

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

DIVERSIDADE E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LEVEDURAS E FUNGOS

FILAMENTOSOS PRESENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS

COM ARSÊNIO

**César Lúcio Lopes de Faria Júnior**

BELO HORIZONTE

2011

César Lúcio Lopes de Faria Júnior

DIVERSIDADE E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LEVEDURAS E  
FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS  
CONTAMINADOS COM ARSÊNIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

**Orientador:** Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos (ICB/UFMG)

**Co-orientadores:**

Prof.Dr. Carlos Augusto Rosa (ICB/UFMG)

Dr. Armino Santos (CDTN/CNEN)

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais 2011

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>3. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 METAIS PESADOS E METALÓIDES</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2 ARSÊNIO</b> .....	<b>17</b>
<i>4.2.1 Origem e fontes de contaminação por arsênio</i> .....	<i>19</i>
<b>4.3 DISTRIBUIÇÃO DE ARSÊNIO EM AMBIENTES AQUÁTICOS</b> .....	<b>23</b>
<i>4.3.1 Biogeoquímica de arsênio em ambientes aquáticos</i> .....	<i>24</i>
<b>4.4 REMOÇÕES DE METAIS PESADOS E METALÓIDES DE ÁGUAS</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5 REMOÇÕES DE ARSÊNIO DE AMBIENTES AQUÁTICOS</b> .....	<b>27</b>
<i>4.5.1 Métodos físico-químicos</i> .....	<i>27</i>
<b>4.6 MÉTODOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>30</b>
<i>4.6.1 Remoção microbiana de arsênio</i> .....	<i>30</i>
<b>4.7 AS CLASSES DE ÁGUAS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.8 O ALTO CURSO DO RIO DAS VELHAS E A CONTAMINAÇÃO COM ARSÊNIO</b> .....	<b>32</b>
<b>4.9 MECANISMOS DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS E METALÓIDES POR LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4.10 METABOLISMO DE ARSÊNIO POR PROCARIOTOS</b> .....	<b>38</b>
<i>4.10.1 Mecanismos básicos de detoxificação</i> .....	<i>38</i>
<i>4.10.2 O metabolismo de arsênio pelos eucariotos</i> .....	<i>41</i>
<b>4.11 CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS E METALÓIDES POR LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.12 DIVERSIDADES DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS EM AMBIENTES CONTAMINADOS COM METAIS E METALÓIDES</b> .....	<b>46</b>
<b>4.13 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS</b> .....	<b>48</b>
<b>4.14 AS ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA ATIVADA</b> .....	<b>50</b>
<b>4.15 PARÂMETROS IMPORTANTES E INFLUENTES NA CAPACIDADE DE CAPTURA DE METAIS PESADOS E METALÓIDES PELO ADSORVENTE</b> .....	<b>52</b>
<i>4.15.1 Formação de complexos no sistema adsorvente-adsorvato</i> .....	<i>53</i>
<i>4.15.2 Influência do valor de pH na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato</i> .....	<i>53</i>
<i>4.15.3 Influência da concentração de metais pesados ou metalóides na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato</i> .....	<i>54</i>
<i>4.15.4 Influência da temperatura na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato</i> .....	<i>54</i>
<i>4.15.5 Influência da força iônica na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato</i> .....	<i>55</i>

4.15.6 Influência do tamanho de partícula do adsorvente na capacidade adsorvativa do sistema adsorvente-adsorvato.....	56
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>57</b>
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
<b>6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS DA REGIÃO DO CÓRREGO DA MINA.....</b>	<b>58</b>
6.1.1 Amostragem.....	58
6.1.2 Isolamento de leveduras e fungos filamentosos.....	58
<b>6.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO .....</b>	<b>59</b>
6.2.1 Amplificação pela PCR fingerprinting com uso do iniciador (GTG) <sub>5</sub> .....	59
6.2.2 Amplificação pela PCR da região D1/D2 do gene 26S rRNA.....	60
<b>6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS POR MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO .....</b>	<b>60</b>
<b>6.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....</b>	<b>61</b>
<b>6.5 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>6.6 ANÁLISES DE DIVERSIDADE.....</b>	<b>62</b>
<b>6.7 ENSAIOS DE TOLERÂNCIAS DE LEVEDURAS AO AS (V) EM MEIO LÍQUIDO.....</b>	<b>63</b>
<b>6.8 AVALIAÇÕES DAS VIABILIDADES CELULARES DAS LEVEDURAS .....</b>	<b>63</b>
<b>6.9 AVALIAÇÕES DA INFLUÊNCIA DE AS (V) NOS NÍVEIS DE RESÍDUOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS DE LEVEDURAS SELECIONADAS .....</b>	<b>64</b>
6.9.1 Preparo das amostras para dosagem de resíduos sulfidrílicos totais .....	64
6.9.2 Obtenção de extratos celulares .....	64
6.9.3 Dosagem de proteínas .....	65
6.9.4 Resíduos sulfidrílicos totais.....	65
<b>6.10 TESTES DE TOLERÂNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS AO AS (V) EM MEIO SÓLIDO.....</b>	<b>65</b>
<b>6.11 ESTUDOS DE REMOÇÃO DE AS UTILIZANDO CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS EM ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA ATIVADA COM CARVÃO .....</b>	<b>66</b>
6.11.1 Produção de esferas macroporosas de alumina ativada.....	66
6.11.2 Caracterização das esferas macroporosas ocas de alumina ativada.....	69
6.11.3 Ensaios de remoção de Cd, Cu, Zn e As pelas esferas macroporosas de alumina ativada.....	69
6.11.4 Produção e caracterização de esferas macroporosas de alumina com carvão ativado .....	70
<b>6.12 IMOBILIZAÇÕES DAS LEVEDURAS EM ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA COM CARVÃO ATIVADO.....</b>	<b>71</b>
<b>6.13 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM CÉLULAS DE LEVEDURAS LIVRES E IMOBILIZADAS EM ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA COM CARVÃO ATIVADO .....</b>	<b>71</b>
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>

<b>7.1 CARACTERIZAÇÕES DAS ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA ATIVADA .....</b>	<b>73</b>
<b>7.2 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE <math>Cd^{2+}</math> PELOS PÓS DE ALUMINA E PELAS ESFERAS DE ALUMINA ATIVADA.....</b>	<b>89</b>
<b>7.3 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE Cd, Cu, Zn e As NO PÓ (AM1) E NAS ESFERAS SECAS (DS1 e DS2) DE ALUMINA .....</b>	<b>95</b>
<b>7.4 CARACTERIZAÇÕES DAS ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA CONTENDO CARVÃO ATIVADO .....</b>	<b>97</b>
<b>7.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE As (V) PELAS ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA ATIVADA CONTENDO CARVÃO ATIVADO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÕES INICIAIS DO ÍON As (V).....</b>	<b>104</b>
7.5.1 <i>O efeito do pH.....</i>	<i>104</i>
7.5.2 <i>O efeito da concentração inicial do íon As (V).....</i>	<i>105</i>
<b>7.6 PARÂMETROS QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA .....</b>	<b>108</b>
<b>7.5 DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS NA REGIÃO DO Córrego da Mina .....</b>	<b>108</b>
<b>7.7 ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO As (V) PELAS LEVEDURAS .....</b>	<b>121</b>
<b>7.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE LEVEDURAS EM PRESENÇA DE As (V) .....</b>	<b>128</b>
<b>7.9 DOSAGENS DE RESÍDUOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS .....</b>	<b>135</b>
<b>7.10 DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS NA REGIÃO DO Córrego da Mina .....</b>	<b>138</b>
<b>7.11 ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO As (V) PELOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....</b>	<b>140</b>
<b>7.12 IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA COM CARVÃO ATIVADO.....</b>	<b>150</b>
<b>7.13 ENSAIOS DE REMOÇÃO DE As (V) COM CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS DE LEVEDURAS EM ESFERAS MACROPOROSAS DE ALUMINA COM CARVÃO ATIVADO.....</b>	<b>152</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>155</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>157</b>
<b>10. ANEXO A .....</b>	<b>172</b>
<b>11. ANEXO B.....</b>	<b>174</b>

