baixas cargas poluentes mas, outros processos, como a bioprecipitação, melhoram o desempenho da biomassa pois servem-se do metal biossorvido como local de nucleação, facilitando o processo global de acumulação de metal. Neste processo a biossorção assume um papel importante como o primeiro passo de um processo de biorremediação de sucesso para o sequestro de metais (Pumpel *et al.*, 2003). Em concordância com este ponto de vista, Schneider *et al.* (2001) relatam exemplos em que as observações ao microscópio electrónico mostram a existência de sorção de metais em multicamadas em zonas definidas da biomassa, o que sugere que a sorção é, pelo menos em parte, um fenómeno de precipitação, e também a existência de sítios reactivos em regiões da superfície da biomassa.

As Figuras 7.11 e 7.12 permitem ainda verificar que a aparência das células se degrada com o aumento do tempo de ensaio, tanto na presença como na ausência de Cr(III), surgindo primeiro células com a superfície enrugada e posteriormente células com depressões, que podem dever-se ao colapso associado à perda de compostos intracelulares. Kadukova e Vircikova (2005) observaram cavidades idênticas em células de *Chlorella kessleri* viáveis após 24 h de exposição a uma solução de Cu(II), atribuindo o seu aparecimento ao efeito nocivo do metal. Os autores afirmam que a extensão destes danos nos ensaios realizados com células desidratadas foi consideravelmente menor. Suh *et al.* (1999b) também descrevem variações da superfície celular da levedura *S. cerevisiae* durante o processo de acumulação de Pb^{2+} identificadas por SEM. Antes da acumulação as células tinham uma forma e aparência íntegra mas durante a acumulação de Pb^{2+} as células foram aparecendo progressivamente deformadas, situação acompanhada da perda de viabilidade.

7.2.2 Remoção de Cr(III) de soluções aquosas num sistema aberto com drêches

O desempenho da operação do sistema aberto com DST e DCT foi apenas testado para a concentração inicial de crómio de 50 mg.L^{-1} . As condições de operação foram idênticas para ambos os materiais, mas com as drêches submetidas ao tratamento alcalino a massa de biossorvente utilizada (20 g) foi menor do que com DST (25 g) devido às diferenças de densidade dos materiais. A diminuição da densidade das drêches após o tratamento alcalino resulta do inchamento cristalino da celulose devido à quebra das pontes de hidrogénio entre moléculas de glucose na matriz de celulose (Macheiner *et al.*, 2003). Contrariamente aos ensaios realizados com *S. cerevisiae* as perdas de DST e DCT ao longo dos ensaios foram inferiores a 2 %, podendo considerar-se que a concentração de biossorvente se manteve constante ao longo de todo o tempo de operação.

A Figura 7.14 mostra a evolução da concentração de metal na corrente efluente do sistema aberto na ausência de enchimento e na presença de DST e DCT. Identifica-se, logo desde o seu

arranque, a acumulação de Cr(III) pelos bio sorventes, sendo as drêches sem tratamento aquelas que o mantêm em operação por um período mais longo antes da saturação.

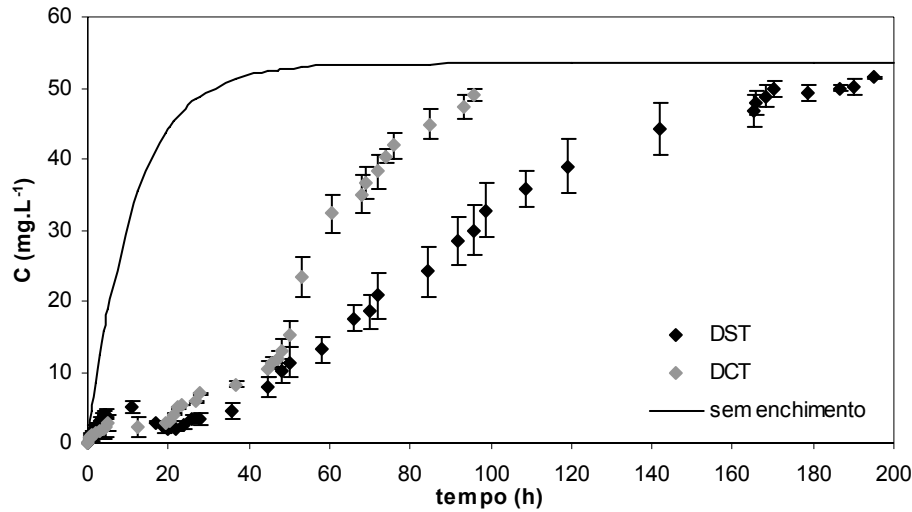


Figura 7.14 – Perfil de concentração de Cr(III) na corrente de saída do sistema aberto a operar com $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ sem enchimento, com DST e com DCT.

Na Figura 7.15, a concentração de saída foi normalizada (C/C_i) e as curvas de *breakthrough* obtidas com ambos os materiais são ainda comparadas com a previsão resultante da aplicação das equações (7.5) e (7.6). O desvio percentual entre os valores da concentração de saída normalizada experimentais e previstos pelos modelos, calculados de acordo com a equação (7.11), são de 59,1 % para as DST e 57,6 % para as DCT.

$$\Delta C/C_i (\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(C/C_i)_{exp} - (C/C_i)_{calc}]^2 / (C/C_i)_{exp}^2}{n-1}} \quad \text{eq. (7.11)}$$

Apesar de os desvios calculados superarem os 50 % para ambos os bio sorventes verifica-se que a curva tem a forma típica de “S” e, principalmente com as DST segue, a partir das 20 h, a mesma tendência prevista pelo modelo ainda que com valores de C/C_i mais baixos, revelando uma capacidade real de acumulação do sistema superior à calculada. No caso das DCT os desvios entre os valores experimentais e os calculados, superiores até às 50 h de ensaio, foram reduzidos a partir das 53 h podendo considerar-se que a partir daí o modelo da equação (7.6) descreve bem os resultados experimentais.

Na Tabela 7.3 apresentam-se os valores de acumulação de metal calculados para a média de três ensaios e para as previsões traduzidas nas curvas da Figuras 7.15 para ambos os bio sorventes. Verificando-se que, como era de esperar, os valores experimentais superam os calculados em ambos os casos.

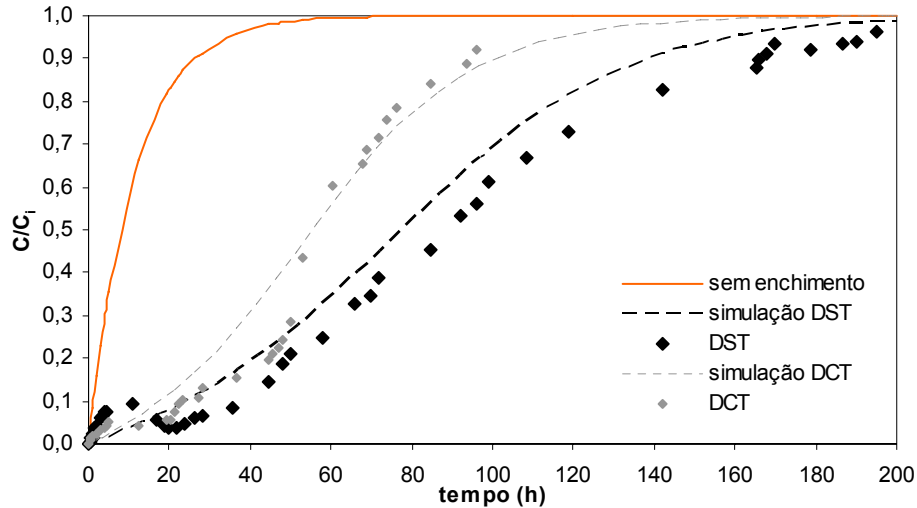


Figura 7. 15- Curva de *breakthrough* de Cr(III) para $C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ considerando o sistema aberto sem enchimento, os valores obtidos pela simulação com as equações (7.5) e (7.6) e os valores experimentais.

Tabela 7.3 – Valores calculados para a quantidade de Cr(III) acumulada pelo sistema aberto com DST e DCT e para a previsão do modelo traduzido nas equação 7.5 e 7.6.

$C_i \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	$m_{\text{acumulada}} \text{ (mg)}$	
	Previsão (eq. 7.4)	Experimental
DST	331,6	389,6
DCT	210,3	222,9

A quantidade de Cr(III) acumulada por grama de biossorvente é de $15,58 \text{ mg.g}^{-1}$ para as DST e de $11,14 \text{ mg.g}^{-1}$ para as DCT, ambos inferiores aos valores de q_{max} calculados pelo modelo de Langmuir (Tabela 5.4). O melhor desempenho das DST era já esperado, estando em concordância com os resultados dos ensaios das isotérmicas de equilíbrio realizadas em sistemas fechados.

Comparando a acumulação de Cr(III) pelas drêches em sistema aberto com a da *S. cerevisiae* verifica-se que para a mesma concentração inicial de metal, a levedura permite a acumulação de metal superior para um menor tempo de operação (188 h), revelando assim ser mais eficiente no tratamento de soluções aquosas de Cr(III). O facto de as leveduras induzirem a formação de precipitados de crómio, excedendo a acumulação prevista com base na biossorção e bioacumulação, contribui significativamente para o seu melhor desempenho como biossorvente.

