

Maristella Ayala Dias

**UTILIZAÇÃO DE REJEITOS DA PRODUÇÃO ARTESANAL
DE AGUARDENTE DE CANA PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSORVENTES**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Valter Roberto Linardi

Belo Horizonte, Janeiro de 1998
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

**Aos meus pais,
Benedito e Plutarca,
meus irmãos,
Flávio Fabiano e Magda, pelo amor
paciência e confiança sempre presentes.**

**Ao Gustavo,
Que com seu amor, companheirismo e confiança
Sempre fez com que minhas fraquezas se
Tornassem estímulos para dias melhores.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Valter Roberto Linardi, pela orientação, confiança e paciência, Indispensáveis para a execução deste trabalho.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Microbiologia o atual coordenador Jacques R. Nicoli, pela oportunidade de alcançar meu objetivo.

Ao CETEC, nas pessoas de Patrícia F. Pimentel, Mércia Helena, Eduardo Souza, Inayara Cristina, Luís Rosa, Eloisa Silva, Maria Lúcia Cardoso, Jacira Maria da Conceição e Maria das Graças Venturino, pelo apoio e disponibilidade em todos os momentos em que foi precisa a participação deles.

Ao Laboratório de Química Fina (FAENQUIL- S.P), nas pessoas de Dra. Heizir de Castro, Pedro e a amiga Cleide Mara pela oportunidade de poder fazer o curso de imobilização de células.

Ao Prof. Carlos Rosa e ao estudante de doutorado Newton Carlos Marcial Gomes pelo empenho e valiosa colaboração.

A todos os colegas do Laboratório de Fermentação pelo companheirismo em todos os momentos.

À Siderúrgica ACESITA, na pessoa de José Robson, pelo apoio e liberação do material utilizado nesta dissertação.

Ao Laboratório de Análise de Plasma e Raio-X do Centro de Pesquisas Prof. Manoel Teixeira da Costa-Instituto de Geociências da UFMG, na pessoa de Robson, pelas análises dos metais.

E a Maria Cristina de Almeida Prado que sempre esteve pronta para ajudar com muito carinho.

A amiga e companheira Elizabeth Pereira Márcia, pela força a todos os momentos.

E a todos os amigos, que de alguma forma colaboraram para a realização desta tese.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Suportes mais utilizados na imobilização de microrganismos.	22
2- Composição dos efluentes.	32
3- Capacidade de retenção de água e massa seca das biomassas.	42
4- Remoção de íons níquel em soluções sintéticas.	48
5- Remoção de íons ferro em soluções sintéticas.	48
6- Remoção de íons cromo em soluções sintéticas.	49
7- Resultados de bioissorção com microrganismos.	50
8- Remoção de íons de níquel em efluentes.	50
9- Remoção de íons de ferro em efluentes.	51
10-Remoção de íons de cromo em efluentes.	51
11- Influência da concentração da biomassa na remoção de metais	56
12- Capacidade de adesão dos suportes na biomassa.	60
13- Capacidade de adsorção da biomassa não imobilizada e Imobilizada com resina Zeveg e Quitina	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Esquema do processamento experimental para determinação da capacidade de bio sorção do material biológico em estudo.	34
2- Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria Lapinha.	44
3- Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria Bocaina.	45
4- Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria Tabaroa.	46
5- Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria Germana.	44
6- Remoção de níquel em função do pH de equilíbrio da biomassa (vinhoto).	54
7- Remoção de ferro em função do pH de equilíbrio da biomassa (vinhoto).	54
8- Remoção de cromo em função do pH de equilíbrio da biomassa (vinhoto).	55

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.	
JUSTIFICATIVA.	
Lista de Tabelas.	III
Lista de Figuras	IV
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	3
2.1 Biossorção.	5
2.1.1 Mecanismos de biossorção	7
2.2 Utilização de rejeitos de destilarias e aguardente de cana.	10
2.3 Problemas gerados pelos metais pesados.	12
2.3.1 Cromo.	13
2.3.2 Ferro.	14
2.3.3 Níquel.	15
2.4 Imobilização do biossorvente.	17
2.4.1 Imobilização celular.	19
A) Adsorção.	19
B) Ligação iônica.	19
C) Ligação covalente.	20
D) Ligação cruzada.	20
E) Confinamento em membrana.	20
F) Encapsulamento.	21
2.4.2 Matrizes de suportes para imobilização de células.	22
2.4.3 Aplicação de células imobilizadas.	25
3. OBJETIVOS.	27
3.1 Objetivo geral.	27
3.2 Objetivos específicos.	27

4. MATERIAIS E MÉTODOS.	28
4.1 Coleta das amostras e preparação do biossorvente	28
4.1.1 Determinação da umidade.	29
4.1.2 Agentes de adsorção.	30
4.1.3 Testes iniciais.	31
4.2 Experimentos de sorção de metais.	33
4.3 Imobilização da biomassa.	38
4.3.1 Procedimento geral de imobilização da biomassa por gel.	38
4.3.2 Procedimento geral de imobilização da biomassa por adsorção.	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	42
5.1 Determinação da umidade.	42
5.2 Análise de infravermelho.	43
5.3 Seleção de biomassa.	48
A) Efeito do pH.	52
B) Efeito da temperatura.	55
C) Efeito da concentração da biomassa.	55
6. Imobilização de biomassa em alginato, resina zeveg e quitina.	59
7. CONCLUSÕES.	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	63

RESUMO

A adsorção de metais pesados por microrganismos é de grande interesse para o tratamento de efluentes industriais, resultando na remoção de metais de ambientes poluídos. O material biossorvente pode ser constituído por biomassa viva ou morta. A utilização de biomassa morta evita problemas de manutenção do metais, nutrientes para o meio, entre outros. Os processos de absorção de metais com biomassa morta não envolvem o metabolismo, sendo este denominado biossorção. Neste trabalho utilizou-se o vinhoto (resíduo sólido do final da destilação da cana), como biossorvente. O vinhoto foi escolhido pela facilidade de obtenção e por apresentar baixos custos, pois o Estado de Minas Gerais é um potencial produtor de aguardente de cana.

Nos testes de adsorção de metais foram testadas biomassa oriundas de quatro destilarias: Bocaina, Germana, Lapinha e Tabaroa. Estas biomassas foram testadas em soluções sintéticas e posteriormente nos efluentes da siderúrgica ACESITA, que apresentam altas concentrações de Fe, Ni e Cr. A análise química deste efluente de espectrofotometria de plasma apresentou: 647,50 mg/l de Fe, 4.920 mg/l de Cr e 2.500 mg/l de Ni. Após os experimentos de adsorção verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com vinhoto de destilaria Germana que possui capacidade de absorver através de biomassa imobilizada ou não. Os melhores resultados de remoção de metais foram obtidos com biomassa não imobilizada com a seguinte capacidade de adsorção: 70% de cromo, 50% de ferro e 2% níquel no pH 4,0.

JUSTIFICATIVA

A biossorção de metais pesados por microrganismos é de grande interesse. Devido à possibilidade da sua utilização no tratamento de efluentes industriais, resultando na desintoxicação de ambientes poluídos por estes metais. A utilização de biossorventes para tratamento de efluentes apresenta uma vantagem adicional, pois estes são capazes de remover, metais elementos radioativos e tóxicos, através de processos acessíveis às indústrias.

Nos últimos anos tem-se observado um crescente aumento de pesquisas que visam à utilização de matérias biológicas obtidos a partir de processos industriais, e que tenham custos reduzidos. Isto se deve ao aumento da consciência ecológica e ao vigor das leis ambientais em vários países desenvolvidos, que proíbem o descarte de metais pesados, metaloides e radionuclídeos no meio ambiente. Sendo assim, o presente trabalho visa estudar a biomassa de resíduos de destilarias artesanais de aguardente de cana como uma nova alternativa de biossorvente

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o crescimento populacional desordenado aliado à população do modelo consumista, surgido nos países desenvolvidos, têm proporcionado a explosão industrial. A atividade industrial é responsável pela produção de inúmeros produtos de primeira necessidade, além de proporcionar, materiais de consumo e serviços. Sendo assim, costuma ser responsabilizada, muitas vezes com justa razão, pelo fenômeno da contaminação ambiental, tema que deixou de ser preocupação exclusiva de cientistas e transformou-se em clamor geral de uma sociedade mais consciente (PERALTA-ZAMORA et al., 1997). Em nosso país, os principais responsáveis pela poluição com metais pesados nos recursos hídricos são as siderúrgicas, metalúrgicas, indústria têxtil, mineradora, entre outras. Estes poluentes são descarregados em ambientes aquáticos e terrestres, principalmente, como solutos ou partículas, podendo alcançar concentrações elevadas em áreas próximas ao lançamento (GADD & WHITE, 1993). Metais pesados podem ser acumulados nos alimentos e trazer sérios problemas para homens e animais. Esses elementos possuem a capacidade de se ligarem a uma variedade de compostos orgânicos causando a desnaturação de proteínas, rompimento da membrana celular, decomposição de metabólicos e ainda apresentam um agravante: não são biodegradáveis (COSTA & LEITE, 1990). Devido ao aumento dos efeitos deletérios e tóxicos dos metais pesados na natureza, a legislação ambiental tornou-se mais rigorosa, despertando no setor industrial maior preocupação com tratamento de seus efluentes, Com este propósito um grande número de estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver uma tecnologia capaz de minimizar os efeitos tóxicos dos metais pesados. Dentre os novos Métodos desenvolvidos destacam-se a utilização de microrganismos para remoção de metais pesados nos efluentes industriais. Os microrganismos possuem capacidade para acumulam íons metálicos através de processos dependentes e independentes do metabolismo (VOLESKY, 1994)

Para a remoção e recuperação de metais pesados, as indústrias comumente utilizam métodos convencionais para tratamento de seus efluentes. Entre os processos tem-se a precipitação, evaporação, cementação, flotação, tratamento eletro-químico, processos com membranas e processos de sorção com carvão ativado. A precipitação química é o processo mais empregado, onde o metal é removido sob a forma de hidróxido, carbonato ou sulfeto em determinadas condições de pH. A aplicação destas tecnologias necessita de processos complementares, envolvendo várias etapas, custos elevados e deixam resíduos na natureza, o que aumenta a necessidade de se buscar novos métodos de preservação do meio ambiente (SUNDSTROM & KLEI, 1979).

Uma fonte alternativa e econômica é a utilização de biossorventes, biomassa microbiana viva ou morta que possam reter altas concentrações de íons metálicos, processo denominado biossorção. A fonte de matéria prima comumente utilizada para produção de biossorventes é constituída basicamente, por rejeitos de origem industrial, como por exemplo o produto final de processos fermentativos, ou natural, como o bagaço de cana, que podem ser utilizados como materiais complexos para remoção de metais e substâncias tóxicas (VOLESKY, 1990 a). A caracterização de biossorvente pode ser realizada tanto qualitativamente (mecanismo) quanto quantitativamente (modelo matemático). Os principais mecanismos responsáveis pela interação metálica e a formação dos complexos entre metais catiônicos e a biomassa aniônica são os componentes formadores da estrutura dos biomateriais (Treen-Sears et al., 1984).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em geral, as células microbianas em crescimento podem simultaneamente ou sequencialmente acumular metais com ou sem participação do metabolismo. Os processos que não dependem do metabolismo são denominados bioissorção enquanto que os processos dependentes são chamados de bioacumulação (VOLESKY, 1990 a). A ligação passiva do metal é observada em uma grande variedade de biomassas e tem sido sugerida como o primeiro estágio de adsorção de metais na superfície das células da parede, sendo uma reação reversível e de pouca duração. O segundo estágio, usualmente se refere a ligação ativa envolvendo transporte de íons para o citoplasma. (SAG & KUTSAL, 1996).

Bactérias, algas, fungos filamentosos e leveduras podem aculular metais pesados do ambiente externo, através de uma grande variedade de mecanismos (PREMUZIC et al. , 1991). Alguns desses mecanismos baseiam-se em um ou mais fenômenos, a saber:

- Ligação do metal a superfície do microrganismo.
- Deposição do metal no interior da célula.
Reações de oxidação e redução que são causadas por processos enzimáticos que precipitam os metais ao redor das células.
- Complexação do metal por metabólitos específicos, mantido solúvel ou transportado para dentro da célula através da membrana celular.
- Biotransformação de certos metais em compostos organometálicos.
- Mecanismos influxo e efluxo de metais através da membrana celular.

