



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO  
UFRJ



**BIOSSORÇÃO DE METAIS PESADOS PELO  
FUNGO *Penicillium corylophilum***

*Yaci Maria Marcondes Farias*

Rio de Janeiro

2014

# **BIOSSORÇÃO DE METAIS PESADOS PELO FUNGO *Penicillium corylophilum***

Yaci Maria Marcondes Farias

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadoras:

Prof. D. Sc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo

D. Sc. Judith Liliana Solórzano Lemos

Rio de Janeiro

2014

Ficha catalográfica

Farias, Yaci Maria Marcondes.

Biossorção de metais pesados pelo fungo *Penicillium corylophilum*/ Yaci Maria Marcondes Farias. – 2014.  
96 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo  
Prof<sup>a</sup> Judith Liliana Solórzano Lemos

1. Biossorção. 2. Metais pesados. 3. *P. corylophilum*. I. Sérvulo, Eliana Flávia Camporese (Orient.). II. Lemos, Judith Liliana Solórzano (Co-Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. IV. Título.

# **BIOSSORÇÃO DE METAIS PESADOS PELO FUNGO**

## *Penicillium corylophilum*

YACI MARIA MARCONDES FARIAS

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 09 de Janeiro de 2014.

---

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc. – EQ/ UFRJ  
(Orientadora – Presidente da banca)

---

Judith Liliana Solórzano Lemos, D. Sc. – UEZO  
(Orientadora)

---

Luis Gonzaga Santos Sobral, D. Sc. – CETEM/MCTI

---

Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc. – EQ/ UFRJ

---

Roberta Gaidzinski, D. Sc. – UEZO

Rio de Janeiro

2014

*“Tantas vezes pensamos ter chegado...  
Tantas vezes é preciso ir além.”*  
**(Fernando Pessoa)**

Para Eric, é claro.

*“... And in the end, the love you take  
is equal to the love you make.”*

**(Beatles)**

## AGRADECIMENTOS

É com imensa alegria que chego ao fim de mais uma etapa que contribuiu de maneira definitiva para minha formação tanto pessoal quanto profissional. E como não poderia ser diferente, este desafio contou com a participação direta e indireta de pessoas que contribuíram sobremaneira para minha conquista. Sendo assim, quero agradecer profundamente:

Ao meu amor, marido, companheiro, amigo, a pessoa que me fez ser quem sou hoje. Eric, o seu amor me faz ser uma pessoa melhor a cada dia. Agradeço por todo incentivo e apoio, sempre.

A minha família, meus pais Maria e Sérgio e meus irmãos Andes, Hosana, Zênite e Raize, por ser essa pequena/grande família feliz, engraçada e acima de tudo unida. Aproveito para agradecer a outra parte da minha família, aos meus sogros René e Rosicléia, por serem sempre gentis e amáveis.

A Liliana, por sua orientação hoje e ontem. Minha primeira orientadora quando dava os primeiros passos na pesquisa. Não poderia ter começado melhor. Agradeço sempre por toda ajuda, paciência, confiança e por boa parte do que sei hoje.

A Prof.<sup>a</sup> Eliana agradeço hoje e vou agradecer sempre por ter aceitado me orientar nos 45' do segundo tempo, sem me conhecer. Obrigada pela confiança, obrigada por ser esta pessoa maravilhosa que abraça e acarinha a quem se aproxima. Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos valiosos.

Aos amigos de luta no mestrado: Lívia Galdino, Suzana Pimentel, Mariana Bittar e Flávia Gabel pelas risadas que certamente tornaram o fardo mais leve. Aproveito para agradecer aos amigos do 107: Diogo, Lindomar, Juliana Cruz (minha salvadora nos momentos tensos de Excel), Dani e Paulinho, pela paciência e ajuda em todos os momentos.

Aos amigos da vida, que de maneira indireta foram essenciais para tornar mais leve e descontraída esta caminhada: Luara, Alexandre, Mônica, Gisele, Eric Maia, Renan, Leilane, Aline e Sabrina.

A preciosa ajuda da Luana e da Leíze, estudantes da UEZO, que dividiram comigo alguns momentos de tensão e também de felicidade, assim como a Mariana Barbalho, por toda ajuda prestada.

Aos amigos do CETEM, por serem sempre muito solícitos: Diego Cara, Dani e a minha amiga Claudete (Cláudia Affonso) por ser esta pessoa maravilhosa que é.

Dedico um agradecimento especial a Débora Monteiro, amiga do CETEM, que desempenhou um papel importantíssimo para a realização deste trabalho, sempre com muita paciência e solicitude. Obrigada!

Agradeço imensamente ao Dr. Luiz Gonzaga Sobral, por permitir a realização das análises nas dependências do CETEM. Agradeço por esta oportunidade e por toda ajuda dispensada na realização deste trabalho.

Aos professores da banca: Dr.<sup>a</sup> Selma Ferreira, Dr.<sup>a</sup> Roberta Gaidzinski e ao Dr. Luiz Sobral, pela participação na banca e de antemão, pelas preciosas contribuições.

A COAM/CETEM – Coordenação de Análises Mineraias do Centro de Tecnologia Mineral pela realização das análises mineraias imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

A CCFF/Fiocruz – Coleção de Cultura de Fungos Filamentos do Instituto Oswaldo Cruz e a Dr. Maria Inêz Sarquis, curadora da coleção, por ter cedido gentilmente a cepa utilizada neste trabalho e pela ajuda e orientação prestadas.

A pós-graduação da Escola de Química – TPQB/UFRJ e seu corpo docente, que contribuíram de maneira fundamental para minha formação.

A Capes, pela bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

## RESUMO

FARIAS, Yaci Maria Marcondes. **Biossorção de metais pesados pelo fungo *Penicillium corylophilum***. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação de Mestrado – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Atualmente, é grande a preocupação com o crescente aumento dos níveis de poluentes descartados no meio ambiente. Dentre esses poluentes, os metais pesados ocupam uma posição de destaque, uma vez que estão presentes na composição de inúmeros rejeitos industriais. Sendo assim, faz-se importante o desenvolvimento de técnicas que tenham como intuito o tratamento desses efluentes. Muitos são os processos utilizados para o tratamento de efluentes, entre eles se encontra o processo de biossorção, técnica que utiliza diferentes biomassas (fungos, bactérias, algas etc.) na remoção, retenção ou recuperação de metais pesados. Sendo assim, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial de remoção do níquel, pelo fungo filamentoso *Penicillium corylophilum* em solução aquosa a fim de obter dados que permitam o seu emprego na recuperação de ambientes contaminados por metais pesados. Para isso, os ensaios de biossorção foram divididos em três etapas. O primeiro ensaio consistiu em verificarmos a capacidade de biossorção do níquel pela biomassa estudada. Sendo assim, foi montado um planejamento de experimentos Plackett & Burman onde foram testadas sete variáveis totalizando doze ensaios e três pontos centrais. Foi observado que o fungo apresentava grande potencial de biossorção, alcançando índices de remoção do metal de até 58%. Na segunda etapa de análises, a biomassa foi avaliada frente a soluções multimetais. Nesse caso, a intenção era simular o que ocorre em um efluente real, onde não existe somente um metal isoladamente e, assim, verificarmos se a interação entre os metais influenciaria no comportamento do fungo em relação à biossorção. Observamos, nesta etapa, que em sistemas binários (Ni + Cu, Ni + Cr e Ni + Zn) e em sistemas com todos os metais (Ni + Cu + Cr + Zn) o níquel foi preterido em relação aos outros metais. O cromo foi o metal que apresentou maior afinidade com a biomassa, mostrando para este metal uma remoção de até 9,7 mg/g. Na terceira etapa, avaliamos a remoção dos metais individualmente, com a finalidade de traçar um comparativo com o sistema multimetais. Constatamos que no sistema individual a remoção de todos os metais foi menor quando comparada com o sistema multimetais. Dessa maneira, pudemos traçar uma sequência de afinidade dos metais pelo fungo nos dois sistemas avaliados, sendo no sistema multimetais o  $Cr > Ni > Cu > Zn$  e no sistema individual o  $Cr > Zn > Cu > Ni$ .

Palavras – chave: Biossorção, *P. corylophilum*, metais pesados.

## ABSTRACT

FARIAS, Yaci Maria Marcondes. **Heavy metals biosorption by *Penicillium corylophilum***. Rio de Janeiro, 2013. Master's Dissertation – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Currently, there are serious concerns with the increasing levels of pollutants discharged into the environment. Among these pollutants, heavy metals occupy a prominent position, since they are present in the composition of many industrial wastes. Therefore, it is important to develop techniques so as to treat these effluents. Many processes are used for the treatment of effluents; among them is the biosorption process, a technique that uses different biomass (fungi, bacteria, algae etc.) to remove, to retain or to recover heavy metals. Therefore, this study aimed at assessing the potential for nickel removal by the filamentous fungus *Penicillium corylophilum* in aqueous solution in order to obtain data that allow its use in the remediation of contaminated environments by heavy metals. For this, the biosorption assays were divided into three stages. The first test was to verify the ability of nickel biosorption by the studied biomass. Therefore, a Plackett & Burman design was set up with seven variables experiments, which were tested in twelve trials and three central points. It was observed that the fungus has shown a great potential for biosorption, increasing nickel removal rates up to 58%. In the second stage of the analysis, the biomass was evaluated against multi-metals solutions. In that case, the idea was to simulate what happens in a real effluent, where there isn't only one metal alone and thus check whether the interaction between metals influence the behavior of the fungus in biosorption. We observed in this step that in binary systems (Ni + Cu; Ni + Cr and Ni + Zn) and in systems with all metals (Ni + Cr + Cu + Zn) nickel was less absorbed before other metals. Chromium has shown higher affinity to the biomass, being highly removed showing extractions up to 9,7 mg/g. In the third step, the metals removals in individual system were evaluated so as to compare with multi-metal system. We noted that in the individual system all metals removal was lower when compared with multi-metal system. Thus, we could draw a sequence of metals affinities by the fungus in the two evaluated systems. In the multi-metal system the affinities were Cr > Ni > Cu > Zn and in individual system were Cr > Zn > Cu > Ni.

Keywords: Biosorption, *P. corylophilum*, heavy metals.

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	6
RESUMO .....	8
ABSTRACT.....	9
Sumário .....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	12
Capítulo 1: Introdução, Justificativa e Objetivos.....	14
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo Geral .....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
Capítulo 2: Revisão Bibliográfica .....	19
2.1 METAIS PESADOS .....	19
2.1.1 Cobre.....	21
2.1.2 Cromo.....	21
2.1.3 Zinco .....	22
2.1.4 Níquel.....	23
2.2 VALORES ORIENTADORES.....	28
2.3 BIORREMEDIAÇÃO.....	33
2.4 BIOSSORÇÃO .....	35
2.4.1 Acumulação de metais por micro-organismos .....	35
2.4.2 Acumulação extracelular .....	37
2.4.3 Acumulação intracelular .....	39
2.5 FUNGOS E A BIOSSORÇÃO DE METAIS .....	41
Capítulo 3: Materiais e Métodos.....	45
3.1 MICRO-ORGANISMO .....	45
3.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA.....	45
3.3 PREPARO DO INÓCULO .....	46
3.4 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES .....	46
3.4.1 Meios de cultura .....	46

3.4.2 Soluções de metais .....	47
3.5 ETAPAS EXPERIMENTAIS .....	48
3.5.1 Avaliação dos parâmetros de relevância para bio sorção de níquel por conídios de <i>P. corylophilum</i> .....	48
3.5.1.1 Delineamento experimental.....	50
3.5.2 Análise comparativa da remoção de Ni por formas esporulada e vegetativa .....	52
3.5.2.1 Formação de <i>pellets</i> .....	52
3.5.2.2 Ensaios de bio sorção com <i>pellets</i> e conídios .....	52
3.5.3 Avaliação da bio sorção de diferentes metais pesados por conídios .....	53
3.5.3.1 Teste em sistemas competitivos .....	53
3.5.3.2 Teste em sistemas não competitivos .....	55
3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	55
3.6.1 Contagem de esporos .....	55
3.6.2 Concentração de açúcar.....	55
3.6.3 pH.....	56
3.6.4 Espectrometria de Absorção Atômica (EAA).....	56
Capítulo 4. Resultados e Discussão .....	57
4.1 Influência dos parâmetros de cultivo na remoção de Ni por conídios de <i>Penicillium corylophilum</i> CCFIOC 4297 .....	57
4.2 Análise comparativa da remoção de níquel por <i>P. corylophilum</i> em forma esporulada e vegetativa .....	66
4.3.1 Avaliação da bio sorção de metais pesados por conídios de <i>P. corylophilum</i> .....	69
4.3.1.1 Testes em sistemas competitivos.....	69
4.3.1.2 Teste em sistemas não competitivos .....	73
4.4 Sequência de afinidade de metais pelo <i>P. corylophilum</i> .....	76
Capítulo 5. Conclusões .....	78
Capítulo 6. Sugestões .....	79
Capítulo 7. Referências Bibliográficas .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reserva e produção mundial de níquel.....	25
Tabela 2. Valores orientadores para o níquel .....	32
Tabela 3. Lista de fungos utilizados para bioissorção de metais.....	37
Tabela 4. Matriz de experimentos do planejamento Plackett & Burman.....	51
Tabela 5. Níveis das variáveis ensaiadas no planejamento Plackett & Burman .....	51
Tabela 6. Composição média de efluentes de indústrias de Galvanoplastia .....	54
Tabela 7. Matriz do planejamento Plackett & Burman para avaliação de 7 fatores na remoção de níquel.....	58
Tabela 8. Comparação da remoção de metais em sistemas competitivos (SC) e não competitivos (SNC) para soluções metais sem adição de sais.....	75
Tabela 9. Comparação da remoção de metais em sistemas competitivos (SC) e não competitivos (SNC) para soluções metais com adição de sais .....	75
Tabela 10. Sequencia de afinidade dos metais no sistema competitivo (SC) .....	76
Tabela 11. Sequencia de afinidade dos metais no sistema não competitivo (SNC).....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Indústria desativada. ....	29
Figura 2. Representação de interações entre metais e micro-organismos. ....	40
Figura 3. Principais benefícios proporcionados pelos fungos. ....	42
Figura 4. Linhagem liofilizada do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> . ....	45
Figura 5. Soluções de metais utilizadas nos experimentos .....	47
Figura 6. Imagens dos frascos Erlenmeyers contendo as soluções de níquel e conídios dispostos em agitador rotatório para avaliação da bioissorção. ....	49
Figura 7. Esquema simplificado do procedimento adotado para avaliação da bioissorção de níquel por <i>P. corylophilum</i> segundo planejamento experimental Plackett & Burman. Fonte: Adaptado de PALLU (2006). ....	50
Figura 8. Diagrama de quadros com a descrição do ensaio realizado para avaliação do emprego de conídios e pellets na bioissorção de níquel.....	53
Figura 9. Remoção percentual de níquel pelo fungo <i>P. corylophilum</i> CCFIOC 4297, segundo dados gerados pelo planejamento experimental P&B. ....	59
Figura 10. Comportamento da biomassa na remoção de níquel (Valor de q: mg do metal por g de biomassa).....	60
Figura 11. Relação entre a remoção de níquel e o consumo de sacarose nos ensaios realizados conforme planejamento P&B12. ....	61
Figura 12. Variação do pH nos ensaios realizados segundo planejamento P&B12. ....	63

Figura 13. Gráfico de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a remoção de níquel por <i>P. corylophilum</i> CCFIOC 4297. ....	65
Figura 14. Imagens dos ensaios 4 (A) e 7 (B) do P&B12 onde se visualiza a germinação de grande parte dos conídios com formação de pequenos pellets.....	66
Figura 15. <i>Pellets</i> formados no segundo dia da semeadura de conídios de <i>P. corylophilum</i> em meio mínimo contendo 30 mg de Ni/L. ....	67
Figura 16. Remoção de níquel em solução aquosa por <i>P. corylophilum</i> , .....	68
Figura 17. Valor de "q" referente às interações Níquel – Cobre (A), Níquel – Cromo (B), Níquel – Zinco (C) e Níquel – Cobre – Cromo – Zinco (D).....	70
Figura 18. Valores de "q" referentes à análise dos metais em sistemas não competitivos.....	74

# Capítulo 1: Introdução, Justificativa e Objetivos

---

## 1. INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento da população mundial nas últimas décadas refletiu no aumento dos níveis de poluição que, em consequência, resultou em destruição de vários ecossistemas, incluindo solos, águas e ar. Segundo Pearson (1995), a degradação de áreas ambientais vem acontecendo desde 2000 a.C., tendo sido, primeiramente, observada na Índia e em países do Oriente Médio. De acordo com este autor, a desertificação de solos teve como principal causa a sua irrigação com água salobra contendo altos índices de sal.

Nos últimos anos, a atividade industrial tem sido uma das principais responsáveis pela deterioração do ambiente, particularmente pelo lançamento indiscriminado de elevadas quantidades de metais pesados (PINTO *et al.*, 2003). De acordo com a Organização dos Estados Americanos, OEA, destacam-se os setores mineiro e metalúrgico, pela geração diária de grandes quantidades de rejeitos, incluindo gases, sólidos e líquidos, contendo elementos de variadas toxicidades, principalmente Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn (LIMA, 2013; RUBIO & TESSELE, 2002). Entretanto, outras indústrias também são apontadas como poluidoras por metais pesados, tais como as de galvanoplastia, curtume, de polpa e de papel e de manufatura de produtos eletrônicos (BORBA *et al.*, 2006; LIMA; MERÇON, 2011).

O termo metal pesado vem sendo, ao longo das últimas décadas, bastante discutido, não havendo, ainda, consenso quanto à sua definição (LIMA; MERÇON, 2011). Em geral, o termo se aplica aos elementos metálicos com massa atômica maior que 55,8 u, valor correspondente ao do ferro, ou com elevada massa específica, variando de 3,5 e 7,0 g.cm<sup>-3</sup>. Alguns elementos, no entanto, são referidos como metais pesados como, por exemplo, o Cr, embora sua massa atômica seja aproximadamente 52 u, ou não são metais, como é o caso do arsênio e do selênio (PIERZYNSKI; SIMS; VANCE, 2000).

Os metais pesados são, quimicamente, altamente reativos e bioacumuláveis nos organismos, o que os torna potencialmente tóxicos para os seres vivos. Porém, alguns são necessários desde que em quantidades mínimas para que os seres vivos, inclusive microorganismos, possam realizar suas funções vitais. De acordo com Emsley (2001), cobalto, cromo, molibdênio, vanádio, níquel e zinco são exemplos de metais essenciais para os seres humanos. Contudo, em níveis elevados, estes mesmos elementos se tornam

extremamente tóxicos. Outros metais pesados como mercúrio, chumbo e cádmio não possuem nenhuma função para os organismos, sendo o seu acúmulo, sobretudo nos seres humanos, causa de graves doenças, podendo até mesmo levar à morte (LIMA; MERÇON, 2011; SALES, 2013).

Em geral, os metais pesados podem se apresentar em mais de um estado de oxidação, o que lhes confere distintas características de mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade, o que por conta da sua não biodegradabilidade pode levar ao acúmulo nos seres vivos, tendo seu efeito aumentado ao longo da cadeia alimentar. Segundo Bridges (1991), o tempo de residência em solos de cádmio e mercúrio se situa nas faixas de 75 a 380 anos e de 500 a 1000 anos, respectivamente; já o tempo de residência para arsênio, chumbo, selênio e zinco, exemplos de metais cuja adsorção é maior, varia de 1000 a 3000 anos.

A toxicidade do metal está diretamente relacionada à sua biodisponibilidade, o que por sua vez está associado com sua especiação física e química (GUIMARÃES; SIGOLO, 2008). Por exemplo, a toxicidade de um metal em água varia em função do pH e do teor de matéria orgânica, uma vez que os metais reagem com carbono, formando complexos ou sendo absorvidos (BAIRD, 2002).

Em vista do exposto, a contaminação por metais pesados é um problema mundial e, por isso, causa de preocupação de órgãos ambientais e da comunidade científica. No Brasil, estudos tanto locais quanto regionais demonstram ser a contaminação por metais pesados motivo de grande preocupação. São exemplos, o estuário de Santos/São Vicente em São Paulo e as baías de Guanabara e de Sepetiba no Rio de Janeiro, que se encontram impactadas em decorrência de neles serem diariamente lançados efluentes altamente contaminados com cobre, níquel, zinco, cádmio e mercúrio, que são oriundos de refinaria, indústrias siderúrgicas, entre outras atividades industriais, existentes nestes locais (CARVALHO; LACERDA; GOMES, 1991).

Neste contexto, torna-se fundamental adotar medidas visando à descontaminação das áreas afetadas, bem como para evitar que outras áreas venham a ser impactadas. Entretanto, embora existam vários trabalhos publicados sobre o tema, cada local contaminado apresenta suas peculiaridades, o que requer um estudo mais detalhado caso a caso.

A estratégia de tratamento cada vez mais em evidencia é a que faz uso de micro-organismos como agentes de remoção de metais, denominado biossorção. Esta técnica se destaca pelo baixo custo quando comparada com outras formas de tratamento por

processos físico-químicos, tais como floculação e eletrólise (PINTO *et al.*, 2003). Além disso, estas técnicas possuem um alcance limitado, por serem, a maioria, processos complexos e de baixa eficiência (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

A biossorção pode ser definida como a tecnologia que faz uso, por exemplo, de biomassa microbiana, viva ou morta, para a remoção, retenção e recuperação de metais pesados em ambientes líquidos. A biossorção, assim como outras técnicas de biorremediação, é considerada eficiente na remoção de poluentes do meio ambiente e já foi aprovada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (US – EPA) como tecnologia de limpeza de locais contaminados com resíduos perigosos. Dentre as vantagens que tornam os micro-organismos importantes no tratamento de resíduos estão o seu crescimento acelerado, a tolerância a condições ambientais extremas, como variação do pH e temperatura, e o fato de possuírem, em geral, baixo custo de cultivo, uma vez que podem ser cultivados em matérias-primas de baixo custo, ou até mesmo por reaproveitamento de rejeitos industriais (SIMÕES; TAU-K-TORNISIELO, 2005).

Diversos são os micro-organismos que apresentam a capacidade de biossorver metais pesados. Dentre eles, os fungos e as bactérias têm se mostrado bastante eficientes. Para Gadd (2000), a biossorção utilizando fungos filamentosos torna-se muito promissora na recuperação de áreas degradadas com metal pesado, pois estes apresentam grande capacidade de adaptação aos metais presentes no solo e ambientes aquáticos. Particularmente, alguns fungos filamentosos, como os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e, ainda, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, exibem maior capacidade de remover metais pesados do ambiente, por serem mais resistentes aos metais tóxicos, permitindo o seu desenvolvimento em ambientes com altas concentrações destes elementos. Por este motivo, são mais indicados nos processos de biossorção (BLUMER, 2002).

O presente trabalho pretende contribuir com dados científicos que possibilitem o tratamento de áreas contaminadas por metais pesados, ampliando os estudos relacionados com biossorção mediante o emprego de fungos filamentosos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente observa-se uma preocupação crescente com a poluição do meio ambiente, principalmente decorrentes das operações de grandes indústrias e o descarte incorreto de seus efluentes. Sendo assim, o interesse por tecnologias que auxiliem nesta questão são extremamente bem vindas.