## Lista de Tabelas

TABELA 1 - DADA DE CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS E DAS ESFERAS DE ALUMINA .....	75
TABELA 2 DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE ALUMINA OBTIDAS NO MEIO DE PRECIPITAÇÃO QUÍMICA PM1 .....	85
TABELA 3 - DADOS DE CARCATERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE ALUMINA OBTIDAS NO MEIO DE PRECIPITAÇÃO QUÍMICA PM2 .....	87
TABELA 4 - RESULTADOS DE ADSORÇÃO DE CD NOS PÓS E ESFERAS DE ALUMINA GAMA A 30 °C POR 6 H .....	92
TABELA 5 - RESULTADOS DE ADSORÇÃO DE CD, CU, ZN E AS NO PÓ E ESFERAS DE ALUMINA GAMA A 30 °C POR 6 H.....	96
TABELA 6 - DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE ALUMINA E DAS ESFERAS DE ALUMINA COM CARVÃO ATIVADO .....	99
TABELA 7 PARÂMETROS QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	110
TABELA 8 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS NA PRIMEIRA COLETA .....	111
TABELA 9 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS NA SEGUNDA COLETA .....	112
TABELA 10 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS NA TERCEIRA COLETA.....	113
TABELA 11 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS NA QUARTA COLETA.....	114
TABELA 12 ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE LEVEDURAS POR COLETA .....	117
TABELA 13 ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE LEVEDURAS POR PONTOS.....	119
TABELA 14 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO AS (V) PELAS LEVEDURAS.....	124
TABELA 14 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO AS (V) PELAS LEVEDURAS (CONTINUAÇÃO) .....	125
TABELA 14 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO AS (V) PELAS LEVEDURAS (CONTINUAÇÃO) .....	126
TABELA 14 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO AS (V) PELAS LEVEDURAS (CONTINUAÇÃO) .....	127
TABELA 15 VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO AS (V).130	

<b>TABELA 15 VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO AS (V) (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>131</b>
<b>TABELA 15 VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO AS (V) (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>132</b>
<b>TABELA 15 VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO AS (V) (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>133</b>
<b>TABELA 15 VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO AS (V) (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>134</b>
<b>TABELA 16 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA PRIMEIRA COLETA.....</b>	<b>141</b>
<b>TABELA 17 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA SEGUNDA COLETA.....</b>	<b>142</b>
<b>TABELA 18 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA TERCEIRA COLETA.....</b>	<b>143</b>
<b>TABELA 19 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA QUARTA COLETA.....</b>	<b>144</b>
<b>TABELA 20 ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR COLETA.....</b>	<b>145</b>
<b>TABELA 21 ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR PONTO.....</b>	<b>146</b>
<b>TABELA 22 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO AS (V) PELOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....</b>	<b>148</b>
<b>TABELA 22 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO AS (V) PELOS FUNGOS FILAMENTOSOS (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>149</b>
<b>TABELA 23 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DAS ESFERAS, DAS CÉLULAS DE R.TORULOIDES L56-1 LIVRES E DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS IMOBILIZADAS.....</b>	<b>154</b>
<b>TABELA 16 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA PRIMEIRA COLETA (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>172</b>
<b>TABELA 16 DENSIDADES E ABUNDÂNCIAS RELATIVAS DE ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA PRIMEIRA COLETA (CONTINUAÇÃO).....</b>	<b>173</b>



## Lista de Figuras

FIGURA 1 - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO-DESSORÇÃO DAS AMOSTRAS .....	77
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE POROS DAS AMOSTRAS DE PÓS E ESFERAS PELO MÉTODO BJH.....	80
FIGURA 3 PADRÕES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) DAS AMOSTRAS .....	81
FIGURA 4 ELETROMICROGRAFIA DA SECÇÃO POLIDA DA ESFERA MOSTRANDO A MACROPOROSIDADE DENTRO DO NÚCLEO DAS ESFERAS DE ALUMINA GAMA SECAS SEM MDF.....	82
FIGURA 5 ESPECTROS INFRAVERMELHO (IV) DAS AMOSTRAS.....	83
FIGURA 6 ELETROMICROGRAFIA DAS ESFERAS DE ALUMINA GAMA SECAS SEM MDF (PM2-A), OBTIDA NO MEIO DE PRECIPITAÇÃO QUÍMICA PM2A, ENVELHECIDA POR 0,5 H E SECA A 60 °C/AR/2 H.....	88
FIGURA 7 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO-DESSORÇÃO DAS AMOSTRAS .....	100
FIGURA 8 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE POROS DAS AMOSTRAS DE PÓ E DAS ESFERAS .....	101
FIGURA 9 PADRÕES DE DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX).....	102
FIGURA 10 ESPECTROS INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS.....	103
FIGURA 11 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE AS (V) EM DIFERENTES VALORES PH PELAS ESFERAS DE ALUMINA ATIVADA COM CARVÃO .....	106
FIGURA 12 DETERMINAÇÃO DE Q EXPERIMENTAL DAS ESFERAS DE ALUMINA ATIVADA COM CARVÃO EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS.	107
FIGURA 13 ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS NOS TRÊS PONTOS.....	118
FIGURA 14 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE RESÍDUOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS EM: (A) R. TORULOIDES L56-1 E (B) P. GUILLIERMONDII L5-2.....	137
FIGURA 15 ELETROMICROGARFIAS DA LEVEDURA IMOBILIZADA EM ESFERAS DE ALUMINA COM CARVÃO ATIVO.....	151