Também Pumpel *et al.* (2001) conseguiram no tratamento de uma água residual contendo níquel, utilizando um reactor de leito de areia móvel inoculado com um consórcio de 5 bactérias seleccionadas pelas suas propriedades de biossorção, bioprecipitação e biodegradação, uma acumulação de metal de aproximadamente 50 mg.g^{-1} . Segundo os autores este valor excede

largamente o potencial da simples bioadsorção passiva, indicando claramente a predominância de processos biológicos de imobilização do Ni(II). Estes resultados são considerados encorajadores para a o sucesso da aplicação do sistema em desenvolvimento.

7.3 Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo, referentes à aplicação da *S. cerevisiae* e das drêches num sistema aberto constituído por uma coluna de leito expandido, permitem concluir que:

i) O regime hidrodinâmico do sistema aberto pode ser aproximado ao de um reactor contínuo perfeitamente agitado, sendo válida a aplicação da equação de balanço mássico de um CSTR. No entanto, a previsão do desempenho do sistema utilizando um modelo que resulta da aplicação da equação do modelo de Langmuir naquela equação, não descreve bem os resultados experimentais obtidos com nenhum dos três bioadsorventes, para as condições operacionais testadas no presente trabalho.

ii) No caso da *S. cerevisiae* os desvios observados acentuam-se a partir das 24 h de operação, e devem-se à formação de precipitados de Cr(III) que se ligam à superfície celular, identificados por análises de raios X realizadas a amostras preparadas para observação por SEM. A precipitação pode estar relacionada com o efluxo de compostos orgânicos intracelulares com absorvância a 260 nm, em resultado da permeabilização da membrana celular e/ou lise celular, pois a diminuição da sua concentração na corrente efluente do sistema a partir das 24 h pode ser um indício de que são retidos no seu interior pela ligação ao crómio.

iii) A manutenção da capacidade de floculação da biomassa e a sua retenção no interior do sistema e o perfil de saída de Ca^{2+} do sistema indiciam uma relação de substituição destes catiões com os iões metálicos.

iv) A precipitação de Cr(III) induzida no sistema com *S. cerevisiae*, só foi detectada nas amostras observadas por SEM após 74 h de operação do ensaio realizado a $C_i = 25 \text{ mg.L}^{-1}$, eventualmente porque para tempos inferiores (e.g. amostra recolhida às 51 h) estariam em concentrações mais difíceis de detectar. Ao fim deste período a percentagem de células viáveis já é inferior a 20 % o pH está no seu patamar de valores máximos, e os catiões K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} já estão muito próximos dos níveis mínimos de equilíbrio. O facto de o pH do meio se encontrar a valores próximos da neutralidade pode contribuir para que a precipitação do crómio ocorra na forma de hidróxidos.

v) A precipitação do Cr(III) que ocorre no sistema com *S. cerevisiae* permite-lhe superar a capacidade máxima de acumulação calculada pelo modelo de Langmuir em 2,7 e 3,7 vezes, respectivamente para as concentrações iniciais de metal de 25 e 50 mg.L^{-1} , e ainda ter um melhor desempenho do que as drêches, pela capacidade de acumulação superior num menor tempo de operação, uma vez que estas apenas acumulam metal por bioadsorção.

vi) No caso da *S. cerevisiae* a concentração inicial de metal afecta a forma das curvas de *breakthrough*, antecipando a saturação do sistema e reduzindo o seu tempo de operação. As curvas de *breakthrough* obtidas com as drêches reforçam o facto de o pré-tratamento não se traduzir em melhorias de desempenho do sistema de sorção, com as DST a apresentar uma quantidade de Cr(III) acumulada superior e um tempo de operação até à saturação superior ao das DCT.

CAPÍTULO 8 – Conclusões gerais e sugestões para trabalho futuro

CAPÍTULO 8 – Conclusões gerais e sugestões para trabalho futuro

8.1 Conclusões gerais

O âmbito deste trabalho incidiu no estudo de alguns aspectos relacionados com a cinética, equilíbrio e mecanismo da acumulação de crómio (III) a biomassa residual da produção de cerveja: drêches e rescaldos de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), para o desenvolvimento de um sistema aberto que permita um tratamento adequado a soluções aquosas deste metal. De entre as conclusões já apresentadas nos Capítulos precedentes, destacam-se os seguintes aspectos:

i) A biossorção de Cr(III) na levedura e nas drêches é influenciada pelo pH do meio, verificando-se que valores de pH mais elevados resultam no aumento da capacidade de acumulação de metal. Este comportamento, comum a outros sistemas de biossorção, relaciona-se com o ponto isoeléctrico dos grupos funcionais da superfície celular intervenientes na sorção dos iões metálicos (e.g. grupos carboxílicos) e com a menor competição entre estes e os protões para os sítios de ligação à biomassa. Uma vez que a maior parte das águas residuais industriais com metais são ácidas (Puranik e Paknikar, 1997), será necessário o consumo de base para ajustar o seu pH ao valor óptimo.

ii) O mecanismo de interacção Cr(III)-*S. cerevisiae* difere substancialmente do mecanismo de interacção Cr(III)-drêches. As drêches revelam um comportamento típico dos biossorbentes, com uma fase inicial de acumulação de metal rápida, onde se identifica a quimiossorção como sendo o mecanismo que limita a velocidade de acumulação de metal, e uma segunda fase mais lenta onde a difusão intraparticular assume um papel importante na definição da velocidade global do processo. Já com as leveduras foi possível identificar duas fases de natureza distinta e com um desfasamento temporal. A fase inicial, idêntica à descrita para outros sistemas de biossorção que utilizam biomassa microbiana viável, é inicialmente dominada pela quimiossorção e seguida de acumulação intracelular, onde a difusão intraparticular também revela ter influência na velocidade global de acumulação de metal para tempos de contacto mais elevados. A segunda fase ocorre após longos períodos de contacto da levedura com as soluções de Cr(III), estando associada à formação de precipitados que se depositam nas paredes celulares. A natureza dos precipitados não foi apurada, podendo corresponder a complexos de metal com compostos intracelulares azotados libertados pelas células, a hidróxidos metálicos ou a ambos.

iii) A inexistência de alterações dos espectros de infravermelhos após o contacto dos biossorbentes com soluções de Cr(III) revela que a quimiossorção identificada na fase inicial de sorção pode ser atribuída essencialmente a fenómenos de troca iónica onde, no caso da *S. cerevisiae* os iões Ca^{2+} representam um papel importante na medida em que os iões metálicos que os substituem contribuem para a manutenção da sua capacidade de floculação, uma característica fundamental para as aplicações em sistemas abertos sem recurso à imobilização.

iv) Nas condições de operação utilizadas no sistema aberto desenvolvido para o tratamento de soluções aquosas com Cr(III), o bioissorvente mais eficiente foi a *S. cerevisiae*, seguindo-se as DST e as DCT. As alterações químicas e estruturais que resultam do tratamento alcalino realizado às drêches não revelam qualquer benefício do ponto de vista da eficiência de acumulação de Cr(III), e uma vez que este tratamento representa um acréscimo de custos para o processo pelo consumo de matérias primas e operações que lhe estão associadas, pode ser excluído em considerações futuras. O desempenho da *S. cerevisiae* na acumulação de metal no sistema aberto, ultrapassando as previsões que têm por base os dados das isotérmicas de equilíbrio, beneficia largamente do facto de o sistema biológico contribuir com a formação de precipitados que lhe permitem superar a capacidade de acumulação de Cr(III) devida à simples bioissorção e bioacumulação. Este fenómeno pode ser considerado como um elemento encorajador à sua aplicação no tratamento de águas residuais.

v) Comparando as capacidades de acumulação dos bioissorventes estudados com as apresentadas na Tabela 1.2 para outros sistemas de bioissorção e o respectivo desempenho em sistemas aberto, pode considerar-se a levedura e as drêches como sendo bioissorventes promissores na aplicação ao tratamento de águas contaminadas com Cr(III). De entre eles destacam-se as DST e a *S. cerevisiae* por não terem sido submetidos a pré-tratamentos químicos que contribuiriam para o aumento dos custos do processo.

vi) Considerando a aplicação da *S. cerevisiae* e das drêches num processo com uma perspectiva mais abrangente, que inclua a recuperação do Cr(III) e a regeneração da biomassa para utilização em vários ciclos de sorção-dessorção, a utilização da levedura pode já não ser tão vantajosa. Por um lado foi demonstrada, para este sistema de sorção, a diminuição da eficiência de recuperação de Cr(III) com o aumento do tempo de incubação, por outro a operação do sistema aberto com *S. cerevisiae* nestas condições vai ser dificultada pela perda de biomassa, agravada pelo tratamento com o eluente, enquanto que com as drêches esse problema não se coloca. Assim, será aconselhável a escolha da utilização de *S. cerevisiae* em sistemas abertos apenas em casos onde a recuperação de Cr(III), a aquisição de levedura e a sua deposição final não seja relevante do ponto de vista económico e ambiental. Nestas situações o facto de a ligação ao crómio a partir de tempos de contacto elevados ter características de irreversibilidade constitui até um factor de segurança do ponto de vista do risco ambiental, por garantir que o metal permanece insolúvel.