Em pesquisas realizadas ao longo de dois anos nos laboratórios do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCTI), sob a orientação da Dra. Judith Liliana Solórzano Lemos, foi constatado que diferentes espécies de fungos filamentosos apresentavam grande potencial de remoção para diversos metais. Dentre os fungos estudados, a linhagem *Penicillium corylophilum* apresentou melhor capacidade em remover diferentes metais em solução aquosa. Por este motivo, este estudo dá continuidade à remoção de metais pesados de alta toxicidade, utilizando como agente o fungo filamentoso *Penicillium corylophilum*, isolado nos trabalhos anteriores. Cabe enfatizar que no levantamento bibliográfico realizado para os últimos cinco anos, existem vários estudos que fazem uso de fungos filamentosos, mas nenhum concernente à participação da espécie *Penicillium corylophilum* na remoção de metais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como principal objetivo avaliar a capacidade de remoção de níquel de soluções aquosas sintéticas por bioissorção pelo emprego do fungo filamentoso *Penicillium corylophilum*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os parâmetros significativos na bioissorção realizando uma triagem pela técnica de planejamento experimental de Plackett & Burman;
- Comparar a sorção do metal pelo fungo na forma esporulada e vegetativa;
- Avaliar a influencia da interação entre metais na bioissorção do níquel pelo fungo.

## Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

---

### 2.1 METAIS PESADOS

Diversos são os resíduos gerados pelas indústrias, e cujo descarte se dá, na maioria das vezes, de forma inadequada. Tal fato é preocupante visto que muitos desses resíduos contêm níveis alarmantes de substâncias orgânicas recalcitrantes e/ou metais pesados, uma ameaça à saúde dos seres vivos pelo alto grau de toxicidade, e sua bioacumulação na cadeia alimentar ao contaminar ambientes aquáticos e terrestres.

Existem diferentes definições para o termo “metal pesado”, também referendado como “metal tóxico”, “metal traço”, “elemento traço” e “constituente traço”. O relatório técnico apresentado por Duffus (2002), da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), apresenta uma extensa revisão bibliográfica que trata das definições de metal pesado. De acordo com este levantamento, metal pesado é qualquer elemento inorgânico que apresente massa atômica superior a 55 u e massa específica maior do que  $5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Entretanto, dependendo do autor, na definição podem ser considerados outros parâmetros tais como propriedades químicas e, inclusive, grau de toxicidade. As divergências entre as definições são ainda nos dias atuais um impeditivo à adoção de um conceito único.

Alguns metais pesados, em quantidades mínimas, são essenciais à vida dos seres vivos, incluindo os humanos e micro-organismos, pelo seu papel em funções metabólicas específicas (HUGHES; POOLE, 1989). Dentre os metais pesados, tem-se, por exemplo, cobalto (Co), níquel (Ni), zinco (Zn) e molibdênio (Mo), que são requeridos em quantidades mínimas, por isso, chamados micronutrientes, embora em maiores concentrações sejam tóxicos (VIRGA; GERALDO; SANTOS, 2007).

A biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade dos metais, de um modo geral, estão relacionadas à espécie do metal, ou seja, a forma química na qual ele se apresenta. Por isso, ao se avaliar os riscos que envolvem a presença de um metal em determinado ambiente é prioritário conhecer a sua forma e percentual disponível para absorção pelos seres vivos, que por sua vez depende diretamente da sua espécie (BARRA *et al.*, 2000; LEMOS *et al.*, 2008). Dependendo da espécie metálica, a disponibilidade de absorção do elemento e sua

acumulação pela biota irão variar prejudicando, assim, o ecossistema. Além disso, a absorção de metal, a toxicidade e a bioacumulação variam dependendo do organismo, e podem ser alteradas pelas condições ambientais como temperatura, pH, do oxigênio dissolvido e a presença de outros metais, qualitativamente e quantitativamente (MORTIMER, 2000).

A contaminação de sistemas aquáticos e terrestres por metais tóxicos é um grave problema ambiental contemporâneo (DAS *et al.*, 2012). Certos metais podem provocar graves problemas por, entre outras características, apresentarem alto tempo de meia vida, o que faz com que permaneçam ativos no meio ambiente por um longo período, e por possuírem alta capacidade de acumulação no corpo humano (JIMENEZ; DAL BOSCO; CARVALHO, 2004; KORF *et al.*, 2008). Entretanto, segundo Freitas e Melnikov (2004), nem sempre é possível prever os efeitos da bioacumulação em longo prazo. Por exemplo, elementos como o cromo, que não se decompõem, ou que apresentam baixa degradabilidade, se acumulam no meio ambiente, sendo transferidos através da cadeia alimentar (MERLINO *et al.*, 2010).

A preocupação mundial com os efeitos nocivos do uso indiscriminado de produtos químicos tóxicos e com o seu indevido descarte no ambiente vem crescendo, resultaram na criação de diversas normas, estabelecidas em Leis e Decretos, que visam controlar a emissão de resíduos na natureza. Especificamente para metais pesados, as principais fontes de emissão são, dentre outros, as atividades metalúrgicas (CHAOUI *et al.*, 1997), gases liberados pela queima de combustíveis fósseis (GIMENO-GARCIA; ANDREU; BOLUDA, 1996), fabricação e descarte de baterias (PRASAD; ANDERSON; STEWART, 1995), aplicação de fertilizantes que contenham impurezas, e uso de pesticidas (GALLI; SCHUEPP; BRUNOLD, 1996).

De acordo com Volesky (2001), os metais que mais representam um risco ambiental são, em ordem decrescente de toxicidade: cádmio, chumbo, mercúrio, cromo, cobalto, cobre, níquel, zinco e alumínio. Os três primeiros são os mais prejudiciais tanto ao homem quanto ao meio ambiente; enquanto cobre, cromo, zinco e níquel afetam os humanos por contato direto posto que são muito utilizados na fabricação de diversos acessórios.

### 2.1.1 Cobre

O cobre é usado intensamente na indústria petrolífera (catalisador e branqueador), tinturaria (mordente) na fabricação de corantes (agente oxidante). O cobre metálico é utilizado na cunhagem de moedas, fabricação de tubos de canalização e fios, peças decorativas etc. Também tem aplicação como fungicida, na pintura de cascos de navios, de madeira ou aço; e, como inseticida e aditivo dos solos, para evitar que as deficiências de cobre afetem as colheitas.

Este elemento desempenha, igualmente, um papel importante no metabolismo dos seres vivos. Um homem adulto necessita de 2 mg de cobre por dia, estando presente no corpo humano na quantidade de 100 a 150 mg. A carência de cobre na dieta pode provocar anemia, diarreia e distúrbios nervosos. Por outro lado, a ingestão excessiva de compostos como o sulfato de cobre pode causar vômitos, câibras, convulsões, e até mesmo a morte (COBRE-NAUTILUS, 2014).

A produção nacional de cobre se distribui nos estados do Pará (52,3%), Goiás (35,9%) e Bahia (11,8%), de acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM/Sumário Mineral, 2012).

### 2.1.2 Cromo

Este elemento tem sido amplamente usado em vários segmentos industriais, como no processamento do couro pelas indústrias de curtumes, no recobrimento de madeira para preservação (indústrias de recobrimentos), bem como pelas indústrias produtoras de amálgamas e pelas de cromagem. Por isso, a poluição associada ao cromo é um problema crescente (RYAN *et al.*, 2002).

O cromo, em quantidades mínimas, é um metal essencial para os organismos vivos (ANDERSON, 1997; CEFALU; HU, 2004), embora possua toxicidade elevada, sendo perigoso, mesmo em concentrações baixas (20 mg/L) (USEPA, 1998; CHEUNG; GU, 2003).

Na natureza (*i.e.*, na água e subcamadas do solo), o cromo ocorre em dois estados de oxidação principais, hexavalente [Cr (VI)] e trivalente [Cr (III)], por serem mais estáveis, na forma de óxidos, sulfatos, cromatos, dicromatos e sais básicos. No estado hexavalente, o

cromo hexavalente é mil vezes mais citotóxico e mutagênico em comparação ao estado trivalente (BIEDERMAN; LANDOLPH, 1990). Isto porque o Cr (VI) é altamente solúvel e móvel, enquanto o Cr (III) apresenta baixa solubilidade, sendo facilmente adsorvido na superfície de minerais.

Em nosso organismo, o cromo é encontrado naturalmente na forma de cromo trivalente (III), que é o mais estável. Portanto, a redução de Cr (VI) para Cr (III) resulta em diminuição da toxicidade do elemento (BAGCHI *et al.*, 2002). As diferenças no sistema de transporte de membranas, na presença do metal, podem explicar a capacidade dessas duas espécies de cromo de induzir a formação de espécies de oxigênio reativo, que causam a oxidação das células epiteliais, lesionando-as. Distintamente do Cr (III), o Cr (VI) induz a uma toxicidade crônica variada denominada de acordo com a doença causada: neurotoxicidade, dermatotoxicidade, genotoxicidade, carcinotoxicidade, imunotoxicidade (BAGCHI *et al.*, 2002).

No Brasil, a produção de cromo ocorre em dois estados: 69% na Bahia e o restante no Amapá (DNPM/Sumário Mineral, 2012).

### 2.1.3 Zinco

O zinco é considerado um elemento essencial para a saúde do ser humano, tendo sido a sua participação bem documentada em diversos processos metabólicos. Contudo, um constante acúmulo deste metal no corpo humano poderá ocasionar uma intensa toxicidade gastrointestinal (WALSH *et al.*, 1994).

O zinco é um dos metais mais encontrados nos efluentes das indústrias de galvanização, eletrodeposição, chapeamento (por meio de eletrólise), fábricas de baterias e outras indústrias metalúrgicas. Na sua forma metálica, sua biodisponibilidade é limitada e não apresenta nenhum risco ecológico. Entretanto, o zinco pode reagir com outras substâncias químicas, como ácidos e oxigênio, resultando na formação de compostos potencialmente tóxicos (RADHIKA; SUBRAMANIAN; NATARAJAN, 2006).

Adicionalmente, o zinco pode se tornar um sério risco à saúde humana, se ingerido além da quantidade diária recomendada pela *Recommended Dietary Allowances* (RDA) que é de 100 a 300 mg Zn/dia, de acordo com a *Food and Nutrition Board* (FDB), comitê fundado em 1940, para estudar as questões de importância nacional e global sobre a

segurança e adequação da oferta de alimentos nos Estados Unidos. Segundo Fosmire (1990), maiores concentrações de zinco podem ocasionar náusea, vômito, problemas gastrointestinais, letargia, fadiga e alterações na resposta imune.

O Brasil dispõe de apenas cerca de 1% das reservas mundiais, correspondentes a 2,2 Mt, localizadas no Estado de Minas Gerais (NEVES, 2012). E, apesar de ser bastante utilizado pelas indústrias automobilística, de eletroeletrônicos da linha branca, de fabricação de pilhas, de confecção de zíperes, de utensílios de fogão, além da aplicação nos setores da agricultura, pecuária, ferroviário, construção civil, a produção nacional de zinco vem caindo, sendo menor do que a de outros metais. Segundo dados do DNPM/Sumário Mineral (2012), a produção de concentrado de zinco decresceu 6,3%, enquanto o decréscimo do metal primário foi de 1,2%, frente à mesma base de comparação. A perda de dinamismo da indústria de zinco pode ser devida à moderação da atividade econômica nacional.

#### 2.1.4 Níquel

O nome níquel deriva da palavra de origem alemã “*kupfernickel*”, que significa cuproníquel. O níquel foi nomeado pelos alemães no século XVII pelo descobrimento do elemento nicolita. Porém, segundo Silva (2001), antes da era cristã, este metal já era utilizado, pois, foi reportada a existência de objetos que o possuíam em sua composição, tais como moedas japonesas de 800 a.C. e gregas de 300 a.C., bem como armas.

Estima-se que, na crosta terrestre, o níquel não exceda a proporção de 0,01%, sendo o vigésimo quarto elemento mais abundante na Terra. Os seus principais minérios são aqueles que contêm sulfetos e silicatos.

De acordo com a sua composição, o minério de níquel pode ser classificado em dois tipos principais: sulfetado e laterítico (oxidado). Além do níquel, os minérios sulfetados possuem em sua composição sulfetos de cobre, cobalto e ferro e ainda, platina, prata e ouro. Os minérios lateríticos possuem teores médios de níquel em torno de 1,95% e teores de óxido de ferro acima de 24%, além da presença de cobalto e magnésio (MINERAÇÃO e METALURGIA, 2000; SILVA, 2001).

Dados da Gerência Setorial de Mineração e Metalurgia de 2000 demonstram que o níquel é utilizado tanto puro como em ligas em quase 300 mil produtos para consumo

(MINERAÇÃO e METALURGIA, 2000). Por conta da grande resistência mecânica à oxidação, nos países industrializados, cerca de 70% do níquel é utilizada na indústria siderúrgica, a maior parte na fabricação de aço inoxidável; enquanto o restante é voltado para a produção de ligas não ferrosas e galvanoplastia entre outros. As ligas ferrosas com níquel tem aplicação em material bélico, em moedas, na área de transporte (aeronaves), na área de construção civil (SILVA, 2001). Na galvanoplastia, a niquelagem das peças metálicas com sulfato de níquel garante um acabamento refinado e protetor do metal.

As reservas mundiais de níquel estão distribuídas por aproximadamente 20 países espalhados por todos os continentes. Em 2009, Cuba era o país que detinha o primeiro lugar no *ranking* das reservas mundiais de níquel, com 17,6% do total, seguida por Nova Caledônia<sup>1</sup>, com 12%; Canadá em terceiro lugar com 11%, enquanto o Brasil aparecia em 10º lugar com 4,5% das reservas (MINERAÇÃO e METALURGIA, 2000). Contudo, em 2011, houve um aumento das reservas mundiais de níquel em 15,80% em face de novas descobertas, tendo a Nova Caledônia contribuído na expansão com 60%.

Na produção mundial de níquel de 2011, segundo o *Mineral Commodity Summaries* de 2012, a Rússia se destaca (DNPM/Sumário Mineral, 2012), conforme pode ser observado na tabela 1. O mesmo cenário pode ser constatado para os anos anteriores, 2009 e 2010, sendo a Rússia, Indonésia, Filipinas, Canadá, Austrália e Nova Caledônia os países responsáveis por 68,8% da oferta mundial de níquel. Neste período, o Brasil vem ocupando a 7ª posição no *ranking* internacional de produção (Tabela 1).

No Brasil, as reservas de níquel se distribuem pelos Estados de Goiás (45,0%), Bahia (36,3%), Pará (11,3%) e Minas Gerais (7,4%) (DNPM/Sumário Mineral, 2012).

---

<sup>1</sup> Arquipélago da Oceania anexado ao território Francês.

Tabela 1. Reserva e produção mundial de níquel

Países	Reservas (10 <sup>3</sup> t) <sup>1</sup>		Produção (10 <sup>3</sup> t) <sup>2</sup>		
	2011	2009 <sup>(r)</sup>	2010 <sup>(r)</sup>	2011	%
Rússia	6.000	262.000	269.000	280.000	15,4
Indonésia	3.900	203.000	232.000	230.000	12,6
Filipinas	1.100	137.000	173.000	230.000	12,6
Canadá	3.300	137.000	158.000	200.000	11,0
Austrália	24.000	165.000	170.000	180.000	9,9
Nova Caledônia	12.000	92.800	130.000	140.000	7,7
<b>Brasil</b>	<b>8.353</b>	<b>41.059</b>	<b>108.983</b>	<b>124.983</b>	<b>6,9</b>
China	3.000	79.400	79.000	80.000	4,4
Cuba	5.500	67.300	70.000	74.000	4,1
Colômbia	720	72.000	72.000	72.000	3,9
África do Sul	3.700	34.600	40.000	42.000	2,3
Botsuana	490	28.600	28.000	32.000	1,8
Madagascar	1.600		15.000	25.000	1,4
República Dominicana	1.000			14.000	0,8
Outros países	4.600	51.700	99.000	100.000	5,5
<b>TOTAL</b>	<b>79.263</b>	<b>1.371.459</b>	<b>1.643.983</b>	<b>1.823.983</b>	<b>100</b>

Fonte: DNPM/Sumário Mineral -2012.

<sup>1</sup>Inclui reservas lavráveis em metal contido; <sup>2</sup>Dados de produção de Ni contido no minério; <sup>(r)</sup>Dados revisados.

O níquel é uma das principais causas de processos alérgicos, por dermatite, provocando lesões nos locais do contato com os produtos que o contenham em sua constituição. Por isso, é comum haver, por exemplo, vermelhidão à volta do pescoço daqueles que usam acessórios feitos com níquel ou alergia no lóbulo da orelha provocada por bijuterias que o contenham em sua composição (SANTOS, 2011).

A sensibilidade ao níquel é bastante comum, já que vários produtos contêm esse metal na sua composição, muitas vezes em quantidade excessiva. Além dos produtos já citados, o níquel também é usado na fabricação de bijuterias, joias, tesouras, pregos, canetas, pinças, enfim, em uma infinidade de produtos regularmente usados no dia a dia. Por isso, estima-se que 15% das mulheres e entre 2 a 5% dos homens no mundo são alérgicos ao níquel, visto ser maior o número de mulheres que fazem uso de adornos. Por sua vez, 30 a 40% das pessoas alérgicas podem desenvolver uma grave inflamação da pele (MARTINS, 2003).

O níquel metálico e suas ligas, segundo a classificação da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2012), são considerados possíveis agentes cancerígenos para os seres humanos, Grupo 2B e Grupo 1, respectivamente.

Segundo a CETESB (2012), o níquel lançado no meio ambiente, por fontes naturais ou por atividades antropogênicas, circula pelos ecossistemas aquáticos e terrestres, além de ser passível de ser transportado biologicamente, via os organismos vivos. O transporte e distribuição do níquel particulado entre os diferentes ecossistemas ambientais são influenciados pelo tamanho da partícula e pelas condições meteorológicas.

O tamanho da partícula vai depender principalmente da fonte emissora. As partículas mais finas permanecem por longos períodos na atmosfera; por conseguinte, podem acarretar problemas à saúde dos seres humanos e animais. Por outro lado, as partículas maiores costumam se depositar próximas a sua fonte de emissão e, deste modo, causam menos danos à saúde (CETESB, 2012).

A produção de produtos de níquel é a principal fonte da contaminação ambiental por esse elemento. A concentração de níquel na atmosfera das áreas industrializadas é por volta de 120-170  $\text{ng.m}^{-3}$  e de 6-17  $\text{ng.m}^{-3}$  em áreas suburbanas (centros urbanos secundários), se apresentando na forma de óxido, sulfetos, silicatos, compostos solúveis e, em menor grau, na forma metálica. Em vista disso, estudos vêm sendo realizados com o intuito de encontrar procedimentos para uma reabilitação eficiente das áreas degradadas (ANDRADE *et al.*, 2009).

Uma vez que o níquel pode ser encontrado no solo, na água e no ar, a exposição a este metal pode ocorrer por qualquer uma destas vias. Além disso, dependendo da forma em que o indivíduo entrou em contato com o metal, os danos à saúde serão diferenciados, desde alergias até câncer de pulmão e seios paranasais.

A principal via de contaminação pelo níquel é a respiratória, sendo o metal inalado principalmente na forma de poeiras de compostos insolúveis, de aerossóis formados a partir das soluções dos compostos solúveis e de vapores de carbonila de níquel. As atividades mais comuns que acarretam exposição ocupacional ao níquel são a mineração, a moagem e a fundição dos minérios (CETESB, 2012).

No Reino Unido e Canadá, foi relatado um aumento do risco de câncer nos pulmões e nas vias nasais de trabalhadores que foram constantemente expostos a formas insolúveis de níquel (óxido e sulfeto) durante processos de sinterização, torrefação e calcinação em refinarias. De forma mais eventual, o risco do aparecimento de carcinomas é atribuído à exposição de sais solúveis do metal tais como o sulfato de níquel (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2009).

Outro risco está relacionado à entrada de contaminantes contendo metais pesados na cadeia alimentar. Esta questão deve ser analisada e ações preventivas devem ser tomadas, uma vez que a porta de entrada de metais na cadeia alimentar é principalmente através do uso de fertilizantes utilizados nas plantações, da água e do solo contaminados principalmente pela ação do homem. Atenção também deve ser dada aos alimentos consumidos pelos animais de corte, principalmente bovinos. Balsalobre *et al.* (2011) afirmam que os alimentos para animais e forragens podem ter quantidades significativas de contaminantes, dentre eles, os metais pesados tóxicos que podem causar prejuízos tanto para o animal quanto para os indivíduos que consomem sua carne. O tomate é um exemplo de vegetal que possui uma capacidade muito grande de acumular metais pesados em suas folhas e frutos, caso sejam cultivados em solos por eles contaminados. Faz parte, portanto, do grupo de vegetais conhecidos como hiperacumuladores, àqueles que são capazes de acumular, em seus tecidos, quantidades muito maiores de contaminantes quando comparadas com outros vegetais. Esses vegetais possuem genes específicos que fazem com que eles apresentem maior capacidade de absorção de metais pesados, sem, portanto, causar nenhum mal visível para a planta (SILVA, 2010). Dessa maneira, quando um animal ou um ser humano se alimenta de vegetais deste grupo ou de animais que ingeriram estes vegetais, há entrada dos metais tóxicos na cadeia alimentar e em consequência, todos os problemas relacionados a esta questão.

Pelos motivos expostos, a presença destes metais no meio ambiente e uma possível exposição humana não podem ser desprezadas. Deve-se atentar sempre para os valores críticos orientadores para cada substância de modo que esteja enquadrada e evitar que ultrapasse os limites máximos permitidos em cada ecossistema, e que assim não venha causar problemas futuros à saúde da população.

## 2.2 VALORES ORIENTADORES

A Constituição Federal Brasileira de 1988, que estabelece diretrizes e princípios da política nacional do meio ambiente, apresenta no capítulo VI (“Do Meio Ambiente”), artigo 225, a seguir transcrito:

*“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”.*

Portanto, a preservação do meio ambiente é um dever e um direito de todo cidadão. Deste modo, impulsionado pela crescente degradação do ecossistema, os estados brasileiros, sobretudo o Estado de São Paulo, estabeleceram diretrizes onde os chamados valores orientadores norteiam os níveis críticos e aqueles que seriam aceitáveis de cada contaminante tanto no solo quanto nas águas subterrâneas.

Em relação ao ecossistema terrestre, a preocupação com a qualidade do solo vem aumentando a cada ano, uma vez que a sua característica está diretamente relacionada à saúde pública (SÁNCHEZ, 2001; SPÍNOLA, 2011). Para Casarini, Dias e Lemos (2002), o tema poluição do solo é extremamente importante e deve ter especial atenção por parte de toda a população. Além do solo ser um recurso limitado, ele é cada vez mais considerado parte importante do ambiente e, portanto, os problemas em torno da sua crescente poluição, bem como das águas superficiais e subterrâneas, não devem ser negligenciados. As áreas contaminadas (AC) representam grandes riscos, pois, além de possuírem substâncias tóxicas que podem prejudicar os indivíduos se entrarem em contato com a pele ou serem ingeridas acidentalmente, ainda possuem odores e gases nocivos que podem ser liberados das áreas contaminadas. Tem-se ainda que as substâncias tóxicas podem migrar vindo a contaminar águas subterrâneas e, até mesmo, os lençóis freáticos ou mesmo se infiltrar em redes de abastecimento de água potável entre outros problemas (SÁNCHEZ, 2001; SPÍNOLA, 2011).

Na Figura 1 vemos um cenário típico de fontes de contaminação do meio ambiente, tendo como base uma indústria desativada, onde podemos visualizar, de forma mais evidente, os efeitos da contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas e, ainda, as vias de propagação desses contaminantes.