## 1. Resumo

O aumento das atividades de mineração e industriais tem intensificado os problemas de poluição ambiental em ambientes aquáticos em várias partes do mundo, com o acúmulo de muitos poluentes, tais como os metais pesados e alguns metalóides, dentre estes o arsênio, um metalóide carcinogênico. Os métodos existentes para tratamento de efluentes contaminados com arsênio em baixas concentrações ( $\leq 0,01$  mg/L) são caros e ineficientes, por isso tem-se tentado desenvolver métodos alternativos de remoção deste metalóide por meio de adsorção ou biossorção. Tendo em vista o exposto acima, o objetivo deste trabalho é estudar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos presentes na região do Córrego da Mina (Nova Lima/MG) contaminado com arsênio e usar estes microrganismos como biossorbentes, na forma de células livres e imobilizadas em esferas macroporosas de alumina com carvão ativado. Foram coletadas trimestralmente no período de julho de 2007 a julho de 2008, três amostras de 500 mL de água por ponto, sendo os pontos 1 e 2 parte do sistema de tratamento de efluentes no interior da mineradora AngloGold Ashanti e o ponto 3 no Córrego da Mina, todos estes em Nova Lima (MG), perfazendo um total de 36 amostras. A partir dessas amostras foram identificados os seguintes gêneros de leveduras: *Hanseniaspora*, *Candida*, *Acremonium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Rhodosporeidium*, *Issatchenkia*, *Kodamaea*, *Trichosporon* e *Cryptococcus*. As leveduras ascomicéticas foram mais frequentemente isoladas neste trabalho em todos os pontos e em todas as coletas. Os gêneros identificados de fungos filamentosos foram *Paraconiothyrium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Plectosphaerella*, *Leptosphaeria*, *Penicillium*, *Hypocrea*, *Alternaria*, *Microsphaeropsis*, *Epicoccum*, *Stemphylium*, *Rhizomucor*, *Neurospora*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Cochliobolus*, *Mucor*, *Cylindrocladiella*, *Bionectria*, *Phaeosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, *Discostroma*, *Daldinia* e *Bipolaris*. Além disso, alguns isolados foram identificados pela ordem como Pleosporales sp. e pela classe como Dothideomycetes sp. A maioria dos isolados de leveduras avaliadas quanto à tolerância ao As(V) no presente trabalho apresentaram o limite de tolerância acima de 50 mM de As (V). Por outro lado, a maioria dos isolados de fungos filamentosos, aproximadamente 51% dos isolados, cresceram apenas em meio sólido não acrescido de As (V). O fungo filamentoso *Plectosphaerella cucumerina* UFMG CB 3426 foi o mais tolerante dentre

os isolados que cresceram até 300 mM, com apenas 39,1% de redução de crescimento. A levedura *Rhodospiridium toruloides* L56-1 foi a única que permaneceu viável após o ensaio de tolerância em meio líquido acrescido de As (V) até a concentração de 300 mM de As (V). As leveduras *Acremonium strictum* L6-3, *Candida* sp. L5-1, *Hanseniaspora uvarum* L2, *Candida oleophila* L16-3 e *R. toruloides* L56-1 que toleraram altas concentrações de As (V) foram imobilizadas em esferas macroporosas de alumina com carvão ativado. Em função disto, neste trabalho, desenvolveu-se um processo químico para aglomerar micropartículas de alumina gama ativada, baseado no processo sol-gel. O processo desenvolvido preserva as características de porosidade das micropartículas de alumina e introduz macroporos na esfera de alumina resultante, os quais possibilitam a imobilização das leveduras. As células da levedura *R. toruloides* L56-1 imobilizadas em esferas gel apresentaram eficiência de remoção de As (V) (97,11%), maior que as células da mesma livres (84,95%), maior que as esferas gel (91,24%), maior que as esferas secas (70,72%), maior que as células das outras leveduras imobilizadas em esferas secas e que as células da mesma imobilizadas nas esferas secas (67,53%). Este aumento da adsorção pode ser explicado pela preservação do caráter hidrofílico das esferas gel e, portanto, pela preservação de parte da alumina no estado de nanopartículas de hidróxido de alumínio. Esta hidrofiliabilidade possibilita um aumento da acessibilidade do arsênio e, portanto, aumento do seu gradiente de concentração nos sítios ativos da alumina e das células imobilizadas. A abordagem assumida neste trabalho, por meio do estudo de diversidade e tolerância ao As (V) de leveduras e fungos filamentosos, isolados de ambientes aquáticos contaminados com As, permitiu a seleção dentre os mesmos de isolados para o desenvolvimento de um adsorvente composto inovador contendo células de leveduras imobilizadas em esferas de alumina com carvão ativado, que foi eficiente na remoção de As (V) a partir da água.

## 2. Abstract

The increase in industrial activities has intensified environmental pollution problems and deterioration of several ecosystems with the accumulation of many pollutants such as heavy metals and metalloids, among them arsenic, a carcinogenic metalloid. The main objective of this study was to study yeast and filamentous fungi diversity in the freshwater environments contaminated with arsenic at the region of Córrego da Mina in Nova Lima, Brazil and use isolated yeasts as biosorbents like free and immobilized cells on macroporous alumina spheres. The water samples were collected from July 2007 to July 2008 at three different points, three water samples of 500 mL were collected at each point. From these samples were identified following genera of yeasts, *Hanseniopsis*, *Candida*, *Acremonium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Rhodospiridium*, *Issatchenkia*, *Kodamaea*, *Trichosporon* and *Cryptococcus*. Ascomycetous yeasts were more frequently isolated in this work at all points and all collections. From these samples were identified following genera of filamentous fungi *Paraconiothyrium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Plectosphaerella*, *Leptosphaeria*, *Penicillium*, *Hypocrea*, *Alternaria*, *Microsphaeropsis*, *Epicoccum*, *Stemphylium*, *Rhizomucor*, *Neurospora*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Cochliobolus*, *Mucor*, *Cylindrocladiella*, *Bionectria*, *Phaeosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, *Discostroma*, *Daldinia* and *Bipolaris*. In addition, some strains were identified by order as Pleosporales sp. and by class as Dothideomycetes sp. Most yeast isolates tested for tolerance to As (V) in this study showed the tolerance limit of up to 100 mM of As (V), on the other hand most of the isolates of filamentous fungi, about 51% of isolates, grew only on YM agar not supplemented with As (V). *Rhodospiridium toruloides* L56-1 was the only one that remained viable after the tolerance test in YM broth supplemented with As (V) up to a 300 mM As (V) concentration. It was chosen with other yeasts that had tolerated high As (V) concentrations to perform immobilization experiments on macroporous alumina spheres. In this work was developed a chemical process for agglomerating microparticles of activated alumina, which is based on a sol-gel process. The developed process preserves the porosity of the alumina microparticles and introduces macropores

in the resulting sphere. The cells of *R. toruloides* L56-1 immobilized in gel spheres showed the highest removal efficiency (97.11%) compared with other yeast cells immobilized in dry spheres. This increase in adsorption can be explained by the preservation of hydrophilicity in gel spheres and preservation of nanoparticles of alumina in form of aluminum hydroxide. This enables a hydrophilicity increase the accessibility of arsenic and thus increasing its concentration gradient in the active sites of alumina and immobilized cells. The approach taken in this work, through the study of diversity and tolerance to As (V) of yeast and filamentous fungi, isolated from aquatic environments contaminated with As and allowed selection among the same isolates to develop an innovative compound containing adsorbent yeast cells immobilized on alumina spheres with activated carbon, which was effective in removing As (V) from water.

### **3. Introdução e Justificativa**

O aumento das atividades industriais tem intensificado os problemas de poluição ambiental e de deterioração de vários ecossistemas com o acúmulo de muitos poluentes, tais como metais pesados e alguns metalóides. A poluição com metais pesados e metalóides, normalmente deriva de atividades como: produção de plásticos, fertilizantes e pigmentos; atividades de mineração e metalurgia; eletrólise e eletroquímica. Em conjunto com os metais pesados contaminantes de ambientes aquáticos, tem-se o arsênio (As), um metalóide tóxico que inibe o processo de fotossíntese; para os seres humanos e outros animais foram relatados casos de doenças causadas por arsênio como: melanose, hiperkeratose, aberrações cromossômicas, cânceres de pele, bexiga, pulmão e fígado, além de neuropatia, parestesia, hipertensão e distúrbios gastrointestinais.