O futuro promissor antevisto para a aplicação da bioissorção à escala industrial ainda não foi alcançado, não existindo ainda um método de tratamento comercialmente viável. O reduzido desenvolvimento comercial é frequentemente justificado pela falta de especificidade e robustez dos sistemas que utilizam biomassa comparativamente às resinas de troca iónica (Gadd, 2000). Esta situação, aliada ao conservadorismo tecnológico por parte das indústrias que já investiram nas tecnologias de tratamento convencionais (Eccles, 1999) resulta na relutância da indústria em adoptar e desenvolver a tecnologia da bioissorção podendo comprometer a fundamentação para a continuidade da investigação científica neste domínio (Gadd, 2000). Estes autores apontam

como estratégias para ultrapassar algumas destas limitações a combinação dos sistemas biológicos com algumas das tecnologias convencionais, e ainda o estudo de aplicações de bioissorção do ponto de vista biogeoquímico. Neste caso o conhecimento das interacções entre os metais, os microrganismos e as partículas do solo pode ajudar a prever a mobilidade dos metais, ou a definir a melhor tecnologia de biorremediação a aplicar para a descontaminação de um solo.

Nesta perspectiva encara-se que o potencial de utilização das drêches será mais provável como um tratamento de afinação, complementar a um tratamento convencional. Já a utilização de *S. cerevisiae* com o mesmo fim poderá necessitar que a água tratada, na fase de maior efluxo de material intracelular, seja ainda submetida a um tratamento para a redução de carga orgânica, o que pode inviabilizar a sua aplicação e/ou contribuir para uma maior relutância na sua aceitação. No entanto as características de interacção da levedura com o Cr(III), em particular a irreversibilidade da ligação estabelecida, poderão constituir uma vantagem em aplicações à biorremediação de solos, na medida em que é garantida a sua imobilização.

8.2 Sugestões para trabalho futuro

Para a continuidade e consolidação deste estudo, apresentam-se as seguintes sugestões para trabalho futuro:

- i) O mecanismo de interacção entre a *S. cerevisiae* e o Cr(III), e a natureza dos precipitados metálicos formados após longos tempos de contacto entre a levedura e as soluções metálicas, necessita de ser aprofundado. A modelação de moléculas é uma área em expansão. Tendo sido já realizadas várias investidas para conhecer a estrutura e o comportamento das proteínas e ácidos nucleicos, a química dos hidratos de carbono, que parece estar na base da bioissorção, ainda não teve benefícios significativos das técnicas de modelação computacional (Volesky, 2001). Esta abordagem, aplicada às drêches e à *S. cerevisiae*, sem descuidar a identificação, caracterização e modelação dos compostos intracelulares que contribuem para a acumulação de metal, constituem uma oportunidade para conhecer o seu funcionamento ao nível molecular apontando o caminho para a sua preparação com o objectivo de “construir” um melhor bioissorvente.
- ii) A realização de ensaios com *S. cerevisiae* não viável, ainda que envolva um pré-tratamento que inviabilize economicamente a sua aplicação no tratamento de efluentes reais, deverá ser abordada com o objectivo de contribuir para a distinção entre a bioacumulação de bioissorção de metal, acrescentando informação útil à caracterização do mecanismo envolvido na acumulação de Cr(III).
- iii) A aplicação da tecnologia de bioissorção a águas residuais industriais, onde a composição das águas residuais difere consideravelmente em função da sua origem, requer que a caracterização da *S. cerevisiae* e das drêches como bioissorventes seja alargada a outros metais e à presença

de outros componentes que alterem as condições ambientais do sistema (e.g. alterações da força iónica, influência da presença de outros metais, manutenção de pH constante).

iv) O desempenho dos biossorventes em sistema aberto deve ainda ser estudado para outras condições de operação, fazendo variar designadamente a concentração de biomassa e o caudal de alimentação de solução de metal. Sendo a modelação uma ferramenta particularmente útil na interpretação dos resultados experimentais e na previsão da resposta dos sistemas à variação das condições de operação, permitindo otimizar o processo e contribuir para o desenvolvimento de estratégias do seu controlo, considera-se ainda que a modelação dos resultados experimentais necessita de uma abordagem mais profunda, nomeadamente recorrendo a modelos mais complexos. A optimização das condições de operação em sistema aberto deverá ainda ser alargada à dessorção de Cr(III), realizando ensaios que incluam vários ciclos de sorção-dessorção.

v) A configuração do sistema e o seu regime hidrodinâmico também poderão ser alvo de optimização. Dadas as características físicas das drêches deverá considerar-se a operação com o leito fixo, considerada a configuração mais eficiente por maximizar a diferença de concentração de metal entre a solução e o biossorvente, a força motriz da acumulação de metais (Kratochvil *et al.*, 1997). Já com a *S. cerevisiae*, verificando-se a dificuldade de operar em leito fixo sem recorrer a pré-tratamentos como a desidratação e/ou imobilização, poderá ser analisada como alternativa a operação num reactor descontínuo sequencial. A flexibilidade associada a este regime de operação permitirá explorar a duração dos ciclos em função da eficiência de remoção de metal da água a tratar, e a recuperação possível na fase de dessorção, em função das especificações definidas.

vi) O ciclo de estudos iniciado com este trabalho deverá culminar com a realização de ensaios com águas residuais reais em sistema aberto, permitindo validar os resultados experimentais obtidos com as soluções sintéticas e comprovar o potencial de aplicação destes biossorventes à escala industrial.

CAPÍTULO 9 – Referências bibliográficas

CAPÍTULO 9 – Referências bibliográficas

1. Adamis, P. D. B., Panek, A. D., Leite, S. G. F. e Eleutherio, E. C. A., Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Brazilian Journal of Microbiology, 2003, 34, 1, 55-60.
2. Ahluwalia, S. S. e Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater, Bioresource Technology, 2007, 98, 12, 2243-2257.
3. Ajmal, M., Rao, R. A. K., Ahmad, R., Ahmad, J. e Rao, L. A. K., Removal and recovery of heavy metals from electroplating wastewater by using Kyanite as an adsorbent, Journal of Hazardous Materials, 2001, 87, 1-3, 127-137.
4. Aksu, Z., Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature, Separation and Purification Technology, 2001, 21, 3, 285-294.
5. Aksu, Z., Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto *Chlorella vulgaris*, Process Biochemistry, 2002, 38, 1, 89-99.
6. Akthar, N., Sastry, S. e Mohan, M., Biosorption of silver ions by processed *Aspergillus niger* biomass, Biotechnology Letters, 1995, 17, 5, 551-556.
7. Aldor, I., Fourest, E. e Volesky, B., Desorption of cadmium from algal biosorbent, Canadian Journal of Chemical Engineering, 1995, 73, 4, 516-522.
8. Arnold, W. N., Introduction, *in* Yeast Cell Envelops: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructures, CRC Press, Inc., Arnold, W. N., 1981, 1-3.
9. Atkinson, B. W., Bux, F. e Kasan, H. C., Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents, Water Sa, 1998, 24, 2, 129-135.
10. Avery, S. V. e Tobin, J. M., Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58, 12, 3883-3889.
11. Bag, H., Turker, A. R., Lale, M. e Tunceli, A., Separation and speciation of Cr(III) and Cr(VI) with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite and determination of both species in water by FAAS, Talanta, 2000, 51, 5, 895-902.
12. Bai, R. S. e Abraham, T. E., Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*, Water Research, 2002, 36, 5, 1224-1236.
13. Bai, R. S. e Abraham, T. E., Studies on chromium(VI) adsorption-desorption using immobilized fungal biomass, Bioresource Technology, 2003, 87, 1, 17-26.
14. Bailey, S. E., Olin, T. J., Bricka, R. M. e Adrian, D. D., A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals, Water Research, 1999, 33, 11, 2469-2479.
15. Barkay, T. e Schaefer, J., Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials, Current Opinion in Microbiology, 2001, 4, 3, 318-323.
16. Barros, A. J. M., Prasad, S., Leite, V. D. e Souza, A. G., Biosorption of heavy metals in upflow sludge columns, Bioresource Technology, 2007, 98, 7, 1418-1425.