**Figura 1. Indústria desativada.**

Legenda: **Fontes de perigo** [1. Vazamento de tanques enterrados e sistemas de tubulação; 2. Valas com barris enferrujados com resíduos tóxicos; 3. Percolação no subsolo de antigos vazamentos; 4. Resíduos abandonados lançados sobre o solo]; **Cenários** [5. Poluição do solo; 6. Poluição de água subterrânea; 7. Percolação de poluentes na água subterrânea em direção ao rio; 8. Fluxo de poluentes superficial e subterrâneo em direção ao rio; 9. Erosão de resíduos sólidos tóxicos em direção ao rio; 10. Deposição de metais pesados no fundo do rio; 12. Evaporação de solventes tóxicos; 13. Efeito do ar poluído na vegetação]; **Medidas de Identificação de problemas** [31. Investigação confirmatória]. Fonte: AHU, Consultoria em Hidrogeologia e Meio Ambiente, Alemanha (1987) *apud* SPÍNOLA (2011).

Pode-se definir, portanto, os valores orientadores como sendo os que fornecem a informação da qualidade do solo e das águas subterrâneas no que diz respeito à concentração de substâncias químicas presentes nestes ambientes. Por isso, devem ser utilizados como ferramenta de prevenção e controle da contaminação e, ainda, de orientação para o gerenciamento de áreas já contaminadas em investigação (CETESB, 2013).

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) publicou em 2001 a primeira lista com os valores orientadores para o estado de São Paulo, que englobava, na ocasião, 37 diferentes substâncias. Em 2005, a CETESB publicou uma nova lista, desta vez contemplando 84 diferentes substâncias e definindo como diretrizes três valores orientadores para solo e água subterrânea (CETESB, 2005).

Os valores orientadores definidos pela CETESB são o Valor de Referência de Qualidade (VRQ), o Valor de Prevenção (VP) e o Valor de Intervenção (VI), a saber:

- Valor de Prevenção (VP) é a concentração aumentada de determinada substância no ambiente, podendo acarretar alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea;
- Valor de Intervenção (VI) é a concentração elevada de determinada substância no meio ambiente onde há risco potencial direto ou indireto à saúde humana. Para o solo, foi calculado utilizando-se procedimento de avaliação de risco à saúde humana para cenários de exposição Agrícola- Área de Proteção Máxima – APM<sub>ax</sub>, Residencial e Industrial.;
- O Valor de Referência de Qualidade (VRQ) é determinado com base em interpretação estatística de análises físico-químicas de diversas amostragens no local a ser analisado ou em suspeição.

Com base nestes indicadores, pode-se estabelecer uma área considerada limpa, de uma área suspeita de contaminação e, ainda, de uma área considerada contaminada. Um ambiente pode ser considerado “limpo” quando a concentração de determinadas substâncias for menor ou igual ao valor de ocorrência natural, sendo esta concentração denominada de VRQ (CASARINI, DIAS; LEMOS, 2002). Ainda segundo esse autor, se após uma avaliação preliminar, for constatada em uma determinada área uma suspeita de que algum contaminante estaria acima do nível normal recomendado, essa seria classificada como uma área suspeita de contaminação. E para que uma área seja considerada contaminada, deve apresentar níveis bastante elevados das substâncias contaminantes, o que além dos riscos intrínsecos poderá ser prejudicial à saúde humana, havendo a necessidade de uma intervenção rápida e eficaz na área contaminada (AC).

O Quadro 1 apresenta os valores orientadores definidos e publicados pela CETESB para substâncias inorgânicas presentes em solos e em águas subterrâneas. Podem-se observar as concentrações limites nas quais as substâncias devem ser encontradas nestes ambientes específicos.

**Quadro 1. Valores Orientadores para solo e água subterrânea do Estado de São Paulo**

Substância	CAS Nº	Solo (mg/Kg de peso seco) <sup>3</sup>					Água Subt (µg/L)
		Referência (a)	Prevenção	Intervenção			Intervenção
				Agrícola APMax	Residencial	Industrial	
<b>Metais/ semi-metais</b>							
Alumínio	7429-90-5	-	-	-	-	-	200
Antimônio	7440-36-0	<0,5	2	5	10	25	5
Arsênio	7440-38-2	3,5	15	35	55	150	10
Bário	7440-39-3	75	150	300	500	750	700
Boro	7440-42-8	-	-	-	-	-	500
Cádmio	7440-48-4	<0,5	1,3	3	8	20	5
Chumbo	7440-43-9	17	72	180	300	900	10
Cobalto	7439-92-1	13	25	35	65	90	5
Cobre	7440-50-8	35	60	200	400	600	2.000
Cromo	7440-47-3	40	75	150	300	400	50
Ferro	7439-89-6	-	-	-	-	-	300
Manganês	7439-96-5	-	-	-	-	-	400
Mercurio	7439-97-6	0,05	0,5	12	36	70	1
Molibdênio	7439-98-7	<4	30	50	100	120	70
Níquel	7440-02-0	13	30	70	100	130	20
Nitrato (como N)	797-55-08	-	-	-	-	-	10.000
Prata	7440-22-4	0,25	2	25	50	100	50
Selênio	7782-49-2	0,25	5	-	-	-	10
Vanádio	7440-62-2	275	-	-	-	-	-
Zinco	7440-66-6	60	300	450	1000	2000	5.000

Legenda: (3) - Procedimentos analíticos devem seguir SW-846, com metodologias de extração de inorgânicos 3050b ou 3051 ou procedimento equivalente. Fonte: Adaptado de CETESB (2005).

Especificamente para o níquel, alvo deste estudo, os valores orientadores que regem os níveis de concentração deste elemento para os diferentes ecossistemas, bem como comentários e referências, são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2. Valores orientadores para o níquel**

<b>Meio</b>	<b>Concentração<sup>1</sup></b>	<b>Comentário</b>	<b>Referência</b>
Efluente	2,0 mg/L	VM (Padrão de lançamento)	CONAMA 430/2011
Solo	30mg/L*	Valor de Prevenção	CONAMA 420/2009
	70 mg/L*	VI cenário agrícola-APMax	
	100 mg/L*	VI cenário residencial	
	130 mg/L*	VI cenário industrial	
Água Potável	0,07 mg/L	Padrão de potabilidade	PORTARIA 2914/2011
Água subterrânea	20 µg/L	VMP (consumo humano)	CONAMA 396/2008
	1000 µg/L	VMP (dessedentação de animais)	
	200 µg/L	VMP (irrigação)	
	100 µg/L	VMP (recreação)	
Águas doces	0,025 mg/L	VM (classes 1, 2 e3)	CONAMA 357/2005
Águas salinas	0,025 mg/L	VM (classes 1)	CONAMA 357/2005
	74 µg/L	VM (classe 2)	
Águas salobras	0,025 mg/L	VM (classes 1)	CONAMA 357/2005
	74 µg/L	VM (classe 2)	

Legenda: <sup>1</sup>Níquel total; \*Massa seca; APMax = Área de Proteção Máxima; VI = Valor de Investigação; VMP = Valor Máximo Permitido; VM = Valor Máximo. Fonte: FIT Níquel – Ficha de Informação Toxicológica do Níquel. Fonte: CETESB (2012).

Dessa maneira, o estabelecimento dos valores orientadores para as diferentes substâncias que seriam contaminantes em potencial do meio ambiente se mostra extremamente necessária, uma vez que permite as agências ambientais avaliar e monitorar as possíveis contaminações que possam ocorrer no meio ambiente, fazendo com que ações preventivas e/ou corretivas possam ser tomadas a tempo de evitar algum prejuízo maior.

Tem-se que salientar que essa medida ainda é pouco perto dos problemas que o Brasil e o mundo vêm enfrentando em relação à poluição ambiental, sobretudo de solos e águas, e que leis mais rígidas seriam bem-vindas no intuito de minimizar danos ao meio ambiente e à saúde da população. Assim como uma maior fiscalização por parte dos órgãos governamentais em controlar se as diretrizes estabelecidas, isto é, se os valores orientadores estão sendo cumpridos a risca.

### 2.3 BIORREMEDIAÇÃO

A Revolução Industrial aliada ao acelerado crescimento da população humana fizeram surgir diferentes fontes de contaminação, elevando os níveis de poluição dos ecossistemas aquáticos, terrestres e atmosféricos. Soma-se a isso, o crescimento desenfreado e desordenado das grandes cidades, que vem agravando, cada vez mais, os problemas ecológicos e de saúde pública, que em alguns lugares já é crítica.

Se por um lado a industrialização gerou vários benefícios para a humanidade, em contrapartida tem contribuído maciçamente na deterioração quer dos ambientes quer da saúde do homem e demais seres vivos, pela geração de rejeitos e emissão de gases com diversos tipos de contaminantes. Dentre as indústrias potencialmente poluentes, se destacam a metalúrgica e a mineradora que introduzem metais pesados, contaminantes de elevada toxicidade para um grande número de organismos, mesmo em baixas concentrações (GUELFY, 2001).

A conscientização das sociedades em todo o mundo, aliada a políticas ambientais cada vez mais restritivas, têm incentivado a comunidade científica na busca por estratégias eficientes e de baixo custo para emprego na descontaminação das áreas já degradadas. A intenção é melhorar a qualidade de vida em curto prazo e, ao mesmo tempo, contribuir para o bem estar das gerações futuras.

Existem inúmeras maneiras de eliminar ou reduzir contaminantes no meio ambiente, dentre elas, o processo de biorremediação, interessante do ponto de vista econômico quando comparado com outras formas de tratamento que utilizam processos físico-químicos como o de floculação e eletrólise (PINTO *et al.*, 2003). O principal propósito da biorremediação é estimular a ocorrência dos processos biológicos de reciclagem de compostos de interesse, quer orgânico quer inorgânico (DIAS, 2000).

Os micro-organismos, tanto fungos quanto bactérias, se mostram bem eficientes no tratamento de áreas impactadas por rejeitos com elevado nível de contaminantes tóxicos, sendo necessário apenas estabelecer as condições nutricionais e ambientais favoráveis ao seu metabolismo, e aproveitando da sua capacidade inerente de resistência aos metais. Dentre as vantagens que tornam os micro-organismos importantes para o tratamento de resíduos podem ser citados: crescimento acelerado, tolerância a condições ambientais extremas e, em geral, com baixo custo de cultivo (SIMÕES; TAUKE-TORNISIELO, 2005).

A biorremediação engloba diversas tecnologias de tratamento que podem variar de acordo com o local, o tipo de contaminante, a constituição do solo, entre outros. A técnica a ser utilizada deve ser escolhida primariamente com base em informações sobre a área impactada, a fim de minimizar quaisquer problemas que possam vir a acontecer durante a intervenção. De acordo com o tipo de tratamento a ser empregado, as técnicas de biorremediação, em um primeiro momento, podem ser classificadas em *in situ* e *ex situ*. Tais técnicas são assim classificadas levando em conta o tipo de poluente, os custos de todo o processo e, sobretudo, a concentração final do contaminante ao término do tratamento (OLIVEIRA, 2008).

Na biorremediação *in situ*, o processo de descontaminação ocorre no local a ser tratado. As técnicas *in situ* geralmente envolvem o aumento da atividade microbiana local pelo condicionamento da área degradada, que pode ser feito, dependendo do caso, por adição de nutrientes, ajuste de pH, controle da umidade e da disponibilidade de oxigênio, de modo a propiciar as condições favoráveis para degradação biológica dos componentes tóxicos. Como principais tecnologias relacionadas à biorremediação têm-se: bioaumento, bioestímulo, bioventilação e fitorremediação (FERRARI, 1996; BOOPATHY, 2000; MARTINS *et al.*, 2003).

Quando a biorremediação é conduzida *ex situ*, o solo a ser tratado deverá ser retirado do local e transportado, adequadamente, para não causar a contaminação de outras áreas, até a unidade onde ocorrerá o tratamento. Assim, haverá a necessidade de remoção do material contaminado, geralmente por escavação para solo ou com bombeamento no caso de água. Este tipo de tratamento, em geral, envolve o uso de biorreatores e de mecanismos que possibilitem o controle dos parâmetros mais importantes do processo de remediação (FERRARI, 1996; BOOPATHY, 2000; MARTINS *et al.*, 2003).

As tecnologias *in situ* e *ex situ* podem ser praticadas para o tratamento de áreas impactadas com os mais diversos tipos de contaminantes, como petróleo e derivados e efluentes domésticos e industriais, no contexto do presente trabalho, qualquer material que contenha metais pesados.

Quando a remoção de metais é o foco do tratamento, é mais apropriado o termo biossorção já que os elementos inorgânicos não sofrem degradação como ocorre para as substâncias orgânicas, tais como hidrocarbonetos e pesticidas (SPROCATI *et al.*, 2006).

No caso de íons metálicos, a bioissorção possibilita a sua imobilização por intermédio de micro-organismos, plantas ou produtos biológicos (como enzimas), de modo a eliminar ou, pelo menos, reduzir a sua concentração conforme estabelecido pela legislação vigente para estes poluentes (SPROCATI *et al.*, 2006).

## 2.4 BIOSSORÇÃO

### 2.4.1 Acumulação de metais por micro-organismos

Em artigo publicado em 1993 por Geoffrey M. Gadd, importante especialista no tema, foi proposta a seguinte definição para bioissorção:

*“O termo bioissorção é usado para abranger a captação/absorção de metais por toda a biomassa, tanto viva quanto morta, através de mecanismos físico-químicos tais como adsorção ou troca iônica.”*

A definição atualmente usada é mais abrangente, porém, tem como base os mesmos princípios. Segundo Volesky (2001), bioissorção é o processo que emprega biomassa vegetal ou microbiana, para retenção, recuperação ou remoção de metais pesados de um ambiente líquido.

Segundo a Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 314 de 2002:

*“... podemos entender como remediador todo produto, constituído ou não por micro-organismos, que é destinado à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados, tratamento de efluentes e resíduos, desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos atuando como agente do processo físico, químico e biológico ou combinados entre si.”*

A bioissorção tem por característica a capacidade dos metais de se ligarem a diversos materiais biológicos, tais como algas, leveduras, bactérias e fungos filamentosos (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Células vivas ou mortas são capazes de acumular metais, apresentando, porém, diferenças nos mecanismos envolvidos em cada caso, dependendo fortemente do seu metabolismo (GADD; WHITE, 1990).

Segundo Pino e Torem (2011), os materiais de origem biológica (biomassas) para serem empregados como bio sorventes devem apresentar, dentre outras, as seguintes características: capacidade de adsorver íons metálicos dissolvidos; seletividade frente a diferentes espécies metálicas; ser passível de regeneração e ter baixo custo. Diferentes materiais são citados pelos autores: micro-organismos (bactérias, microalgas e fungos), vegetais macroscópicos (algas, gramíneas e plantas aquáticas) e partes ou tecidos específicos de vegetais, subprodutos agrícolas ou industriais (cascas, bagaço, sementes). Cada caso é um caso, isto é, para indicar um bio sorvente como efetivo, há que se considerar a espécie metálica bem como a composição do efluente a ser tratado, o pH do ambiente (solução), e o sistema operacional que se pretende usar.

A sorção do metal pelo micro-organismo pode ocorrer naturalmente pelos seguintes mecanismos, de forma isolada ou combinada: complexação (coordenação ou quelatação dos metais); troca iônica; adsorção ou microprecipitação inorgânica. Qualquer que seja o mecanismo de ação microbiana, a imobilização de uma ou mais espécies metálicas pode ser rápida e eficiente (BARROS *et al.*, 2005).

O processo de bio sorção envolve duas fases: uma denominada fase sólida (bio sorvente) e outra denominada fase líquida (solvente, normalmente água) que contém uma espécie dissolvida que é o adsorvato (*i.e.*, íons metálicos). Deve existir uma afinidade eletrostática entre o bio sorvente e o adsorvato, de modo a haver uma atração. Este processo é contínuo, até que ocorra o equilíbrio entre a concentração do adsorvato dissolvido em solução e a concentração do adsorvato presente no bio sorvente (concentração de equilíbrio) promovida pela saturação do adsorvato sobre o bio sorvente. A relação entre o bio sorvente e o adsorvato determina a distribuição do metal entre a fase sólida e a líquida. A qualidade do material bio sorvente é classificada pela capacidade de atração e retenção do adsorvato (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

A bio sorção ainda pode ocorrer de duas maneiras: (i) adsorção, que independe de energia e que, portanto, ocorre de forma passiva, sem que haja atividade metabólica, (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1999); e (2) denominada absorção ou bioacumulação, quando dependente de gasto energético e da atividade metabólica (STRANDBERG; SHUMATE; PARROT, 1981). Na tabela 3 são mostrados alguns exemplos citados na literatura científica sobre a bio sorção de metais por diferentes espécies fúngicas.

Tabela 3. Lista de fungos utilizados para bioadsorção de metais

Fungo	Metais	Referência
<i>Aspergillus flavus</i>	Pb, Cu, Zn	Akar; Tunali (2006); Faryal <i>et al.</i> (2006)
<i>A. foetidus</i>	Cr	Prasenjit; Sumathi (2005)
<i>A. fumigatus</i>	Zn	Faryal <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus</i> sp.	Cd e Cr	Ahmad <i>et al.</i> (2005); Fukuda <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cd, Cu, Pb, Th, U Zn e Cr	Holan; Volsky (1995); Niu <i>et al.</i> (1993); Pazouki <i>et al.</i> (2007); Skowronski <i>et al.</i> (2001); Su <i>et al.</i> (2003); Tan; Cheng (2003); Tsezos; Volesky (1981)
<i>P. cyclopium</i>	Cu	Ianis <i>et al.</i> (2006)
<i>P.janthinellum</i>	Cr	Kumar <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium</i> sp.	Co e Cr	Fukuda <i>et al.</i> (2008); Pal <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizopus arrhizus</i> ou <i>R. oryzae</i>	Cu, Th, U, Zn, Cr	Bhainsa; D'Souza (2008); Subudhi; Kar (2008)
<i>Aspergillus níger</i> , <i>A. sydoni</i> , <i>P. janthinellum</i> e <i>Trichoderma viride</i>	Ni, Zn, Cr e Cd	Kumar <i>et al.</i> , (2012); Pallu (2006)
<i>Inonotus hispidus</i>	As	Tsezos; Volesky (1981)

Fonte: Adaptado de Martins (2009).

#### 2.4.2 Acumulação extracelular

Na acumulação extracelular, também conhecida como adsorção, os íons metálicos se ligam à parede celular dos micro-organismos. Neste caso, como dito anteriormente, não há gasto energético e o processo é realizado independente dos micro-organismos estarem ou não realizando suas funções vitais. A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário um gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. Portanto, neste caso, a remoção pode ocorrer usando tanto células vivas quanto células mortas (GADD, 1992).

Praticamente todo material biológico possui afinidade por metais, inclusive tóxicos, e radionuclídeos. Em geral, a parede celular dos micro-organismos possui diversos componentes que se ligam aos metais, contribuindo, assim, para o processo de adsorção. Alguns mecanismos pelos quais os metais interagem com a parede celular já foram estabelecidos. Por exemplo, diversas biomoléculas presentes na parede celular funcionam, especificamente, como ligantes de metais e, portanto, a adsorção é induzida pela sua presença (GADD, 1993). Segundo este autor, estas moléculas intermediam a ligação dos micro-organismos aos metais como, por exemplo, a melanina fúngica, que pode ter sua produção aumentada quando a cultura é exposta a concentrações subletais de metais tóxicos, aumentando as taxas de adsorção.

Muitos fungos possuem uma quantidade elevada de quitina em sua parede celular, e esse polímero de N-acetilglicosamina é um efetivo biossorvente de metais e radionuclídeos. Do mesmo modo, além dos polissacarídeos e mucopolissacarídeos constituintes da parede celular, substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *extracellular polymeric polyssacharides*), e algumas proteínas produzidas por alguns micro-organismos apresentam grande potencial de ligação com metais tóxicos (GADD, 1993).

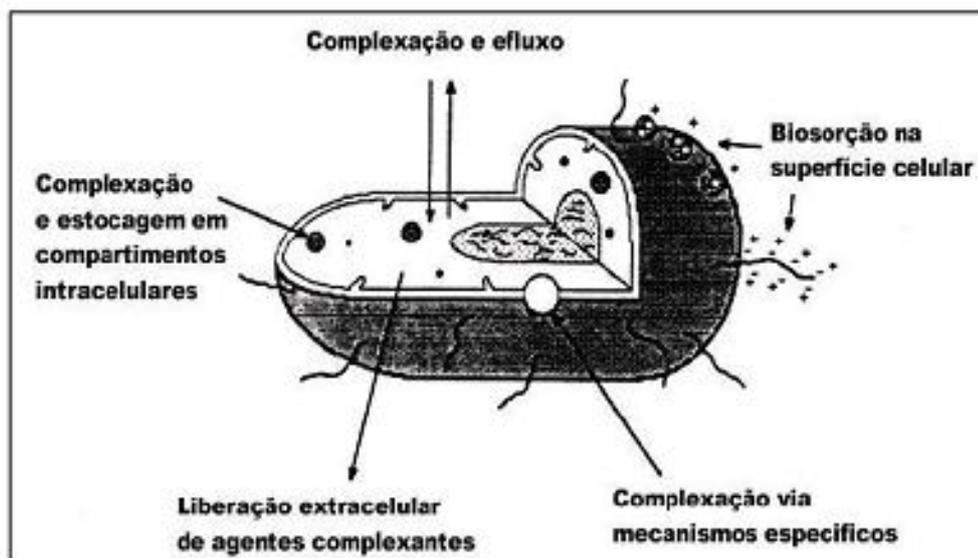
As ligações características do fenômeno de adsorção ocorrem, principalmente, segundo Bandeira (2007), por influência das forças de Van der Waals e são, portanto, de natureza essencialmente física. Porém, por não serem ligações fortes, a adsorção pode ser facilmente revertida. Em alguns sistemas, forças adicionais ligam as moléculas adsorvidas à superfície do sólido. Nestes casos, as forças são de natureza química e envolvem a troca ou o compartilhamento de elétrons, ou possivelmente moléculas formando átomos ou radicais. Em tais casos, o termo quimiossorção é usado para descrever o fenômeno e é restrito somente a uma camada de moléculas na superfície, embora possa ser seguida por camadas adicionais de moléculas fisicamente adsorvidas.

Dependendo do tipo de ligação, a adsorção pode ser definida como específica e não específica. De forma geral, os íons adsorvidos por meio de ligações covalentes ou iônicas são mais fortemente retidos, e o fenômeno é chamado de adsorção específica. Quando a interação entre os íons e as partículas ocorre por forças físicas, como a de Van der Waals, tem-se a adsorção não específica.

### 2.4.3 Acumulação intracelular

Os metais, de uma maneira geral, são importantes para a realização dos processos vitais dos micro-organismos. Alguns deles como o cobre e o zinco são considerados nutrientes essenciais e são usados como catalisadores de reações bioquímicas, estabilizadores de proteínas e mantenedores do equilíbrio osmótico da célula (JI; SILVER, 1995). O cobre, por exemplo, é um elemento essencial para a sobrevivência das bactérias e fungos do solo, mas pode se tornar tóxico quando a concentração excede 750 mg/g (BÄATH, 1989). Em consequência, a célula deve ter meios de carrear para dentro os elementos de interesse para suas funções metabólicas.