Em estudo realizado pelo Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) no período de 2002 a 2004, foram verificadas algumas ocorrências de metais tóxicos em desconformidade com os padrões legais de proteção ao meio ambiente, como cobre, mercúrio, arsênio, selênio, cianeto, cádmio, zinco e chumbo, em córregos, rios, ribeirões e lagoas da Bacia do Alto Curso do Rio das Velhas em Minas Gerais em desconformidade com os padrões legais de proteção ao meio ambiente. As atividades de mineração são responsáveis por efetivas interferências na qualidade das águas da bacia do alto curso do rio das Velhas. A ocorrência de substâncias como arsênio, cobre, mercúrio, selênio, cádmio e chumbo em concentrações acima dos limites ambientais tem sido relatada em muitos cursos d' água da região. As situações mais críticas foram observadas no ribeirão Água Suja e no Córrego da Mina, localizados em Nova Lima e no rio das Velhas a jusante destas confluências, sobretudo no que diz respeito ao passivo ambiental da mineração de ouro.

A preocupação crescente em relação aos perigos para a saúde humana e de outros seres vivos em decorrência da permanência de metais pesados no meio ambiente e de seu acúmulo na cadeia alimentar tem levado ao desenvolvimento de tecnologias para a remoção dos mesmos de diferentes ecossistemas. Entretanto, os métodos convencionais como precipitação química, troca iônica, tecnologia de

membrana ou extração com solventes, para remoção de metais pesados de ambientes aquáticos não são eficientes, particularmente quando a concentração do íon metálico ou do metalóide é baixa (0,01-100 mg/L). Além disso, alguns métodos como a precipitação química e o tratamento eletroquímico geram subprodutos que necessitam ser tratados posteriormente. Outra desvantagem é o elevado custo de aplicação e execução dos métodos físico-químicos para as empresas da administração pública ou da iniciativa privada.

Um processo alternativo de tratamento dos referidos rejeitos industriais é a biorremediação, o qual utiliza vários materiais de origem biológica como: bactérias, cianobactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e plantas para remoção de metais pesados e metalóides de ambientes aquáticos. Esses materiais possuem a capacidade de reter os metais e metalóides e podem diminuir a concentração dos íons de metais pesados e metalóides em solução do nível de partículas por milhão (ppm, equivalente a mg/L) para o de partículas por bilhão (ppb, equivalente a µg/L).

As investigações sobre a diversidade de leveduras e fungos filamentosos em ambientes aquáticos contaminados com arsênio no Brasil são escassas, assim como o uso de microrganismos encontrados nesses ambientes em ensaios de remoção de arsênio. A maioria dos estudos de remoção de arsênio é realizada com biomassas de microrganismos modelos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*. Desta forma, a abordagem assumida neste trabalho de estudar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos em ambientes contaminados com arsênio e investigar seu potencial de remover arsênio de meios aquosos se constitui numa abordagem inovadora do ponto de vista científico e biotecnológico.

A biomassa pode ser utilizada na forma de células vivas ou mortas para remoção de metais pesados e como células livres ou imobilizados em suportes do tipo alumina ativada e/ou óxido de ferro, os quais podem apresentar um efeito sinérgico na remoção de metais pesados e metalóides. Estes processos podem ser vantajosos sob vários aspectos. O processo pode ser viável do ponto de vista econômico, pois podem ser usados organismos cultivados a baixos custos e que produzem grandes quantidades de biomassa. Do ponto de vista industrial, existe uma grande vantagem na utilização de materiais imobilizados, pois permite recuperação dos metais adsorvidos após tratamento da biomassa com ácidos ou bases, além do reaproveitamento da própria biomassa para uma nova rodada de

remoção de metais pesados ou metalóides. Além disso, a característica de seletividade da biomassa para um determinado metal pesado ou metalóide permite a remoção eficiente dos mesmos encontrados em baixas concentrações em solução, mesmo na presença de outros metais ou metalóides.

Tendo em vista que a contaminação com metais pesados e metalóides na região do Córrego da Mina pode causar danos à saúde humana e de outros seres vivos que habitam a região e que a política governamental incentiva a pesquisa e desenvolvimento de soluções inovadoras para este problema, este trabalho mostra-se relevante uma vez que o estudo da diversidade de leveduras e fungos filamentosos presentes em corpos d'água da região do Córrego da Mina contaminados com arsênio pode fornecer uma solução viável para este problema de contaminação. Sobretudo, também, porque este trabalho desenvolve o processo sol-gel para obter esferas macroporosas de alumina, nas quais as leveduras selecionadas serão imobilizadas, visando avaliar o potencial dessas esferas e dessas leveduras livres e imobilizadas em ensaios de remoção do arsênio.



## **4. Revisão Bibliográfica**

### **4.1 Metais Pesados e Metalóides**

Os metais pesados e os metalóides ou semi-metais mencionados no campo da biorremediação são normalmente classificados nas seguintes categorias: metais tóxicos (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, Co, Sn), metais preciosos (Pd, Pt, Ag, Au, Ru), radionuclídeos (U, Th, Ra, Am) e metalóides (As, Sb, Te, Po), cujos pesos específicos são normalmente maiores que 5 g/cm<sup>3</sup> (VOLESKY 1990; BISHOP, 2002). A partir do rápido desenvolvimento de várias indústrias como: mineradoras, produção de combustíveis, produção de fertilizantes e pesticidas, metalurgia, produção de ferro e aço, eletrólise e fotografia, resíduos contendo metais são diretamente ou indiretamente descartados no meio ambiente, especialmente nos países em desenvolvimento, causando sérios problemas de poluição ambiental (VOLESKY, 1990; BISHOP, 2002; WANG, 2002).

As características dos metais pesados são: (1) a toxidez pode durar por um longo período na natureza; (2) alguns metais pesados podem ser transformados de espécies químicas de baixa toxidez em formas mais tóxicas em certos ambientes, sendo o mercúrio um exemplo deste fenômeno; (3) a bioacumulação e a bioaugmentação de metais pesados na cadeia alimentar pode alterar a atividade fisiológica normal e ameaçar a vida humana; (4) os metais podem apenas ser transformados e mudados de valência e espécie, mas não podem ser degradados por quaisquer métodos, inclusive por tratamentos biológicos; (5) a toxidez dos metais pesados e metalóides ocorre mesmo em baixas concentrações (0,01-10 mg/L) (VOLESKY, 1990). Alguns íons metálicos, tais como o Hg<sup>2+</sup> e o Cd<sup>2+</sup>, são muito tóxicos mesmo em baixas concentrações de 0,001-0,1 mg/L (VOLESKY, 1990; WANG, 2002; ALKORTA et al., 2004).

### **4.2 Arsênio**

Arsênio (As) é um metalóide encontrado em rochas, solo, água, sedimentos e no ar. Este entra nos ecossistemas terrestres e aquáticos por meio de uma combinação de processos naturais, tais como os intemperismos físicos e químicos,

atividade biológica, emissões vulcânicas e também por meio de atividades antropogênicas. O uso excessivo de pesticidas à base de arsênio e o despejo indiscriminado de esgotos domésticos e efluentes industriais, assim como de atividades mineradoras, resultaram na contaminação disseminada com As de solos e cursos d' água. A presença do arsênio em ecossistemas terrestres e aquáticos desperta o interesse da opinião pública mundial devido aos seus efeitos adversos sobre a saúde humana. Em geral, a população pode estar exposta ao As do ar, alimentos e água (ADRIANO, 2001; SPARKS, 1995). Das várias fontes de arsênio no meio ambiente, a água para consumo, provavelmente, impõe a maior ameaça à saúde humana (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002). As pessoas que bebem água contaminada com As durante períodos prolongados freqüentemente apresentam lesões típicas, as quais são manifestações tardias da toxidez de As. Além disto, o arsênio é tóxico e carcinogênico para os seres humanos e outros animais (MAHIMAIRAJA et al., 2005).