17. Benguella, B. e Benaissa, H., Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies, *Water Research*, 2002, 36, 10, 2463-2474.
18. Bingol, A., Uzun, H., Bayhan, Y. K., Karagunduz, A., Cakici, A. e Keskinler, B., Removal of chromate anions from aqueous stream by a cationic surfactant-modified yeast, *Bioresource Technology*, 2004, 94, 3, 245-249.
19. Bishnoi, N. R., Kumar, R., Kumar, S. e Rani, S., Biosorption of Cr(III) from aqueous solution using algal biomass *Spirogyra* spp., *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 145, 1-2, 142-147.
20. Blackwell, K. J., Singleton, I. e Tobin, J. M., Metal Cation Uptake by Yeast - A Review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43, 4, 579-584.
21. Blackwell, K. J. e Tobin, J. M., Cadmium accumulation and its effects on intracellular ion pools in a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 23, 3, 204-208.
22. Blackwell, K. J., Tobin, J. M. e Avery, S. V., Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47, 2, 180-184.
23. Blackwell, K. J., Tobin, J. M. e Avery, S. V., Manganese toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on intracellular and extracellular magnesium concentrations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49, 6, 751-757.
24. Brady, D. e Duncan, J. R., Binding of heavy-metals by the cell-walls of *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, 16, 7, 633-638.
25. Brady, D., Stoll, A. e Duncan, J. R., Biosorption of heavy-metal cations by nonviable yeast biomass, *Environmental Technology*, 1994a, 15, 5, 429-438.
26. Brady, D., Stoll, A. D., Starke, L. e Duncan, J. R., Chemical and enzymatic extraction of heavy-metal binding polymers from isolated cell-walls of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1994b, 44, 3, 297-302.
27. Brady, J. M. e Tobin, J. M., Binding of hard and soft metal ions to *Rhizopus arrhizus* biomass, *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17, 9, 791-796.
28. Branyik, T., Vicente, A., Oliveira, R. e Teixeira, J., Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88, 1, 84-93.
29. Brás, I. P. L., Utilização de casca de pinheiro como adsorvente para remoção de pentaclorofenol de águas contaminadas, Dissertação para a obtenção do grau de Doutor, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2005
30. Bustard, M., Rollan, A. e Mchale, A. P., The effect of pulse voltage and capacitance on biosorption of uranium by biomass derived from whiskey distillery spent wash, *Bioprocess Engineering*, 1998, 18, 1, 59-62.
31. Butter, T. J., Evison, L. M., Hancock, I. C. e Holland, F. S., The kinetics of metal uptake by microbial biomass: Implications for the design of a biosorption reactor 2, *Water Science and Technology*, 1998a, 38, 6, 279-286.
32. Butter, T. J., Evison, L. M., Hancock, I. C., Holland, F. S., Matis, K. A., Philipson, A., Sheikh, A. I. e Zouboulis, A. I., The removal and recovery of cadmium from dilute aqueous solutions by biosorption and electrolysis at laboratory scale, *Water Research*, 1998b, 32, 2, 400-406.

33. Bux, F., Swalaha, F. M. e Kasan, H. C., Assessment of acids as desorbents of metal-ions bound to sludge surfaces, *Water Sa*, 1995, 21, 4, 319-324.
34. Carvalheiro, F., Esteves, M. P., Parajo, J. C., Pereira, H. e Girio, F. M., Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain, *Bioresource Technology*, 2004, 91, 1, 93-100.
35. Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C. e Moreno-Sanchez, R., Interactions of chromium with microorganisms and plants, *Fems Microbiology Reviews*, 2001, 25, 3, 335-347.
36. Chen, C. e Wang, J., Influence of metal ionic characteristics on their biosorption capacity by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007b, 74, 4, 911-917.
37. Chen, C. e Wang, J., Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007a, 74, 3, 683-687.
38. Chojnacka, K., Biosorption of Cr(III) ions by eggshells, *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 121, 1-3, 167-173.
39. Chu, K. H., Improved fixed bed models for metal biosorption, *Chemical Engineering Journal*, 2004, 97, 2-3, 233-239.
40. Chu, K. H., Hashim, M. A., Phang, S. M. e Samuel, V. B., Biosorption of cadmium by algal biomass: Adsorption and desorption characteristics, *Water Science and Technology*, 1997, 35, 7, 115-122.
41. Chubar, N., Carvalho, J. R. e Correia, M. J. N., Cork biomass as biosorbent for Cu(II), Zn(II) and Ni(II), *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, 230, 1-3, 57-65.
42. Cossich, E. S., Da Silva, E. A., Tavares, C. R. G., Cardozo, L. e Ravagnani, T. M. K., Biosorption of chromium(III) by biomass of seaweed *Sargassum* sp. in a fixed-bed column, *Adsorption-Journal of the International Adsorption Society*, 2004, 10, 2, 129-138.
43. Cross, R. H. M., A reliable epoxy resin mixture and its application in routine biological Transmission Electron Microscopy, *Micron and Microscopica Acta*, 1989, 20, 1, 1-7.
44. Davis, T. A., Llanes, F., Volesky, B. e Mucci, A., Metal selectivity of *Sargassum* spp. and their alginates in relation to their alpha-L-guluronic acid content and conformation, *Environmental Science & Technology*, 2003a, 37, 2, 261-267.
45. Davis, T. A., Volesky, B. e Mucci, A., A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae, *Water Research*, 2003b, 37, 18, 4311-4330.
46. Davis, T. A., Volesky, B. e Vieira, R. H. S. F., *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals, *Water Research*, 2000, 34, 17, 4270-4278.
47. De Groot, P. W. J., Ram, A. F. e Klis, F. M., Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls, *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42, 8, 657-675.
48. Decreto Lei n.º 194/2000 de 21 de Agosto, *Diário da República*, 21-8-2000
49. Decreto Lei n.º 243/2001 de 5 de Setembro, *Diário da República* 206 Série I - A, 5-9-2001
50. Decreto Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, *Diário da República* - I Série A, nº 176, 1-8-1998

51. Donmez, G. e Aksu, Z., Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species, *Process Biochemistry*, 2002, 38, 5, 751-762.
52. Donmez, G. e Kocberber, N., Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36, 5-6, 700-705.
53. Doshi, H., Ray, A. e Kothari, I. L., Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: Spectroscopic, kinetics and SEM studies, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96, 6, 1051-1063.
54. Dostalek, P., Patzak, M. e Matejka, P., Influence of specific growth limitation on biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54, 2-3, 203-207.
55. Eccles, H., Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?, *Trends in Biotechnology*, 1999, 17, 12, 462-465.
56. Engl, A. e Kunz, B., Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae* - Effects of nutrient conditions, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1995, 63, 3, 257-261.
57. Esposito, A., Pagnanelli, F. e Veglio, F., pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems, *Chemical Engineering Science*, 2002, 57, 3, 307-313.
58. Farinella, N. V., Matos, G. D. e Arruda, M. A. Z., Grape bagasse as a potential biosorbent of metals in effluent treatments, *Bioresource Technology*, 2007, 98, 10, 1940-1946.
59. Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R. e Gadd, G. M., Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery, *Fems Microbiology Letters*, 2002, 213, 1, 1-6.
60. Fein, J. B., Martin, A. M. e Wightman, P. G., Metal adsorption onto bacterial surfaces: development of a predictive approach, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2001, 65, 23, 4267-4273.
61. Ferraz, A., Tavares, T. e Teixeira, J. A., Cr (III) recovery from *Saccharomyces cerevisiae* by elution - a preliminary study, *Chisa 2000 - 14th International Congress of Chemical and Process Engineering, Process System Engineering*, Novosad, J., 2000, Praga, República Checa.
62. Ferraz, A. I., Tavares, T. e Teixeira, J. A., Cr(III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*, *Chemical Engineering Journal*, 2004, 105, 1-2, 11-20.
63. Ferraz, A. I. e Teixeira, J. A., The use of flocculating brewer's yeast for Cr(III) and Pb(II) removal from residual wastewaters, *Bioprocess Engineering*, 1999, 21, 5, 431-437.
64. Figueira, M. M., Volesky, B., Azarian, K. e Ciminelli, S. T., Biosorption column performance with a metal mixture, *Environmental Science & Technology*, 2000a, 34, 20, 4320-4326.
65. Figueira, M. M., Volesky, B., Ciminelli, S. T. e Roddick, F. A., Biosorption of metals in brown seaweed biomass, *Water Research*, 2000b, 34, 1, 196-204.
66. Figueira, M. M., Volesky, B. e Mathieu, H. J., Instrumental analysis study of iron species biosorption by *Sargassum* biomass, *Environmental Science & Technology*, 1999, 33, 11, 1840-1846.
67. Fontana, A., Chraibi, M., Guiraud, J. P. e Ghommidh, C., Diffusivity measurement in a flocculating yeast layer, *Biotechnology Techniques*, 1991, 5, 2, 133-138.