A acumulação intracelular de metais, processo também denominado absorção, resulta da interiorização dos elementos mediada por ATP; portanto, a célula deve estar metabolicamente ativa. No entanto, a atividade metabólica celular pode resultar na geração de metabólitos que por sua vez podem causar a alteração de alguns fatores tais como pH, potencial redox (Eh), e concentração de substâncias orgânicas e inorgânicas, intra e extracelularmente, e que, por conseguinte, poderá interferir no processo de bioabsorção (TING; LOWSON; PRINCE, 1989; GADD, 1990). Os mecanismos de transporte envolvidos na acumulação intracelular de metais pesados são pouco conhecidos. Uma das possibilidades relacionadas ao acúmulo de metais seria a de que os metais pesados podem ser captados via sistemas de transporte de membrana, que são essenciais para o desenvolvimento microbiano. Uma vez dentro das células, e dependendo do elemento metálico e do micro-organismo, as espécies metálicas podem se ligar a proteínas, que leva a sua precipitação, ou se inserir em estruturas ou organelas celulares (GADD, 1992; ECCLES, 1995; GADD, 2004). A figura 2 mostra um esquema sobre os mecanismos de interação entre metais e células microbianas.



**Figura 2. Representação de interações entre metais e micro-organismos.**  
**Fonte: Birch; Bachofen (1990).**

As interações relacionadas à complexação são aquelas em que um agente, chamado complexante, se liga ao íon metálico no meio ambiente, com formação de um complexo, que através do transporte via membrana poderá realizar diferentes rotas. Para Bezerra, Takiyama e Bezerra (2009), as reações de complexação são as que têm maior significância, pois estão diretamente relacionadas com a geoquímica dos íons metálicos, podendo modificar a sua solubilidade, carga e potencial redox. Essas mudanças podem, ainda, influenciar a biodisponibilidade, transporte e migração dos metais nos ecossistemas aquáticos, por exemplo. A grande importância química dos agentes complexantes em sistemas biológicos se baseia na sua capacidade potencial de alterar o estado físico dos metais em solução (BIRCH; BACHOFEN, 1990).

Nem todas as espécies catiônicas podem ser acumuladas dentro das células, e quando é possível, o fenômeno vai depender da sua afinidade e especificidade. Além disso, comparativamente ao mecanismo de adsorção físico-químico, a remoção de íons metálicos pela acumulação intracelular é usualmente mais lenta que. Mas, em contrapartida, maiores quantidades de metal podem ser acumuladas (GADD, 2001).

## 2.5 FUNGOS E A BIODIVERSIDADE DE METAIS

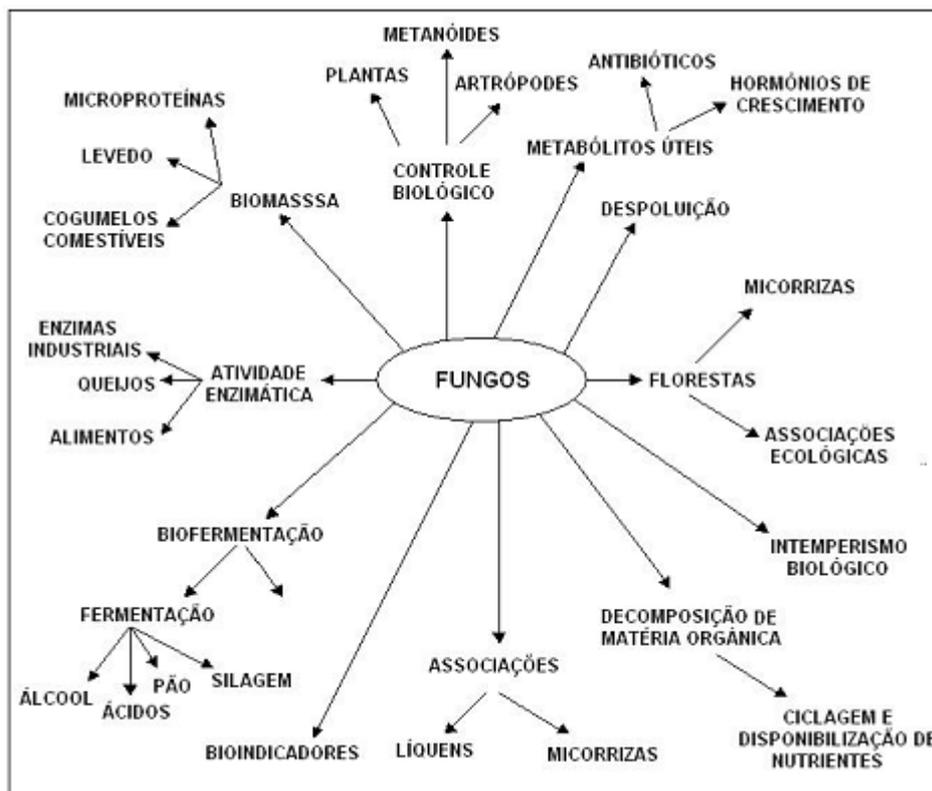
Mundialmente, já foram descritas mais de 99.000 espécies de fungos (KIRK *et al.*, 2008), das quais cerca de 13.800 foram também isoladas no Brasil, o que corresponde a aproximadamente 14% da biodiversidade global até recentemente descoberta (LEWINSOHN; PRADO, 2006)

Os fungos são ubíquos, o que permite que sejam isolados dos mais variados habitats em todo o planeta, na forma esporulada ou vegetativa, de vida livre ou em associação com algas (MAIA; JUNIOR, 2010). Na biosfera, a maior diversidade de fungos é encontrada no solo. Isto se deve ao fato de serem organismos heterotróficos e o solo, em geral, conter grande quantidade de matéria orgânica, tanto de origem animal quanto vegetal, tornando-se uma fonte inesgotável de nutrientes, própria para o desenvolvimento dos micro-organismos em geral, e em especial para os fungos (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1991; SILVEIRA, 1995).

No solo, os fungos se encontram desde a superfície até uma profundidade que varia de 15 a 20 cm. De fato, os fungos e as bactérias constituem a maioria da microbiota deste habitat; e, em se tratando de solos ácidos e ricos em matéria orgânica, o número de fungos pode ser bem maior do que o das bactérias (SILVEIRA, 1995).

Em 1957 foram catalogadas 690 espécies pertencentes a 170 gêneros de fungos oriundos do solo (GILMAN, 1957 *apud* ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1991). Desde então, muitas novas espécies fúngicas foram isoladas do solo, sendo os gêneros mais frequentemente encontrados: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Verticillium* (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1990; SILVEIRA, 1995).

Os fungos apresentam diversas características biológicas que os transformam em organismos de atividade indispensável no ambiente. A atenção dispensada a estes micro-organismos vem aumentando a cada ano, uma vez que são descobertos novos usos para sua biomassa ou produtos por eles gerados. A figura 3 mostra algumas das aplicações dos fungos nos mais variados setores.



**Figura 3. Principais benefícios proporcionados pelos fungos.**

Fonte: PUTZKE; PUTZKE (2002).

De acordo com a vasta literatura sobre o tema, fungos filamentosos e leveduras têm mostrado, ao longo dos anos, excelentes características biossorbitivas. Estes micro-organismos possuem, entre outras vantagens, alta velocidade de reprodução, e síntese de elevada quantidade de material celular (biomassa), bem como podem ser manipulados geneticamente, o que pode intensificar o seu poder de biossorbção. Adicionalmente, considerando o intensivo emprego de fungos em bioprocessos industriais, poder-se-ia usar as biomassas fungicas por eles geradas como agentes biossorbentes, contribuindo para a sustentabilidade do planeta. Por exemplo, estes micro-organismos são utilizados na produção de ácidos orgânicos, como gálico, cítrico e kojik, como também de enzimas como amilases e lipases (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995). Segundo Waihung (1999), a utilização de biomassa residual na biossorbção de metais pode gerar um ganho nos rendimentos para a indústria, uma vez que reduz os custos relacionados com a disposição dos rejeitos sólidos.

Araújo e Lemos (2002) isolaram oitenta linhagens de fungos filamentosos de solo contaminado com 5% (m/m) de petróleo, das quais 75% apresentavam capacidade de degradar hidrocarbonetos. Os quatro gêneros preponderantes foram: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*.

Outro estudo mostrou a capacidade de cinco espécies fúngicas - *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Penicillium corylophilum*, *P. chrysogenum* e *Saccharomyces cerevisiae* – em remover metais pesados (FARIAS; LEMOS, 2008). Todas as linhagens foram potencialmente efetivas na bio sorção dos metais testados (cobre, zinco e manganês), destacando-se *A. versicolor*. Volesky e Holan (1995) e Kapoor e Viraraghavan (1995), também comprovaram a eficácia de algumas espécies fúngicas como *Rhizopus arrhizus*, *Absidia orchidis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nonatum*, *P. chrysogenum* e *Saccharomyces cerevisiae* na remoção de metais como urânio, tório, chumbo, ouro, cobre e cádmio, entre outros, de efluentes contaminados.

Price, Classem e Payne (2001), trabalhando com rejeito líquido da suinocultura, contendo elevados teores de cobre e zinco, observaram que os metais podiam ser acumulados em níveis fitotóxicos em solos utilizados na agricultura. No estudo, *Aspergillus niger* foi apontado como o de maior potencial de bio sorção.

No estudo de López e Vázquez (2003), uma linhagem de *Trichoderma atroviride*, obtida de uma usina de tratamento de água, localizada em Madrid (Espanha), foi usada pela sua capacidade de captação de metais pesados e pela sua potencial tolerância a cobre, zinco e cádmio. Foi mostrado que esse fungo é capaz de sobreviver em altas concentrações de metais, aparentemente, como resultado da seleção natural de células resistentes. O crescimento do fungo e o potencial de captação foram avaliados para um único cátion, bem como para combinações de dois ou três elementos, de modo a estabelecer as interações sinérgicas e antagônicas.

A remediação de metais pesados de solos, águas de superfície e subterrâneas pode ser mais efetiva pelo emprego de biossurfactantes de origem microbiana (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Prata, Lemos e Barros (2008) determinaram a capacidade produtiva de linhagem de *P. corylophilum* na síntese de substância com propriedade tensoativa. Em função do baixo índice de emulsificação, de apenas 5,5%, e da redução da tensão

superficial da água de 72 mN/m para 31,4 mN/m, foi sugerido ser o biossurfatante um glicolípido ou um lipopeptídeo.

O cenário apresentado permite indicar o uso de micro-organismos, especialmente de fungos filamentosos, como alternativa no tratamento de áreas impactadas com metais pesados. Como também é possível indicar, dentre as inúmeras espécies de fungos existentes, o emprego das espécies do gênero *Penicillium*, em particular *P. corylophilum*, como agente biorremediador. Fungos do gênero *Penicillium*, pertencentes à família Trichocomaceae e ao filo Ascomycota, estão amplamente distribuídas no ambiente. No caso específico de *P. corylophilum*, foi relatado seu isolamento de material em decomposição, solo, grãos de cereais e ambientes com baixa umidade (SILVA *et al.*, 2006)

O levantamento bibliográfico realizado deixa patente a importância da busca por estratégias que possibilitem a regeneração de áreas contaminadas com metais pesados. A adoção de medidas é do interesse da sociedade civil, do governo, e de várias indústrias que estão engajadas a propostas mais sustentáveis.

## Capítulo 3: Materiais e Métodos

---

### 3.1 MICRO-ORGANISMO

Foi utilizada a linhagem do fungo *Penicillium corylophilum* CCFIOC 4297, isolada de solo contaminado pela Dra Liliana Solórzano Lemos e que atualmente pertence à Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, RJ, sob a coordenação da Dr<sup>a</sup> Maria Inez de Moura Sarquis, onde está sendo mantida na forma liofilizada (Figura 4).

Estudos prévios realizados sob a orientação da Dra Liliana Lemos no CETEM revelaram a capacidade desta cultura fúngica como biossorvente de metais.



**Figura 4. Linhagem liofilizada do fungo *Penicillium corylophilum*.**

### 3.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA

Culturas estoques da linhagem fúngica foram mantidas no laboratório por subcultivos mensais em tubos de ensaio contendo o meio Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado, conforme recomendado pela Coleção de Cultura CCFF. Após sete dias de incubação em estufa a 30°C, a cultura era preservada em geladeira a cerca de 4°C.

### 3.3 PREPARO DO INÓCULO

Para ativação e propagação do micro-organismo, esporos da cultura estoque (item 3.2), de no máximo 30 dias, foram semeados em meio BDA, distribuído em garrafas de Roux. Para tanto, os esporos de 3 tubos de ensaio foram suspensos em 30 mL de água destilada estéril, dos quais 10 mL foram distribuídos sobre os meios solidificados nas garrafas com o auxílio de esferas de cristal previamente esterilizadas em autoclave a 1 atm por 30 min. Todo o procedimento foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar.

Após 7 dias de incubação em estufa a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , os esporos de três garrafas foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de água estéril, que a seguir foi disposto em agitador rotatório (Controlled Enviromental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co, EUA), a 150 rpm e  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 min., com o propósito de dispersar os esporos. De modo a facilitar a dispersão dos esporos na água, foi adicionado 0,5 mL de Tween 80 à água antes da autoclavação.

A seguir, alíquotas retiradas da suspensão de esporos apropriadamente homogeneizada, foram convenientemente diluídas, e dispostas em câmara de Neubauer para contagem dos esporos. O valor médio de três contagens distintas foi utilizado no cálculo do volume de suspensão a ser empregado nos ensaios de bio-sorção. Este procedimento teve como propósito padronizar as concentrações iniciais de esporos específicas em cada ensaio.

### 3.4 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

#### 3.4.1 Meios de cultura

##### 3.4.1.1 Meio Batata Dextrose Agar (BDA)

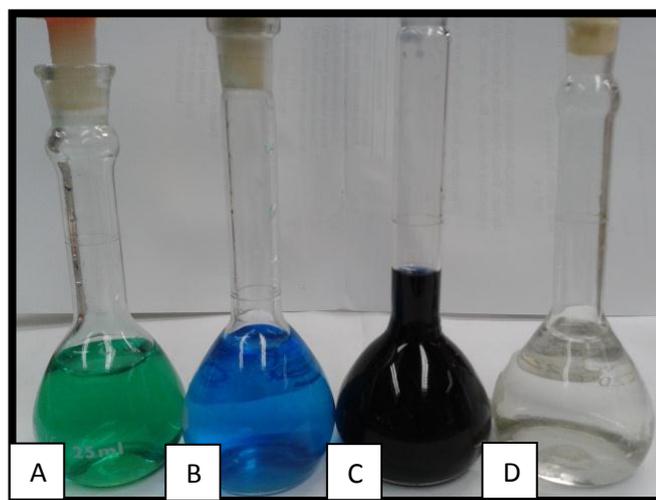
O meio de cultura utilizado para obtenção de esporos foi o BDA, meio indicado para o crescimento de fungos, sendo dextrose a principal fonte de açúcar simples e batata a fonte dos demais nutrientes requeridos para suas funções metabólicas (SAI; TELES; AZEVEDO, 2012).

### 3.4.1.2 Meio Agar Sabouraud

Este foi o meio de cultura utilizado para desenvolvimento dos esporos em *pellets*, que foram empregados nos ensaios onde o micro-organismo foi testado na forma vegetativa.

### 3.4.2 Soluções de metais

Para as soluções de metais, inicialmente foi preparada uma solução concentrada de cada um de acordo com o peso de cada composto, utilizando os reagentes metálicos na forma de cloreto, no caso do níquel e de sulfatos, no caso do cobre, zinco e cromo. As concentrações de cada reagente utilizadas para a preparação de 25 mL de solução concentrada foram: 4,02 g de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 4,4 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3,93 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 7,0 g de  $\text{CrSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . A partir destas soluções concentradas, foram retiradas alíquotas para uso nos ensaios de bioadsorção. A figura 5 apresenta as soluções de metais preparadas.



**Figura 5. Soluções de metais utilizadas nos experimentos [A – Níquel; B- Cobre; C – Cromo; e D- Zinco].**

### 3.4.2.2 Soluções de sais

Para os ensaios de avaliação do efeito do suprimento de fontes de nitrogênio, fósforo e enxofre, foram preparadas soluções concentradas individuais de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (200 g/L) e

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (200 g/L), que foram em seguida esterilizadas separadamente por filtração em membrana Millipore com 0,22 µm de porosidade, recolhidas em frascos estéreis e mantidas em geladeira a aproximadamente 5°C.

### 3.5 ETAPAS EXPERIMENTAIS

#### 3.5.1 Avaliação dos parâmetros de relevância para bioissorção de níquel por conídios de *P. corylophilum*

Todos os ensaios foram realizados em escala de bancada, em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL da solução aquosa de níquel constituída de distintas concentrações de níquel, de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, e de sacarose de acordo com planejamento experimental, detalhado mais adiante (item 3.5.1.1).

As soluções foram preparadas, inicialmente, em béqueres graduados de 200 mL, contendo 90 mL de água destilada, na qual foram dissolvidas as quantidades específicas de cada constituinte. Em seguida, o pH foi aferido e ajustado para os valores previamente definidos com 0,1M HCl ou 0,1M NaOH, conforme o caso. As soluções foram então transferidas para balões volumétricos e seu volume aferido para 100 mL com água destilada. A seguir, as soluções foram autoclavadas a 121°C por 20 min. e acondicionadas no escuro sob-refrigeração até o momento do uso.

Uma vez inoculada, conforme o planejamento experimental, as soluções foram incubadas em agitador rotatório a 150 rpm e 30°C em diferentes períodos de tempo (Figura 6).



**Figura 6. Imagens dos frascos Erlenmeyers contendo as soluções de níquel e conídios dispostos em agitador rotatório para avaliação da biossorção.**

Após o tempo previsto para cada condição ensaiada, todo o volume contido em cada frasco foi filtrado à vácuo em membrana Millipore de 3,0  $\mu\text{m}$  de porosidade, de modo a separar a biomassa. Alíquotas das soluções filtradas, livres de biomassa, foram recolhidas e enviadas para análise da concentração final de níquel pelo método de Espectrometria de Absorção Atômica (EAA).

A biomassa retida na membrana foi quantificada pela técnica de peso seco. Com os dados obtidos, pode-se calcular o valor de “q”, ou seja, a quantidade de metal adsorvido por grama de biomassa, através da equação 1 (MOREIRA, 2007; CALFA; TOREM, 2004). Assim, foi possível comparar a remoção do metal em relação ao percentual e a remoção em mg/g.

$$q = \frac{V \times (C_i - C_f)}{M} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

q – Quantidade de metal adsorvido por grama de biomassa (mg/g)

V – Volume da solução contendo o metal (L)

Ci – Concentração inicial de metal (mg/l)

Cf – Concentração final de metal (mg/l)

M – Massa da biomassa (g)

Na figura 7 está representado o esquema simplificado adotado nesta etapa do trabalho.

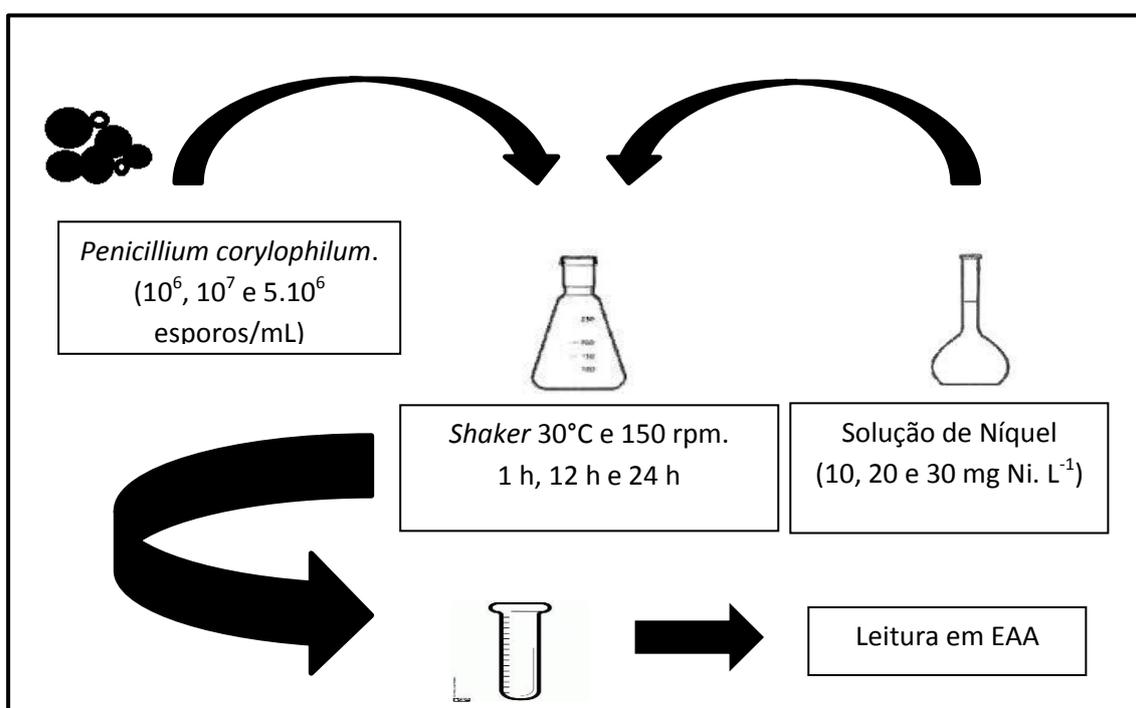


Figura 7. Esquema simplificado do procedimento adotado para avaliação da biossorção de níquel por *P. corylophilum* segundo planejamento experimental Plackett & Burman. Fonte: Adaptado de PALLU (2006).

### 3.5.1.1 Delineamento experimental

Os testes realizados neste trabalho foram baseados no planejamento experimental P&B (Plackett & Burman). Este tipo de análise ocorre de maneira sequencial e apresenta como grande vantagem a possibilidade de análise de grande número de variáveis sem, contudo, gerar grande quantidade de experimentos.

Em um primeiro momento foram avaliadas sete variáveis (Tabela 5) com a finalidade de verificar a influência – significativa ou não – de cada uma delas. Este planejamento consistiu em 12 ensaios com três pontos centrais, não havendo, portanto, a necessidade de realização de duplicatas. Os ensaios foram realizados de modo aleatório.

A matriz dos experimentos realizados através do planejamento Plackett & Burman (P&B12) se encontra na tabela 4. Nela constam, de acordo com a disposição dos níveis, as especificidades de cada ensaio.

**Tabela 4. Matriz de experimentos do planejamento Plackett & Burman**

Ensaio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> (g)	Sacarose (g)	Tempo (h)	[Níquel] (mg)	pH	[Biomassa]
1	+	-	-	+	-	-	+
2	+	+	+	-	-	-	-
3	-	+	-	+	+	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-
5	+	+	+	-	+	-	+
6	+	+	-	+	+	+	-
7	-	+	+	+	-	+	+
8	-	-	+	+	+	-	+
9	-	-	+	-	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

A Tabela 5 mostra as concentrações correspondentes a cada variável para cada nível do planejamento fatorial P&B12, bem como o tempo e pH, e seus respectivos níveis.

**Tabela 5. Níveis das variáveis ensaiadas no planejamento Plackett & Burman**

Parâmetro	-1	PC	+1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	0,5	1	1,5
MgSO <sub>4</sub> (g)	0,5	1	1,5
Sacarose (g)	0	5g	10
Tempo (h)	1	12	24
Níquel (mg)	10	20	30
pH	2	4	6
Biomassa (conídios/mL)	10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>

As variáveis resposta foram a concentração final de níquel, a variação do pH e a concentração de açúcar consumido.

Alguns parâmetros foram fixados baseados em publicações científicas específicas sobre o tema, a saber, a agitação e a temperatura foram fixadas e controladas em 150 rpm e 30°C, respectivamente (PALLU, 2006; COLLA, 2012).