2.1 - Biossorção

A biossorção é definida como a capacidade da biomassa microbiana, viva ou morta, de concentrar elementos metálicos das soluções através de processos independentes do metabolismo (VOLESKY, 1990 b; GADD, 1990 A). Este tipo de interação depende de fatores externos, tais como: a variação de pH, presença de outros íons, tipo do metal e forma iônica em que se encontra na solução. O pH influencia os processos de biossorção em várias etapas como: a especificação do íon metálico na solução e a solubilidade do metal complexado. Altos valores de pH podem causar precipitação ou biossorção (SCHIEWER & VOLESKY, 1995).

Quando se utiliza a biomassa morta, a remoção de metais, as células não estão sujeitas a limitações tóxicas, não necessitando portanto da adição de nutrientes na solução de alimentação, da regulação dos períodos de exposição com os metais, do controle de temperatura, dos produtos do metabolismo e ocorre a redução na utilização de microrganismos patogênicos.

Outra vantagem apresentada neste processo é a possibilidade de reversão da ligação dos íons metálicos com os sítios de ligação da parede, possibilitando a recuperação dos metais. Portanto o processo não é comandado por restrições fisiológicas e o sequestro de metais é rápido, semelhante a uma resina de troca iônica (DARNALL et al., 1986).

Muitos metais, tais como Cu, Zn e Mn, em baixas concentrações, são essenciais para o crescimento e metabolismo microbiano. Entretanto, outros não possuem função biológicas essencial conhecida, como Au, Ag, Cd, Pb, Hg, e Al. Todos estes elementos em altas concentrações, são tóxicos para as células vivas, trazendo problemas na sua utilização (GADD, 1992).

Portanto, a utilização de biomassa morta ou produtos derivados, se tornam mais eficazes em muitas situações (GADD, 1990). Em geral, a escolha da biomassa, viva ou morta, no processo de remoção e recuperação de metais em efluentes, tem que ser baseada na eficiência e na viabilidade de cada caso, uma vez que os poluentes metálicos são uma ameaça ao sistema ecológico devido ao impacto negativo em muitas formas de vida (GOMES, 1995).

2.1.1 - Mecanismos de biossorção

Os mecanismos responsáveis pela remoção dos metais pesados em solução, envolvem diferentes interações físico-químicas como: complexação, coordenação, quelação de metais, troca iônica adsorção e microprecipitação (CHONG, 1993).

Complexação: A complexação é definida como a formação de um complexo pela associação de dois ou mais elementos químicos, cada um capaz de existir de maneira independente. Quando um dos elementos é um íon metálico a entidade resultante é conhecida como complexo metálico.

Coordenação : Quando um átomo metálico liga-se a um outro átomo não metálico esse é chamado receptor e o não metálico de coordenador. A ligação é chamada de ligação coordenada. O complexo metálico é um tipo particular de coordenação, por isso os termos coordenação e complexação são frequentemente usados como sinônimos.

Quelação de metais: Os íons inorgânicos simples e as moléculas, como NH_3 , Cn , Cl , H^+ , formam ligantes monodentados, isto é, um íon ou molécula ocupa um dos espaços disponível em torno do íon central na esfera de coordenação. Também são conhecidos ligantes bidentados, tridentados e até tetradentados. Os complexos formados por ligantes polidentados, são frequentemente denominados quelatos.

Desta forma, os metais são quelados devido á ação de compostos polidentados que liga-se fortemente a estes por meio de, no mínimo, duas ligações

Troca iônica: A troca iônica é o intercâmbio de partículas eletricamente carregadas que são formadas pela perda e/ou ganho de elétrons, Provavelmente trata-se do fenômeno mais comum na bioissorção.

Microprecipitação: A microprecipitação de metais ocorre quando substancias ao redor de célula, devido a imposição de condições químicas, convertem íons solúveis em sais insolúveis.

A parede celular das células microbianas são compostas de polissacarídeos, proteínas e lipídeos. O metal se liga a grupos funcionais desses compostos como carboxila, hidroxila, sulfato, fosfato e aminas (KUYUCAK & VOLESKY, 1988). Os mecanismos físico-químicos são baseados na ligação do metal á superfície da biomassa. Esta ligação pode ser considerada uma proteção do sistema contra a toxicidade dos metais pesados, em outros casos se pode formar uma camada externa impedindo a penetração do metal no interior da célula ou apenas admitir um tipo de ligação entre a célula e o metal (VEGLIÓ et al., 1997). De acordo com BRADY (1995), Têm-se observado que muitos metais de transição se ligam á biomassa morta de *Rhizopus arrhizus* por ligação covalente inibindo outros tipos de ligações.

Isto se deve a variações de carga e geometria dos grupos de ligação nas paredes e membranas dos microrganismos, que podem resultar em uma seletividade na remoção dos íons metálicos. Portanto, o conhecimento da estrutura química dos materiais biológicos é de grande valia para ligação do metal ao bioissorvente. A predominância de grupos livres carregados negativamente em vários polímeros que compõem a parede celular concedem às superfícies celulares um caráter aniônico, tornando-os eficientes para processos de adsorção catiônica (SONNENFELD et al., 1985; REMACLE, 1990; FOUREST & ROUX, 1992). Sendo assim, é importante que se façam estudos para melhor esclarecimento da ligação dos metais, para a seleção de bioissorventes na aplicação industrial.

2.2 Utilização de rejeitos de destilaria de aguardente de cana para produção de bioissorventes

A aguardente de cana-de-açúcar é obtida pela destilação do mosto fermentado proveniente do caldo da cana-de-açúcar. Após a destilação o resíduo remanescente na caldeira do alambique é chamado vinhoto”. O vinhoto é um resíduo industrial produzido em grande escala, apresentado sérios problemas com seu descarte em efluentes. Por isso são crescentes os estudos para sua aplicação

Esse resíduo da produção da cana, foi por longo período inadvertidamente liberado em cursos d’água, sendo considerado um produto desprezível. Com o aumento das preocupações ecológicas, passou-se a estudar formas viáveis de utilização deste produto, evitando jogá-lo em rios, onde constitui-se um fator de alta poluição, principalmente em função da alta demanda biológica de oxigênio.

Quanto á utilização alternativa, vinhoto pode ser usado para a alimentação animal e para fertilização do solo. Para o uso do produto “in natura “, na alimentação animal, fica restrito ás propriedades localizadas nas proximidades da indústria, em função da necessidade de transporte, que para longas distâncias, aumenta o custo. Neste sentido, trabalhos têm permitido concluir pela viabilidade do uso do vinhoto em substituição da água para bovinos em confinamentos com consumo de 18 a 22 litros/animal/dia.

Outra possibilidade, seria o uso do vinhoto concentrado, evaporando-se parte da água, prevalecendo um liquido viscoso cujos resultados parecem satisfatórios, principalmente quando o uso visa substituir o melaço na alimentação de bovinos, proporção de até 33% de substituição.

O vinhoto também pode ser utilizado como fertilizante, mas terá menor ou maior eficiência dependendo do tipo de solo, forma de aplicação e cultura utilizada.

A utilização do resíduo da fabricação da cachaça, levará a resultados mais ou menos satisfatórios, dependendo de cada situação específica. Não existe um projeto pré-concebido, que solucione o problema da poluição e da economicidade do uso deste resíduo para qualquer tipo de exploração de um alambique (Produção Artesanal de Aguardente, UFLA, 1996).

A parte sólida deste resíduo foi usada como biossorvente em nossos experimentos. As vantagens de se utiliza-lo são: baixos custos e facilidade de obtenção, pois a aguardente de cana é a principal bebida fermento destilada brasileira, sendo produzida em diversos Estados.

A microbiota na produção da aguardente artesanal é muito diversificada, variando de alambique para alambique. Podendo ser encontrado: *Saccharomyces*, leveduras apiculadas, *Cândida*, *Schizosaccharomyces* e outras. Isso porque é utilizada a fermentação espontânea, ou seja, conduzida pela ação de microbiota indígena que acompanha o substrato e os equipamentos, sem a presença do fermento.

Em Minas Gerais, a produção artesanal de aguardente é uma atividade tradicional e que se encontra em expansão. De acordo com estimativas do INDI (Instituto de Desenvolvimento industrial de Minas Gerais) em 1994, o Estado tinha cerca de 6000 alambiques cadastrados, com produção estimadas de 130 milhões de litros de aguardente. O volume da produção nacional não tem estatísticas precisas, mas estima-se que supera 1 bilhão de litros anuais (AQUARONE et al., 1983).

2.3 - Problemas gerados pelos metais pesados

A bioquímica e a toxicidade dos metais sido pesquisada durante décadas, enfatizando principalmente as interações dos metais com o ser vivo.

De acordo com FURST (1987), já é conhecida a bioquímica e o histórico médico causado por cada metal. Atualmente, tem sido estudado as interações dos metais com as substâncias orgânicas e inorgânicas, Os métodos de transporte dos metais através das membranas celulares para circulação sanguínea ou para o interior das células influenciam os seus efeitos tóxicos.

Os metais podem reagir com a acidez estomacal ou no ambiente alcalino dos intestinos, podendo mesmo influenciar na solubilidade dos mesmos. A inalação de partículas tóxicas pode resultar em rápida transferência do metal solúvel para o sangue (MERIAN, 1987).

2.3.1 – Cromo

O cromo é um elemento encontrado em muitos minerais e amplamente distribuído na crosta terrestre. A deficiência do cromo nos animais pode produzir diabetes, arteriosclerose e várias outras enfermidades. O cromo existe em vários estados oxidação, desde +2 até +6, mas somente os compostos trivalente e hexavalente são compostos metálicos. O cromo trivalente é um estado de oxidação mais estável e menos solúvel, já o cromo hexavalente tem sido considerado como tóxico e carcinogênico para os animais e humanos (MERIAN, 1987).

É comum nas águas industriais existir dois estados de oxidação do cromo: Cr +3 e Cr +6 . A toxicidade, solubilidade e mobilidade do cromo no ambiente depende ainda do seu estado de oxidação. A redução do Cr+6 e, Cr+3, é considerado um pré tratamento do Cr +6 nas águas residuais, Esta redução é feita por métodos químicos, que envolvem ajuste de pH a adição de agentes redutores. O tratamento é caro devido a utilização de várias amostras químicas e geração ativado (CHEN & HAO, 1997).

2.3.2 – Ferro

O ferro é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, considerado biologicamente muito ativo e também mais versátil que os outros elementos. O Único com propriedades essenciais no desempenho de catálises e processos metabólicos, E muito importante a sua assimilação no organismo pois participam de várias reações essenciais. Sua deficiência pode provocar inúmeras doenças mas em lata concentrações se torna tóxico para a atividade celular, Sua absorção é feita através da ingestão de alimentos que se interagem com o ferro livre. Devido á grande mobilidade n organismo, atinge rapidamente a mucosa intestinal e se espalha para outras partes do corpo. Em ambientes biológicos, o ferro é férrico é oxidante na forma ferroso (Fe^{+2}) e na forma Férrico (Fe^{+3}). O estado férrico é oxidante e suporta hidrólise, passando para a forma insolúvel de hidróxido férrico formando a ferrugem. Existem outras formas de oxidação que são mais difíceis de serem encontradas, entre as quais temos a forma tóxica pentacarbonil de ferro que se apresenta com a cor laranja. O ferro além de ser um elemento natural, é também muito utilizado na construção, transporte, fabricação de máquinas, produção de aço e indústrias energéticas (SAAGER, 1984).

2.3.3 - Níquel

O níquel é um elemento natural e abundante na crosta terrestre e largamente distribuído no nosso ambiente. O conhecimento de seus efeitos biológicos são variados dependendo da classe a que ele pertence, pois são compostos diferenciados. Quando o Ni, na forma bivalente, é encontrado em altas concentrações nas águas, solo e alimentos, geralmente, não se apresenta tóxico para plantas e animais. Nos humanos os efeitos são adversos, quando combinados com substâncias inorgânicas. Efluentes com a presença de níquel quando em contato com a pele ou ingeridos causa dermatites, aberrações cromossômicas e dificuldade respiratória. Em maior quantidade no organismo causa irritação no trato respiratório, induzindo à asma que posteriormente evoluem a câncer (WONG & FUNG, 1997). O níquel carboxílico é um importante composto orgânico do ponto de vista toxicológico, pois quando se liga a um lipídeo se torna solúvel, podendo penetrar nas membranas celulares e atravessar as barreiras do cérebro. Este metal é constituinte de mais de 3000 ligas de metais, como por exemplo o Ni-Cr-Fe para utensílios de cozinha, equipamentos anti-corrosão, o Ni-Cr para elementos de calor, turbinas de gás entre outros. É largamente utilizado nas indústrias de baterias, tintas para cerâmica, elementos para computadores, prótese dentária, siderúrgicas, metalúrgicas e têxtil.