O problema da contaminação com As nos lençóis freáticos da Bengala Oeste e Bangladesh foi considerado calamidade pública devido à quantidade significativa da população sob alto risco, com milhões de pessoas já sofrendo com os efeitos irreversíveis da intoxicação com As (CHATTERJEE et al., 1995). Em outros locais do mundo, os despejos indiscriminados de efluentes industriais e de mineradoras levaram a ampla contaminação de terras. As conseqüências econômicas da contaminação com As de terras agriculturáveis incluem perda da produtividade, aumento dos gastos na área de saúde e o mais importante, a imposição da contaminação com As como barreira não tarifada, a qual evita exportações de produtos agrícolas para alguns países (MAHIMAIRAJA et al., 2005).

A contaminação com arsênio das águas superficiais e subterrâneas ocorre no mundo todo e tornou-se um problema sócio – político e econômico em várias partes do planeta. Por exemplo, milhões de pessoas estão sob ameaça de beber água contaminada com arsênio na Bengala Oeste (Índia) (CHAKRABORTI et al., 2002; CHATTERJEE et al., 1995) e Bangladesh (SMITH et al., 2000). Muitas pessoas na China (WANG, 1984), Vietnã (BERG et al., 2001), Taiwan (LU, 1990), Chile (SMITH et al., 1998), Argentina (HOPENHAYN- RICH et al., 1998) e México (DEL RAZO et al., 1990) estão também sob provável risco. No Brasil, pode-se citar a região do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais que apresenta uma

contaminação histórica das águas superficiais e subterrâneas, assim como dos sedimentos dos rios da região devido à atividade mineradora na área por centenas de anos (BORBA et al., 2004).

Nota-se, portanto, que a preocupação com a intoxicação causada por arsênio em seres humanos e animais gera um interesse crescente no desenvolvimento de diretrizes e tecnologias de remediação para tratar ambientes contaminados com As. Dentre estas tecnologias desenvolvidas, imobilização de biossorventes ganha crescente espaço nos esforços de remover adequadamente o arsênio (MAHIMAIRAJA et al., 2005).

#### **4.2.1 Origem e fontes de contaminação por arsênio**

Uma gama de compostos de As, ambos orgânicos e inorgânicos, é introduzida no ambiente por meio de fontes geológicas (geogênicas) e antropogênicas (atividades antrópicas). Pequenas quantidades de As também entram no solo e água por meio de várias fontes biológicas (biogênicas) que são ricas em As.

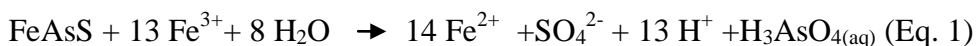
##### **4.2.1.1 Geogênica**

O arsênio é amplamente distribuído em todos os materiais em várias concentrações. Uma concentração média de 1,5 a 2,0 mg de As/kg é esperada na crosta continental da Terra. As concentrações médias de As em rochas ígneas variam de 1,5 a 3,0 mg/kg, enquanto nas rochas sedimentares variam de 1,7 a 400 mg/kg (SMITH et al., 1998). O arsênio é o 52º elemento em abundância na crosta e é o constituinte principal em mais de 245 minérios. Estes são minérios contendo principalmente sulfetos de cobre, níquel, chumbo, cobalto, zinco, ouro e outros metais. Os minérios mais importantes de As incluem: piritas, rosálgar e auripigmento (MAHIMAIRAJA, 2005). O arsênio é introduzido no solo e na água por meio de intemperismos em rochas e minerais, seguidos de lixiviações e escoamentos. Portanto, a fonte primária de As no solo é a rocha matriz da qual o mesmo é derivado (YAN-CHU, 1994). A contaminação geogênica com As em solos e águas tem sido registrada em muitas partes do mundo. Um exemplo típico é a contaminação extensa com As em lençóis subterrâneos em Bangladesh e na Bengala Oeste na Índia (MAHIMAIRAJA, 2005). A alta concentração

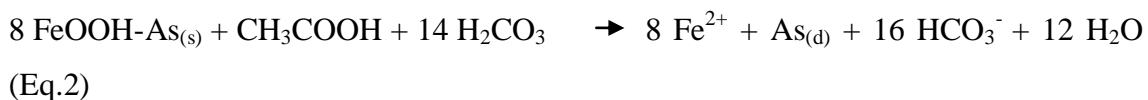
de As em lençóis subterrâneos pode estar associada às condições redutoras, resultantes da presença do carbono orgânico dissolvido, particularmente em ambientes aluviais e deltaicos. Enquanto os mecanismos exatos responsáveis por isto permanecem incertos, é possível que ambos a dissolução redutora e a dessorção de As de óxidos e argila exerçam um papel importante em elevar a concentração de As (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002).

Baseando-se na geoquímica do As, três mecanismos têm sido citados para descrever a mobilidade de As em lençóis subterrâneos da Bengala Oeste e Bangladesh (BOSE & SHARMA, 2002):

- a mobilização de As devido à oxidação de piratas contendo As. Os minérios contendo As, tais como: arseniopirita (FeAsS) são rapidamente oxidados (Eq. 1), quando expostos à atmosfera, liberando arsenito solúvel As (III), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e o íon ferroso Fe (II) (MANDAL et al., 1996). A dissolução destes minérios contendo As é altamente dependente da disponibilidade de oxigênio e da taxa de oxidação de sulfeto (LOEPPERT, 1997). O As liberado, As (III), é parcialmente oxidado a arseniato, As (V), por reações mediadas por microrganismos (WILKIE & HERING, 1998).



- a dissolução de oxihidróxidos de ferro ricos em As (FeOOH) devido ao estabelecimento de condições redutoras na subsuperfície. Sob condições oxidantes, e na presença de Fe, espécies inorgânicas de As são predominantemente retidas na fase sólida por meio de interação com coberturas de FeOOH em partículas do solo. O estabelecimento de condições redutoras em tais ambientes pode levar à dissolução de coberturas de FeOOH. A fermentação da turfa na subsuperfície libera moléculas orgânicas (p.ex.: acetato), que realizam a dissolução redutora de FeOOH, resultando na liberação de Fe (II), As (III) e As (V) presentes em tais coberturas segundo a equação dois abaixo (MCARTHUR et al., 2000; NICKSON et al., 2000).



na qual  $\text{As}_{(\text{s})}$  é o As adsorvido e  $\text{As}_{(\text{d})}$  é o As dissolvido.

- liberação de As adsorvido para minérios presentes em aquíferos por troca competitiva com os íons fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) que migram para dentro dos aquíferos a partir da aplicação de fertilizantes na superfície do solo (ACHARYA et al., 1999).

Dentre os mecanismos apresentados, o segundo envolvendo a dissolução de FeOOH sob condições redutoras é considerado como o que mais contribui para o acúmulo excessivo de As em lençóis subterrâneos (HARVEY et al., 2002; SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002).

As concentrações relativamente altas de As naturalmente ocorrentes podem surgir em algumas áreas como resultado de aportes de fontes geotermiais ou lençóis subterrâneos ricos em As (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002).