### 3.5.2 Análise comparativa da remoção de Ni por formas esporulada e vegetativa

#### 3.5.2.1 Formação de *pellets*

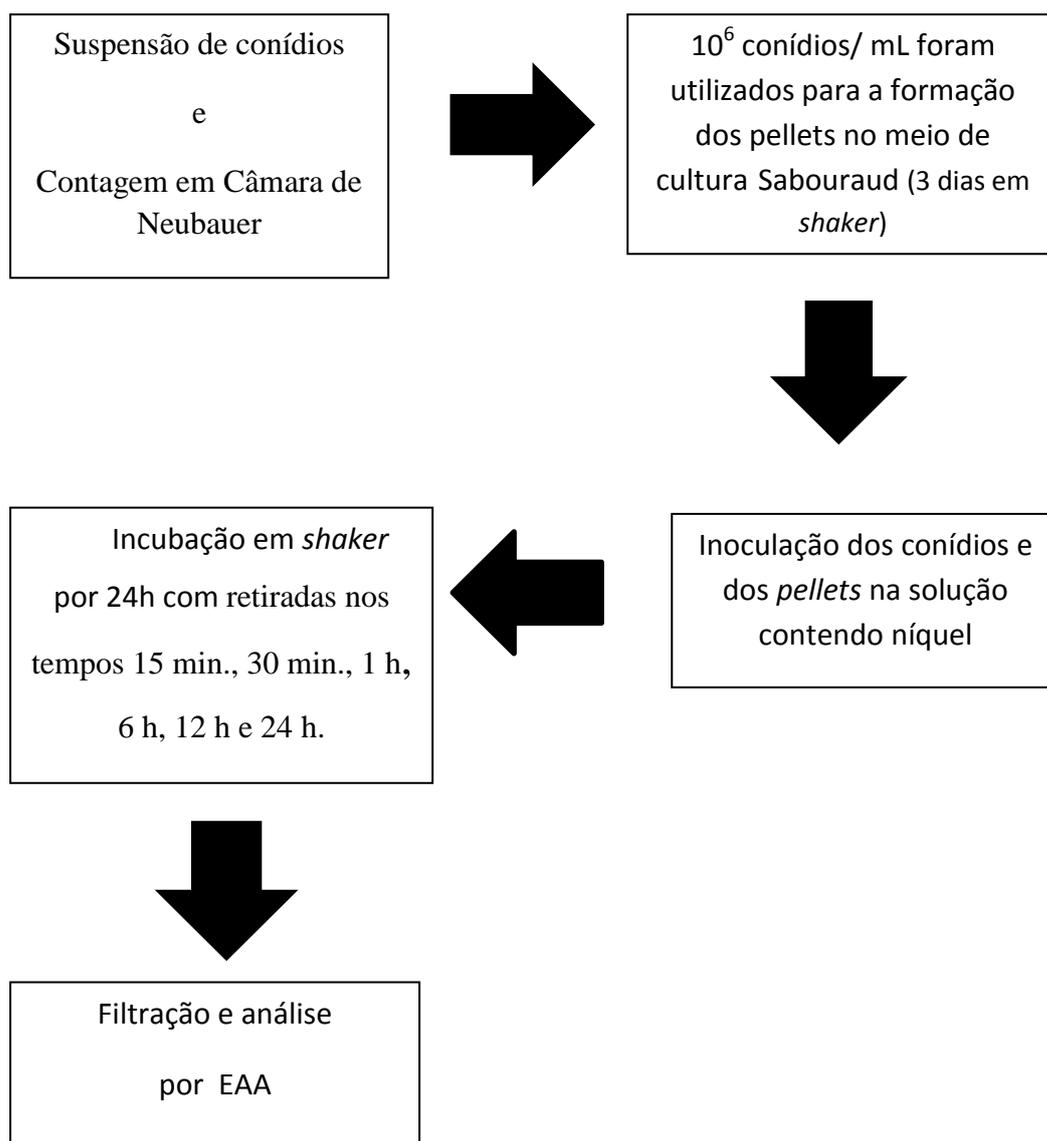
O objetivo desta análise foi o de determinar o tempo necessário para a formação de *pellets*. Para esta análise foram utilizados frascos Erlenmeyers com meio de cultura Sabouraud, onde foram armazenados em *shaker* à 30° C e 150 rpm. O tempo total de contato foi de três dias, com observações diárias. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 3.5.2.2 Ensaios de bioadsorção com *pellets* e conídios

A proposta deste experimento foi estabelecer em qual condição o fungo apresentaria uma melhor capacidade de remoção dos metais, se na forma esporulada (conídios) ou vegetativa (*pellets*).

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, foi padronizada para inóculo uma concentração inicial de  $10^6$  conídios/mL ou *pellets* produzidos a partir do cultivo prévio de  $10^6$  conídios/mL em 100 mL de caldo Sabouraud. Antes do emprego, os *pellets* foram separados do caldo por centrifugação, garantida a técnica asséptica, e rinsados com água destilada estéril. As demais condições foram: 30 mg/L de níquel; pH 6,0; e nenhuma adição de nutrientes. O tempo total de contato foi de 24 h, com retiradas com 15 min., 30 min., 1h, 6 h, 12 h e 24 h, quando foi feita a separação da biomassa por processo de filtração conforme descrito no item 3.5.1, sendo o filtrado enviado para a análise de EAA.

O diagrama de quadros apresentado a seguir esquematiza os procedimentos adotados nesta etapa (Figura 8).



**Figura 8. Diagrama de quadros com a descrição do ensaio realizado para avaliação do emprego de conídios e pellets na biossorção de níquel.**

### 3.5.3 Avaliação da biossorção de diferentes metais pesados por conídios

#### 3.5.3.1 Teste em sistemas competitivos

A proposta deste ensaio foi verificar o comportamento do fungo quanto à taxa de sorção de metais em conjunto. As concentrações dos metais foram mimetizadas em laboratório a fim de simularmos o tratamento de um efluente verdadeiro. Para tanto, foi adotada como composição base a de um efluente real de uma indústria de galvanoplastia (Tabela 6), segundo trabalho publicado por Costa, Schneider e Rubio (2000). Os metais

utilizados nesta etapa foram cobre, cromo e zinco, além do níquel, sendo as concentrações dos metais estabelecidas de acordo com as concentrações médias do efluente real mimetizado.

**Tabela 6. Composição média de efluentes de indústrias de Galvanoplastia**

<b>Parâmetros</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Temperatura (°C)	25	20	28
Cianeto (mg/L)	16,3	0,026	53
Cobre (mg/L)	12,9	0,1	52,5
Cromo VI (mg/L)	5,4	0,018	26,6
Cromo total (mg/L)	13,8	0,14	62,5
Ferro (mg/L)	10,1	0,5	42,8
Níquel (mg/L)	9,94	0,05	44,5
Óleo e graxas (mg/L)	98	1,0	868
pH	5,68	1,6	9,5
Resíduo não filtrável (mg/L)	473	8	2450
Resíduo sedimentável (mg/L)	1,98	0,1	8,5
Sulfato (mg/L)	107	12	650
Zinco (mg/L)	22,3	0,16	260

Fonte: CETESB/SP *apud* Costa, Schneider e Rubio (2000).

Em um primeiro momento procurou-se testar a interação entre o níquel e um dos outros metais. Sendo assim, foram preparados os seguintes sistemas binários: Ni e Cu, Ni e Cr e Ni e Zn. Também foi testado o comportamento do fungo para um sistema quaternário contendo uma combinação dos quatro metais em associação.

Todos os sistemas foram ensaiados sem e com adição de sais de nitrogênio, fósforo e enxofre, sendo todos realizados em triplicata. De sorte que, os resultados foram expressos em valores médios.

O preparo das soluções foi feito de acordo com o item 3.4.2. O pH das soluções foi ajustado para 5,7 conforme descrito na tabela acima e o tempo total de contato foi de 24h.

### 3.5.3.2 Teste em sistemas não competitivos

Foram realizados testes com todos os metais em soluções individuais, com o intuito de comparar a taxa de rendimento do fungo para cada metal individualmente. As condições dos experimentos foram idênticas ao do item 3.5.3.1, exceto pelo fato de não haver combinações de metais.

## 3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 3.6.1 Contagem de esporos

A contagem foi feita em microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer (VIEIRA *et al.*, 1979). Com este fim, amostras da suspensão de conídios foram convenientemente diluídas de modo a permitir uma contagem total entre 200 e 300 unidades no volume de 1 mm<sup>3</sup> correspondente aos 25 quadrantes centrais da câmara (SIMON; CAYE-VAUGEN; BOUCHONNEAU, 1993).

### 3.6.2 Concentração de açúcar

Nos ensaios realizados com sacarose, de acordo com o planejamento experimental (item 3.5.1), foram determinadas as concentrações iniciais e finais da fonte de carbono, para cálculo do açúcar consumido pela biomassa. O intuito era analisar se a presença da fonte de carbono influenciava a capacidade do micro-organismo em biossorver o metal.

Foi utilizado o método de Somogyi-Nelson, cujo princípio se baseia na redução de Cu<sup>++</sup> a Cu<sup>+</sup> pelos açúcares redutores (glicose e frutose), produtos gerados a partir da hidrólise da sacarose, com formação de Cu<sub>2</sub>O, que reduz o arsenomolibdato e produz um composto de coloração azul (EMBRAPA, 2013). Tendo em vista que a sacarose não é um açúcar redutor para emprego desta metodologia há necessidade de ser realizada a hidrólise da amostra antes de ser efetuada a análise. Para tanto, 1 mL da amostra deve ser acrescido de igual volume de 0,2M de HCl e logo a seguir colocado em banho a 65-70°C. Decorridos 10 min., a amostra deve ser resfriada para só então dar início ao protocolo analítico.

### 3.6.3 pH

As medições do pH foram realizadas logo após o término do período de tempo previsto para cada ensaio. As análises foram realizadas em potenciômetro digital (QUIMIS, modelo Q400AS).

### 3.6.4 Espectrometria de Absorção Atômica (EAA)

A determinação da biossorção do níquel pelo fungo foi realizada através do método de espectrometria de absorção atômica na Coordenação de Análises Mineraias (COAM) nas dependências do CETEM - Centro de Tecnologia Mineral.

Esta técnica tem sido amplamente utilizada para determinação e identificação de íons metálicos em diferentes tipos de amostras, tanto sólidas quanto líquidas, por ser considerado um método qualitativo e quantitativo bastante preciso. Outras vantagens deste método são a rapidez, a elevada seletividade e os custos relativamente moderados (MUSTRA, 2009).

## Capítulo 4. Resultados e Discussão

---

### 4.1 Influência dos parâmetros de cultivo na remoção de Ni por conídios de *Penicillium corylophilum* CCFIOC 4297

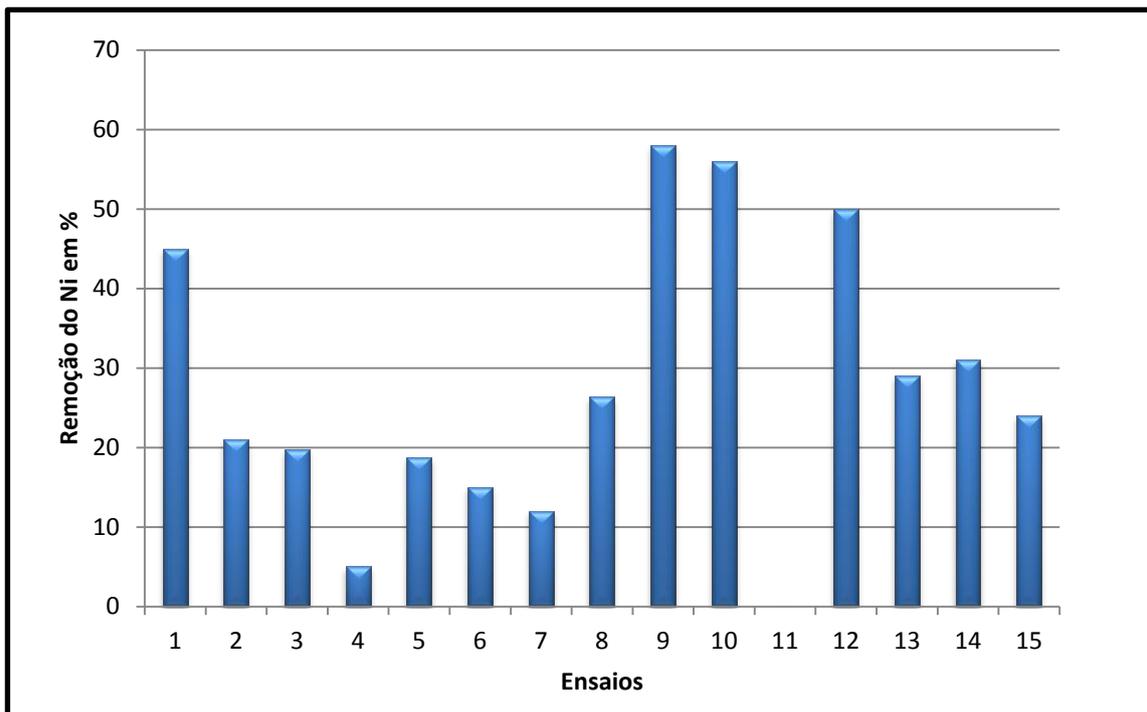
Inicialmente, foi empregado o delineamento experimental de Plackett & Burman (P&B) para avaliação da influência de oito fatores: concentrações de biomassa, de sacarose, dos sais minerais  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$ , e de níquel e, ainda, pH e tempo, na bio sorção de níquel pelo fungo filamentosos. Os fatores foram estimados em dois níveis correspondendo a doze ensaios, e mais três repetições no ponto central, totalizando quinze ensaios. Na tabela 7 foram compilados os dados da matriz P&B, bem como os valores obtidos referentes às variáveis resposta, que incluem a remoção do níquel, consumo de sacarose e variação do pH.

A partir dos dados referentes às concentrações iniciais e finais de níquel em solução aquosa sintética foram calculados os valores de remoção percentual, que podem ser visualizados na tabela 7 e na figura 9. A análise da figura permite inferir que a linhagem *P. corylophilum* CCFIOC 4297 é capaz de remover níquel, embora a taxa de bio sorção tenha variado de acordo com as condições do ensaio. À exceção do ensaio 11, onde a remoção de níquel foi nula, o percentual de remoção do metal variou de 5% (ensaio 4) a 56-58% (ensaios 10 e 9, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos por Martins (2009) ao utilizar oito espécies de *Penicillium* (*P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosun*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*) isoladas de solo. O autor alcançou máximos de remoção de 41,8% para chumbo e 34,3% para cromo pelo emprego de conídios em mistura binária dos metais. Já Ianis, Tsekova e Vasileva (2006) conseguiram melhores resultados para remoção de cobre (75%) pelo emprego de *P. cyclopium*.

**Tabela 7. Matriz do planejamento Plackett & Burman para avaliação de 7 fatores na remoção de níquel pela linhagem *P. corylophilum* CCFIOC 4297**

Ensaio	Parâmetros							Respostas		
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	MgSO <sub>4</sub> (g/L)	Sacarose (g/L)	Tempo (h)	Níquel* <sup>1</sup> (mg/L)	pH inicial	Biomassa (esp./mL)	Níquel* <sup>2</sup> (mg/L)	Consumo sacarose (g/L)	pH final
<b>1</b>	1,5	0,5	0	24	10	2	10 <sup>7</sup>	5,5	-	2,5
<b>2</b>	1,5	1,5	10	1	10	2	10 <sup>6</sup>	7,9	0,7	2,2
<b>3</b>	0,5	1,5	0	24	30	2	10 <sup>6</sup>	24,1	-	2,1
<b>4</b>	1,5	0,5	10	24	10	6	10 <sup>6</sup>	9,5	0,8	5,5
<b>5</b>	1,5	1,5	10	1	30	2	10 <sup>7</sup>	24,4	1,7	1,9
<b>6</b>	1,5	1,5	0	24	30	6	10 <sup>6</sup>	25,5	-	6,0
<b>7</b>	0,5	1,5	10	24	10	6	10 <sup>7</sup>	8,8	3,4	5,5
<b>8</b>	0,5	0,5	10	24	30	2	10 <sup>7</sup>	22,1	0,1	1,9
<b>9</b>	0,5	0,5	10	1	30	6	10 <sup>6</sup>	12,6	1,1	5,9
<b>10</b>	1,5	0,5	0	1	30	6	10 <sup>7</sup>	13,2	-	6,0
<b>11</b>	0,5	1,5	0	1	10	6	10 <sup>7</sup>	* <sup>3</sup>	-	6,1
<b>12</b>	0,5	0,5	0	1	10	2	10 <sup>6</sup>	5,0	-	1,4
<b>13</b>	1	1	5	12	20	4	5x10 <sup>6</sup>	14,2	1,6	3,2
<b>14</b>	1	1	5	12	20	4	5x10 <sup>6</sup>	13,8	1,4	3,1
<b>15</b>	1	1	5	12	20	4	5x10 <sup>6</sup>	15,2	1,3	3,2

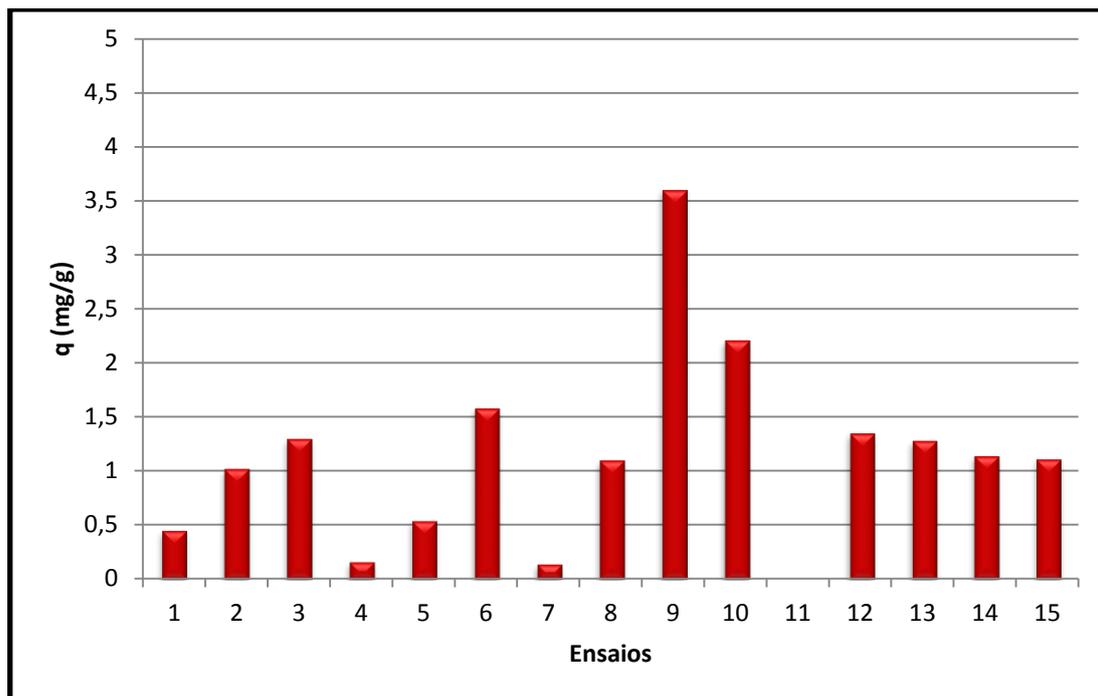
\*<sup>1</sup> Concentração inicial; \*<sup>2</sup> Concentração final em solução; \*<sup>3</sup> Não houve remoção.



**Figura 9. Remoção percentual de níquel pelo fungo *P. corylophilum* CCFIOC 4297, segundo dados gerados pelo planejamento experimental P&B.**

Particularmente para a biossorção de níquel por fungos filamentosos, foi encontrado o trabalho científico realizado por Dias *et al.* (2002) com biomassa de *Aspergillus terreus*, imobilizada em poliuretano, para tratamento de efluente de indústria metalúrgica. Em comparação ao nosso estudo, o autor obteve melhores resultados, sendo os percentuais de remoção de 85% para cromo e de 90% para níquel, embora deva ser ressaltado que o tempo de ensaio foi de 6 dias.

A quantidade de metal adsorvido foi também relacionada à quantidade de biomassa (valor de  $q$ ) de acordo com a equação 1 (item 3.5.1). Os valores de  $q$ , isto é, massa (mg) de metal removido por massa (g) de micro-organismos, foram plotados na figura 10. O valor máximo de  $q$  de 3,60 mg/g correspondeu ao ensaio 9, o que comparativamente à figura 9 permite definir este parâmetro como mais indicado para analisar o comportamento do fungo no processo de adsorção.



**Figura 10. Comportamento da biomassa na remoção de níquel (Valor de q: mg do metal por g de biomassa).**

Ainda de acordo com a tabela 7, pode-se observar que, de uma maneira geral, nos ensaios com adição de sacarose, o consumo deste substrato foi baixo, variando de 1% a 30,4% (ensaio 7). A correlação entre a remoção percentual de níquel e o consumo da fonte de carbono pode ser melhor analisada na figura 11. Nota-se que a remoção do metal foi independente do consumo de substrato, indicando não ser a captação do metal pelo fungo condicionada à atividade metabólica.

Segundo Franco *et al.* (2004), a adsorção de íons metálicos ocorre sem que haja necessariamente qualquer atividade metabólica por parte da célula, sem gasto energético, constituindo-se em um processo passivo. Neste caso, forças eletrostáticas seriam as responsáveis pela aderência destes íons à superfície celular.

Pallu (2006), em trabalho realizado com biomassa micelial (viva e morta) de *Aspergillus* sp. para a remoção de cádmio, demonstrou que as funções fisiológicas da biomassa não interferem de modo significativo no processo de biossorção. O autor sugere que o fenômeno estaria mais associado à mecanismos envolvendo a parede celular (adsorção) do que à transporte ativo envolvendo a membrana ou o metabolismo da célula.

Analisando ainda a figura 11, constata-se que os maiores consumos de sacarose foram determinados nos ensaios realizados com o menor teor de fosfato, a maior concentração inicial de sacarose e pH inicial de 6,0. Logo, o consumo de substrato não foi influenciado pela concentração inicial de conídios e tampouco pelo tempo de processo.

Além disso, se for considerado que a segunda melhor remoção de níquel foi alcançada no ensaio 10, que não recebeu a fonte de carbono, pode-se concluir que a biossorção deste metal independe da germinação dos conídios. Portanto, o processo de biossorção pode ser eficientemente conduzido pelo emprego de conídios. Esta conclusão é corroborada por Damasceno *et al.* (2007) que avaliaram a biossorção de metais pelo emprego de conídios de *Aspergillus niger* no tratamento de efluente da indústria petroquímica. Na ausência de substrato, a remoção foi de 54% em 12 h.