68. Fourest, E., Canal, C. e Roux, J. C., Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*) - pH control and cationic activation, *Fems Microbiology Reviews*, 1994, 14, 4, 325-332.
69. Gadd, G. M., Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides, *Endeavour*, 1996, 20, 4, 150-156.
70. Gadd, G. M., Fungi and yeasts for metal accumulation, *in* *Microbial Mineral Recovery*, Lehrlich, H. L. and Brierley, C. L., MacGraw Hill, 1990, 249-275.
71. Gadd, G. M., Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11, 3, 271-279.
72. Gadd, G. M., Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation, *Geoderma*, 2004, 122, 2-4, 109-119.
73. Gadd, G. M., Gharieb, M. M., Ramsay, L. M., Sayer, J. A., Whatley, A. R. e White, C., Fungal processes for bioremediation of toxic metal and radionuclide pollution, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1998, 71, 4, 364-366.
74. Gadd, G. M., Ramsay, L., Crawford, J. W. e Ritz, K., Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals, *Fems Microbiology Letters*, 2001, 204, 2, 311-316.
75. Gardea-Torresdey, J. L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Cruz-Jimenez, G. e Cano-Aguilera, I., Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 48, 2, 225-232.
76. Gardea-Torresdey, J. L., Dokken, K., Tiemann, K. J., Parsons, J. G., Ramos, J., Pingitore, N. E. e Gamez, G., Infrared and X-ray absorption spectroscopic studies on the mechanism of chromium(III) binding to alfalfa biomass, *Microchemical Journal*, 2002, 71, 2-3, 157-166.
77. Garg, U. K., Kaur, M. P., Garg, V. K. e Sud, D., Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass, *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 140, 1-2, 60-68.
78. Gavrilescu, M., Removal of heavy metals from the environment by biosorption, *Engineering in Life Sciences*, 2004, 4, 3, 219-232.
79. Géhin, G., Coulon, J., Coleman, A. e Bonaly, R., Isolation and biochemical characterization of cell wall tight protein complex involved in self-flocculation of *Kluyveromyces bulgaricus*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 80, 3, 225-236.
80. Gerente, C., du Mesnil, P. C., Andres, Y., Thibault, J. F. e Le Cloirec, P., Removal of metal ions from aqueous solution on low cost natural polysaccharides - Sorption mechanism approach, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, 46, 2, 135-144.
81. Gharieb, M. M. e Gadd, G. M., Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite, *Biometals*, 1998, 11, 2, 101-106.
82. Gharieb, M. M. e Gadd, G. M., Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biometals*, 2004, 17, 2, 183-188.
83. Ginisty, P., Besnainou, B., Sahut, C. e Guezennec, J., Biosorption of cobalt by *Pseudomonas halodenitrificans*: influence of cell wall treatment by alkali and alkaline-earth metals and ion-exchange mechanisms, *Biotechnology Letters*, 1998, 20, 11, 1035-1039.

84. Goksungur, Y., Uren, S. e Guvenc, U., Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass, *Bioresource Technology*, 2005, 96, 1, 103-109.
85. Gomes, D. S., Fragoso, L. C., Riger, C. J., Panek, A. D. e Eleutherio, E. C. A., Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2002, 1573, 1, 21-25.
86. Goyal, N., Jain, S. C. e Banerjee, U. C., Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals, *Advances in Environmental Research*, 2003, 7, 2, 311-319.
87. Gulnaz, O., Saygideger, S. e Kusvuran, E., Study of Cu(II) biosorption by dried activated sludge: effect of physico-chemical environment and kinetics study, *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 120, 1-3, 193-200.
88. Gupta, V. K., Shrivastava, A. K. e Jain, N., Biosorption of chromium(VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species, *Water Research*, 2001, 35, 17, 4079-4085.
89. Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. e Boudabous, A., Resistance of environmental bacteria to heavy metals, *Bioresource Technology*, 1998, 64, 1, 7-15.
90. Hatzikioseyan, A., Tsezos, M. e Mavituna, F., Application of simplified rapid equilibrium models in simulating experimental breakthrough curves from fixed bed biosorption reactors, *Hydrometallurgy*, 2001, 59, 2-3, 395-406.
91. Ho, Y. S., Citation review of Lagergren kinetic rate equation on adsorption reactions, *Scientometrics*, 2004a, 59, 1, 171-177.
92. Ho, Y. S., Pseudo-isotherms using a second order kinetic expression constant, *Adsorption-Journal of the International Adsorption Society*, 2004b, 10, 2, 151-158.
93. Ho, Y. S., Chiu, W. T., Hsu, C. S. e Huang, C. T., Sorption of lead ions from aqueous solution using tree fern as a sorbent, *Hydrometallurgy*, 2004, 73, 1-2, 55-61.
94. Ho, Y. S., Huang, C. T. e Huang, H. W., Equilibrium sorption isotherm for metal ions on tree fern, *Process Biochemistry*, 2002, 37, 12, 1421-1430.
95. Ho, Y. S. e McKay, G., Sorption of copper(II) from aqueous solution by peat, *Water Air and Soil Pollution*, 2004, 158, 1, 77-97.
96. Ho, Y. S. e McKay, G., Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochemistry*, 1999b, 34, 5, 451-465.
97. Ho, Y. S. e McKay, G., The sorption of lead(II) ions on peat, *Water Research*, 1999a, 33, 2, 578-584.
98. Ho, Y. S. e McKay, G., The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss flat, *Water Research*, 2000, 34, 3, 735-742.
99. Ho, Y. S., Ng, J. C. Y. e McKay, G., Kinetics of pollutant sorption by biosorbents: Review, *Separation and Purification Methods*, 2000, 29, 2, 189-232.
100. Ho, Y. S., Ng, J. C. Y. e McKay, G., Removal of lead(II) from effluents by sorption on peat using second-order kinetics, *Separation Science and Technology*, 2001, 36, 2, 241-261.
101. Ho, Y. S., Wase, D. A. J. e Forster, C. F., Kinetic studies of competitive heavy metal adsorption by sphagnum moss peat, *Environmental Technology*, 1996, 17, 1, 71-77.
102. Holan, Z. R. e Volesky, B., Biosorption of Lead and Nickel by Biomass of Marine-Algae, *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43, 11, 1001-1009.

103. Jarosz-Wilkolazka, A. e Gadd, G. M., Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium, *Chemosphere*, 2003, 52, 3, 541-547.
104. Jianlong, W., Biosorption of copper(II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochemistry*, 2002, 37, 8, 847-850.
105. Jianlong, W., Zeyu, M. e Xuan, Z., Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stress, *Process Biochemistry*, 2004, 39, 10, 1231-1235.
106. Kadukova, J. e Vircikova, E., Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption, *Environment International*, 2005, 31, 2, 227-232.
107. Kalyani, S., Rao, P. S. e Krishnaiah, A., Removal of nickel(II) from aqueous solutions using marine macroalgae as the sorbing biomass, *Chemosphere*, 2004, 57, 9, 1225-1229.
108. Kapoor, A. e Viraraghavan, T., Fungal biosorption - An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review, *Bioresource Technology*, 1995, 53, 3, 195-206.
109. Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. e Klis, F. M., Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content, *The Journal of Bacteriology*, 1997, 179, 20, 6279-6284.
110. Karamushka, V. I. e Gadd, G. M., Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* with gold: toxicity and accumulation, *Biometals*, 1999, 12, 4, 289-294.
111. Kefala, M. I., Zouboulis, A. I. e Matis, K. A., Biosorption of cadmium ions by *Actinomycetes* and separation by flotation, *Environmental Pollution*, 1999, 104, 2, 283-293.
112. Keskinan, O., Goksu, M. Z. L., Basibuyuk, M. e Forster, C. F., Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*), *Bioresource Technology*, 2004, 92, 2, 197-200.
113. Khormaei, M., Nasernejad, B., Edrisi, M. e Eslamzadeh, T., Copper biosorption from aqueous solutions by sour orange residue, *Journal of Hazardous Materials*, 2007, In Press, Corrected Proof, doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.074
114. Klis, F. M., Boorsma, A. e Groot, P. W. J., Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 2006, 23, 185-202.
115. Kogej, A. e Pavko, A., Comparison of *Rhizopus nigricans* in a pelleted growth form with some other types of waste microbial biomass as biosorbents for metal ions, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, 17, 7, 677-685.
116. Kratochvil, D., Pimentel, P. e Volesky, B., Removal of trivalent and hexavalent chromium by seaweed biosorbent, *Environmental Science & Technology*, 1998, 32, 18, 2693-2698.
117. Kratochvil, D. e Volesky, B., Advances in the biosorption of heavy metals, *Trends in Biotechnology*, 1998a, 16, 7, 291-300.
118. Kratochvil, D. e Volesky, B., Biosorption of Cu from ferruginous wastewater by algal biomass, *Water Research*, 1998b, 32, 9, 2760-2768.
119. Kratochvil, D. e Volesky, B., Multicomponent biosorption in fixed beds, *Water Research*, 2000, 34, 12, 3186-3196.
120. Kratochvil, D., Volesky, B. e Demopoulos, G., Optimizing Cu removal/recovery in a biosorption column, *Water Research*, 1997, 31, 9, 2327-2339.