A concentração de arsênio é normalmente maior em solos e xistos do que na crosta terrestre, devido a sua contínua acumulação durante intemperismos e translocações em frações coloidais. O arsênio pode também ser co-precipitado com hidróxidos de Fe e sulfetos em rochas sedimentares. Portanto, depósitos de Fe e minérios de ferro sedimentares são ricos em As, e os solos derivados de tais rochas sedimentares podem conter concentrações tão altas quanto 20 a 30 mg de As/kg de solo (ZOU, 1986). Os vulcões são também considerados como uma fonte geogênica de As no meio ambiente, com emissões anuais atmosféricas totais estimadas em 31.000 mg (WALSH et al., 1979 ; SMITH et al., 1998).

#### **4.2.1.2 Antropogênica**

O arsênio é também introduzido no meio ambiente por meio de várias atividades antropogênicas. Estas fontes liberam compostos de As que diferem muito em natureza química (especificação) e biodisponibilidade. As fontes principais de As descarregadas sobre a terra originam-se de rejeitos industriais (~40%), cinzas de carvão (~22%), mineração (~16%) e a precipitação atmosférica da indústria de aço (~13%) (EISLER, 2004; NRIAGU & PACYNA, 1998).

O trióxido de arsênio ( $As_2O_3$ ) é usado extensamente na fabricação de cerâmica, vidro, eletrônicos, pigmentos, cosméticos e fogos de artifício (LEONARD, 1991). O arsênio é também usado para preservação de madeira em conjunto com o Cu e Cr, isto é, cobre-cromo-arseniato (CCA) (MAHIMAIRAJA, 2005).

As indústrias que fabricam pesticidas e herbicidas contendo As liberam resíduos sólidos e líquidos, que após descarte podem contaminar solos e corpos d'água. Por exemplo, a descarga indiscriminada de efluentes industriais de *Paris Green* [ $Cu(CH_3COO)_2 \cdot 3Cu(AsO_2)_2$ ] (acetoarsenito de cobre, um pesticida arsênico) resultou na contaminação de solos e lençóis subterrâneos na área residencial de Calcutá na Índia

(CHATTERJEE et al., 1999). Similarmente, na Nova Zelândia, o tratamento de efluentes contendo CCA é considerado a principal fonte de contaminação com As de ambientes aquáticos e terrestres (BOLAN & THIYAGARAJAN, 2001). Devido ao As ser amplamente distribuído em minérios que contenham sulfetos de Pb, Zn, Au e Cu, ele é liberado durante os processos de mineração e fundição dos mesmos. Os gases de combustão e particulados das fundições podem contaminar ecossistemas na direção do vento a partir da operação com vários metalóides, inclusive As (ADRIANO, 2001). A combustão de carvão não apenas libera As gasoso na atmosfera, mas também gera cinzas em suspensão e terrestres contendo quantidades variáveis de As. O descarte desses materiais frequentemente leva a contaminação do solo e água com As (BERETKA & NELSON, 1994).

O arsênio está presente em muitos pesticidas, herbicidas e fertilizantes. O uso de pesticidas hortícolas, arseniato de chumbo ( $PbAsO_4$ ), arseniato de cálcio ( $CaAsO_4$ ), arseniato de magnésio ( $MgAsO_4$ ), arseniato de zinco ( $ZnAsO_4$ ), arsenito de zinco [ $Zn(AsO_2)_2$ ] em pomares tem contribuído para contaminação dos solos com As em muitas partes do mundo (MERRY et al., 1983; PERYEA & CREGER, 1994). A contaminação do solo devido ao uso de herbicidas organoarsênicos tais como: metanoarseniato monossódico (MSMA) e metanoarseniato dissódico (DSMA), também foi registrada (GILMORE & WELLS, 1980; SMITH et al., 1998). O uso de arsenito de sódio ( $NaAsO_2$ ) para controlar ervas aquáticas tem contaminado com As pequenas lagoas de peixes e lagos em várias partes dos EUA (ADRIANO, 2001). A contaminação do solo com arsênio foi também registrada devido aos pesticidas arsênicos usados em ovinos e bovinos para controlar carrapatos, pulgas e piolhos (MCBRIDGE et al., 1998; MCLAREN et al., 1998). A aplicação contínua de fertilizantes que contenham níveis traços de As, também resulta na contaminação do solo com As, contribuindo para a inserção do As na cadeia alimentar por meio de absorção e posterior acúmulo do mesmo pelas plantas (MCLAUGHLIN, et al., 1996).

#### **4.2.1.3 Redistribuição biogênica**

As fontes biológicas contribuem apenas com pequenas quantidades de As dentro dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Entretanto, as plantas, os microrganismos e os macrorganismos afetam a redistribuição de As por meio da bioacumulação (p.ex. biossorção), biotransformação (p. ex. biometilação) e transferência (p. ex.

volatilização). O arsênio acumula rapidamente em tecidos vivos, devido a sua forte afinidade por proteínas, lipídeos e outros componentes celulares (FERGUSON & GAVIS, 1972). Os organismos aquáticos acumulam As, resultando em concentrações consideravelmente maiores do que as presentes na água, nas quais eles vivem, processo denominado de biomagnificação. Na eliminação ou consumo, eles subsequentemente tornam-se uma fonte de contaminação ambiental. O arsênio pode ser transferido do solo para as plantas e então, para os animais e seres humanos, envolvendo cadeias alimentares terrestres e aquáticas.

### **4.3 Distribuição de arsênio em ambientes aquáticos**

O arsênio em um ambiente aquático é distribuído tanto na forma de solução aquosa quanto na de sedimento. As concentrações elevadas de As em águas naturais são normalmente associadas às rochas sedimentares ricas em As de origem marinha, intemperismos de rochas vulcânicas, combustíveis fósseis, áreas geotérmicas, depósitos minerais, resíduos de mineração, uso agrícola e práticas de irrigação (KORTE & FERNANDO, 1991). As águas não contaminadas normalmente contêm menos de 0,001 µg/L de As. Nas áreas contaminadas, entretanto, altos níveis de As tem sido registrados em corpos d'água como córregos, ribeirões, rios e lagos. Deve-se notar que existe variação considerável na concentração de As dentro da mesma área geológica, como foi registrada por diferentes pesquisadores. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1981) recomenda que a concentração de As na água para consumo humano não exceda 10 µg/L.

Uma proporção significativa de As no ambiente aquático é derivado de sedimentos e a distribuição relativa de As na água e sedimentos depende principalmente da natureza e quantidades de sedimentos. O arsênio nos sedimentos de rio é altamente variável, variando de 32,8-42,7 mg/kg na Austrália (TAYLOR, 1996) a 8.700 mg-156.100 mg/kg na Nova Zelândia (ROBINSON et al., 1995). Os sedimentos ricos em As agem como um tampão ao manter a concentração de As nos corpos d'água, assim controlando a dinâmica e a biodisponibilidade de As no ambiente aquático.