O cromo hexavalente, os íons férrico e ferroso e o níquel são graves poluentes do meio ambiente, onde são encontrados frequentemente nas escórias das águas industriais, juntos a material químico orgânico e inorgânico, provenientes de indústrias de petróleo, aço, chapas, limpadores, depósitos e processadores de metais. Na limpeza de metais e fabricação de chapas são utilizados cerca de 20.000 a 75.000 e 15.000 a 52.000 mg/l de cromo e ferro respectivamente, enquanto que na produção de aço inox essa

concentração alcança níveis de 100.000 a 270.000 mg/l cromo, ferro e níquel, acentuando a necessidade de tratamento das águas residuais provenientes destes efluentes (SAG & KUTSAL, 1996).

2.4 – Imobilização do biossorvente

A imobilização é um termo geral que descreve as muitas formas das células serem encapsuladas ou aprisionadas. O conceito das células imobilizadas, vivas ou mortas, refere-se então a biomassa fisicamente confinada ou localizada em um região definida do espaço, de tal forma que suas características sejam mantidas, possibilitando sua utilização contínua (PRADELLA, 1987; PULITANO, 1992). As pesquisas na área de imobilização de células têm aumentado consideravelmente na área de biotecnologia e muitos trabalhos estão sendo realizados (MICHAEL & REEVES, 1997). As Células podem ser imobilizadas por adsorção de superfície, ligação iônica, ligação covalente, ligação cruzada, confinamento, encapsulamento em gel e aprisionamento na matriz. A escolha de um método vai depender do tipo de célula, natureza do substrato e do produto desejado. Entre os métodos pesquisados os mais utilizados em aplicações industriais são: o encapsulamento com géis (alginato de cálcio, carragenina ou poliacrilamida). Aprisionamento de células com polímetro em matriz de gel e adsorção em superfícies de suportes sólidos com prévia seleção (ATKINSON et al., 1980; CHIBATA et al., 1986; BEDELL & DARNALL, 1990). Estas técnicas também são consideradas comuns na imobilização de microrganismos (CASSIDY et al., 1996).

Experimentos com células imobilizadas em biorreatores têm demonstrado que estes apresentam inúmeras vantagens sobre as células livres em fase de crescimento, tais como: a possibilidade de manutenção em elevadas concentrações celulares, obtenção de elevada produtividade, a possibilidade de reaproveitamento do biocatalizador e a flexibilidade de

permitir o funcionamento contínuo e estável dos biorreatores sem problemas com lavagem de células (PAZ, 1992).

Como exemplo pode-se citar o crescimento celular que pode ser controlado com a adição proporcional de nutrientes sem maiores problemas no biorreator (GADD, 1986; TSEZOS, 1986). Já nos processos aeróbios, é necessário um maior controle das concentrações celulares, devido a taxa limitada de oxigênio no meio (NILSON et al., 1980).

Para obtenção de melhores resultados, são empregados normalmente uma combinação de diversas técnicas. Uma combinação típica é a adsorção do biocatalizador por gel, seguido da técnica de ligação cruzada usando agentes bifuncionais. Estes métodos podem ser feitos através de suporte sólido (ligações covalentes e adsorção) ou por inclusão (matriz ou cápsulas).

No primeiro caso a ligação pode ser feita entre enzimas e no segundo através de carreadores que entram na matriz de polímeros ou por aprisionamento pela membrana (HARTMEIER, 1988).

2.4.1 – Imobilização celular

Segundo HATTMEIR (1988) há seis métodos de imobilização de células, enzimas ou organelas, os quais podem ser combinados entre si originando novas técnicas.

A) Adsorção:

Neste caso, o material que se deseja imobilizar é ligado á superfície do suporte por forças físicas, como de Van der Waaks , e por outros tipos de interações, como ligações iônicas, pontes de hidrogênio, além de interações hidrofóbicas. Apesar de simples e rápida, esta técnica apresenta desvantagens devido á tentativa fragilidade das forças de adsorção, as quais podem ser rompidas por variações na temperatura, pH e na composição do meio fermentativo.

B) Ligação iônica :

O método de ligação iônica é baseado na atração eletrostática entre grupos de cargas opostas, presentes no suporte e na espécie que se deseja grupos de cargas opostas, presentes no suporte e na espécie que se deseja imobilizar. Este processo é bastante simples e pode ser realizado em condições ambiente de temperatura e pressão. Ocorre também por agitação das partículas do suporte, em solução ou suspensão de células que contenha o material a ser imobilizado ou através de um fluxo destas soluções ou suspensões sobre partículas do suporte.

C) Ligação covalente:

Na ligação covalente, os átomos estão ligados através do compartilhamento de pares eletrônicos, obtendo-se fortes ligações entre as espécies de interesse. Este processo é bastante aplicado na imobilização de enzimas, sendo pouco utilizado para células. Uma desvantagem deste método é a tensão à qual se sujeita a enzima, pela intensidade da ligação, o que pode levar a variações consideráveis na conformação enzimática, resultando em perda de parte da atividade catalítica.

D) Ligação cruzada:

Neste processo, unidades isoladas de células, enzimas ou organelas são ligadas umas às outras através de agentes bi ou multifuncionais, formando, geralmente, agregados insolúveis de elevado peso molecular. Este método é relativamente simples, tendo no entanto, algumas desvantagens.

Geralmente, as partículas obtidas por este método são gelatinosas e pouco resistentes. Quando se emprega substratos de peso molecular elevado em concentrações reduzidas, o acesso dos mesmos aos sítios ativos é limitado pelas condições desfavoráveis à difusão. Como este método geralmente envolve ligações do tipo covalente, podendo ocorrer perda na conformação do material imobilizado com consequente perda de atividade.

E) Confinamento em membrana:

Este método tem por objetivo delimitar o espaço no qual o biocatalizador exerce sua atividade, através da utilização de uma membrana

semipermeável que permite a difusão de substrato e produtos, retendo a espécie imobilizada em seu interior.

As vantagens deste método consistem na boa estabilidade mecânica e química do sistema, além da possibilidade do controle da reação através da difusão seletiva de substrato e produtos.

F) Encapsulamento:

A técnica consiste na utilização de uma grande variedade de matrizes carreadoras. Este método não tem sido muito utilizado para imobilização de enzimas, mas recentemente foi o escolhido para imobilização de células e organelas (MORBACH, 1976). O encapsulamento é realizado através do envolvimento do polímero sobre o biocatalizador, sendo as células aprisionadas por unidade do polímero, criando uma barreira (obstáculo) para que o suporte e os produtos das moléculas passem livres mas seja impermeável ao biocatalizador. Uma vez que os biocatalizadores são mais importantes que os suportes com o qual agem, existem muitos caminhos nos quais as barreiras utilizadas são confeccionadas por matérias básicas, de tamanhos variados, dependendo de sua utilização. Deverá ser indicado em qual concentração da solução, o biocatalizador age livremente confinado no sistema de encapsulamento (LEFEBVRE, J. I. & VICENT, C, J., 1995).

2.4.2 – Matrizes de suportes para a imobilização de células

A literatura cita a utilização dos mais variados materiais na imobilização celular e, de forma geral, pode-se classifica-los em suportes orgânicos. Na tabela 1, adaptada por KOLOT (1981), são mostrados os suportes mais comumente utilizados.

Tabela 1: Suportes mais utilizados na imobilização de microrganismos, adaptados de KOLOT (1981).

Compostos Orgânicos			Compostos Inorgânicos	Outros materiais
A	B	C	Alumina	Serragem
K-Carrageno	Gelatina	Poliestireno	Cerâmica	Bagaço de cana de açúcar
Aginato	Colágeno	Resinas fenólicas	Sílica	Celite
Pectina		Poliacrilamida	Vidro	Fragmentos de madeiras
Quitina		Cloreto de polivinila	Zircônia	Palhas
Celulose		Resinas de troca iônica (Zeveg)	Aço inoxidável	

Obs: A – Polissacarídeos
B – Proteínas
C – Polímeros Sintéticos

Segundo alguns autores (GHOMMIDH et al., 1982; HARTMEIER 1988; PHILLIPS & POON, 1988), a seleção de suporte a ser empregado na imobilização de células envolve alguns critérios básicos. Em todos estes critérios, deve-se levar em consideração os seguintes fatores: a massa do biocatalizador, o comportamento cinético e a estabilidade do material a ser imobilizado. A massa do biocatalizador se refere não somente à quantidade real das células que sofrem imobilização, mas também ao fato de que, no decorrer do processo não ocorra perda de atividade ou de sítios ligantes e

que o comportamento cinético do complexo (biocatalizador e suporte) sejam estabilizados.

Para que um material possa ser usado como suporte deve-se levar em consideração, entre outros fatores, a resistência do suporte no meio reacional, isto é, o suporte deve ser pouco ou muito pouco solúvel no meio, Principal nas condições de operação. A morfologia do suporte é extremamente importante principalmente a superfície de contato e a porosidade, fatores esses que afetam a atuação do biocatalizador. De acordo com os fatores mencionados acima, os suportes podem ser classificados da seguinte maneira:

- Não porosos
- Porosos: - porosidade controlada
- estrutura de gel

Além da morfologia básica, é possível usar o mesmo suporte em diferentes configurações, como fibra ou membrana.

Suportes não porosos, possuem superfície de contato extremamente baixa, dificultando a fixação dos biocatalizadores. Esse problema pode ser contornado, usando os suportes sob a forma de fibras ou pequenas partículas. Entretanto, partículas ou mesmo fibras são de difícil remoção e devido à quedas de pressão e baixa velocidade de escoamento que provocam, limitam seu uso em reatores contínuos. Por outro lado, oferecem a vantagem de fixar o biocatalizador externamente, o que o coloca imediatamente em contato com o meio reacional. Atualmente, suportes porosos, orgânicos ou inorgânicos, são encontrados no mercado, como por exemplo, poliestireno macro reticular, um suporte orgânico de porosidade controlada. A maior desvantagem do suporte poroso é que, todos os agentes

são importantes no processo, principalmente, as grandes moléculas dos biocatalizadores, que devem penetrar na superfície interna ou na estrutura do suporte para garantir a fixação. Além disso, substratos com moléculas maiores que os dos biocatalizadores podem não penetrar nos poros e, nesse caso não ocorreria a reação desejada já que, grandes quantidades de biocatalizador não devem ser utilizados. As vantagens dos materiais porosos são: grandes áreas para imobilização, proteção do biocatalizador, carga superficial oposta à do biocatalizador (HARTMEIER, 1988).

2.4.3 – Aplicação de células imobilizadas

Embora não fossem conhecidos os princípios da imobilização, a aplicação de células imobilizadas em processo de larga escala industrial eram amplamente empregados na produção de compostos orgânicos desde os primórdios do século XIX. Neste período, o vinagre era produzido em tanques contendo pedaços de madeira, cerâmica, carvão e outros materiais, sobre os quais eram gotejados soluções aquosas contendo etanol, propiciando assim o desenvolvimento de bactérias na superfície dos suportes (PHILLIPS & POON, 1988).

A utilização de células imobilizadas é hoje um dos enfoques para a incorporação de biomassa microbiana dentro dos processos de engenharia. Várias espécies microbianas têm sido encapsuladas em diversas matrizes para diferentes aplicações industriais, ambientais, analíticas e quimioterapêuticas (ANSELMO et al., 1985; FRAVEL et al., 1985). Na aplicação ambiental são utilizadas na agricultura (BASHAN, 1986), como biocontrole (AXTELL & GUZMAN, 1987), pesticidas (CONNICK, 1982), no tratamento de águas e na hidrólise de celulose, hemi-celulose e lignina contidos em águas urbanas. Além destas aplicações têm sido relatado que a imobilização têm se mostrado como ótimo ligante de metais de águas industriais, devido ao maior poder de adesão conferido as células (FRY & MEHLHORN, 1994). A imobilização biológica para evitar os desperdícios e poluição da água (COSTA & FRANÇA, 1996).

A imobilização têm sido utilizada no tratamento sintético de águas residuais, devido a facilidade do processo e o curto período de sua realização (HSU et al., 1996). O aumento considerável de estudos sobre o crescimento e fermentação tem demonstrado que as células imobilizadas apresentam

maior resistência às condições adversas apresentadas pelo ambiente (KRISCH & SZAJÄNE, 1996). Sendo assim, o presente trabalho baseou-se na capacidade dos resíduos industriais oriundos de destilarias de aguardente de cana “*in natura*” e immobilizados, em remover metais pesados presente em efluentes industriais.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Estudar a biomassa microbiana resultante da produção de aguardente de cana, como material sorvente de metais pesados em efluentes industriais, visando o controle da poluição e/ou reciclagem destes rejeitos.

3.2 – Objetivos específicos

- Estudar a biomassa microbiana de destilarias de cachaça e testá-la quanto à capacidade na remoção de metais.