121. Lazaridis, N. K., Jekel, M. e Zouboulis, A. I., Removal of Cr(VI), Mo(VI), and V(V) ions from single metal aqueous solutions by sorption or nanofiltration, *Separation Science and Technology*, 2003, 38, 10, 2201-2219.
122. Lee, C. K., Low, K. S. e Kek, K. L., Removal of chromium from aqueous solution, *Bioresource Technology*, 1995, 54, 2, 183-189.
123. Lee, H. S. e Volesky, B., Interaction of light metals and protons with seaweed biosorbent, *Water Research*, 1997, 31, 12, 3082-3088.
124. Lehmann, M., Zouboulis, A. I. e Matis, K. A., Modelling the sorption of metals from aqueous solutions on goethite fixed-beds, *Environmental Pollution*, 2001, 113, 2, 121-128.
125. Leung, W. C., Wong, M. F., Chua, H., Lo, W., Yu, P. H. F. e Leung, C. K., Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater, *Water Science and Technology*, 2000, 41, 12, 233-240.
126. Lin, Z., Wu, J., Xue, R. e Yang, Y., Spectroscopic characterization of Au³⁺ biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, 61, 4, 761-765.
127. Lloyd, J. R. e Lovley, D. R., Microbial detoxification of metals and radionuclides, *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12, 3, 248-253.
128. Lopez, A., Lazaro, N., Morales, S. e Marques, A. M., Nickel biosorption by free and immobilized cells of *Pseudomonas fluorescens* 4F39: A comparative study, *Water Air and Soil Pollution*, 2002, 135, 1-4, 157-172.
129. Loukidou, M. X., Karapantsios, T. D., Zouboulis, A. I. e Matis, K. A., Diffusion kinetic study of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2004a, 43, 7, 1748-1755.
130. Loukidou, M. X., Karapantsios, T. D., Zouboulis, A. I. e Matis, K. A., Diffusion kinetic study of cadmium(II) biosorption by *Aeromonas caviae*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004b, 79, 7, 711-719.
131. Loukidou, M. X., Zouboulis, A. I., Karapantsios, T. D. e Matis, K. A., Equilibrium and kinetic modeling of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004c, 242, 1-3, 93-104.
132. Lovley, D. R. e Coates, J. D., Bioremediation of metal contamination, *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8, 3, 285-289.
133. Low, K. S., Lee, C. K. e Liew, S. C., Sorption of cadmium and lead from aqueous solutions by spent grain, *Process Biochemistry*, 2000, 36, 1-2, 59-64.
134. Low, K. S., Lee, C. K. e Low, C. H., Sorption of chromium (VI) by spent grain under batch conditions, *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 82, 9, 2128-2134.
135. Macheiner, D., Adamitsch, B. F., Karner, F. e Hampel, W. A., Pretreatment and Hydrolysis of Brewer's Spent Grains, *Engineering in Life Sciences*, 2003, 3, 10, 401-405.
136. Mack, C., Wilhelmi, B., Duncan, J. R. e Burgess, J. E., Biosorption of precious metals, *Biotechnology Advances*, 2007, 25, 3, 264-271.
137. Malik, A., Metal bioremediation through growing cells, *Environment International*, 2004, 30, 2, 261-278.

138. Malik, U. R., Hasany, S. M. e Subhani, M. S., Sorptive potential of sunflower stem for Cr(III) ions from aqueous solutions and its kinetic and thermodynamic profile, *Talanta*, 2005, 66, 1, 166-173.
139. Malkoc, E. e Nuhoglu, Y., Fixed bed studies for the sorption of chromium(VI) onto tea factory waste, *Chemical Engineering Science*, 2006, 61, 13, 4363-4372.
140. Mamaril, J. C., Paner, E. T. e Alpante, B. M., Biosorption and desorption studies of chromium (III) by free and immobilized *Rhizobium* (BJV r 12) cell biomass, *Biodegradation*, 1997, 8, 4, 275-285.
141. Mapolelo, M. e Torto, N., Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*, *Talanta*, 2004, 64, 1, 39-47.
142. Marques, P. A., Descontaminação de Soluções Aquosas Contendo Metais Pesados, por Biomassa Microbiana, Dissertação para a obtenção do grau de Doutor, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2002
143. Marques, P. A., Pinheiro, H. M., Teixeira, J. A. e Rosa, M. F., Removal efficiency of Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ by waste brewery biomass: pH and cation association effects, *Desalination*, 1999, 124, 1-3, 137-144.
144. Marques, P. A. S. S., Rosa, M. F. e Pinheiro, H. M., pH effects on the removal of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ from aqueous solution by waste brewery biomass, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2000, 23, 2, 135-141.
145. Martins, R. J. E., Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas, Dissertação para a obtenção do grau de Doutor, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2004
146. Masia, A., Avery, S. V., Zoroddu, M. A. e Gadd, G. M., Enrichment with a polyunsaturated fatty acid enhances the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of tributyltin, *Fems Microbiology Letters*, 1998, 167, 2, 321-326.
147. Mehta, S. K., Singh, A. e Gaur, J. P., Kinetics of adsorption and uptake of Cu²⁺ by *Chlorella vulgaris*: Influence of pH, temperature, culture age, and cations, *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2002, 37, 3, 399-414.
148. Mejare, M. e Bulow, L., Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals, *Trends in Biotechnology*, 2001, 19, 2, 67-73.
149. Melo, J. S. e D'Souza, S. F., Removal of chromium by mucilaginous seeds of *Ocimum basilicum*, *Bioresource Technology*, 2004, 92, 2, 151-155.
150. Molecular Probes, Probes for Yeast Viability, 2001
151. Murphy, V., Hughes, H. e McLoughlin, P., Cu(II) binding by dried biomass of red, green and brown macroalgae, *Water Research*, 2007, 41, 4, 731-740.
152. Nasernejad, B., Zadeh, T. E., Pour, B. B., Bygi, M. E. e Zamani, A., Comparison for biosorption modeling of heavy metals (Cr(III), Cu(II), Zn(II)) adsorption from wastewater by carrot residues, *Process Biochemistry*, 2005, 40, 3-4, 1319-1322.
153. Ngwenya, B. T., Enhanced adsorption of zinc is associated with aging and lysis of bacterial cells in batch incubations, *Chemosphere*, 2007, 67, 10, 1982-1992.
154. Niu, H. e Volesky, B., Characteristics of anionic metal species biosorption with waste crab shells, *Hydrometallurgy*, 2003, 71, 1-2, 209-215.

155. Niu, H. e Volesky, B., Characteristics of gold biosorption from cyanide solution, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1999, 74, 8, 778-784.
156. Niu, H. e Volesky, B., Gold-cyanide biosorption with L-cysteine, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2000, 75, 6, 436-442.
157. Osumi, M., The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation, *Micron*, 1998, 29, 2/3, 207-233.
158. Ozer, A. e Ozer, D., Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S-cerevisiae*: determination of biosorption heats, *Journal of Hazardous Materials*, 27-6-2003, 100, 1-3, 219-229.
159. Ozer, A., Ozer, D. e Ekiz, H. I., The equilibrium and kinetic modelling of the biosorption of copper(II) ions on *Cladophora crispata*, *Adsorption-Journal of the International Adsorption Society*, 2004, 10, 4, 317-326.
160. Padmavathy, V., Vasudevan, P. e Dhingra, S. C., Thermal and spectroscopic studies on sorption of nickel(II) ion on protonated baker's yeast, *Chemosphere*, 2003, 52, 10, 1807-1817.
161. Pagnanelli, F., Esposito, A., Toro, L. e Veglio, F., Metal speciation and pH effect on Pb, Cu, Zn and Cd biosorption onto *Sphaerotilus natans*: Langmuir-type empirical model, *Water Research*, 2003, 37, 3, 627-633.
162. Pagnanelli, F., Veglio, F. e Toro, L., Modelling of the acid-base properties of natural and synthetic adsorbent materials used for heavy metal removal from aqueous solutions, *Chemosphere*, 2004, 54, 7, 905-915.
163. Palmieri, M. C., Volesky, B. e Garcia, O., Biosorption of lanthanum using *Sargassum fluitans* in batch system, *Hydrometallurgy*, 2002, 67, 1-3, 31-36.
164. Park, D., Yun, Y. S., Cho, H. Y. e Park, J. M., Chromium biosorption by thermally treated biomass of the brown seaweed, *Ecklonia* sp., *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2004, 43, 26, 8226-8232.
165. Park, D., Yun, Y. S., Jo, J. H. e Park, J. M., Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*, *Water Research*, 2005, 39, 4, 533-540.
166. Park, J. K., Lee, J. W. e Jung, J. Y., Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33, 4, 371-378.
167. Parvathi, K., Naresh Kumar, R. e Nagendran, R., Biosorption of manganese by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23, 5, 671-676.
168. Patzak, M., Dostalek, P., Fogarty, R. V., Safarik, I. e Tobin, J. M., Development of magnetic biosorbents for metal uptake, *Biotechnology Techniques*, 1997, 11, 7, 483-487.
169. Pethkar, A. V., Kulkarni, S. K. e Paknikar, K. M., Comparative studies on metal biosorption by two strains of *Cladosporium cladosporioides*, *Bioresource Technology*, 2001, 80, 3, 211-215.
170. Pumpel, T., Ebner, C., Pernfuss, B., Schinner, F., Diels, L., Keszthely, Z., Stankovic, A., Finlay, J. A., Macaskie, L. E., Tsezos, M. e Wouters, H., Treatment of rinsing water from electroless nickel plating with a biologically active moving-bed sand filter, *Hydrometallurgy*, 2001, 59, 2-3, 383-393.