### 4.3.1 Biogeoquímica de arsênio em ambientes aquáticos

#### 4.3.1.1 Adsorção e Dessorção

O arsênio é estável em quatro estados de oxidação (+5, +3, 0, -3) sob as condições que ocorrem em sistemas aquáticos. Em altos valores de potencial de redução (existentes em águas com alta concentração de oxigênio dissolvido) as espécies ácidas de arsênio ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^-$  e  $\text{AsO}_4^{3-}$ ) são estáveis. Em condições moderadamente redutoras, as espécies de As,  $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  e  $\text{HAsO}_3^{2-}$ , tornam-se instáveis (KORTE & FERNANDO, 1991; PENROSE, 1974; SMITH, 1986). A especiação de As em ambientes aquáticos é essencial no controle das reações de adsorção/dessorção nos sedimentos. A adsorção nas partículas pode remover As (V) da água contaminada, tanto quanto inibir a precipitação de minérios contendo As como  $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que controlam a concentração de equilíbrio de As (FOSTER et al., 1997).

Sob condições aeróbicas e de ácidas para neutras (típicas de muitos ambientes aquáticos), As (V) é adsorvido muito fortemente por óxidos minerais em sedimentos. A natureza não linear da isoterma de adsorção de As (V) em óxidos minerais assegura que a quantidade de As adsorvida seja relativamente grande, mesmo quando concentrações aquosas dissolvidas de As são muito baixas. Tal adsorção ocorrendo em ambientes naturais protege os corpos d'água de problemas de toxicidade por disseminação de As. A adsorção de espécies de As por sedimentos segue esta ordem:

As (V) > As (III) > As (II) > DMA (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002).

Em sedimentos contaminados com As, Clement e Faust (1981) descobriram que uma parte significativa de As estava ligada a formas organo-complexas e indicaram que tanto o equilíbrio de adsorção-dessorção como o efeito redox devem ser considerados ao se examinar a dinâmica de As em ambientes aquáticos. Quando o pH aumenta, especialmente acima do pH 8,5, o As desorve das superfícies oxidadas, aumentando assim a concentração de As em solução. Esta dessorção de As de sedimentos contaminados com o mesmo em alto pH é o mecanismo mais provável para o desenvolvimento de problemas de contaminação com As de lençóis subterrâneos sob condições oxidantes (ROBERTSON, 1989; SMEDLEY et al., 2002). Estas reações de adsorção e dessorção de As, comuns em ambientes aquáticos, são amplamente exploradas no presente trabalho.



#### 4.3.1.2 Biotransformação

O arsênio sofre uma série de transformações biológicas no ambiente aquático, produzindo um grande número de compostos, especialmente organoarsênicos. Certas reações tais como, a oxidação de As (III) a As (V), podem ocorrer na presença e ausência de microrganismos, enquanto outras reações, tais como metilação, não são termodinamicamente favoráveis na água e podem ocorrer apenas na presença de microrganismos. Em águas neutras oxigenadas, o As (V) é favoravelmente formado, enquanto o As (III) é estável sob condições redutoras (FERGUSON & GAVIS, 1972). Algumas bactérias e o fitoplâncton marinho são capazes de reduzir As (V) a As (III) ou oxidar As (III) a As (V) (ANDREAE, 1977). A redução biológica de As (V) a As (III) ocorre mais facilmente em um valor de pH entre 6,0 e 6,7 (KORTE & FERNANDO, 1991). A ocorrência desta biotransformação tem sido registrada em vários sistemas aquáticos, mediada por bactérias (JOHNSON, 1972; MEYERS et al., 1973) e algas (ANDREAE & KLUMPP, 1979; SANDERS & WINDOM, 1980; SANDERS 1983).

Os microrganismos bênticos são capazes de metilar As sob ambas as condições aeróbias e anaeróbias para produzir metilarsinas e compostos metilarsênicos com uma fórmula genérica  $(\text{CH}_3)_n\text{As}(\text{O})(\text{OH})_{3-n}$ , no qual  $n$  pode ser 1, 2 ou 3. O mono-metil arsênio (MMA) e o dimetil-arsênio (DMA) são organoarsênicos comuns na água do rio. As espécies metiladas de As podem resultar da excreção direta pelas algas ou microrganismos ou da degradação de arsênicos excretados ou organoarsênicos celulares mais complexos. A metilação pode exercer um papel significativo na mobilização de As ao liberá-lo de sedimentos para o meio aquoso. A presença de organoarsênicos em sedimentos do rio é uma evidência que a metilação ocorre nos sedimentos (ANDERSON & BRULAND, 1991). A taxa das reações de metilação/demetilação e a conseqüente mobilização de arsênicos são afetadas pela adsorção pelos sedimentos e solos.

Os produtores primários tais como as algas internalizam As (V) da solução e o reduzem a As (III), o qual é metilado produzindo MMA e DMA; os derivados metilados são então excretados. Isto pode ser considerado um processo de detoxificação dos mesmos. O As (V) é transportado para o interior das células devido a sua similaridade química ao fosfato, este processo é denominado mímica molecular. Embora a detoxificação de As por microrganismos possa ser alcançada por meio de metilação, o

As metilado, ainda pode ser tóxico para o fitoplâncton e comunidades do perifíton em ambientes marinhos (MAHIMAIRAJA, 2005).

Ambos os macrorganismos e os microrganismos acumulam As em suas células. As concentrações nos organismos podem ser consideravelmente maiores do que nas águas nas quais eles vivem, mas ao contrário do mercúrio, existe pouco, senão nenhum, aumento nos níveis superiores da cadeia alimentar, isto é, bioaumentação. A toxicidade de As para os organismos aquáticos é similar aos seus efeitos na vida terrestre, isto é, o As (V) é muito menos tóxico do que o As (III) (FERGUSON & GAVIS, 1972).

Em águas deficientes em fosfato, o arseniato pode substituí-lo e ser transportado para o interior das células de algas, sendo então acumulado. Em um estudo de acúmulo de As na cadeia alimentar, foi registrado que a maioria do As acumulado pelas algas estava na forma não metilada, o qual estava ligado fortemente a proteínas e polissacarídeos da célula (MAEDA et al., 1990). Tal transformação pode ser estimulada pela adição de nutrientes. A formação microbiana de arsina volátil ou outros compostos reduzidos voláteis pode contribuir para liberação de As na atmosfera. O arsenito pode ser reduzido e metilado a DMA, o qual pode posteriormente ser metilado ou reduzido e pode eventualmente volatilizar (KORTE & FERNANDO, 1991).

#### **4.4 Remoções de metais pesados e metalóides de águas**

Os procedimentos comumente usados para remoção de íons de metais pesados de efluentes líquidos incluem precipitação química, troca iônica, tratamento eletroquímico, osmose reversa, ultrafiltração e adsorção em carbono ativado, dentre outros. Entretanto, a precipitação química e o tratamento eletroquímico não são eficientes, especialmente quando a concentração do íon do metal em solução aquosa é tão baixa quanto: 0,01-100 mg/L. Estes procedimentos também produzem grandes quantidades de rejeitos, os quais requerem tratamento adicional a elevado custo para que possam ser descartados adequadamente. Os processos de troca iônica, ultrafiltração e adsorção em carbono ativado são extremamente caros, principalmente quando há necessidade de tratar volumes grandes de águas ou efluentes contendo metais pesados em baixa concentração, por isso esses processos, em algumas situações não podem ser usados em larga escala (WANG & CHEN, 2006).

A busca por novas tecnologias tem sido recentemente dirigida para aplicação da biorremediação, a qual constitui uma alternativa atraente em relação aos métodos físico-químicos de remediação comumente usados (ZOUBOULIS et al., 1997). Neste método são usadas biomassas de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e plantas, as quais podem ligar-se passivamente a uma grande quantidade de metais ou metalóides, um fenômeno comumente referido como biossorção (MCHALE & MCHALE, 1994). Assim este processo constitui uma solução eficiente e de baixo custo para o tratamento de efluentes industriais (VOLESKY & HOLAN, 1995). Isto porque a biomassa viva, em contato prolongado com a solução contendo metais ou metalóides, é também capaz de seqüestrar os metais ou metalóides intracelularmente por meio de um processo ativo chamado bioacumulação.