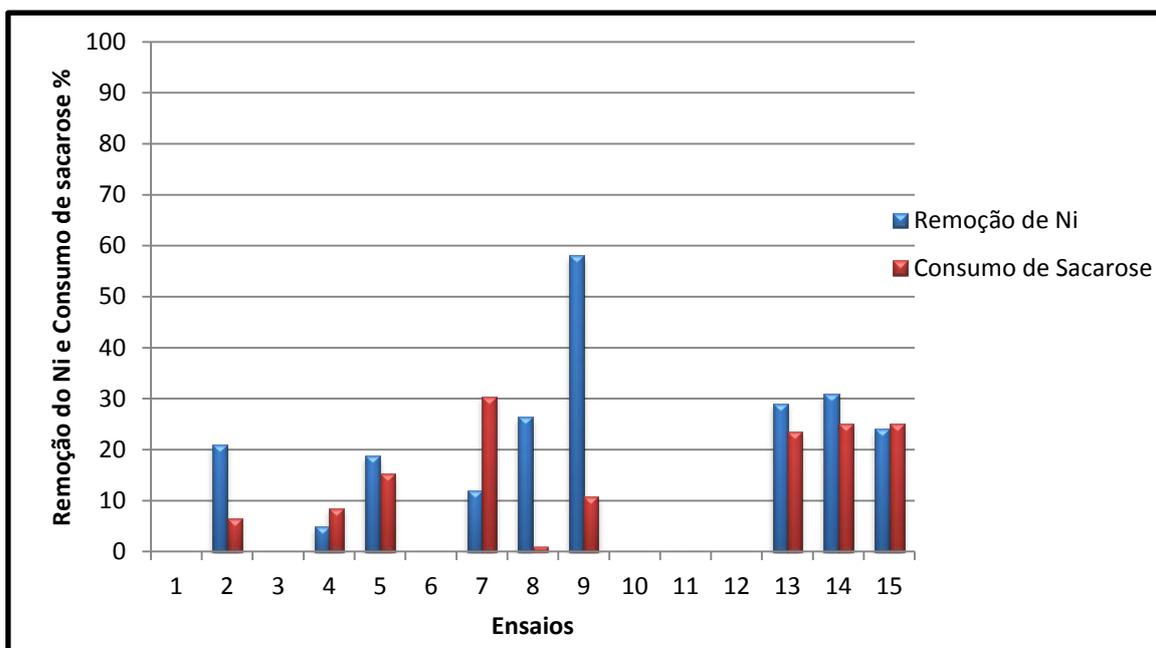
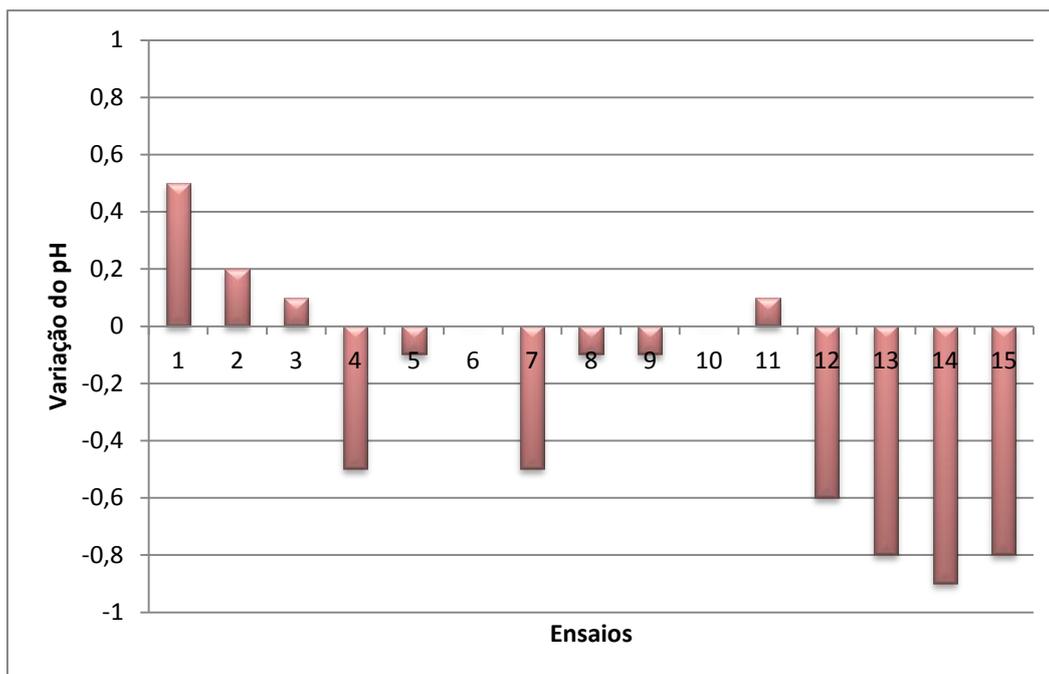


Figura 11. Relação entre a remoção de níquel e o consumo de sacarose nos ensaios realizados conforme planejamento P&B12.

No presente estudo fica claro que o fungo não depende do substrato para realizar a biossorção, caracterizando assim, um processo passivo de remoção. Desta maneira, pode-se supor que o processo predominante de biossorção realizado por *P. corylophilum* CCFIOC 4297 foi a adsorção.

Nas condições dos ensaios 9 e 10 (Tabela 7), onde foram obtidos os valores máximos de remoção de níquel, tem-se, em comum, o menor nível de sulfato de magnésio (0,5 g/L), o maior nível de níquel (30 g/L), o valor inicial de pH de 6,0 e o tempo de exposição de 1 h. Porém, cabe mencionar que no ensaio 12, onde a remoção do metal foi de 50%, o pH inicial era de apenas 2,0. Sabe-se que o valor de pH possui forte influência na taxa de remoção dos metais uma vez que está intimamente relacionado com a solubilidade dos mesmos em solução. Segundo Pino (2005), o pH é um dos fatores mais importantes no processo de remoção de metais pesados por biomassas microbianas, visto que, além de influenciar na solubilidade dos metais, também está relacionado com a sua especiação.

Na figura 12 foram plotados os valores referentes à variação do pH para cada um dos quinze ensaios realizados (Tabela 7). Podem ser observadas variações positivas e negativas variando de 4,5% a 28,5%. As maiores variações ocorreram quando o pH inicial foi ajustado em 4, enquanto para o pH 6 foram observadas as menores alterações. Ressalta-se que as melhores taxas de remoção foram alcançadas nos ensaios 9 e 10, onde o valor inicial de pH foi 6. Porém, em todos os valores de pH estudados houve decréscimo do teor de metal em solução, ao contrário do que é reportado por Pino (2005). Este autor, estudando diferentes valores de pH para a remoção de níquel por biomassa fúngica, concluiu que em valores de pH 3 ou 4, há um ligeiro incremento na biossorção, já em pH entre 4 e 6, a sorção ocorre de maneira constante e em pH entre 6 e 8 há aumento na taxa de sorção do metal. O autor constatou ainda que a remoção cai rapidamente em valores de pH acima de 8, devido a precipitação do metal na forma de  $\text{Ni}(\text{OH})_2$ .



**Figura 12. Variação do pH nos ensaios realizados segundo planejamento P&B12.**

Em relação ao tempo de residência, os melhores resultados ( $\geq 50\%$  de bioadsorção) foram alcançados em apenas 1 h (ensaios 9, 10 e 12). Estes resultados indicam que 24 h é um tempo além do necessário para bioadsorção de níquel pelo emprego de conídios nas condições ensaiadas, mesmo quando estabelecidas as condições mínimas para germinação. Se por um lado, o tempo é um dos parâmetros de maior significância na bioadsorção de metais, por outro, dependendo da concentração do metal e do bioadsorvente, pode interferir negativamente no fenômeno por causar a saturação da biomassa.

Outros trabalhos também alcançaram bons índices de remoção em curto período de tempo. Alguns exemplos de bioadsorção por diversas biomassas fúngicas são descritos a seguir, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura científica quanto à capacidade da espécie fúngica empregada neste estudo (*P. corylophilum* CCFIOC 4297) em relação à bioadsorção.

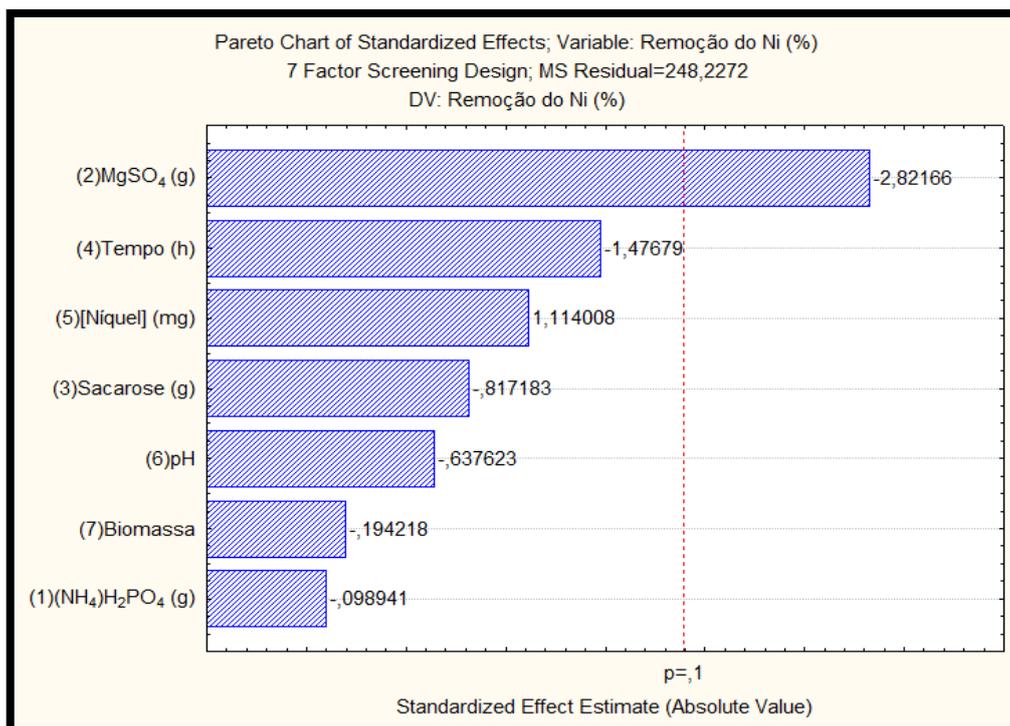
De acordo com Faryal, Lodhi e Hameed (2006), a bioadsorção de zinco por biomassa fúngica, empregada na forma de conídios, foi de 64,5% para *Aspergillus flavus* e 88% para *Aspergillus fumigatus* em 30 minutos. Elevados percentuais de remoção de chumbo também foram obtidos por Qazilbash *et al.* (2006) pelo emprego de *A. niger*, em *pellets*,

vivos e inativados. Os autores obtiveram 99,8% de remoção do chumbo com a biomassa morta em 80 minutos e 96,4% de remoção pela biomassa viva em apenas 30 minutos.

Em estudo utilizando biomassa micelial seca de diferentes linhagens de *Penicillium* spp., isoladas de solo, as taxas de bioadsorção de cobalto também foram altas em períodos curtos, aumentando de 78% em 15 min para 89% em 60 min. (PAL; GHOSH; PAUL, 2006). A potencialidade do emprego de fungos filamentosos na remoção de cromo de efluente da indústria de galvanoplastia também foi demonstrado por Kumar, Bishnoi e Bishnoi (2008). Após 60 minutos, foram alcançadas remoções de 87% a 91% pelo emprego de conídios de *A. niger*, *A. sydoni* e *P. janthinellum*.

A bioadsorção do íon cobre (II), em soluções aquosas sintéticas, usando biomassa seca do fungo *Pleurotus ostreatus* também ocorreu rapidamente (BURATTO; COSTA; FERREIRA, 2012). Estudo cinético conduzido com 3 mg/L do metal revelou remoção de 86% em 5 min., quando a biomassa atingiu 82% da sua capacidade de saturação.

A avaliação da influência dos fatores estudados tem respaldo na análise visual do gráfico de Pareto, o que por sua vez possibilita selecionar aqueles de relevância para melhoria do processo (Figura 13). A linha transversal pontilhada indica os fatores com significado estatístico para  $p=0,09$ , isto é, para o nível de 90% de confiança. Este é o valor recomendado quando se trata de processos que fazem uso de micro-organismos.

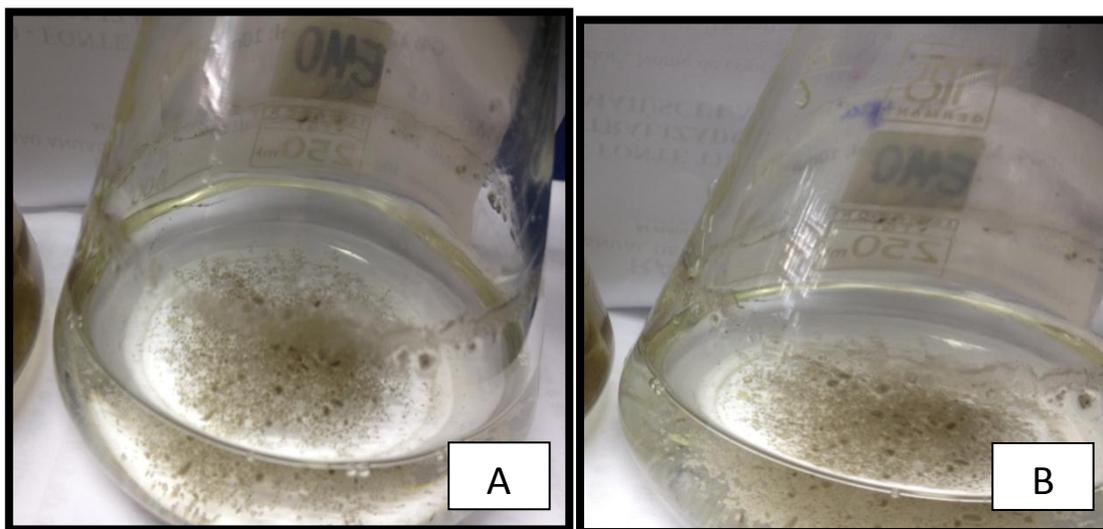


**Figura 13.** Gráfico de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a remoção de níquel por *P. corylophilum* CCFIOC 4297.

Analisando a figura 13, tem-se que o sal sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) foi o único, dentre os fatores avaliados no planejamento de experimentos P&B, que influenciou de forma estatisticamente significativa na biossorção de níquel por *P. corylophilum* CCFIOC 4297, com efeito estimado de aproximadamente 2,8. O sinal negativo significa que o aumento da resposta ocorre quando esta variável passa do nível +1 para o -1. Portanto, a biossorção é maior quando empregada a menor concentração de sulfato de magnésio.

No presente estudo, em geral, não foi visualizada germinação dos conídios em todos os ensaios realizados no tempo máximo de 24 h (ensaios 1, 3, 4, 6, 7 e 8). Conforme pode ser comprovado pela observação da figura 14, a presença de *pellets* foi constatada tão somente nos ensaios 4 e 7. Nestes dois ensaios houve a adição da fonte de carbono (sacarose), o valor de pH foi inicialmente ajustado em 6,0 e o tempo total de processo foi de 24 h. Tal fato ratifica a capacidade da biomassa fúngica de se desenvolver mesmo atendendo as exigências nutricionais mínimas e na presença de elementos de alta toxicidade.

Existem estudos que relatam a influência do pH no processo de transformação dos esporos em *pellets*. Segundo Pamboukiam (1997), o pH do meio altera as propriedades eletrostáticas da superfície dos esporos. Valores de pH baixos (entre 2 e 3) induzem a dispersão dos conídios, porém, valores de pH na faixa entre 5 e 6 favorecem a aglomeração de conídios e a formação de *pellets*.



**Figura 14.** Imagens dos ensaios 4 (A) e 7 (B) do P&B12 onde se visualiza a germinação de grande parte dos conídios com formação de pequenos pellets.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e dos compilados na literatura científica, pode-se concluir que os fungos e, em particular a espécie *P. corylophilum*, apresentam potencial para emprego na remoção de metais pesados, visando a descontaminação de áreas degradadas.

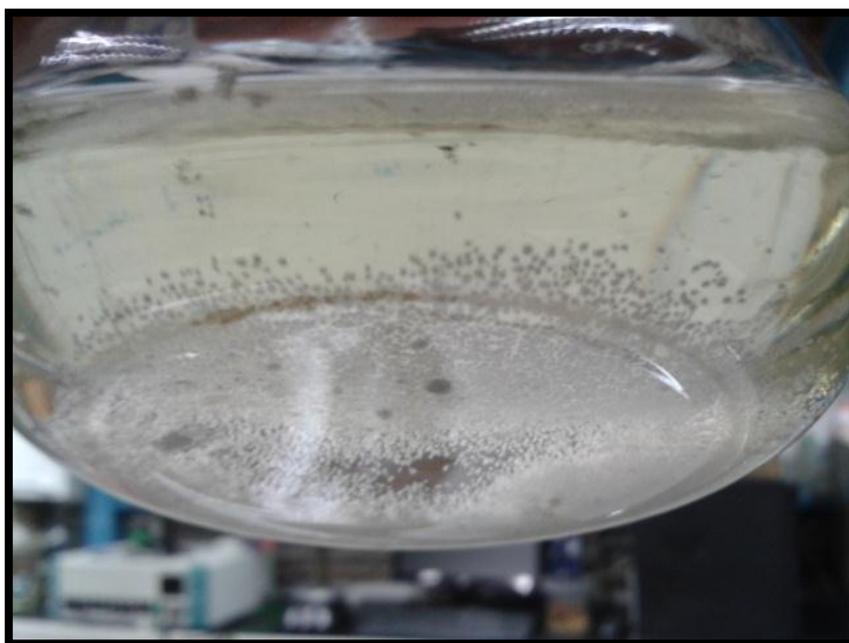
#### 4.2 Análise comparativa da remoção de níquel por *P. corylophilum* em forma esporulada e vegetativa

Este estudo teve como premissa definir a melhor estratégia para remoção de níquel quer pelo emprego da biomassa vegetativa (*pellets*), quer pelo emprego de conídios, já que os resultados obtidos na etapa anterior não foram conclusivos. Para tanto, foi necessário, primeiramente, estabelecer o tempo de cultivo dos conídios para que houvesse a formação de *pellets*.

Decorridas 24 h a partir da semeadura dos conídios no meio mínimo contendo 30 mg de Ni/L já foi possível visualizar a presença de inúmeros *pellets* bem pequenos, corroborando as observações feitas na etapa anterior. No dia seguinte, não mais se evidenciavam conídios, mas os *pellets* continuavam pequenos, conforme revela a figura 15. Transcorridas mais 24 h, o *pellets* ainda apresentavam tamanho similar. Provavelmente, os parâmetros estabelecidos para a realização dos ensaios, tais como a natureza e quantidade da fonte de carbono, sais minerais, velocidade de rotação do *shaker*, temperatura, entre outros, pode ter influenciado na germinação e no crescimento do fungo.

Estudo realizado por Pallu (2006) com linhagens de *Aspergillus* sp. sugere o tempo de 24 h como ideal para a formação de *pellets*.

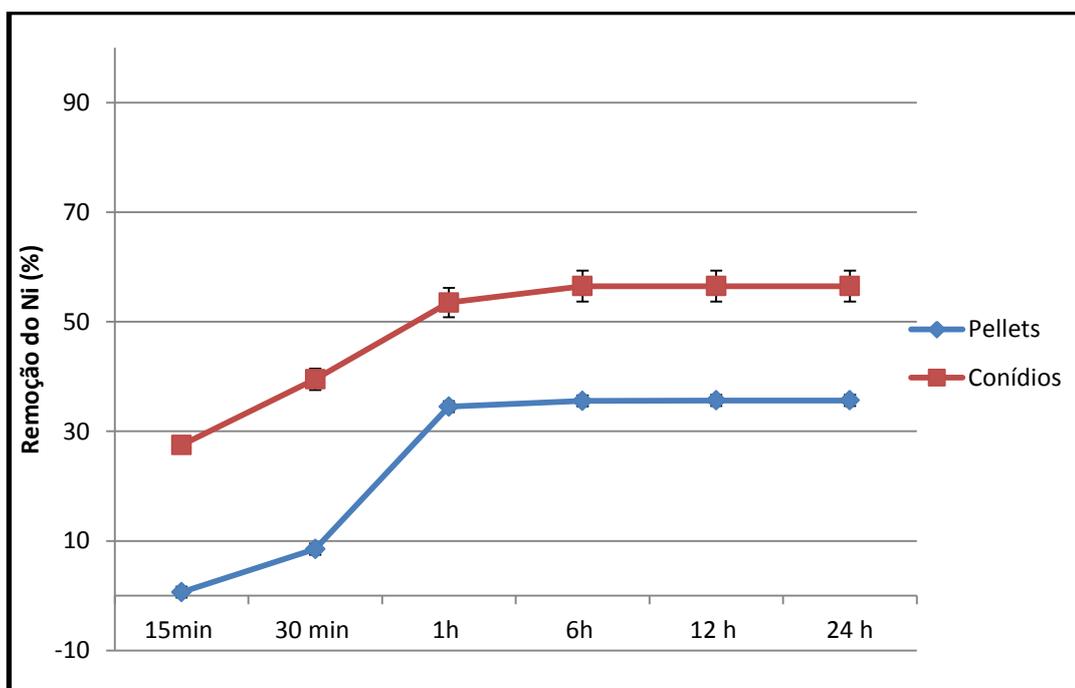
Neste contexto, para avaliação da remoção de níquel por *P. corylophilum* por conídios e *pellets*, foi então definida a obtenção de *pellets* a partir do cultivo de conídios por 48 h.



**Figura 15.** *Pellets* formados no segundo dia da semeadura de conídios de *P. corylophilum* em meio mínimo contendo 30 mg de Ni/L.

A figura 16 apresenta o monitoramento da remoção percentual de níquel, em solução aquosa, por conídios e por *pellets* durante 24 h. O perfil cinético foi similar para ambos, embora, comparativamente, o fungo na forma esporulada tenha apresentado melhor desempenho na remoção do metal no período monitorado, alcançando 28% de remoção em apenas 15 minutos de contato e chegando a um percentual máximo de remoção de cerca 57% em 12 h. Note-se que no tempo de contato de apenas 1 h, os conídios foram capazes de reduzir em 54% a quantidade de níquel em solução, enquanto pelo emprego de *pellets* a redução tenha sido de 35%.

Os resultados ratificam a capacidade da espécie fúngica *P. corylophilum* de sorver níquel em solução quer na forma esporulada quer na forma vegetativa. Além disso, a similaridade dos valores de remoção a partir de 1 h é indicativa de saturação da biomassa.



**Figura 16. Remoção de níquel em solução aquosa por *P. corylophilum*, formas vegetativa e esporulada CCFIOC 4297.**

Vários são os trabalhos que utilizam biomassa fúngica para sorção de metais. Na maioria dos casos, a biomassa fúngica é empregada na forma de *pellets* (Faryal *et al*, 2006; Martins, 2009; Pallu, 2006). Isto seria um modo de aumentar a superfície de contato e, por conseguinte, elevar a capacidade biossorbitiva. Adicionalmente, a peletização da biomassa se

caracteriza como uma forma natural de imobilização, que resultaria em inúmeros benefícios para o micro-organismo, tais como estabilidade e maior sobrevivência (BARROSO, 2006).

Por outro lado, o uso da biomassa na forma de conídios pode ser igualmente vantajoso, principalmente se considerado o custo do processo. Como desvantagens têm-se: tamanho reduzido das partículas, baixa resistência mecânica e dificuldade na separação da biomassa do meio líquido; que se contrapõem ao emprego de *pellets* (COVIZZI *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstraram a capacidade de conídios em bioissorver metais. Por exemplo, Celestino *et al.* (2009), utilizando conídios de *A. niger* para tratamento de efluente sintético contendo BTX, obtiveram percentuais de remoção do contaminante de 83%. Pires *et al.* (2010), também utilizando *A. niger* para tratamento do corante índigo alcançaram 94% de remoção em sete dias.

Em face do melhor desempenho dos conídios frente aos *pellets*, na continuidade dos experimentos, o fungo foi empregado na forma esporulada, posto que dessa maneira, o processo é menos trabalhoso e ainda possibilita reduzir o custo do tratamento, pois não haverá necessidade de germinação dos conídios e crescimento do fungo.