171. Pumpel, T., Macaskie, L. E., Finlay, J. A., Diels, L. e Tsezos, M., Nickel removal from nickel plating waste water using a biologically active moving-bed sand filter, *Biometals*, 2003, 16, 4, 567-581.
172. Puranik, P. R. e Paknikar, K. M., Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptovorticillium cinnamoneum* waste biomass, *Journal of Biotechnology*, 1997, 55, 2, 113-124.
173. Ramirez, C., Pereira da Silva, M., Ferreira, L. e Vasco E., O., Mathematical models applied to the Cr(III) and Cr(VI) breakthrough curves, *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 146, 1-2, 86-90.
174. Ramsay, L. M. e Gadd, G. M., Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification, *Fems Microbiology Letters*, 1997, 152, 2, 293-298.
175. Rao, J. R., Gayatri, R., Rajaram, R., Nair, B. U. e Ramasami, T., Chromium(III) hydrolytic oligomers: their relevance to protein binding, *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1999, 1472, 3, 595-602.
176. Rapoport, A. I. e Muter, O. A., Biosorption of Hexavalent Chromium by Yeasts, *Process Biochemistry*, 1995, 30, 2, 145-149.
177. Reddad, Z., Gerente, C., Andres, Y., Thibault, J. F. e Le Cloirec, P., Cadmium and lead adsorption by a natural polysaccharide in MF membrane reactor: experimental analysis and modelling, *Water Research*, 2003, 37, 16, 3983-3991.
178. Reis, M. A. M., Almeida, J. S. e Zungailia, E. J., Biorremediação, *in* *Biotecnologia - Fundamentos e Aplicações*, Nelson Lima and Manuel Mota, Lidel, 2003, 285-300.
179. Remoudaki, E., Hatzikioseyan, A., Kousi, P. e Tsezos, M., The mechanism of metals precipitation by biologically generated alkalinity in biofilm reactors, *Water Research*, 2003, 37, 16, 3843-3854.
180. Riordan, C., Bustard, M., Putt, R. e Mchale, A. P., Removal of uranium from solution using residual brewery yeast: Combined biosorption and precipitation, *Biotechnology Letters*, 1997, 19, 4, 385-387.
181. Riordan, C. e Mchale, A. P., Removal of lead from solution using non-living residual brewery yeast, *Bioprocess Engineering*, 1998, 19, 4, 277-280.
182. Rostami, K. e Joodaki, M. R., Some studies of cadmium adsorption using *Aspergillus niger*, *Penicillium austurianum*, employing an airlift fermenter, *Chemical Engineering Journal*, 2002, 89, 1-3, 239-252.
183. Saeed, A. e Iqbal, M., Bioremoval of cadmium from aqueous solution by black gram husk (*Cicer arietinum*), *Water Research*, 2003, 37, 14, 3472-3480.
184. Sag, Y., Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: A review, *Separation and Purification Methods*, 2001, 30, 1, 1-48.
185. Sag, Y. e Aktay, Y., Kinetic studies on sorption of Cr(VI) and Cu(II) ions by chitin, chitosan and *Rhizopus arrhizus*, *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 12, 2, 143-153.
186. Sag, Y., Yalcuk, A. e Kutsal, T., Mono and multi-component biosorption of heavy metal ions on *Rhizopus arrhizus* in a CFST, *Process Biochemistry*, 2000, 35, 8, 787-799.
187. Santos, M., Jimenez, J. J., Bartolome, B., Gomez-Cordoves, C. e del Nozal, M. J., Variability of brewer's spent grain within a brewery, *Food Chemistry*, 2003, 80, 1, 17-21.

188. Sawalha, M. F., Peralta-Videa, J. R., Saupe, G. B., Dokken, K. M. e Gardea-Torresdey, J. L., Using FTIR to corroborate the identity of functional groups involved in the binding of Cd and Cr to saltbush (*Atriplex canescens*) biomass, *Chemosphere*, 2007, 66, 8, 1424-1430.
189. Schiewer, S. e Volesky, B., Modeling of the Proton-Metal Ion-Exchange in Biosorption, *Environmental Science & Technology*, 1995, 29, 12, 3049-3058.
190. Schiewer, S. e Volesky, B., Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons, *Environmental Science & Technology*, 1997, 31, 9, 2478-2485.
191. Schmitt, D., Muller, A., Csogor, Z., Frimmel, F. H. e Posten, C., The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth, *Water Research*, 2001, 35, 3, 779-785.
192. Schneider, I. A. H., Rubio, J. e Smith, R. W., Biosorption of metals onto plant biomass: exchange adsorption or surface precipitation?, *International Journal of Mineral Processing*, 2001, 62, 1-4, 111-120.
193. Sharma, D. C. e Forster, C. F., A comparison of the sorptive characteristics of leaf mould and activated carbon columns for the removal of hexavalent chromium, *Process Biochemistry*, 1996, 31, 3, 213-218.
194. Sheng, P. X., Tan, L. H., Chen, J. P. e Ting, Y. P., Biosorption performance of two brown marine algae for removal of chromium and cadmium, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2004a, 25, 5, 679-686.
195. Sheng, P. X., Ting, Y. P., Chen, J. P. e Hong, L., 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*, 2004b, 275, 1, 131-141.
196. Silva, J. P., Sousa, S., Rodrigues, J., Antunes, H., Porter, J. J., Goncalves, I. e Ferreira-Dias, S., Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains, *Separation and Purification Technology*, 2004, 40, 3, 309-315.
197. Simmons, P. e Singleton, I., A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45, 1 - 2, 278-285.
198. Singh, K. K., Talat, M. e Hasan, S. H., Removal of lead from aqueous solutions by agricultural waste maize bran, *Bioresource Technology*, 2006, 97, 16, 2124-2130.
199. Singh, S., Rai, B. N. e Rai, L. C., Ni (II) and Cr (VI) sorption kinetics by *Microcystis* in single and multimetallic system, *Process Biochemistry*, 2001, 36, 12, 1205-1213.
200. Smith, W. L. e Gadd, G. M., Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms, *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88, 6, 983-991.
201. Soares, E. V., Coninck, G., Duarte, F. e Soares, H. M. V. M., Use of *Saccharomyces cerevisiae* for Cu²⁺ removal from solution: the advantages of using a flocculant strain, *Biotechnology Letters*, 2002a, 24, 663-666.
202. Soares, E. V., Duarte, A. P. R. S., Boaventura, R. A. e Soares, H. M. V. M., Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002b, 58, 6, 836-841.
203. Solisio, C., Lodi, A., Converti, A. e Del Borghi, M., The effect of acid pre-treatment on the biosorption of chromium(III) by *Sphaerotilus natans* from industrial wastewater, *Water Research*, 2000, 34, 12, 3171-3178.

204. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W. e Garg, S. K., Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria, *Chemosphere*, 2002, 48, 4, 427-435.
205. Stoll, A. e Duncan, J. R., Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biotechnology Letters*, 1996, 18, 10, 1209-1212.
206. Suh, J. H. e Kim, D. S., Effects of Hg^{2+} and cell conditions on Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioprocess Engineering*, 2000, 23, 4, 327-329.
207. Suh, J. H., Kim, D. S., Yun, J. W. e Song, S. K., Process of Pb^{2+} accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, 1998a, 20, 2, 153-156.
208. Suh, J. H., Yun, J. W. e Kim, D. S., Comparison of Pb^{2+} accumulation characteristics between live and dead cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnology Letters*, 1998b, 20, 3, 247-251.
209. Suh, J. H., Yun, J. W. e Kim, D. S., Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioprocess Engineering*, 1999a, 21, 5, 383-387.
210. Suh, J. H., Yun, J. W., Kim, D. S. e Song, S. K., A comparative study on Pb^{2+} accumulation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Aureobasidium pullulans* by SEM (scanning electron microscopy) and EDX (energy dispersive X-ray) analyses, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999b, 87, 1, 112-115.
211. Suhasini, I. P., Sriram, G., Asolekar, S. R. e Sureshkumar, G. K., Biosorptive removal and recovery of cobalt from aqueous systems, *Process Biochemistry*, 1999, 34, 3, 239-247.
212. Sze, K. F., Lu, Y. J. e Wong, P. K., Removal and recovery of copper ion (Cu^{2+}) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5X, *Resources Conservation and Recycling*, 1996, 18, 1-4, 175-193.
213. Tam, N. F. Y., Wong, Y. S. e Simpson, C. G., Repeated removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae, *Biotechnology Techniques*, 1998, 12, 3, 187-190.
214. Tarley, C. R. T. e Arruda, M. A. Z., Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents, *Chemosphere*, 2004, 54, 7, 987-995.
215. Taty-Costodes, V. C., Fauduet, H., Porte, C. e Delacroix, A., Removal of Cd(II) and Pb(II) ions, from aqueous solutions, by adsorption onto sawdust of *Pinus sylvestris*, *Journal of Hazardous Materials*, 2003, 105, 1-3, 121-142.
216. Teixeira, J. A., Oliveira, R., Azeredo, J., Sousa, M. e Sil, C., Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1995, 5, 3-4, 197-203.
217. Tobin, J. M. e Roux, J. C., *Mucor* biosorbent for chromium removal from tanning effluent, *Water Research*, 1998, 32, 5, 1407-1416.
218. Tsezos, M., Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development, *Hydrometallurgy*, 2001, 59, 2-3, 241-243.
219. Tsezos, M., Remoudaki, E. e Angelatou, V., A Systematic Study on Equilibrium and Kinetics of Biosorptive Accumulation - the Case of Ag and Ni, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1995, 35, 1-3, 129-153.
220. Tsezos, M., Remoudaki, E. e Angelatou, V., A study of the effects of competing ions on the biosorption of metals, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 38, 1, 19-29.