- Caracterizar o biossorvente quanto a aspectos físico-químicos e cinéticos.

- Testar diferentes materiais como suporte para imobilização da biomassa.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Coleta das amostras e preparação do bioissorvente

A seleção e avaliação do material sólido contido no vinhoto, foi feita através de coletas em quatro destilarias produtoras de aguardente de cana do Estado de Minas Gerais. Durante a safra de cana-de-açúcar no ano de 1997 foram feitas as coletas de aproximadamente 25 litros de vinhoto de cada destilaria. O vinhoto foi devidamente identificado, através do nome do produtor local, data de coleta e a espécie de cana utilizada. Em seguida, o material foi centrifugado por 20 minutos, a 5.000 rpm a temperatura ambiente. A biomassa obtida foi lavada em água destilada deionizada por três vezes e seca a 60°C até atingir peso constante, logo após foi moída.

Antes de iniciar os testes de bioissorção determinou-se a umidade de cada biomassa.

4.1.1 – Determinação da umidade:

Para determinar a umidade utilizou a seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{P2 - P1}{P_{\text{amostra}} (g)} \times 100$$

P2 = cápsula + amostra seca (em uma estufa a 105^oc; 24 horas)

P1 = cápsula vazia

P_{amostra} = 100 mg de biomassa

A umidade foi determinada pela diferença de massa do material pela quantidade de amostra utilizada. O excesso de água do biossorvente, foi removido previamente, colocando-se o material em um meio poroso (papel de filtro) e levado a estufa a 105^oc por 24 horas. Após o cálculo, pode-se avaliar o valor de retenção da água expresso em mg de água/grama de biomassa seca (SIMON, 1991).

4.1.2 – Agentes de adsorção:

Foram utilizadas biomassas inativas recuperadas do vinhoto das seguintes destilarias: Lapinha, Bocaina, Germana e Tabaroa.

A fim de se verificar a afinidade da biomassa com os metais, os primeiros testes de biossorção foram feitos em soluções sintéticas com diferentes valores de pH (2,0, 3,0, 4,0, e 5,0).

Meios sintéticos

Foram efetuados testes em meios sintéticos, empregando-se os seguintes óxidos e sais $K_2Cr_2O_7$, Fe_2O_3 , e $NiSO_4 \cdot 6H_2O$. A concentração inicial dos seguintes metais nos meios sintéticos foi de 50 mg/L. Os meios foram codificados como se segue:

Meio 1: Fe_2O_3

Meio 2: $NiSO_4 \cdot 6H_2O$

Meio 3: $K_2Cr_2O_7$

Meio 4: $Fe_2O_3 + NiSO_4 \cdot 6H_2O$

Meio 5: $Fe_2O_3 + K_2Cr_2O_7$

Meio 6: $Fe_2O_3 + NiSO_4 \cdot 6H_2O + K_2Cr_2O_7$

4.1.3 - Testes iniciais

A biomassa foi testada como bioissorvente utilizando-se efluentes da siderúrgica ACESITA, que possuem altas concentrações de poluentes, tais como: Cr, Fe, Ni. Para se compreender a bioissorção passiva, ou seja, adsorção do metal por células ou dos componentes da parede celular por espectrofotometria de infra vermelho (EIV). Esta técnica é uma ferramenta indispensável para a determinação de informações estruturais em relação às substâncias orgânicas. Suas aplicações abrangem as áreas das análises tanto qualitativas quanto quantitativas. Na interpretação do espectro se compara o espectro de um composto desconhecido com uma amostra conhecida, a correlação do pico a pico constitui boa prova de identidade visto ser muito pouco provável que dois compostos diferentes tenham o mesmo espectro (SILVERSTEIN et al., 1987). As análises foram feitas pelo Laboratório do Departamento de Química da UFMG, no infravermelho por transmissão, com pastilhas de KBr, em espectrômetro da Perkin-Elmer modelo 1430 e em um espectrofotômetro Mattson modelo 3020.

A siderúrgica ACESITA possui três etapas na produção de aço inox. A primeira etapa produz o aço e o efluente oriundo desta etapa recebeu a denominação de 3ª. Após a produção de aço, parte deste passa por um tratamento chamado recapagem, no qual todo o aço é revestido pelo elemento químico cromo, este efluente é denominado 1ª. Depois deste tratamento, o aço pode ser considerado inox. Já o processo denominado banho químico (efluente 2A) é a etapa na qual o aço inox passa a ter brilho e o elemento químico responsável por esta etapa é o níquel.

Nestes experimentos foram empregados os três tipos de efluentes coletados na ACESITA, cuja composição é mostrada na **Tabela 2**. Os meios

testados foram diluídos numa razão de 1:13 (efluentes 1A e 2ª) e 1:16 (efluente 3ª).

Tabela 2: Composição dos efluentes (“*in natura*”) da ACESITA

Tipo de efluente	Fe (mg/l)	Cr (mg/l)	Ni (mg/l)
1A	64750	4920	250
2A	45750	4700	2.120
3A	72750	157,5	59

*Antes de serem tratados

4.2 – EXPERIMENTOS DE SORÇÃO DE METAIS

1ª Etapa

Foi analisado o material sorvente em soluções sintéticas de Cr, Fe e Ni contendo diferentes concentrações e combinações de metais. Após estes resultados a biomassa foi então testada em efluentes industriais, que além dos vários metais, possuem interferentes como ácidos, sais e outros. O procedimento experimental de obtenção dos dados, é descrito a seguir:

As soluções contendo metais pesados (meios sintéticos ou efluentes) foram previamente diluídas, para obter uma concentração aproximada de 50mg/l dos metais Fe, Ni e Cr. O volume utilizado foi de 50ml, sendo distribuídos em Erlenmeyer de 250 ml. Os experimentos envolveram simples contato entre o material adsorvente e a solução contendo a espécie a ser adsorvida, conforme esquema mostrado na **Figura 1**. Após três horas de contato com o pH sendo controlado de uma em uma hora, os conteúdos foram filtrados e as concentrações residuais de íons metálicos, determinadas pelo Laboratório de plasma e raio-x da UFMG através de espectrofotometria de absorção atômica, modelo AA-475 Varian, método de dosagem direta com ar/acetileno (APHA, 1992). A quantidade de espécie sequestrada (íon metálico) pelo adsorvente foi determinada pela diferença entre a concentração de metais em soluções antes e depois da exposição ao biossorvente (concentração inicial (C_i) e final (C_f)), através da equação 1:

$$q = \frac{V (C_i - C_f)}{m}$$

- C_i → Concentração inicial do íon metálico, em mg/l.
- C_f → Concentração residual final de equilíbrio, em mg/l.
- V → Volume da solução, em ml.
- m → Massa do bioissorvente, em g.
- q → Capacidade de bioissorção, em mg do íon metálico/grama de biomassa.

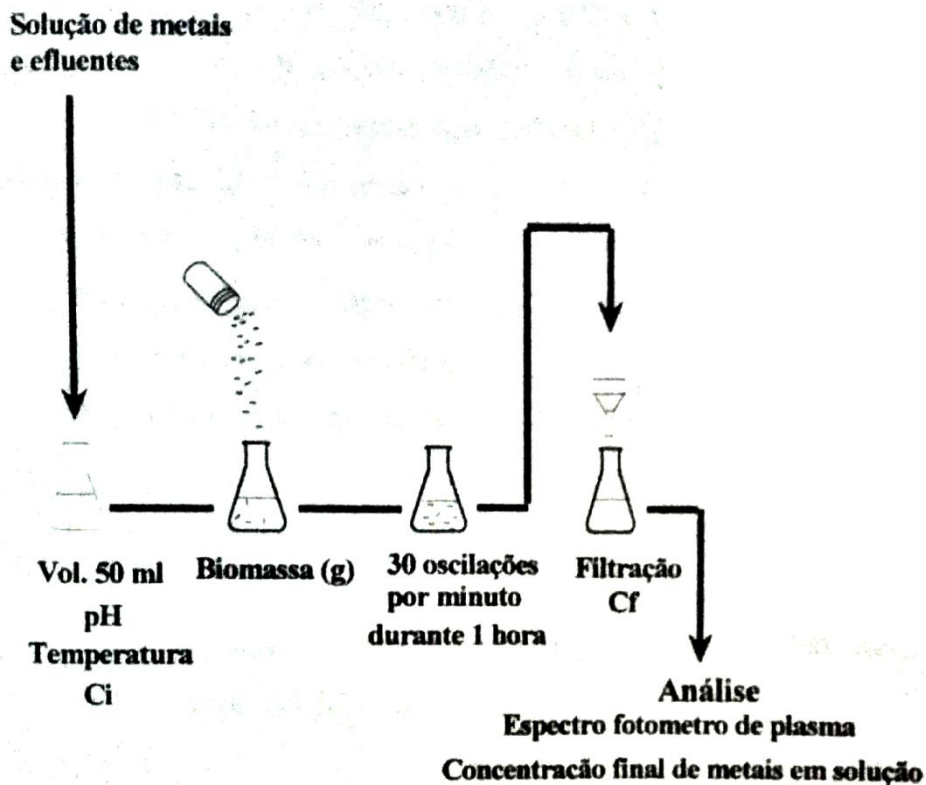


FIGURA-1: Esquema do procedimento experimental para determinação da capacidade de bioissorção do material biológico em estudo. C_i representa a concentração inicial de metal na solução e C_f a concentração final.

Fonte – VOLESKY, p. 23, 1990.

2ª Etapa

ISOTERMAS DE SORÇÃO

As isotermas de adsorção são feitas para se ter uma avaliação quantitativa da capacidade de bioadsorção da biomassa (VOLESKY, 1990 a). O material adsorvente é testado em função do metal que se está estudando. Traça-se a isoterma de sorção, plotando a capacidade de bioadsorção em função da concentração residual final de equilíbrio (TSEZOS, 1995). A capacidade de bioadsorção das biomassas é afetada tanto pela temperatura quanto pelo pH. Contudo, o pH tem maior influência na capacidade de bioadsorção. Vários modelos já foram propostos para descrever, quantitativamente, o fenômeno de adsorção (VOLESKY, 1990 a). Consideram-se melhores os que correlacionam os dados experimentais da bioadsorção, os quais são propostos por LANGMUIR e FREUNDLICH.

O modelo de LANGMUIR tem como premissas:

- A superfície do sólido é constituída por certo número, "S" , de sítios de adsorção;
- As espécies adsorvidas (adsorvatos) interagem somente com um sítio ativo;
- A adsorção se dá apenas em uma camada;
- a energia de adsorção é idêntica para todos os sítios e independente da presença das espécies adsorvidas em qualquer outro sítio;

- É utilizada para pequenas concentrações de metais

Resultando na seguinte expressão:

$$Q = \frac{q_0 \times K \times C_f}{1 + K C_f}$$

Quando a concentração é muito baixa, $C_f \rightarrow 0$, temos “($1 + K C_f \approx 1$ ” , temos:

$$q = q_0 k C_f$$

Isto é, quantidade adsorvida (q) , em baixas concentrações, é diretamente proporcional à concentração residual final (C_f) , sendo representada por uma reta cuja inclinação indica a afinidade entre o adsorvente e o adsorvato. Por outro lado, quando temos altas concentrações, $K C_f \geq 1$, e ($1 + K C_f$) , temos:

$$q = q_0$$

Ou seja, em concentrações elevadas, a capacidade de adsorção tende a seu valor máximo, definido como capacidade de carregamento.

O modelo de FREUNDLICH é um modelo empírico que propõe uma distribuição exponencial dos diversos sítios de adsorção. A equação que descreve este modelo é da forma:

$$Q = K^* \times C^{1/N}$$

Onde, K^* e “ n ”, são constantes do modelo de FREUNDLICH. Estas constantes são determinadas ao linearizarmos esta equação, que representa bem os resultados experimentais para faixas medianas de concentrações em sistemas onde premissas do modelo de LANGMUIR são validas. Este modelo não fornece informações a respeito da capacidade de carregamento da biomassa. Nestes experimentos podemos também utiliza dois metais gráficos tridimensionais, podendo assim caracterizar se o bioissorvente na presença de dois metais acelera sua adsorção ou metal compete com o outro diminuindo assim o poder de adsorção do bioissorvente, Por isso foram feitos experimentos para se caracterizar este bioissorvente (CHONG & VOLESKY, 1996).

4.3 – Imobilização da biomassa

4.3.1 – Procedimento geral de imobilização da biomassa por gel

O processo de imobilização foi realizado em três etapas:

- Obtenção da suspensão polimérica à qual será adicionada uma suspensão celular com 10^8 células / ml;
- extrusão da suspensão resultante com a solução gelificante para os géis naturais;
- gelificação das partículas.