#### 4.3.1 Avaliação da bioissorção de metais pesados por conídios de *P. corylophilum*

##### 4.3.1.1 Testes em sistemas competitivos

Nesta etapa, os conídios de *P. corylophilum* CCFIOC 4297 foram ensaiados em soluções mistas, de modo a traçar um comparativo quanto à competitividade dos metais uma vez que a grande maioria dos efluentes industriais se encontra multicontaminada. Além disso, os ensaios foram conduzidos também na presença e ausência de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , visando reavaliar o efeito desses sais na bioissorção de níquel, tendo em vista que, nos ensaios anteriores, o segundo influenciou negativamente o processo.

Os resultados referentes às misturas binárias Ni-Cu, Ni-Cr, Ni-Zn encontram-se na figura 17 (A, B e C), assim como os resultados referentes à combinação dos quatro metais (figura 17 D).

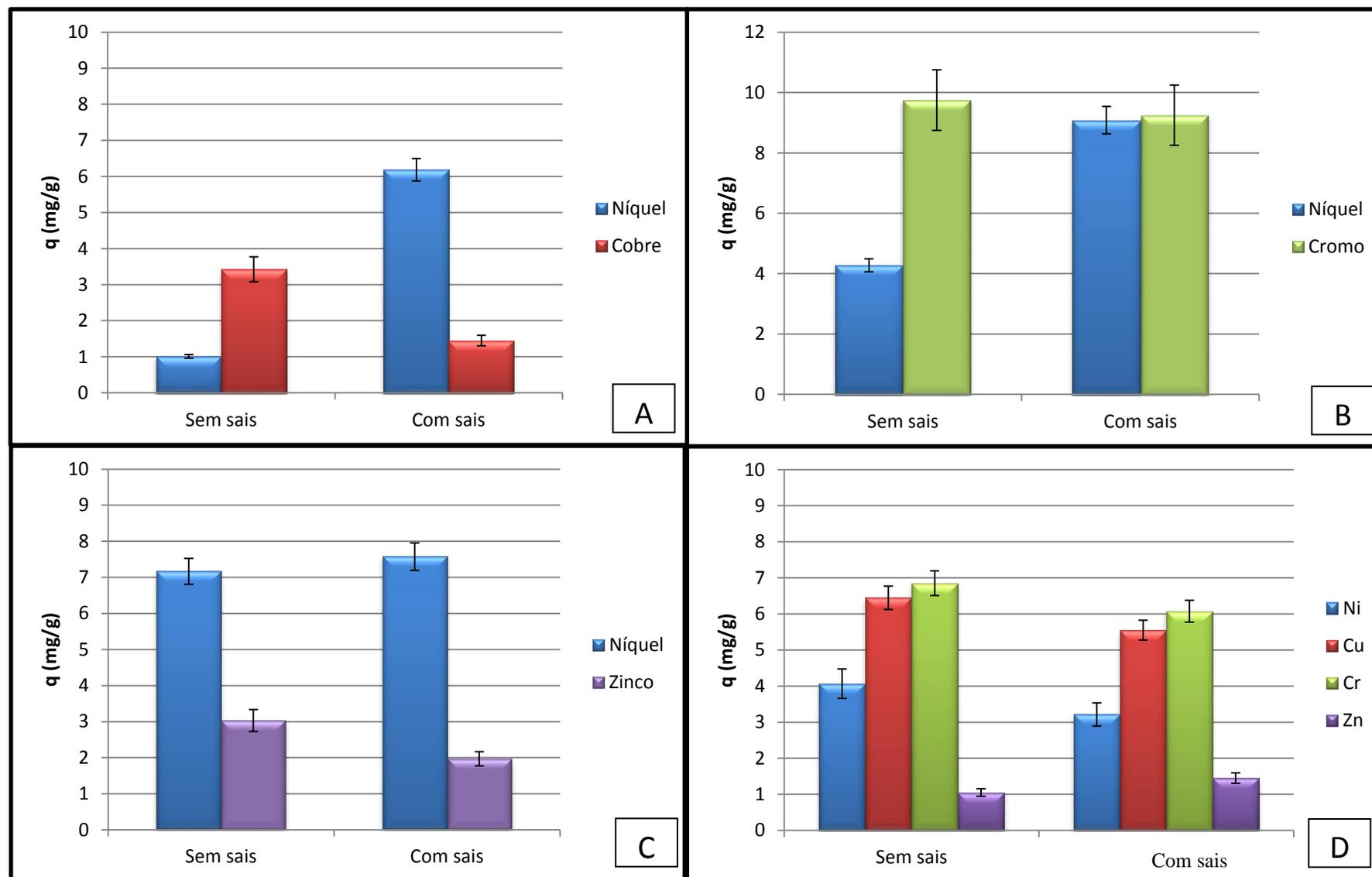


Figura 17. Valor de "q" referente às interações Níquel - Cobre (A), Níquel - Cromo (B), Níquel - Zinco (C) e Níquel - Cobre - Cromo - Zinco (D).

O cobre aparentemente não interferiu na sorção de níquel pelo fungo (Figura 17A). Na presença dos sais, a remoção de níquel foi mais satisfatória (6,19 mg/g), enquanto na sua ausência, houve um aumento da remoção de cobre correspondendo a cerca de 3,43 mg/g, e redução da recuperação de níquel. Portanto, existe uma seletividade maior do fungo pelo níquel na presença de sais. Além disso, pode-se constatar que há inibição da remoção de cobre pelo micro-organismo na presença de sais.

Dias *et al* (2002) testaram a biomassa do fungo *Aspergillus terreus* imobilizada em poliuretano para avaliarem o potencial de remoção de ferro, níquel e cromo de efluentes de uma metalúrgica. O valor de remoção para o ferro foi de 164,50 mg/g, 96,50 mg/g para o cromo e 19,60 mg/g para o níquel após 6 dias de experimento.

Martins (2009), estudando diferentes linhagens de *Penicillium spp.* na bio-sorção de mistura binária contendo níquel e cobre, não observou seletividade para nenhum dos dois metais. A porcentagem média de remoção do níquel foi de 14,7% e a de cobre de 10,5% decorridas 24 h de contato dos conídios na mistura aquosa binária, enquanto em 48 h, a porcentagem média da remoção do cobre aumentou ligeiramente (12%) e a de níquel caiu para 8,5%.

A preferência por outro metal que não o níquel, pode estar relacionada ao tipo de ligação do íon níquel à biomassa ou a maior deslocamento desta espécie metálica, em meio aquoso. Segundo Arroyo *et al.* (2000), este fenômeno se caracteriza pelo que se conhece como troca sequencial, típico dos processos de adsorção competitiva.

No caso da mistura binária Ni-Cr, tem-se que a bio-sorção de níquel também foi negativamente afetada pela presença de cromo na ausência de sais (Figura 17B). No entanto, o fungo apresentou grande capacidade de sorver o íon cromo (9,8 mg/g). Para este metal, os sais não tiveram qualquer influência no processo, já que tanto na presença quanto na ausência de sais, a recuperação foi semelhante.

Similarmente, Veit *et al.* (2009), ao avaliar a bio-sorção em efluente real de galvanoplastia contendo níquel e cromo, constataram que a biomassa (alga marinha) utilizada apresentou preferência pelo íon cromo em detrimento do níquel. Seolatto (2005) anteriormente já havia observado, para essa mesma biomassa algácea, maior afinidade pelo cromo em sistema binário.

Ainda na figura 17C, observa-se a prevalência do fungo pela biossorção de níquel (7,58 mg/g), contra apenas 1,97 mg/g para o zinco quando em mistura binária na presença de sais. Porém, na ausência dos sais de sulfato e de fosfato, o cobre teve um ligeiro aumento na sua sorção. Note-se ainda que, conforme ocorreu para as misturas binárias Ni-Cu, houve maior remoção de níquel na presença dos sais.

Podemos observar ainda os resultados referentes a remoção do níquel em relação aos demais metais por *P. corylophilum* CCFIOC 4297 em mistura quaternária para tempo de contato de 24 h (figura 17D). Conforme anteriormente observado, a remoção de níquel foi superior na presença de sais, se bem que na sua ausência, aparentemente a presença dos outros metais tenha minimizado a sua recuperação.

Destaca-se novamente a seletividade do fungo pelo cromo quer na presença quer na ausência de sais (Figura 17D). Entretanto, a presença simultânea de cromo, e ainda do cobre, não causou alteração significativa na remoção do zinco. Por sua vez a remoção do cobre foi melhorada pela presença dos outros metais, sobretudo quando na presença de sais. Tais fatos podem estar relacionados à afinidade da biomassa por metais específicos, como neste caso, o cromo ou mesmo pela composição da superfície da parede da biomassa ou o seu tamanho.

Aksu e Dönmez (2006) afirmam que a presença de outros elementos em uma mesma solução promove automaticamente uma competição pelos sítios de adsorção da biomassa, o que pode influenciar positiva ou negativamente a sorção de cada metal. Além disso, ainda segundo os autores, caso um dos metais se encontre em uma concentração mais elevada, este tende a ocupar mais rapidamente os sítios de ligação, fazendo com que a adsorção dos demais elementos seja automaticamente inferior.

Diferentemente deste trabalho, Doan *et al.*, (2008) verificaram que o zinco foi mais adsorvido que o níquel, o que demonstra, mais uma vez, a competitividade do processo. Cabe salientar que os referidos pesquisadores utilizaram uma biomassa diferente à do presente trabalho, no caso, o fungo *Triticum aestivum*.

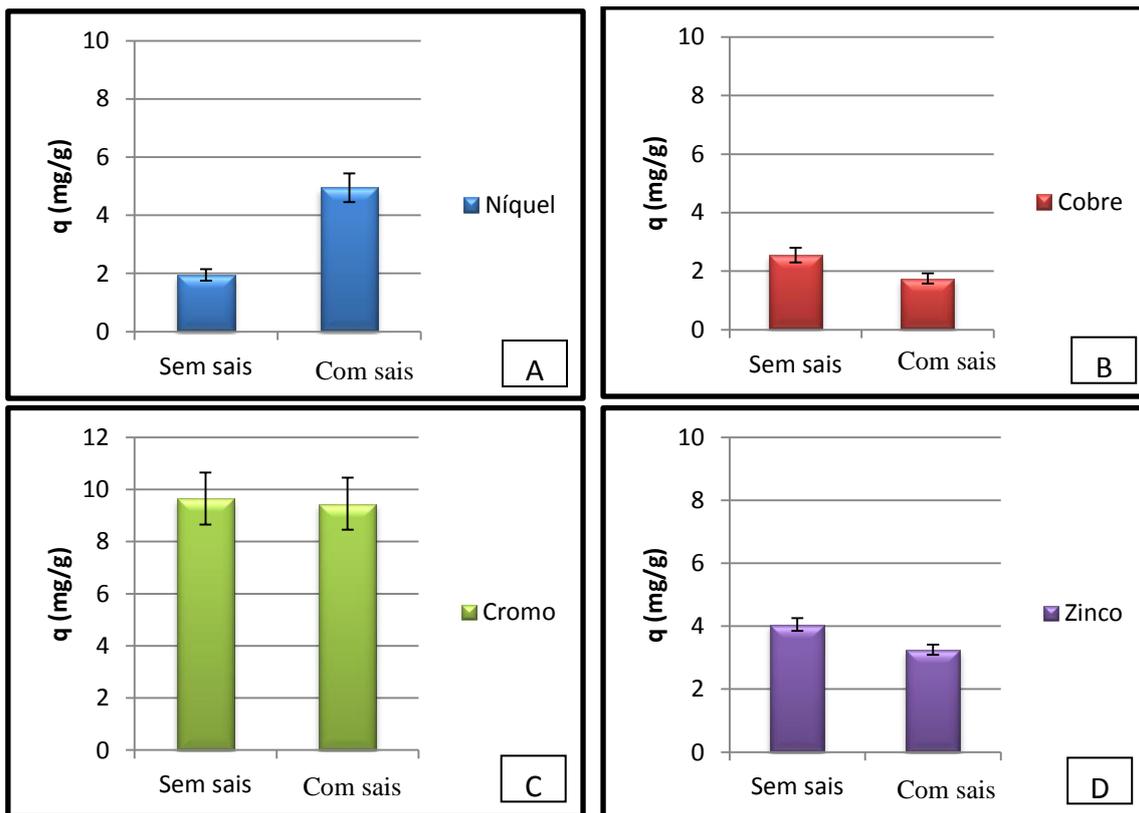
Porém, segundo Baig *et al.* (2013) e Davis *et al.* (2003), a eficiência da adsorção é maior em soluções que apresentam concentrações de metais na faixa de 1 a 100 mg/L, pois assim, evita-se uma possível saturação da biomassa e um rendimento inferior ao esperado.

Diversos são os trabalhos na literatura que reportaram a interação dos metais no processo de bioissorção, utilizando para isso diferentes tipos de biomassa. França, Tavares e Costa (2002), estudando a bioissorção conjunta de Zn e Ca pela macroalga *Sargassum filipendulla*, observaram que a presença do Ca influenciava negativamente na adsorção do Zn. Da mesma forma, Kleinübing *et al.* (2011), utilizando a mesma biomassa, reportaram que o Cd influiu na adsorção do Ni de maneira negativa.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o fungo apresenta capacidade de bioissorção de metais o que torna possível a sua adoção para tratamento de efluentes industriais, principalmente se estiverem contaminados com cromo. Obviamente, haverá necessidade de ser testado o comportamento do fungo caso a caso para avaliação do seu potencial e definição das melhores condições a fim de alcançar a maior eficácia do tratamento e estabelecer a forma de recuperação do metal.

#### 4.3.1.2 Teste em sistemas não competitivos

Para fins comparativos também foram realizados ensaios para análise da bioissorção por *P. corylophilum* CCFIOC 4297 em sistemas contendo os metais individualmente. A figura 18 ( A, B, C e D) apresenta os valores de “q” dos metais na presença e ausência dos sais.



**Figura 18. Valores de "q" referentes à análise dos metais em sistemas não competitivos**

Em conformidade com os resultados obtidos para os sistemas binários e quaternário, o níquel teve melhor sorção na presença de sais (figura 18A). Para os demais metais, a ausência de sais foi a melhor condição para sorção pelo fungo (figuras 18 B, C e D).

De maneira geral, traçando um comparativo entre as amostras de multimetais e as individuais, vemos que não houve diferenças discrepantes entre os dois sistemas (Tabelas 8 e 9). Alguns autores sugerem que a adsorção de metais é menor em sistemas competitivos (SC) que em sistemas não competitivos (SNC), porém, sabe-se que a remoção depende fortemente do metal utilizado e mesmo do tipo de biomassa que está sendo empregada para a biossorção (LOPES, 2009; MOREIRA, 2004).

**Tabela 8. Comparação da remoção de metais em sistemas competitivos (SC) e não competitivos (SNC) para soluções metais sem adição de sais.**

Metal	Remoção (mg/g)	
	SC	SNC
Níquel	4,07	2,0
Cobre	6,5	2,5
Cromo	6,9	9,7
Zinco	1,0	4,1

SC – mistura quaternária dos metais; SNC – com soluções unitárias dos metais.

**Tabela 9. Comparação da remoção de metais em sistemas competitivos (SC) e não competitivos (SNC) para soluções metais com adição de sais**

Metal	Remoção (mg/g)	
	SC	SNC
Níquel	3,2	5,0
Cobre	5,6	1,8
Cromo	6,08	9,5
Zinco	1,5	3,2

SC – mistura quaternária dos metais; SNC – com soluções unitárias dos metais.

Ainda segundo Lopes (2009), no geral, a adsorção em sistemas competitivos seria menor justamente pelo fato de haver, nestes sistemas, competitividade entre os metais pelos sítios de ligação na parede celular da biomassa, o que foi corroborado pelos resultados obtidos neste estudo.

Luna *et al.* (2010) e Kumar, Bishnoi e Bishnoi (2008) explicaram que os estudos sobre a interação entre os metais nos processos biossorbitivos vem aumentando principalmente devido a sua importância no tratamento de efluentes, que em sua maioria, são heterogêneos, apresentando variados íons metálicos em sua composição.

Assim, os estudos que reproduzem a biossorção em sistemas multimetais, simulando um efluente real, se aproximam mais da realidade encontrada nos diversos sítios onde a contaminação por metais acontece.

#### 4.4 Sequência de afinidade de metais pelo *P. corylophilum*

Nas tabelas 10 e 11 pode-se observar a sequência de afinidade do fungo *Penicillium corylophilum* CCFIOC 4297 em relação aos metais estudados. O cromo, nos dois sistemas propostos (sistema competitivo e não competitivo) foi o metal mais sorvido. Os demais metais, ocuparam a mesma posição, no SC. Vemos, portanto, que independente da presença ou não dos sais, a biomassa demonstrou ter a mesma sequência de afinidade para estes metais, neste sistema.

**Tabela 10. Sequencia de afinidade dos metais no sistema competitivo (SC)**

<b>Com sais</b>	Cromo > Cobre > Níquel > Zinco
<b>Sem sais</b>	Cromo > Cobre > Níquel > Zinco

**Tabela 11. Sequencia de afinidade dos metais no sistema não competitivo (SNC)**

<b>Com sais</b>	Cromo > Zinco > Cobre > Níquel
<b>Sem sais</b>	Cromo > Níquel > Zinco > Cobre

Vale salientar que a presença ou ausência dos sais nas amostras do SC não mostrou ter influência na sorção dos metais. Sendo observado nos dois sistemas, a mesma sequência de afinidade em relação aos sais (Cromo > Cobre > Níquel > Zinco).

No SNC não houve variação em relação a posição do cromo, sendo este sorvido preferencialmente nos dois sistemas. Os outros metais variaram suas posições de acordo com a presença ou não de sais.

Alguns autores corroboram com relação à preferência pela sorção do cromo. Fontes e Gomes (2003) estudaram adsorção competitiva em solos, em pH natural, e chegaram a seguinte sequência de afinidade em relação a sorção dos metais: Cr > Cu > Ni > Cd > Zn.

Segundo Moreira (2004), um dos fatores que explica o comportamento competitivo dos metais é o tipo de interação metal-superfície. Cada metal apresenta, portanto, um tipo de ligação/interação preferencial, sendo as interações eletrostáticas e as covalentes as

principais. Este autor, em estudo realizado com sorção de metais em sistemas competitivos (SC) e não competitivos (SNC) no solo, encontrou uma sequência de afinidade metálica onde, para o SC:  $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Ni}$  e para o SNC, o autor encontrou a seguinte sequência:  $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cd}$ .

No caso específico deste trabalho, não há na literatura a descrição da sorção preferencial do fungo estudado em relação aos metais testados, sendo dificultada a comparação com outros estudos. Desta maneira, este trabalho contribui para que sejam ampliados os conhecimentos acerca da biossorção de metais por fungos, neste caso específico, pelo *P. corylophilum* CCFIOC 4297.

## Capítulo 5. Conclusões

---

A partir do desenvolvimento deste trabalho pode-se concluir que:

- O fungo *Penicillium corylophilum* apresenta potencial para a remediação de áreas impactadas por contaminantes metálicos;
- O planejamento experimental Plackett & Burman indicou que, à exceção do sulfato de magnésio, cujo aumento leva ao decréscimo da remoção de níquel, em solução aquosa unitária, as concentrações de sacarose, de fosfato monoácido de amônio, de biomassa e de níquel, e o pH, não influenciam na capacidade de remoção dos metais pelo fungo;
- Os valores máximos de remoção de níquel em torno de 57% foram obtidos para 30 mg/L Ni,  $10^6$  conídios/mL, 0,5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 6 e tempo de 1 h (ensaios 9 e 10);
- O melhor valor de “q” também foi observado no ensaio 9 com remoção de 3,60 mg/g.
- Tanto os conídios quanto os *pellets* do fungo podem ser empregados satisfatoriamente como biossorbentes, embora o valor máximo de remoção (57%) tenha sido alcançado com conídios em 12 h de contato;
- Em sistemas binários e quaternário de metais (Ni, Cu, Cr e Zn), o cromo foi o metal que apresentou maior afinidade com a biomassa utilizada;

## Capítulo 6. Sugestões

---

- Estudar o reuso da biomassa fúngica, avaliando os processos de sorção- dessorção.
- Averiguar o mecanismo predominante na remoção de metais pelo fungo estudado, por conídios e *pellets*, metabolicamente ativos e inativados.
- Testar o comportamento da biomassa em efluente real.

## Capítulo 7. Referências Bibliográficas

---

AHMAD, I.; ZAFAR, S. E AHMAD, F.; Heavy metal biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp. isolated from wastewater treated soli. **Journal of Applied Sciences & Enviromental Management**, 9(1), 123-126, 2005.

AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. **Biores. Technol.**, v. 97, n. 15, p. 1780-1787, 2006.

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. Binary biosorption of cadmium (II) and nickel (II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. **Process Biochem.**, v. 41, p. 860–868, 2006.

ANDERSON, R. A. Chromium as an essential nutrient for humans. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26, p. S35–S41, 1997.

ANDRADE, M. G.; MELO, V. F.; GABARDO, J.; SOUZA, L. C. de P.; REISSMANN, C. B. Metais pesados em solos de área de mineração e metalúrgica de chumbo. I – Fitoextração. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, p.1879-1888, 2009.

ARAÚJO, F. S. M.; LEMOS, J. L. S. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, 2002.

ARROYO, P. A.; BARROS, M. A. S. D.; QUERINO, M. V.; FERREIRA JUNIOR, I. A.; SOUSA-AGUIAR, E. F. Troca multicomponente dinâmica em sistemas zeolíticos. **Rev. Tecnol.**, v.9, n. esp., p. 31-38, 2000.

BÄATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). **Water, Air and Soil Pollut: Focus**, v. 47, n. 5, p. 335-379, 1989.

BAGCHI, D.; STOHS, S. J.; DOWNS, B. W.; PREUSS, H. G. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of Chromium. **Toxicol.**, v. 180, n. 1, p. 5–22, 2002.

BAIG, S.A., WANG, Q., LV, X., XU, X. Removal of hexavalent chromium by limonite in aqueous solutions. **Hydrometallurgy**, v.138, p.33-39, 2013.

BAIRD, C. *Química ambiental*. Trad. Recio, M.A.L. e Carrera, L.C.M.. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BALSALOBRE, M. A. A.; MARTINS, A. L. M.; CRUZ, A. E.; SEVILLA, C. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal 2011. Formulação de misturas minerais para bovinos. Disponível em: <[www.grupoapb.com.br/pdf/Formulacao\\_de\\_misturas\\_minerais\\_para\\_bovinos.pdf](http://www.grupoapb.com.br/pdf/Formulacao_de_misturas_minerais_para_bovinos.pdf)>. Acessado em 10 nov. 2013.

BANDEIRA, L. F. M. **Remoção de metal pesado de efluentes aquosos através da combinação dos processos de osmose inversa e adsorção**. Dissertação (Mestrado) Engenharia Química, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. de la. Especificação de arsênio – uma revisão. *Quím. Nova*, v. 23, n. 1, p. 58-70, 2000.

BARROS, A. J. M.; PRASAD, S.; LEITE, V. D.; SOUZA, A. G. Avaliação do processo de biossorção de níquel em colunas verticais carregadas com biosólidos. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Campo Grande/MS, 2005.

BARROSO, C. B. **Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismos de solubilidade de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 111p. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

BEZERRA, P. S. S.; TAKIYAMA, L. R.; BEZERRA, C. W. B. Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais. *Acta Amazon.*, v. 39, n.3, p. 639-648, 2009.

BHAINSA, K.C. E D'SOUZA, S.F.; Removal of copper ions by filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. *Biores. Technol.*, 99, 3829-3835, 2008.

BIEDERMANN, K. A.; LANDOLPH, J. R. Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis, and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Res.*, v. 50, p. 7835–7842, 1990.