221. Tsezos, M., Remoudaki, E. e Angelatou, V., Biosorption sites of selected metals using electron microscopy, *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, 1997, 118, 3, 481-487.
222. Unlu, N. e Ersoz, M., Adsorption characteristics of heavy metal ions onto a low cost biopolymeric sorbent from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 136, 2, 272-280.
223. Valls, M. e de Lorenzo, V., Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution, *Fems Microbiology Reviews*, 2002, 26, 4, 327-338.
224. van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H. e Lens, P. N. L., Nickel and cobalt sorption on anaerobic granular sludges: kinetic and equilibrium studies, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, 79, 11, 1219-1227.
225. Vasudevan, P., Padmavathy, V. e Dhingra, S. C., Kinetics of biosorption of cadmium on Baker's yeast, *Bioresource Technology*, 2003, 89, 3, 281-287.
226. Veglio, F. e Beolchini, F., Removal of metals by biosorption: A review, *Hydrometallurgy*, 1997, 44, 3, 301-316.
227. Veglio, F., Beolchini, F. e Barba, D., Experimental study and simulation on the biosorption of copper(II) in membrane reactors: A preliminary study, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2000, 39, 7, 2480-2484.
228. Verstrepren, K. J. e Klis, F. M., Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts, *Mycological Research*, 2006, 60, 1, 5-15.
229. Vianna, L. N. L., Andrade, M. C. e Nicoli, J. R., Screening of waste biomass from *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus lentus* fermentations for removal of Cu, Zn and Cd by biosorption, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2000, 16, 5, 437-440.
230. Vicente, A., Meinders, J. M. e Teixeira, J. A., Sizing and counting of *Saccharomyces cerevisiae* floc populations by image analysis, using an automatically calculated threshold, *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 51, 6, 673-678.
231. Vieira, R. H. S. F. e Volesky, B., Biosorption: a solution to pollution?, *International Microbiology*, 2000, 3, 17-24.
232. Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S. e Boaventura, R. A. R., Chromium and zinc uptake by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste: Kinetics and equilibrium, *Journal of Hazardous Materials*, 2007, In Press, Corrected Proof, [doi:10.1016/j.jhazmat.2007.04.023](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.023)
233. Vincent, J. B., Elucidating a biological role for chromium at a molecular level, *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33, 7, 503-510.
234. Vincent, J. B., Recent advances in the biochemistry of chromium(III), *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 2003, 16, 4, 227-236.
235. Volesky, B., Equilibrium biosorption performance, *in Sorption and Biosorption*, BV-Sorvex, Inc, Quebec, 2004, 103-116.
236. Volesky, B., Biosorbent Materials, *Biotechnology and Bioengineering Symp*, 1986, 16, 121-126.
237. Volesky, B., Biosorbents for Metal Recovery, *Trends in Biotechnology*, 1987, 5, 4, 96-101.

238. Volesky, B., Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century, *Hydrometallurgy*, 2001, 59, 2-3, 203-216.
239. Volesky, B. e Holan, Z. R., Biosorption of Heavy-Metals, *Biotechnology Progress*, 1995, 11, 3, 235-250.
240. Volesky, B., May, H. e Holan, Z. R., Cadmium Biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 41, 8, 826-829.
241. Volesky, B., Weber, J. e Park, J. M., Continuous-flow metal biosorption in a regenerable *Sargassum* column, *Water Research*, 2003, 37, 2, 297-306.
242. Wang, J. e Chen, C., Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review, *Biotechnology Advances*, 2006, 24, 427-451.
243. Wang, L., Chua, H., Wong, P. K., Lo, W. H. e Yu, P. H. F., Ni²⁺ removal and recovery from electroplating effluent by *Pseudomonas putida* 5-x cell biomass, *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2003a, 38, 3, 521-531.
244. Wang, L., Chua, H., Zhou, Q., Wong, P. K., Sin, S. N., Lo, W. L. e Yu, P. H., Role of cell surface components on Cu²⁺ adsorption by *Pseudomonas putida* 5-x isolated from electroplating effluent, *Water Research*, 2003b, 37, 3, 561-568.
245. White, C. e Gadd, G. M., Determination of metals and metal fluxes in algae and fungi, *Science of the Total Environment*, 1995, 176, 1-3, 107-115.
246. White, C., Sayer, J. A. e Gadd, G. M., Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination, *Fems Microbiology Reviews*, 1997, 20, 3-4, 503-516.
247. White, C., Wilkinson, S. C. e Gadd, G. M., The Role of Microorganisms in Biosorption of Toxic Metals and Radionuclides, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1995, 35, 1-3, 17-40.
248. Wilde, E. W. e Benemann, J. R., Bioremoval of Heavy Metals by the Use of Microalgae, *Biotechnology Advances*, 1993, 11, 4, 781-812.
249. Wilhelmi, B. S. e Duncan, J. R., Metal Recovery from *Saccharomyces cerevisiae* Biosorption Columns, *Biotechnology Letters*, 1995, 17, 9, 1007-1012.
250. Wilhelmi, B. S. e Duncan, J. R., Reusability of immobilised *Saccharomyces cerevisiae* with successive copper adsorption-desorption cycles, *Biotechnology Letters*, 1996, 18, 5, 531-536.
251. Wong, P. K., Lam, K. C. e So, C. M., Removal and Recovery of Cu(li) from Industrial Effluent by Immobilized Cells of *Pseudomonas putida* li-11, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 39, 1, 127-131.
252. Wu, F. C., Tseng, R. L. e Juang, R. S., Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan, *Water Research*, 2001, 35, 3, 613-618.
253. Xie, J. Z., Chang, H. L. e Kilbane, J. J., Removal and recovery of metal ions from wastewater using biosorbents and chemically modified biosorbents, *Bioresource Technology*, 1996, 57, 2, 127-136.
254. Yan, G. Y. e Viraraghavan, T., Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*, *Water Research*, 2003, 37, 18, 4486-4496.

255. Yang, J. B. e Volesky, B., Biosorption of uranium on *Sargassum* biomass, *Water Research*, 1999a, 33, 15, 3357-3363.
256. Yang, J. B. e Volesky, B., Cadmium biosorption rate in protonated *Sargassum* biomass, *Environmental Science & Technology*, 1999b, 33, 5, 751-757.
257. Yang, J. B. e Volesky, B., Modeling uranium-proton ion exchange in biosorption, *Environmental Science & Technology*, 1999c, 33, 22, 4079-4085.
258. Yazgan, A. e Ozcengiz, G., Subcellular Distribution of Accumulated Heavy Metals in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, 1994, 16, 8, 871-874.
259. Yetis, U., Dolek, A., Dilek, F. B. e Ozcengiz, G., The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*, *Water Research*, 2000, 34, 16, 4090-4100.
260. Yu, J., Tong, M., Sun, X. e Li, B., Enhanced and selective adsorption of Pb²⁺ and Cu²⁺ by EDTAD-modified biomass of baker's yeast, *Bioresource Technology*, 2007, In Press, Corrected Proof, [doi:10.1016/j.biortech.2007.04.038](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.038)
261. Yu, Q. M. e Kaewsarn, P., Desorption of Cu²⁺ from a biosorbent derived from the marine alga *Durvillaea potatorum*, *Separation Science and Technology*, 2001, 36, 7, 1495-1507.
262. Yun, Y. S., Park, D., Park, J. M. e Volesky, B., Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass, *Environmental Science & Technology*, 2001, 35, 21, 4353-4358.
263. Yun, Y. S. e Volesky, B., Modeling of lithium interference in cadmium biosorption, *Environmental Science & Technology*, 2003, 37, 16, 3601-3608.
264. Zhao, M., Duncan, J. R. e Van Hille, R. P., Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluent using *Azolla filiculoides*, *Water Research*, 1999, 33, 6, 1516-1522.
265. Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X. e Matis, K. A., Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soils, *Process Biochemistry*, 2004, 39, 8, 909-916.
266. Zouboulis, A. I., Matis, K. A. e Lazaridis, N. K., Removal of metal ions from simulated wastewater by *Saccharomyces* yeast biomass: Combining biosorption and flotation processes, *Separation Science and Technology*, 2001, 36, 3, 349-365.

Páginas da internet consultadas:

<http://www.unicer.pt/gca/index.php?id=407>; consultado a 7 de Maio de 2007

<http://www.le.ac.uk/chemistry/pdf/teachersworkshops.pdf>

<http://www.spectroscopynow.com/FCKeditor/UserFiles/File/specNOW/eac10815.pdf>