Alginato de cálcio:

O alginato é um hetero polissacarídeo estrutural encontrado em muitas espécies de algas marrons, entre elas a *Macrocystis pyrifera*, na qual é um importante constituinte da parede celular.

Nos experimentos foi utilizado 0,51 g de alginato de sódio (1%), após a obtenção da suspensão, pela adições de 18 ml de água destilada, a mesma foi esterilizada a 120°C , por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 6 ml de 10^8 células / ml a 35°C . A suspensão foi extrudada, com auxílio de uma seringa e agulha hipodérmica com 1 mm de diâmetro interno, por gotejamento e, 200ml de uma solução estéril contendo o sal gelificante na concentração de 2% de cloreto de sódio. Após a formação das “partículas” de alginato de cálcio

Contendo a biomassa em seu interior, agitou-se por mais 1 hora, filtrou-se e conservou-se por até uma semana. A imobilização em alginato foi utilizada para comparação da capacidade de bioabsorção de metais com os outros suportes.

4.3.2 – Procedimento geral de imobilização da biomassa por adsorção

Para uma avaliação preliminar dos suportes foi adotado um procedimento padrão de imobilização, mantendo fixa a relação biomassa e suporte em 1:2 .

Inicialmente, 5 gramas de biomassa foram dissolvidas em 40 ml de uma solução á 5% de glutaraldeido e misturadas com 10 gramas de cada tipo de suporte testado. A adsorção da biomassa ao suporte foi realizada em repouso a temperatura ambiente durante duas horas. A biomassa imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo e o sistema imobilizado lavado com solução 0,3 % de KCL para remoção da biomassa não adsorvida no suporte. Os biocatalizadores imobilizados foram levados a secagem numa estufa a 60°C durante 18 horas. Verificou-se a adesão do suporte na biomassa através da análise de carbono, hidrogênio, nitrogênio e umidade da biomassa, do suporte e da biomassa imobilizada nos demais suportes pelo Laboratório de Química fina da FAENQUIL (S.P) pelo aparelho Perkin Elmer, Elemental Analyser, modelo 2400 CNL. Logo após, foi testado a viabilidade do uso desses suportes nos experimentos de adsorção de metais pesados (Fe , Ni e Cr), de acordo com procedimento padrão.

Suporte utilizados na imobilização por adsorção:

Zeveng:

Nome comercial de uma resina de troca iônica, muito utilizada em imobilização de enzimas (CASTRO, 1985).

Quitina:

Polissacarídeo duro, nitrogenado, presente no exoesqueleto dos artrópodes, na cutícula epidérmica, em outras estruturas superficiais de muitos outros invertebrados e nas paredes celulares de Certos fungos (CURTIS, 1977).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Determinação da umidade

Foram feitos os cálculos de massa seca e úmida de cada biomassa. Os valores estão na tabela 3 e expressos em mg/g.

Tabela 3: Capacidade de retenção de água e massa seca das biomassas testadas.

BIOMASSA	MASSA SECA (Mg/g)	RETENÇÃO DE ÁGUA (mg/g)
Lapinha	97,10	2,90
Tabaroa	93,45	6,55
Bocaina	94,35	5,65
Germana	92,51	7,49

De acordo com os resultados obtidos na tabela 3, biomassa com maior capacidade de retenção de água foi a Germana e a com menor retenção foi a Lapinha. Após a realização destes experimentos, foi feita correção pelas biomassas, em função da retenção da umidade.

5.2 – Análise de infravermelho

A caracterização dos grupos superficiais presentes nas biomassas foram realizados por espectroscopia no infra- vermelho. Todos os materiais mostraram, uma forte redução na transmitância no comprimento de onda de 3200-3650 cm^{-1} , indicando uma alta concentração de ligações O-H, apesar de terem sido tomados os cuidados para manter o material isento da umidade. A absorbância em 1000-1260 cm^{-1} mostra a presença de ligações C-O, confirmando a existência de grupos oxidrilas de polissacarídeos (Figura 2,3,4,5). A redução da transmitância em todos os biossorventes em 1700-1750 cm^{-1} , mostra a existência do grupamento C=O, possivelmente de grupos carboxilas de proteínas. As ligações S-H, são indicativas do grupo tiol, com absorbância por deformação axial em 2550-2600 cm^{-1} que aparecem no espectro. /ligações N-H de amins primárias ou amins secundárias com absorbância típicas em 3400-3500 cm^{-1} e 3310-3350 cm^{-1} também são encontradas no espetro. As análises demostraram que as biomassas apresentavam um alto teor de álcool primário e secundário, grupo tiol, carboxilas e grupos OH.

De acordo com VOLESKY (1990) os íons metálicos como Cr e Fe, apresentam maior afinidade por alguns grupos ligantes como: O-H, C-O, C=O e N-H pois formam ligações rápidas do tipo troca-iônica. Já os grupamentos S-H (tiol) formam ligações estáveis, normalmente com complexo insolúveis. O Níquel geralmente se liga a grupamentos N, NO_2 e S, pois formam interações estáveis com os grupos que não se encontram livres na solução.