BIRCH, L.; BACHOFEN, R. Complexing agents from microorganisms. *Experientia*, v. 46, n. 7, p. 827-834, 1990.

BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, SP (Brasil), 53p., 2002.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Technol.*, v. 74, p. 63-67, 2000.

BORBA, C. E.; GUIRARADELLO, R.; SILVA, E. A, VEIT, M. T.; TAVARES, C. R. G. Removal of nickel (II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: experimental and theoretical breakthrough curves. *Biochem. Eng. J.*, v. 30, p. 184–191, 2006.

BURATTO, A. P.; COSTA, R. D.; FERREIRA, E. da S. Application of fungal biomass of *Pleurotus ostreatus* in the process of biosorption of copper ions (II). *Eng. Sanit. Ambient.*[online], v.17, n.4, p. 413-420, 2012.

CALFA, B. A.; TOREM, M. L. Uso de biomassas em processo combinado biossorção/flotação para remoção de metais pesados. Relatório de atividades do projeto de iniciação científica, 2004 – 2007. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC, 2007.

CARVALHO, C. E. V.; LACERDA, L. D.; GOMES, M. P. Heavy metal contamination of the marine biota along the Rio de Janeiro coast, Se – Brazil. *Water Air and Soil Pollut.*, v 57-58, n. 1, p 645-653, 1991.

CASARINI, D.C.P.; DIAS, C.L.; LEMOS, M.M.G. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB,73p. 2002.

CEFALU, W. T.; HU, F. B. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*, v. 27, p. 2741–2751, 2004.

CELESTINO, P.; BARBOSA, B.; AMARAL, W.; SAMPAIO, G.; RODRIGUES, K. Efeito do tamanho do inóculo na remoção de matéria orgânica de água residuária

contaminada com BTX. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de educação Tecnológica. Belém, PA, 2009.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos. Orientações para Manutenção, Cultivo e Realização de Testes de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Vol. 1. São Paulo, 2005.

\_\_\_\_\_. Valores orientadores para solo e água subterrânea. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/legislacao>>. Acessado em 20 nov. 2013.

\_\_\_\_\_. 2012. Níquel e seus compostos. Disponível em: <[www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/niquel.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/niquel.pdf)>. Acessado em 01 dez. 2013.

CHAOUI, A.; MAZHOUD, S.; GHORGBAL, M. H.; EL FERJANI, E. Cadmium and zinc inductions of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme actives in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.*, v. 127, n. 2, p. 139-147, 1997.

CHEUNG, H.; GU, J. D. Reduction of chromate by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*, v. 52, p. 1523–1529, 2003.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fields studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.*, v. 93, p. 915-929, 2002.

COBRE-NAUTILUS. Disponível em: <[nautilus.fis.uc.pt/st2.5/scenes-p/elem/e02900.html](http://nautilus.fis.uc.pt/st2.5/scenes-p/elem/e02900.html)>. Acessado em 27 jan. 2014.

COLLA, L. M. Biossorção de cádmio e produção de biosurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Revist. CIATEC – UPF*, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução N° 314, RESOLUÇÃO CONAMA n° 314, de 29 de outubro de 2002, publicada no DOU N° 224, de 20 de novembro de 2002, Seção 1, página 90.

COSTA, C. A.; SCHNEIDER, I. A. H.; RUBIO, J. Plantas aquáticas secas: uma alternativa moderna para remoção de metais pesados de efluentes industriais. *Rev. Eng. Sanit. e Ambient.*, v. 5, n. 1 – 2, p. 19 – 24, 2000.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, n. 2, p. 143 – 160, 2007.

DAMASCENO, E. P.; PINHEIRO, Z. B.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, G. M. M.; RODRIGUES, K.; SAMPAIO, G. M. M. S. Tratamento biológico de efluentes de indústria petroquímica em reatores em batelada com biomassa dispersa e imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400. VII Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação (VII ENPPG) / VII Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica (VII ENICIT) / I Simpósio de Inovação Tecnológica (I SIMPIT), 2007.

DAS, N.; BASAK, L.V.G.; SALAM, J.S.; ABIGAIL, M. E. A. Application of biofilms on remediation of pollutants – An overview. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, v. 2, n 5, p. 783-790, 2012.

DAVIS, T. A.; LLANES F.; VOLESKY B.; MUCCI A. Metal selectivity of *Sargassum spp.* and their alginates in relation to their r-l-guluronic acid content and conformation. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, p. 261-267, 2003.

DIAS, A. E. X. O. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p., 2000.

DIAS, M.A.; LACERDA, I.C.A.; PIMENTEL, P.F.; CASTRO, H.F. E ROSA, C.A.; Removal of heavy metal by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 34, p. 46-50, 2002.

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral / Sumário Mineral de 2012. Disponível em: <[www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=2263](http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=2263)>. Acessado em 15 dez. 2013.

DOAN, H. D.; LOHI, A.; DANG, V. B. H.; DANG-VU, T. Removal of Zn<sup>+2</sup> and Ni<sup>+2</sup> by adsorption in a fixed bed of wheat straw. *Process Saf. Environ. Protect.*, v. 86, n. 7, p. 259-267, 2008.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - A meaningless term? *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

ECCLES, H. Removal of heavy metals from effluent streams – Why select a biological process? *Int. Biodeter. Biodegr.*, v. 35, p. 5-16, 1995.

EMBRAPA. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Comunicado Técnico, 86. Março, 2013.

EMSLEY, J. **Moléculas em exposição: o fantástico mundo das substâncias e dos materiais que fazem parte de nosso dia a dia.** São Paulo: Edgar Blücher, 224 p., 2001.

FARIAS, Y. P. M. M.; LEMOS, J. L. S. Aplicação de microrganismos na remediação de áreas contaminadas por metais pesados. In: XVI Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, 2008.

FARYAL, F.; LODHI, A.; HAMEED, A. Isolation, characterization and biosorption of zinc by indigenous fungal strains *Aspergillus fumigates* RH05 and *Aspergillus flavus* RH07. *Pakistan J. Bot.*, v. 38, n. 4, p. 817-832, 2006.

FERRARI, M. D. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación em la biorremediación de suelos y lodos contaminados. *R. Argent. Microbiol.*, v. 28, p. 83-98, 1996.

FONTES, M. P. F.; GOMES, P. C. simultâneos competitive adsorption oh heavy metals by the mineral matrix of tropical soils. *Appl. Geochem.*, v. 18, p. 795-804, 2003.

FOSMIRE, G. J. Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 51, p. 225-227, 1990.

FRANÇA, F. P.; TAVARES, A. P. M.; COSTA, A. C. A. Calcium interference with continuous biosorption of zinc by *Sargassum sp.* (*Phaeophyceae*) in tubular laboratory reactors. *Biores. Technol.*, v. 83, p. 159–163, 2002.

FRANCO, L.O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. C. Heavy metal iosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazil. J. Microbiol.*, v. 35, p. 243-247, 2004.

FREITAS, T. C. M.; MELNIKOV, P. O uso e os impactos da reciclagem de cromo em indústrias de curtume em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 11, n. 4, p. 305-310, 2004.

FUKUDA, T.; ISHINO, Y.; OGAWA, A.; TSUTSUMI, K. E MORITA, H.; Cr(VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 54(5), 295-303, 2008.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, v. 122, p. 109-119, 2004.

\_\_\_\_\_ Accumulation and transformation of metals by microorganisms. In: Rhem, H-J and Reed, G. PUHLER, A. and STADLER, P. (eds) *Biotechnology* v. 10, Wisley, Weinheim, 2001.

\_\_\_\_\_ Microbial control of heavy metal pollution. In: Zry, J. C. et al. (ed.): *Microbial Control of Pollution*, 58<sup>th</sup> Symposium of the Society for General Microbiology, 1992.

\_\_\_\_\_ Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, v. 46, p. 834-840, 1990.

\_\_\_\_\_ WHITE, C. Biosorption of radionuclides by yeast and fungal biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 49, p. 331-343. 1990.

\_\_\_\_\_ De ROMA, L. Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeasts. In: **Biohydrometallurgy**: Proceedings of the International Symposium; Norris, P. R. and Kelly, D. P.; eds. Sci. Tech. Letters: Kew, Surrey, U.K., pp 421-436. 1988.

GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium and copper – treated maize (*Zea mays* L.). *Planta*, v. 198, n. 1, p. 139 – 143, 1996.

GIMENO-GARCIA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ. Pollut.*, v. 92, n. 1, p. 19 – 25, 1996.

GUELFY, A. Resposta das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio. 60p. Dissertação (Mestrado) em Genética e melhoramento de plantas – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GUIMARÃES, V.; SÍGOLO, J.B. Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbicula fluminea*) – Rio Ribeira de Iguape – SP. *Quim. Nova*, v. 15, n. 3, p. 254-261, 1992.

HPA – Health Protection Agency 2009 - Nickel Toxicological Overview. Disponível em: <[www.hpa.org.uk/Topics/ChemicalsAndPoisons/CompendiumOfChemicalHazards/Nickel](http://www.hpa.org.uk/Topics/ChemicalsAndPoisons/CompendiumOfChemicalHazards/Nickel)>. Acessado em 30 nov. 2013.

HOLAN, Z. R.; VOLESKY, B. Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 53. p. 133-134, 1995.

HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. Metals and micro-organisms. Chapman and Hall, London, 412p., 1989.

IANIS, M.; TSEKOVA, K.; VASILEVA, S. Copper biosorption by *Penicillium cyclospium*: equilibrium and modeling study. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, v. 20, n. 1, 195-201, 2006.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100c. Nickel and nickel compounds. p. 169-218, 2012. Disponível em: <[monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-10.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-10.pdf)>. Acessado em 18 dez. 2013.

JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern, *J. Ind. Microbiol.*, v. 14, p. 2707- 2708, 1995.

JIMENEZ, R. S.; DAL BOSCO, S. M.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolécita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 734-738, 2004.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Biores. Technol.*, v. 53, p. 195-206, 1995.

KIRK, P.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. In: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. CAB International, Wallingford, UK, 771 p., 2008.

KLEINÜBING S.J.; DA SILVA E.A.; DA SILVA M.G.C.; GUIBAL E. Equilibrium of Cu(II) and Ni(II) biosorption by marine alga *Sargassum filipendula* in a dynamic system: Competitiveness and selectivity. *Biores. Technol.*, v. 102, p. 4610–4617, 2011.

KORF, E. P.; MELO, E. F. R. Q.; THOMÉ, A.; ESCOSTEGUY, P. A. V. Retenção de metais em solo da antiga área de disposição de resíduos sólidos urbanos de Passo Fundo – RS. *Rev. Cienc. Ambient.*, v. 2, n. 2, p. 43-60, 2008.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. *Tibtech*, v. 16, p. 291-300, 1998.

KUMAR, R.; BISHNOI, N. R.; BISHNOI, K. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chem. Engin. J.*, v. 135, p. 202-28, 2008.

LEMOS, J. L. S.; CARLOS, M. C.; FARIAS, Y. M. M.; SANTOS, R. L. C. Revisão a cerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. 65p. (Série Tecnologia Ambiental, 43), – Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

\_\_\_\_\_ ; OLIVEIRA, S. D.; SCHLITTLER, L. A. F. S.; JÚNIOR, N. P. Técnicas de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. *Diálogos & Ciência (Rede de Ensino FTC)*, Ano III, n. 11, 2009.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. In: Lewinsohn T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2006.

LIMA, D. P. de. Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da Bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Amazônia, Brasil. Dissertação (Mestrado) (Mestrado), 147 p. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, UNIFAP, Amapá, 2013.

LIMA, V. F.; MERÇON, F. Metais pesados no ensino da química. *Rev. Quim. Nova na Escola*, v. 33, n. 4, p. 2011. Disponível em: <nesc.sbq.org.br/online/qnesc33\_4/199-CCD-7510.pdf>. Acessado em 20 dez. 2013.

LOPES, M. **Estudo do metabolismo do fungo *Aspergillus niger* AN400 na remoção de nutrientes e de fenol.** 70 p. Trabalho de conclusão de curso – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, [S. 1], 2009.

LÓPEZ, E.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*, v. 50, n. 1, p. 137-143, 2003.

LUNA, A. S.; COSTA, A. L.H.; COSTA, A. C. A.; HENRIQUES, C. A. Competitive biosorption of cadmium(II) and zinc(II) ions from binary systems by *Sargassum filipendula*. *Biores. Technol.*, v. 101, p. 5104–5111, 2010.

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. In: Forzza, R. C. *et al.* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio De Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48.

MARTINS, A.; DINARDI, A. L.; FORMAGI, V. M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C .M. R.; BRITO, N. N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. 2003. Disponível em: <[www.ceset.unicamp.br/ite/artigos/3fec2401](http://www.ceset.unicamp.br/ite/artigos/3fec2401)>. Acessado em 20 ag. 2013.

MARTINS, L. R. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, 203p., 2009.

MERLINO, L.C.S.; MELO, W.J.; MACEDO, F.G.; GUEDES, A.C.T.P.; RIBEIRO, M.H.; MELO, V.P.; MELO, G.M.P. Bário, cádmio, cromo e chumbo em plantas de milho e em latossolo após onze aplicações anuais de lodo de esgoto. *Rev. Brasil. Ciênc. Solo*, v. 34, p. 2031-2039, 2010.

MINERAÇÃO e METALURGIA 2000 – BNDES (Banco Nacional do desenvolvimento). NÍQUEL- Novos Parâmetros de Desenvolvimento. Área de Operações Industriais 2 - AO2. Disponível em: <[www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/relato/niquel.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/relato/niquel.pdf)>. Acessado em: 15 dez. 2013.

MOREIRA, A. S. **Biossorção utilizando alga marinha (*Sargassum* sp) aplicada em meio orgânico**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

MOREIRA, C. S. **Adsorção competitiva de Cádmio, Cobre, Níquel e Zinco em solos**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 108 p., 2004.

MORTIMER, M.R. Pesticide and trace metal concentrations in Queensland Estuarine Crabs. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 41, p. 7-12, 2000.

MUSTRA, C.J.G.O. **Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metalóides em amostras biológicas**. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses), 124 p., Universidade de Lisboa- Faculdade de Medicina de Lisboa, 2009.

NEVES, C. A. R. Zinco. DNPM/Sumário Mineral 2012. Disponível em: <[sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra\\_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7415](http://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7415)>. Acessado em 15 dez. 2013.

NIU, H.; XU, X.S.; WANG, J.H. E VOLESKY, B.; Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. *Biotechnol. and Bioengine.*, 42(6), 785-787, 1993.

OLIVEIRA, S. D. de. **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. Dissertação (Mestrado) Programa Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 140 p., 2008.

PAL, A.; GHOSH, S.; PAUL, A.K.; Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. *Biores. Technol.*, v. 97, p. 1253-1258, 2006.

PALLU, A. P. S. **Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 69p., 2006.

PAMBOUKIAN, C. R. **Influência das condições de preparo de inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori***. Dissertação

(Mestrado) em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PAZOUKI, M.; KEYANPOUR-RAD, M.; SHAFIC, S. E SHAHHOSCINI, S.; Efficiency of *Penicillium chrysogenum* PTCC 5037 in reducing low concentration of chromium hexavalent in a chromium electroplating plant wastewater. **Bioresource Technology**, 98, 2116-2122, 2007.

PEARSON, K. M. On the remediation of polluted land – ex-site treatment. 1995. In: GOMES, M. M. & HOGLAND, W. (Eds.) proceedings of the Latin American. Swedish Seminar on Solid Waste Management and Round Table on Landfill Technology and Contaminated Site Remediation. Sweden: Lund University, 195 – 196. 2000.

PIERZYNSKI, G. M; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. Soil and Environmental Quality. 2nd ed. CRC Press LLC, 459p., 2000.

PINO, G. H. **Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (*Cocos nucifera*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2005.

\_\_\_\_\_; TOREM, M. L. Aspectos fundamentais da biossorção de metais não ferrosos – estudo de caso. **Tecnol. Metal. Mater. Miner.**, v. 8, n. 1, p. 57-63, 2011.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITÃO, M. A. S.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **J. Phycol.**, v. 39, p. 1008-1018, 2003.

PIRES, J. N.; LOYOLA, L.; MAXIMO, H. O.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K.; PESSOA WANDERLEY, C. R. Influência da glicose na remoção de corante índigo de efluente têxtil por *Aspergillus niger* AN400 em reatores em batelada. Instituto Federal de educação Ciência e Tecnologia do Ceará, 8 p. 2010.

PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; STEWART, C. R. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. **Plant Physiol.**, v. 108, n. 4, p. 1597 – 1605, 1995.

PRASENJIT, B. E SUMATHI, S.; Uptake of chromium by *Aspergillus foetidus*. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, 7, 88-92, 2005.

PRATA, J. A.; LEMOS, J. L. S; BARROS, C. A. Produção de tensoativo por *Penicillium corylophilum*. In: XVI Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, 2008.

PRICE, M. S.; CLASSEM, J. J.; PAYNE, G. A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Biores. Technol.*, v. 77, n.1, p. 41-49, 2001.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T L. Os Reinos dos Fungos, v.2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 214 p., 2002.

QAZILBASH, A.A.; FARYAL, R.; TABASUM,A.; LODHI, A.; SHAMAD, S. E HAMEED, A. Comparative analysis of oven-dried and non-growing strains of *Aspergillus niger* for the removal of lead under laboratory conditions. *Int. J. Bot.*, v. 2, n. 2, p. 137-145, 2006.

RADHIKA, V.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. *Water Res.*, v. 40, p. 3628-3636, 2006.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de Microbiologia**, v. 2, São Paulo: Editora Manole, 126 p., 1991.

RUBIO, J.; TESSELE, F. Processos para o Tratamento de Efluentes na Mineração. Em Capítulo 16 do livro “Tratamento de Minérios”. Luz, A. B.; Sampaio, J. A.; Monte, M. B.; Almeida, S. L. (Editores), CETEM-CNPq-MCT, p.637-697, 3a ed. 2002.

RYAN, M. P.; WILLIAMS, D. E.; CHATER, R. J.; HUTTON, B. M.; MCPHAIL, D. S. Why stainless steel corrodes? *Nature*, v. 415, p. 770–774, 2002.

SÁNCHEZ, L. E. Desengenharia: O passivo Ambiental na Desativação de Empreendimentos Industriais. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo (EDUSP), 224p., 2001.

SALES, C. Medicina Funcional integrativa. Disponível em: <[www.cristinasales.pt/pt-pt/Medicina-Integrada/Texts/Text.aspx](http://www.cristinasales.pt/pt-pt/Medicina-Integrada/Texts/Text.aspx)>. Acessado em 28 dez. 2013.

SANTOS, W. A. T. dos. Investigação da citotoxicidade e resistência à corrosão de revestimentos eletrodepositados de cobre, níquel, bronze branco, com e sem camada de

ouro, utilizados em aplicações decorativas. Dissertação (Mestrado) em Ciências na área de Tecnologia Nuclear do IPEN, USP, São Paulo, 112p., 2011.

SEOLATTO, A. A. **Biossorção de cromo e níquel por biomassa de alga marinha *Sargassum filipendula***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica), UEM, 2005.

SIA, E. F.; TELES, F. L.; AZEVEDO, J. L. Meio de cultura substituto do BDA para fungos. Escola Superior de Agricultura Luiz De Queiroz, São Paulo, 2012.

SILVA, A. A. **Identificação de espécies hiperacumuladores e prospecção de genes relacionados à tolerância de plantas ao cádmio**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, 2010.

SILVA, L. C. Fungos e micotoxinas em grãos armazenados. Faculdade de Farmácia UNIOESTE. Disponível em: <[www.agais.com/fungos.htm](http://www.agais.com/fungos.htm)>. Acessado em 24 out. 2013.

SILVA, B. H. Influência das fontes: carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 31479 e *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Monografia (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP –Rio Claro, 2005.

SILVA, C. S. da. Níquel. Balanço Mineral Brasileiro 2001. 18 pp. Disponível em: <[www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/niquel.pdf](http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/niquel.pdf)>. Acessado em 15 dez. 2013.

SILVA, E. A. **Estudo da remoção dos íons cromo (III) e cobre (II) em colunas de leito fixo pela alga marinha *Sargassum sp.*** Tese (Doutorado), Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 163 p., 2001.

SILVEIRA, V. D. Micologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 336p., 1995.

SIMÕES, M. L. G.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo de diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. *HOLOS Environ.* 94, v.5, n.2, 2005.

SIMON, L.; CAYE-VAUGIEN, C.; BOUCHONNEAU, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. *J. Gen. Microbiol.*, v. 139, p. 979-985, 1993.

SKOWRONSKI, T.; PIRSZEL, J. E PAWLIK-SKOWROSKA, B.; Heavy metal removal by the waste biomass of *Penicillium chrysogenum*. **Water Quality Research Journal of Canada**, 36(4), 793-803, 2001.

SPÍNOLA, A. L. S. **Inserção das áreas contaminadas na gestão municipal: desafios e tendências**. Tese (Doutorado), 289 f., Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, 2011.

SPROCATI, A. R.; ALISI, C.; SEGRE, L.; TASSO, F.; GALLETTI, M.; CREMISINI, C. Investigating heavy metals resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. **Sci. Total Environ.**, v. 366, p. 649–658, 2006.

STRANDBERG, G. W.; SHUMATE, S. E.; PARROT, J. R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 237 – 245, 1981.

SU, H.; WANG, Z. E TAN, T.; Adsorption of Ni<sup>2+</sup> on the surface of molecularly imprinted absorbent from *Penicillium chrysogenum* mycelium. **Biotechnology Letters**, 25, 949-953, 2003

SUBUDHI, E. E KAR, R.N.; *Rhizopus arrhizus* – An efficient fungus for copper effluent treatment. **Internat. J. of Integrative Biol.**, 2(3), 166-171, 2008.

TAN, T. E CHENG, P.; Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. **Applied Biochemist. and Biotechnol.**, 104(2), 119-128, 2003;

TING, Y. P.; LOWSON, F.; PRINCE, I. G. Uptake of cadmium and zinc by alga *Chlorella vulgaris*: part 1. Individual ion species. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 34, p. 990-999, 1989.

TSEZOS, M. E VOLESKY, B.; Biosorption of uranium and thorium. **Biotechnol. and Bioengine.**, 23, 583-604, 1981.

USEPA. Recent developments for in situ treatment of heavy metal contaminated soil , Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office, Washington, D.C. 1998.

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

VEIT, M.T.; SILVA, E.A.; FAGUNDES-KLEN, M.R.; TAVARES, C.R.G.; GONÇALVES, G.C. Biossorção de níquel e cromo de um efluente de galvanoplastia utilizando alga marinha pré-tratada em coluna. *Acta Sci-Technol.*, v. 31, n. 2, p. 175-183, 2009.

VIEIRA, M. M.; LIU UN RIGO, L. U.; MARAgCHAL, L. R.; VEIGA L. A. Induction and catabolite repression of l-rhamnose dehydrogenase in *Pullularia pullulans*. *J. Bacteriol.*, v. 38, n. 1, p. 55-59, 1979.

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

\_\_\_\_\_; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.*, v. 11, n. 3, p. 235-250, 1995.

WAIHUNG, L.; CHUA, H.; LAM K-H.; BI, S-P. A comparative investigation of the biosorption of lead by filamentous fungus biomass. *Chemosphere*, v. 39, n. 15, p. 2723-2736, 1999.

WALSH, C. T.; SANDSTEAD, H. H.; PRASAD, A. S.; NEWBERNE, P. M.; FRAKER, P. J. Zinc: health effects and research priorities from the 1990's. *Environ. Health Perspect.*, v. 102, p. 5-46, 1994.