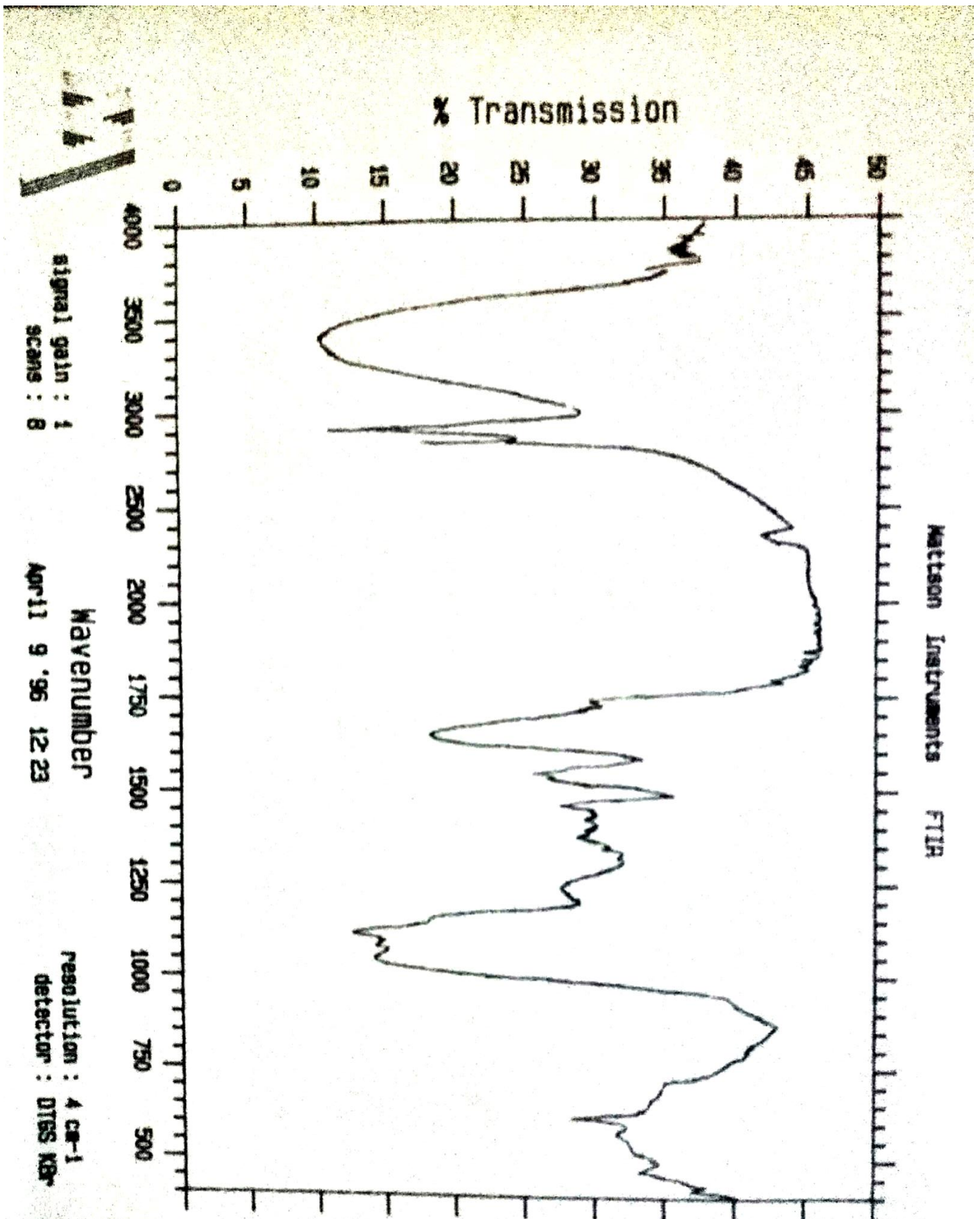


Figura 5.1 : Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria lapinha

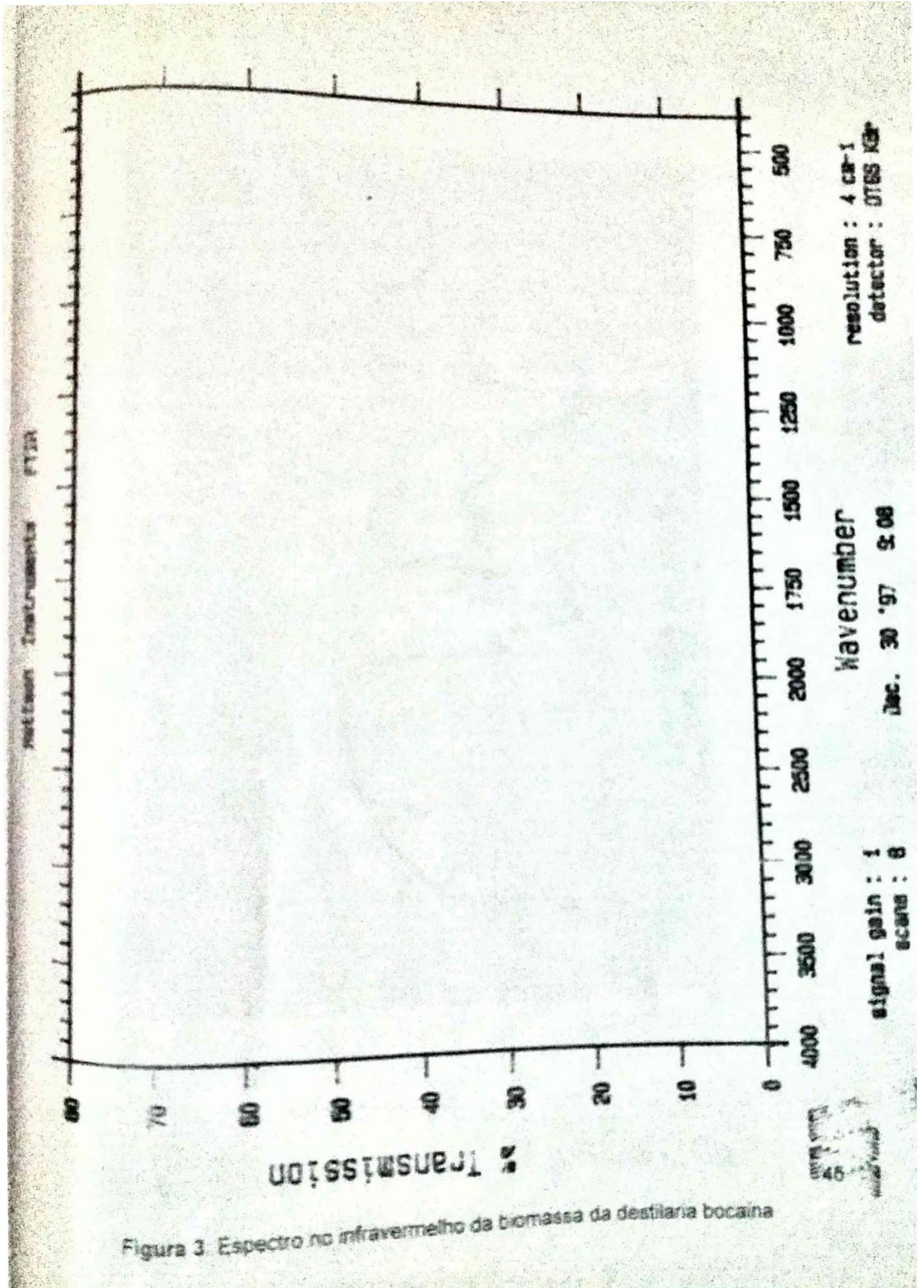


Figura 3. Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria bocaina

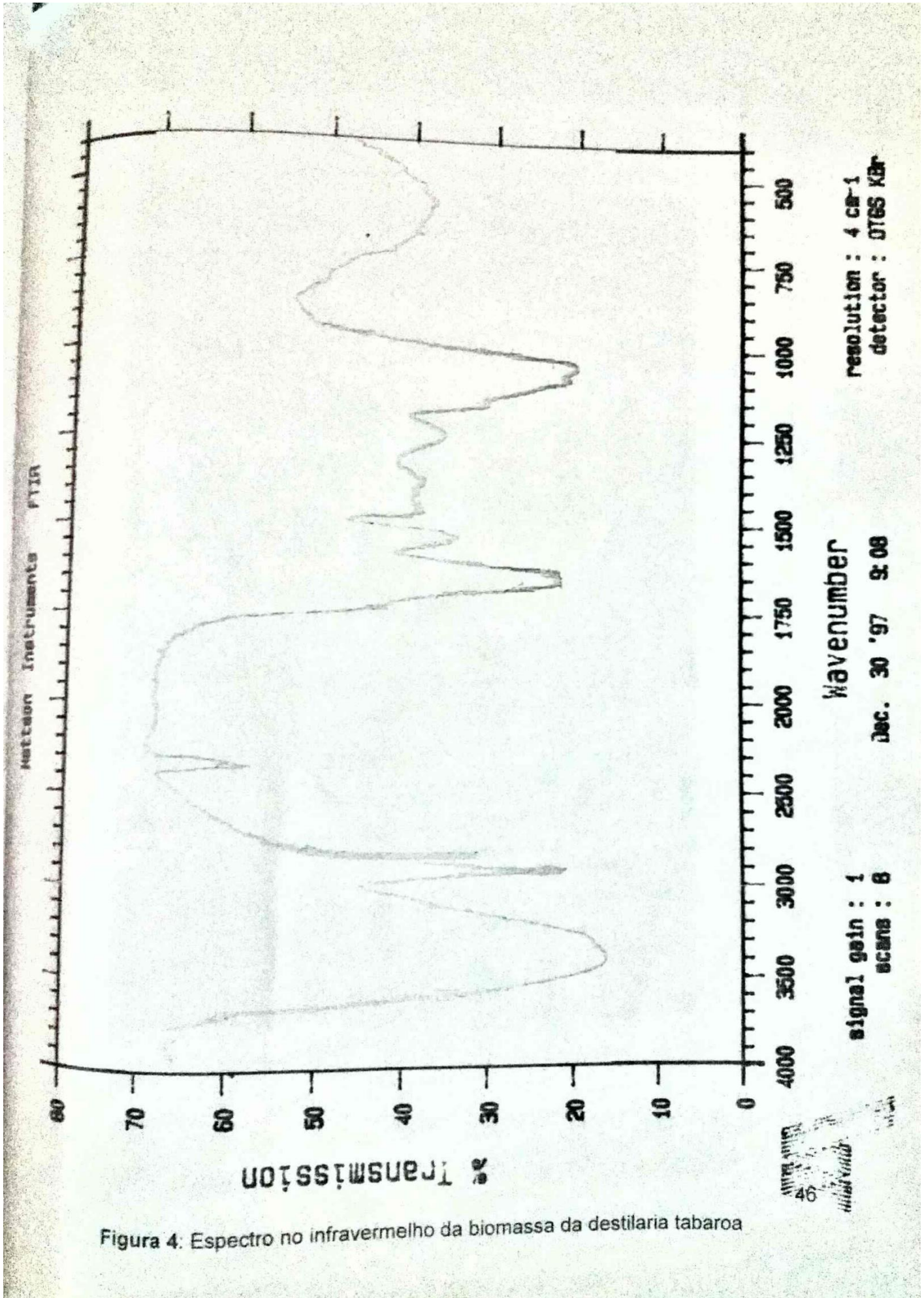
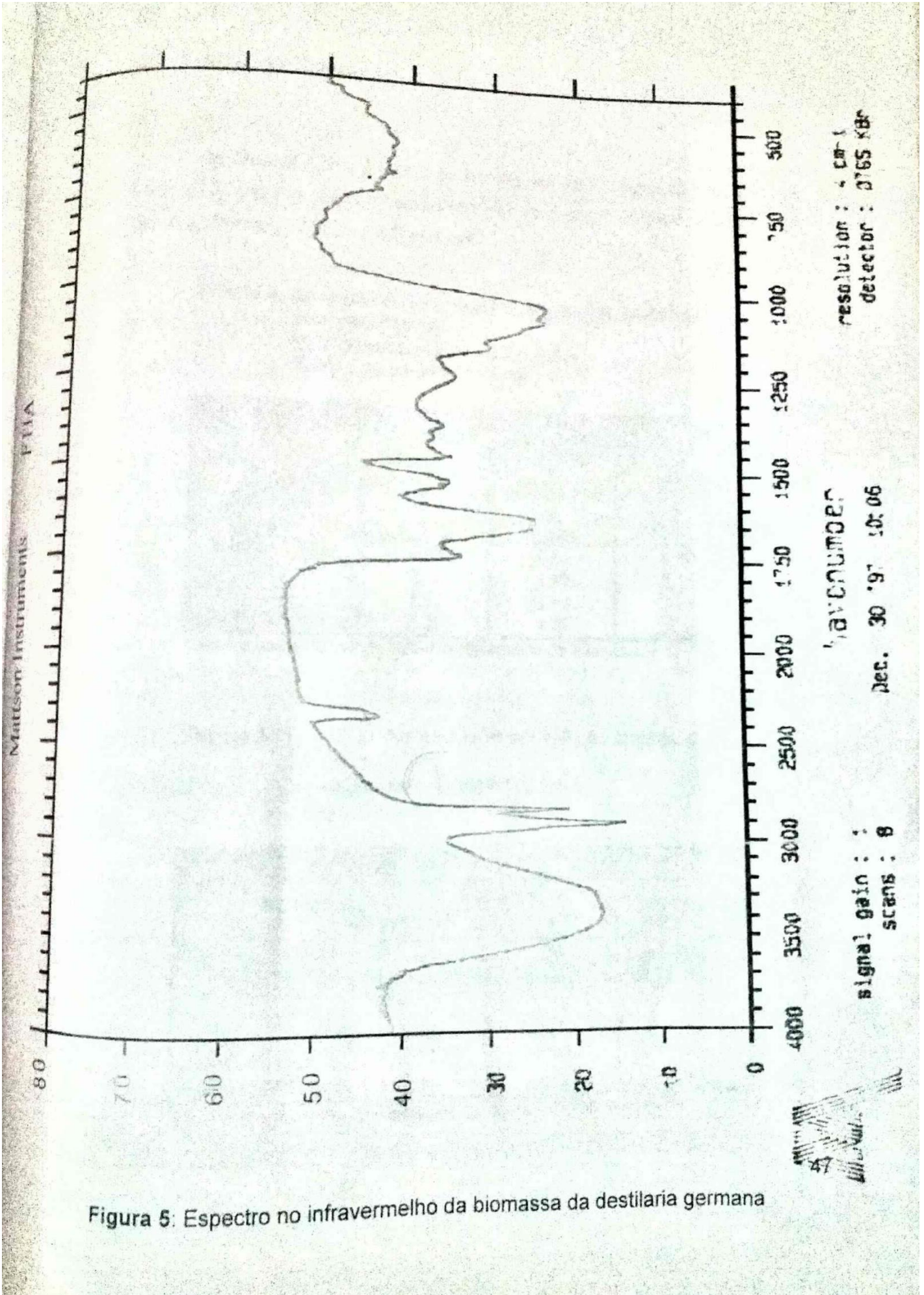


Figura 4. Espectro no infravermelho da biomassa da destilaria tabaraoa



5.3 – Seleção da biomassa

As tabelas 4,5 e 6 listam os resultados de remoção dos íons Níquel, Ferro e Cromo em soluções sintéticas das biomassas obtidas das destilarias Lapinha, Bocaina, Tabaroa e Germana.

Tabela 4: Remoção de íons níquel em soluções sintéticas:

Biomassa: 50mg

Tempo de contato: 3 horas

NÍQUEL			
BIOMASSA	Soluções sintéticas		
	pH = 2,0	pH = 3,0	pH = 5,0
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
LAPINHA	0,00	4,71	4,80
BOCAINA	0,00	3,48	5,13
TABAROA	2,40	2,49	1,22
GERMANA	3,25	4,37	15,01

Obs: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

Tabela 5: Remoção dos íons ferro em solução sintética:

Biomassa: 50 mg

Tempo de contato: 3 horas

FERRO			
BIOMASSA	Soluções sintéticas		
	pH = 2,0	pH = 3,0	pH = 5,0
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
LAPINHA	6,05	16,12	0,00
BOCAINA	2,62	2,50	0,00
TABAROA	2,27	1,36	0,00
GERMANA	12,80	25,10	0,00

Obs: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

Tabela 6: Remoção dos íons cromo em solução sintéticas

Biomassa: 50mg

Tempo de contato: 3 horas

CROMO			
BIOMASSA	Soluções sintéticas		
	pH = 2,0	pH = 3,0	pH = 5,0
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
LAPINHA	8,27	9,05	1,51
BOCAINA	1,87	4,62	3,25
TABAROA	0,62	1,62	3,87
GERMANA	9,50	16,5	18,67

Obs.: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

De acordo com as tabelas 4,5 e 6 entre as biomassas testadas, a que demonstrou melhor capacidade de remoção de metais foi a da destilaria Germana. Esta biomassa obteve bons resultados em todos os pH testados. A remoção de metais presentes na solução, vai depender do pH correspondente a cada metal. Nos experimentos verificou-se que o pH ideal para níquel foi 5,0 para ferro foi 3,0 e para cromo foi 3,0. Observa-se que a elevação do Ph induz a precipitação espontânea dos metais. Isto foi observado no pH 5,0 , com o elemento ferro, pois nesta faixa de pH ocorreu precipitação, tornando nula a adsorção da biomassa. O elemento Cromo foi melhor adsorvido no ph 3,0 , pois no pH 5,0 verificou-se precipitação parcial na solução. Comparando-se os valores de q (capacidade de remoção de metais) para Cr , Fe e Ni em soluções sintéticas com os obtidos por outros autores (Tabela 7) verifica-se que as biomassas da Germana e Lapinha apresentam valores bastante significativos tendo em vista que a legislação ambiental permite as seguintes quantidades destes metais : níquel 2,0 ferro 2,0 cromo total 1,0 (mg/l).

Após os testes com a solução sintética, as biomassas foram analisadas diretamente nos efluentes da ACESITA. Estas foram testadas nos efluentes 1 A (Recapagem do aço), 2ª (Banho químico) e 3ª (produção aço). Os experimentos foram feitos em condições que mais se aproximam das do efluente “in natura”. Os efluentes foram diluídos devido a altas concentrações de metais (Tabelas 8,9 e 10).

Tabela 7: Resultados de biossorção obtidos com microrganismos.

ESPÉCIE	METAL	Q (mg/g)	REFÊRENCIA
Streptomyces Noursei	Níquel	0,8	MATTUSCHKA & STRAUBE, 1993
Pseudomonas Syringae	Cromo	6,0	CABRAL, 1992
Streptomyces Noursei	Cromo	10,6	MATTUSCHKA & STRAUBE, 1993
R. arrhizus	Cromo	12,4	SÃG & KUTSAL. 1996
R. arrhizus	Ferro	5,1	SÃG & KUTSAL, 1996

Obs: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

Tabela 8 : Remoção de íons níquel em efluentes

Biomassa: 50mg

Tempo de contato: 3 horas

NÍQUEL pH = 2,0			
BIOMASSA	Efluentes		
	1A	2A	3A
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
LAPINHA	4,33	0,04	4,51
BOCAINA	1,20	1,14	8,46
TABAROA	0,47	0,25	4,04
GERMANA	6,0	8,75	12,30

Obs: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

Tabela 9 : Remoção de íons ferro em efluentes

Biomassa: 50mg

Tempo de contato: 3 horas

FERRO pH = 2,0			
BIOMASSA	Efluentes		
	1A	2A	3A
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
LAPINHA	43	69	0
BOCAINA	12	32	60
TABAROA	18	2	60
GERMANA	251	370	1,00

Obs: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

Tabela 10 : Remoção de íons ferro em efluentes

Biomassa: 50mg

Tempo de contato: 3 horas

CROMO pH = 2,0			
BIOMASSA	Efluentes		
	1A	2A	3A
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
LAPINHA	5,07	2,75	4,71
BOCAINA	0,7	0,93	5,50
TABAROA	1,37	0,45	5,86
GERMANA	15,62	1,50	1,00

Obs: q (capacidade de remoção de metais da biomassa)

Os resultados das tabelas (8, 9 e 10) , demonstram que a biomassa da destilaria Germana possui uma maior capacidade de adsorção. Estes resultados não foram satisfatórios confluyente 3ª para Cr e Fe. A biomassa Germana possui maior afinidade pelos íons Cromo e Ferro nos efluentes 1ª e 2ª e o Níquel no influente 3ª. Quando se testa a biomassa em efluentes, a adsorção de metais se torna mais difícil pois este apresenta vários interferentes que podem diminuir a capacidade da biomassa. Mesmo com estes interferentes estas biomassas demostraram bons resultados tendo em vista que ela adsorve todos metais em condições reais de um efluente poluído. O biossorvente escolhido foi o da destinatária Germana, e o efluente selecionado foi o 1ª, pois os efluentes m possuem características específicas tornando difícil o estudo em conjunto.

Vários fatores intervém na biorremoção de uma espécie de íons metálicos por microrganismos. Estes fatores incluem propriedades específicas da superfície do organismo e parâmetros físico-químicos da solução como temperatura, pH, concentração inicial de íons e concentração da biomassa (MACASKIE & DEAN, 1989). Para se obter resultados satisfatórios de biorremoção estudou-se parâmetros que afetam diretamente o mecanismo de biossorção.

A) Efeito do pH

A biomassa selecionada foi testada nos pH 2,0 , 3,0 e 5,0 , é efluente 1ª foi diluído obtendo-se as concentrações: Ni= 3,0 mg/l, Fe= 600mg/l , Cr= 82mg/l.

Os figuras 6,7 e ° mostram o efeito pH de equilíbrio na sorção dos metais Níquel , Ferro e Cromo.

Observa-se que a remoção do Níquel é máxima em pH 5,0, a do cromo em pH 3,5 a 4,0 e a do Ferro em pH acima de 2,5.

A partir do pH 5,0 ocorre o fenômeno da precipitação dos metais Fe^{+6} e Cr^{+6} . Portanto o processo de biossorção deste efluente ocorre em condições ácidas. De acordo com a literatura, o Fe^{+3} é melhor adsorvido em baixos valores de pH, pois em valores elevados ocorre a precipitação tanto de Fe^{+3} quanto do Fe^{+2} (BRADY et Al., 1994). O cromo hexavalente em baixos pHs é reduzido a Fe^{3+} , nesta valência e 'mais facilmente adsorvido (SHARMA & FORTER 1994). Apenas o Níquel foi o melhor adsorvido em pH 5,0. A diferença de Ph no perfil de ligação de íons metálicos pode ser devido à natureza química das interações de cada metal, interferindo com o ponto isoelétrico das células. Os pHs acima do ponto isoelétrico apresentam carga negativa e os grupos iônicos como carboxil, fosfato e grupos amino reagem com metais que se apresentam na forma catiônica, Entretanto, os pHs muito baixos, em função do ponto isoelétrico, invertem a carga da superfície das células tornando-se positivas e inibindo a aproximação de metais catiônicos.

Devido à carga da parede dos microrganismos é necessário encontrar o pH ideal da solução de metais, pois o pH está diretamente ligado ao processo de biossorção. No pH ideal ocorre o primeiro estágio diretamente ligado ao processo de biossorção. No pH ideal ocorre o primeiro estágio da biossorção que é rápido equilíbrio estabelecido entre metal adsorvido pela biomassa e os metais não adsorvidos na solução (BRADY DUNCAM 1994). Este equilíbrio entre as espécies metálicas e a superfície da célula é determinado pela relativa afinidade dos sítios para os metais tóxicos e outros cátions presentes na solução final (TING et al., 1991)

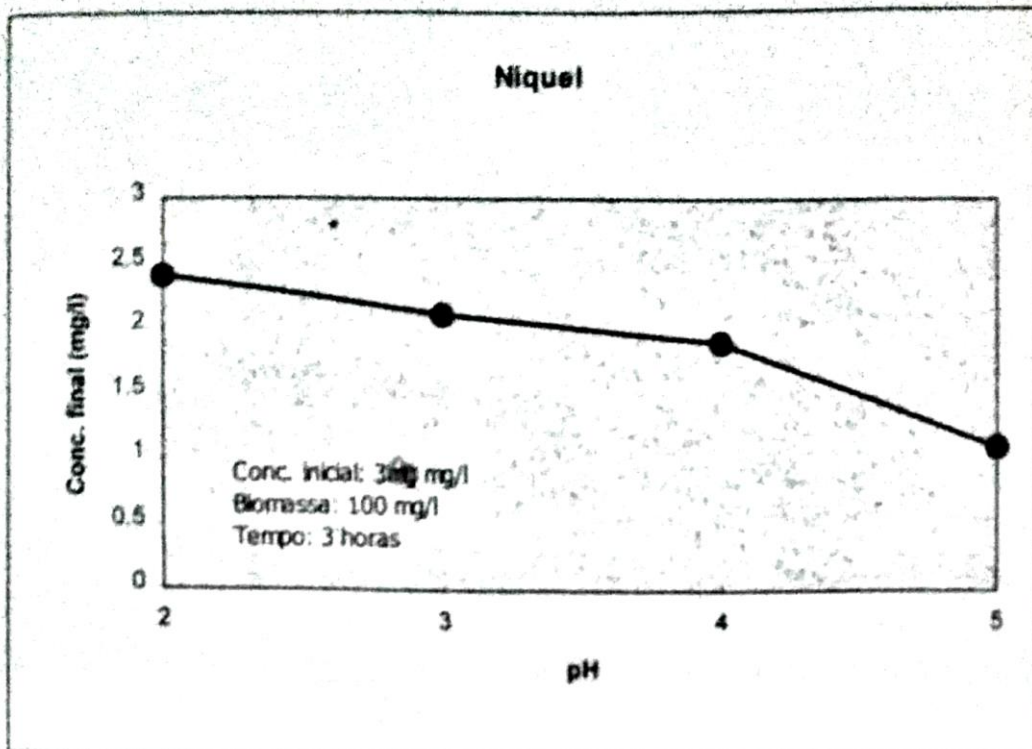


Figura 6: Remoção de Níquel em função do pH de equilíbrio da biomassa (Vinhoto).

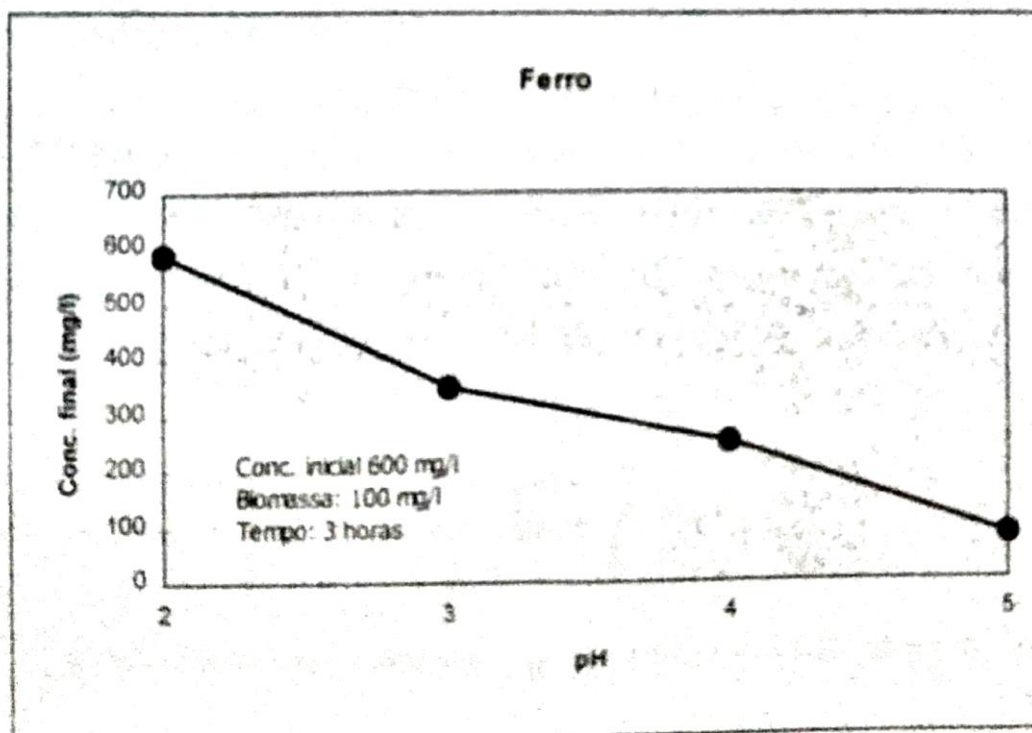


Figura 7: Remoção de Ferro em função do pH de equilíbrio da biomassa (Vinhoto).

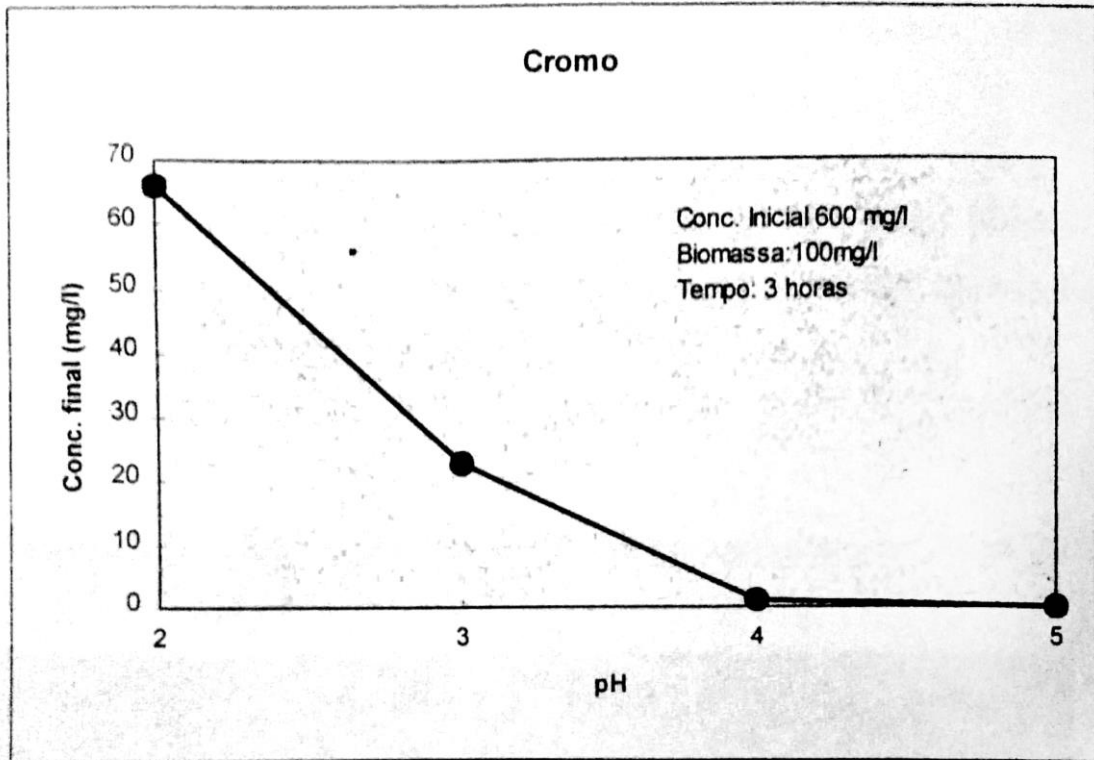


Figura 8: Remoção de Cromo em função do pH de equilíbrio da biomassa (Vinhoto).

B) Efeito da Temperatura

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Segundo SINGLETON & SIMMONS (1996) os mecanismos independentes de energia são pouco afetados pelas mudanças de temperatura na solução, porque os processos de bioadsorção são puramente físico-químicos.

C) Efeito da concentração da biomassa

Em pH ótimo de adsorção, concentrações crescentes de biomassa influenciam a capacidade de remoção de metais. Portanto, deve-se determinar a quantidade ideal de biomassa em função da concentração dos metais. Após

Determinada concentração, a biomassa se torna saturada, ou seja, não existem mais sítios disponíveis neste determinado pH.

Para determinar a concentração ótima da biomassa (Tabela 11) , o valor de pH foi mantido em 4,0 e as concentrações de metais foram: Ni=3.0mg/l; Fe=600mg/l; Cr=80mg/l.

Tabela 11: influência da concentração da biomassa na remoção de metais

		Ni	Fe	Cr
Biomassa (mg)	pH	Q (mg/g)	Q (mg/g)	Q (mg/g)
50	4,0	0,20	112,0	13,00
100	4,0	0,50	155,0	39,65
250	4,0	0,18	65,6	15,36
400	4,0	0,12	42,8	9,40

Observa-se que a melhor concentração de biomassa é 100mg, pois com este valor obtêm-se os melhores índices de remoção de metais. Quando se aumenta a concentração da biomassa, a capacidade de

bissorção diminui, pois a concentração da biomassa é inversamente proporcional a sua capacidade de adsorção.

D) Efeito de multicomponentes no modelo de adsorção

O resultado da interação de dois ou mais metais em uma solução com células microbianas dependerá da variedade das combinações dos níveis de concentração de metais que competem pelos mesmos sítios de ligação (PASCUCCI, 1993).

Os efeitos das alterações das misturas de metais com os microrganismos podem ser extremamente complexo e produzir três respostas:

- 1 – O efeito da mistura ser maior do que o de cada um individualmente, constituído assim um sinergismo.
- 2 – O efeito da mistura ser menor do que o efeito individual, constituído uma mistura (antagonismo)
- 3 – O efeito da mistura é igual a cada efeito individual, não ocorrendo interação entre eles (TING et al., 1991).

No efluente (1 A) o íon dominante é o Ferro, por estar em maior concentração, sendo assim o mais adsorvido, impedindo maior adsorção do Cromo. Já Níquel não compete por estes mesmos sítios, pois o pH ideal para sua adsorção é em 5,0, não interferindo na adsorção dos demais metais no pH 4,0.

Os experimentos apresentaram efeito do antagonismo, pois, altas concentrações do elemento Ferro interferem na ligação do Cromo pelos

sítios ativos. Já o Níquel que aparece em baixas concentrações e possui valência diferente, foi menos adsorvido.

Na literatura, observa-se que os testes de adsorção são feitos em soluções sintéticas facilitando assim a padronização dos fatores cinéticos. Entretanto, isto não se observa quando se trabalha com efluentes industriais, por ser pouco descrito. Sendo vários os interferentes dos efluentes que atuam a nível de biomassa dificultando a padronização do processo.

6 – IMOLIZAÇÃO DE BIOMASSA EM ALGINATO, QUITINA E RESINA ZEVEG

A imobilização de células microbianas em suportes inertes é uma técnica utilizada para se obter concentrações elevadas de biomassa celular no sistema de fermentação. Dependendo do tipo de suporte e da técnica selecionada, inúmeras vantagens podem ser constatadas experimentalmente.

Quando se utilizou o alginato observou-se que ele por si só, sem a presença da biomassa adsorve os metais. Portanto, este tipo de suporte foi descartado dos experimentos. Outra desvantagem de se utilizar alginato é a pouca resistência nos processos pois os “pellets” formados perdem rapidamente sua forma, dificultando, sua reutilização; além disto, a imobilização com alginato se torna bastante onerosa.

No procedimento padrão de imobilização de biomassa, foram obtidos uma adsorção satisfatória nos suportes Quitina e resina Zeveg, tornando-se por base a porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio

contida na biomassa, suporte e biomassa imobilizada, conforme é mostrado na tabela 12.

Tabela 12: Capacidade de adesão dos suportes na biomassa.

EFICIÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA					
	MASSA	UMIDADE	C	H	N
Biomassa	1,00	2,48	30,7	5,20	4,00
Quintina	1,00	7,61	40,82	6,14	8,11
Resina (Zeveg)	1,00	14,82	18,72	6,46	0,01
Solução de Gutaraldeído	1,00	-	6,15	3,35	1,01
Biomassa imobilizada em quintina	1,00	3,70	45,38	7,10	7,20
Biomassa imobilizada em zeveg	1,00	5,50	45,70	6,25	4,00

Obs: Massa (mg), Umidade (mg), CHN (% de concentração)

A **tabela 12** demonstra que a resina de Zeveg foi a que melhor imobilizou a biomassa. A massa utilizada foi padronizada em 1 mg, e de acordo com o teor de umidade a resina Zeveg foi a que reteve maior quantidade. Este suporte obteve melhor adesão à biomassa quando comparado à quitina, pois foi o que apresentou maior concentração de

carbono, hidrogênio e nitrogênio. Neste experimento de imobilização foi utilizado o método adsorção de superfície sólida por ser o mais adequado para este tipo de biomassa. Após estes experimentos as biomassas imobilizadas foram utilizadas em testes de adsorção conforme procedimento padrão.

A **tabela 13** mostra que a biomassa imobilizada não perdeu a capacidade de remover metais, e o suporte que melhor adsorveu foi Zeveg, com maior afinidade pelo elemento Cromo. O poder de adsorção da quitina foi menor, como demonstrado na tabela.

Tabela 13: Capacidade de adsorção da biomassa não imobilizada e imobilizada com resina zeveg e quitina.

1A			
SUPORTE	Ni	Fe	Cr
	q (mg/g)	q (mg/g)	q (mg/g)
Germana não imobilizada	0,2	203	39,5
Germana imobilizada Zeveg	0,6	156	24,5
Germana imobilizada Quitina	0,3	29	2,5

Verificou-se que a imobilização aumentou a capacidade de adsorção somente do Ni. Para o Fe e Cr a biomassa não imobilizada apresentou melhores níveis de adsorção. Entretanto isto ocorreu devido a parâmetros cinéticos da biomassa que não se assemelham aos do suporte.

Como foi observado na Tabela 13, a biomassa imobilizada apresentou menor afinidade em adsorver metais do que a não imobilizada. Ainda assim, a imobilização de células ser utilizadas afim de se evitar a obstrução dos biorreatores, provenientes da baixa resistência e pequeno tamanho das células.

7 – CONCLUSÕES

A capacidade de adsorção dos biossorventes em soluções sintéticas e efluentes apresentaram bons resultados.

A biomassa que mais se destacou nestes experimentos foi a da destilaria Germana, demonstrando alta capacidade de reter metais nas seguintes condições cinéticas: pH 4,0, concentração de biomassa 100 mg, temperatura ambiente. Ela apresentou grande afinidade pelos metais Cromo e Ferro.

Na imobilização, a técnica melhor adaptada para estes experimentos foi o método de adsorção.

O melhor suporte para esta biomassa e estes metais foi a resina Zeveg pela grande afinidade pelos metais deste efluente e pela maior capacidade de adesão a biomassa.

A biomassa deve ser imobilizada pois facilita o processo de adsorção de metais pelas indústrias.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSELMO, A.M.; MATEUS, M.; CABRAL, J.M.S.; NOVAIS, J.N. Degradation of phenol by immobilized cell of *Fusarium floccifer*. **Biotechnol Lett.** V 7 p. 889-894, 1985.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZONI, W. **Biotecnologia – Alimentos e bebidas produzidas por fermentação.** Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1983.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 3000 – Metals. In; Standard methods for the examination of water and westerwater, 18 ed. Washington: **APHA.** p. 3-18, 1992.
- ATKINSON, B.G.M & PINCHES, A. Process Intensification Using Cell Suporte Systems. **Process Biochem.**, v 20, p24-32, 1980.

- CABRAL, J .P.S. Selective binding of metal ions to *Pseudomonas syringae* cells, *Microbios*, v. 71, 9. 47-53, 1992.
- CASSIDY, M.B., LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cell: a review. *Journal of Microbiology*. v. 16, p. 79-101, 1996.
- CASTRO, H.F. Biocatalyst and substrate properties for alcohol production, Ph.d. Thesis, university of Manchester, England, 1985.
- CHEN, J.M. & HAO, J. Biological Removal of Aqueous Hexavalent Chromium, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 69, p. 70-76, 1997.
- CHIBATA, L.; T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A. (Eds) *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Washington D.C. : American Society of Microbiology, cap. 18, p. 217-229, 1986.
- CHONG, K.H. & VOLESKY, B, Metal Biosorption Equilibria in a ternary System. *BIOTECHNOL and BIOENG*. V. 49, p. 629-638, 1996.
- CHONG, K.H. Biosorption of heavy metal ions: Department of Chemical Engineering, McGill University, (Dissertation Course Load for Selected Topics in Chemical Engineering) p. 43, 1993.
- CONNICK, W.J. Controlled release of the herbicides 2,4- D and dichlorobenil from alginate gels. *J. Appl. Poly. Sci.*, v. 27, p. 3341-3348, 1982.

- COSTA, A.C E FRANÇA, P.F. The use of seaweeds as immobilization supports for microorganisms used in continuous cadmium biosorption. *Biotechnology Techniques*. V. 10, p. 761-766, 1996.

- CURTUS, H. *Biologia*. Trad. H. Sauaia. 2 ed, Rio De Janeiro: Guanabara Koogan S.A., Glossário, p. 939, 1977.

- DARNALL, D.W.GREENE, D.; HENZIL, M.T.; HOSEA, J.M.; MCPHERSON, R.A.; SNEDDON, J & ALEXANDER, M.D.; Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass. *Environ. Sci. Technol.*, v. 20, p. 206-208, 1986.

- FRAVEL, D.R.; MAROIS. J.J LUMSDEN , R.D.; CONNICK, jr, encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate- clay matrix. **Phytopathology**. V.75, p. 774-77, 1985,

- FRY, I.V. & MEHLHORN, R.J. Polyurethane and alginate- immobilized algal biomass for the removal of aqueous toxic metals, In: **Emerging technology for Bioremediation of metals** (Means JL and RE Hindree, eds), p. 130-134, CRC press, Florida, USA, 1994.

- FOUREST, E. & ROUX, J.C. A Heavy metal biosorption by fungal mycelial by- products: mechanisms and influence of pH. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, 37,p. 399-403, 1992.

- FURST, A, metals interaction in carcinogenesis, in: Fishbein, L. Furst, And Mehaim, M.A (eds), *Genotox and Carcinogenic Metals : Environment and exposure*, Scientific publishing co., Princeton, New Jersey, p. 295-327, 1987.

- GADD, G.M. The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. In: Immobilization of ions, biosorption. Eds. A H, ECCLESS & S. Hunt, EILIS HORWOOD, CHICHESTER, p. 135-147, 1986.
- Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experiencia*. V. 46, p. 834-840, 1990.
- Biosorption, *J Chem. Technol Biotechnol.*, v. 55, n. 3, p. 302-304, 1992.

GADD, G.M. & WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? **TIBTECH.**, v. 11, p. 353-359, 1993.

- GOMES, N.C.M. Acumulação e recuperação de metais por uma linhagem de *Aspergillus* em solução de uma mineração de ouro. **Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, Belo horizonte, MG, 1995.**
 - GHOMMIDH, C.; NAVARRO, J.M., DURAND, G. A STUDY of acetic acid production by immobilized acetobacter cells: oxygen transfer, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p, 122-127, 1982.
- **HARDTMEIER, W. Immobilized Biocatalysts: Na introduction. Editora Springer-Verlag, Berlin. Cap. 2, p. 123-130, 1988.**

- **KYISCH, J. & SZAJÁNI, B.** Effects of immobilization on biomass production and acetic acid fermentation of *Acetobacter aceti* as a function of temperature and pH. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 393-396, 1996.

- **KUYUCAK, N. VOLESKY, B.** New algal biosorbent for a gold recovery process, In: **INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON BIOHYMETALLURGY.** Warwick, Biohydrometallurgy proceedings of the international Symposium. Warwick: STL, p. 453-463, 1988.

- **LEFEBVRE, J. & VICENT, J.C.** Diffusion- reaction- growth limiting in gel-immobilized cell systems: model and experiment. *En Microb. Technol.* v. 17, p. 276-284, 1995.

- **MASCASKIE, L.E & DEAN, A.C. R.** Microbial metabolism, desolubilization and deposition of heavy metals: metal uptake by immobilized cells and application to the detoxication of liquid waste treatment. V. 12, p. 159- 201, ed. A. Mirzrahi. Alan R. Liss, New York, 1989.

- **MATTUSCHKA, B. & STRAUBE, G.** Biosorption of Metals by a Waste Biomass, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 58, p. 57-63, 1993.

- **MERIAN, E.** Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance. 2 ed. New York:

VHC, caps. I. 10,I.16, I 17, II. 14, II.22, p. 491-495, 585-603, 853-861, 945-957, 1101-1121, 1997.

- MICHAEL, Z.C.; HU, C.; REEVES, M. Biosorption of Uranium by *Pseudomonas aeruginosa* Strain CSU Immobilized in novel Matrix, *Biotechnol. Prog.*, 13, p. 60-70, 1997.

- MOSBACH, K. Immobilized Enzymes Methods in Enzymology. V44, Academic Press, New York, 1976.

- NILSSON, I., OHLSON, S. HAGGSTRÖM, L. MOLIN N., MOSBACH, K. Denitrification of Water Using immobilized *Pseudomonas denitrificans* Cells. *Er. j. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 10, p. 261-274, 1980.