A biossorção é possível para ambas as biomassas, vivas ou mortas, mas a bioacumulação é mediada apenas pela biomassa viva (SANDAU et al., 1996). Além disso, a bioacumulação é um processo dependente de crescimento, ao contrário da biossorção que é independente. Sendo assim, a biomassa microbiana pode ser usada e explorada mais eficientemente como biossorvente do que como bioacumuladora de metais e metalóides.

#### **4.5 Remoções de arsênio de ambientes aquáticos**

Devido ao fato de que a maioria dos casos de toxicidade por As em seres humanos é resultado do consumo de água contaminada com As, têm sido propostas diversas tecnologias para remoção de As da água. Uma plêiade de métodos adequados para remoção de As da água em níveis domésticos e comunitários está atualmente disponível. Estes métodos são primariamente baseados na (i) remoção de As em fase sólida por coagulação, sedimentação ou filtração; (ii) remoção de As da fase solúvel por troca iônica, osmose ou eletrodialise; (iii) oxidação de As (III) a As (V) e sua subsequente remoção por adsorção e/ou precipitação; (iv) biossorção usando microrganismos e (V) rizofiltração usando plantas aquáticas (MAHIMAIRAJA et al., 2005).

##### **4.5.1 Métodos físico-químicos**

#### 4.5.1.1 Filtração

A maioria dos sistemas de tratamento de esgoto domésticos para remoção de As envolve filtração. Por exemplo, o filtro *Pitcher*, que envolve cerâmica porosa (NEKU & TANDUKAR, 2003) e os filtros de areia (YOKOTA et al., 2001) têm sido eficientes na remoção de As da água. Seid e colaboradores (2001) registraram que a nanofiltração porosa por meio de membrana de troca aniônica removeu cerca de 90% de As (V) presente na água a uma concentração de 316 µg/L. Embora esta tecnologia possa alcançar um alto grau de remoção de As, ela envolve um alto investimento inicial e altos custos de operação e manutenção.

#### 4.5.1.2 Adsorção

Vários compostos, incluindo alumina ativada, areia coberta com Fe e resinas de troca iônica, são usados para adsorver As. Na maioria dos ambientes, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresenta uma carga de superfície positiva que preferencialmente adsorve As. Similarmente, Al(OH)<sub>3</sub> e argilas de silicato adsorvem grandes quantidades de As. Yoshida e colaboradores (1976) investigaram a remoção de As da água usando o “gel marrom”, o qual é um gel de sílica contendo 6% de Fe(OH)<sub>3</sub>, o qual apresentou uma adsorção máxima de 17 g de As/kg de gel tanto de As (III) quanto de As (V) em pH 6,0.

Rothbaum e Buisson (1977) descobriram que o Fe-floc sintético Fe(OH)<sub>3</sub>, preparado ao tratar FeSO<sub>4</sub> com NaOCl em pH 3,5-5,0, removeu uma grande porcentagem de As de água de descarte geotérmico por meio de co-precipitação. Similarmente, Yuan e colaboradores (2002) examinaram o potencial de vários materiais naturais, tais como: carbono ativado tratado com Fe, esferas géis tratadas com Fe e areia coberta com óxido de Fe, de remoção de As de água potável em condições de laboratório e de campo. A areia coberta com óxido de Fe apresentou um alto grau (>94%) de remoção de As (III) e As (V). Quando o pH foi aumentado de 5,0 para 9,0, a adsorção de As (V) diminuiu, mas a adsorção de As (III) permaneceu relativamente estável. Também, os minérios de sulfeto de ferro, tais como pirita e pirrotita, foram adsorventes muito eficientes na remoção de As (III) e As (V) da água (HAN & FYFE, 2000).

Hlavay & Polyak (1997) desenvolveram e testaram novos adsorventes para remoção de As. Os materiais de suporte foram granulados usando-se Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e/ou TiO<sub>2</sub> e

então,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  foi precipitado sobre a superfície dessas partículas. O adsorvente poroso impregnado de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  resultante foi seco a temperatura ambiente e empacotado em uma coluna de troca iônica. Estas colunas removeram mais de 85% de As da água. Os íons As (III) são adsorvidos por reação química na superfície de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . O grupo funcional  $\equiv\text{FeOH}$  reage com os íons  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ , e assim os compostos de superfície  $\equiv\text{FeAsO}_3\text{H}_2$ ,  $\equiv\text{FeAsO}_3\text{H}$  e  $\equiv\text{FeAsO}^{2-}$  são formados.

Das e colaboradores (1995) demonstraram a aplicação prática da técnica de adsorção para remover As ao desenvolver um simples dispositivo para remover arsênio de águas subterrâneas usadas para beber e cozinhar. O sistema consiste em um filtro com uma barra e duas jarras plásticas. A barra contém sal de Fe (III), um agente oxidante e carvão ativado. Este sistema de remoção foi instalado em vários locais de Bangladesh e de Bengala Oeste, e os resultados analíticos mostraram que geralmente 93-100% do total de As na água, em uma concentração de 149-463  $\mu\text{g/L}$ , foram removidos.

Kim e colaboradores (2004) mostraram que a alumina mesoporosa com uma grande área superficial específica (302  $\text{m}^2/\text{g}$ ), grande volume de poro (0,39  $\text{m}^3/\text{g}$ ), tamanho de poro uniforme (3,5 nm) e sistema interligado de poros é eficiente na remoção de As de água doméstica. A alumina mesoporosa é insolúvel e estável dentro da faixa de pH 3 a 7. A adsorção máxima de As foi sete vezes maior (121 mg de As (v)/g e 47 mg de As (III)/g) do que na de alumina ativada convencional, e a cinética de adsorção foi também rápida, com a remoção completa em menos de 5 h quando comparado a alumina convencional, a qual requer cerca de dois dias para remover a metade da concentração inicial. Fryxell e colaboradores (1999) usaram ligantes quelantes de metais imobilizados em sílica mesoporosa como um novo material de ligação a ânions para remover As da água. A remoção quase completa de As (V) tem sido alcançada a partir de soluções contendo mais de 100 mg de As (V)/L.

#### **4.5.1.3 Precipitação**

O arseniato pode ser removido por precipitação/co-precipitação usando compostos de Fe e Al. Gullledge e O'Connor (1973) conseguiram a remoção completa de As (V) da água usando  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  em uma faixa de pH de 5 a 7,5. Hering e colaboradores (1997) alcançaram uma remoção superior a 90% de As (V) de águas contendo uma concentração inicial de 100  $\mu\text{g}$  de As/L. Shen (1973) removeu As de

água potável com cloro (Cl<sub>2</sub>) por oxidação de As (III) a As (V) e subsequente precipitação do último.

Uma das vantagens do método de precipitação química é que este pode ser usado em ambos os níveis: domiciliar e comunitário. Os materiais são prontamente disponíveis e geralmente baratos. Entretanto, o problema do descarte de rejeitos tóxicos existe e requer mão-de-obra treinada para que o mesmo seja feito de maneira segura.

## **4.6 Métodos Biológicos**

### **4.6.1 Remoção microbiana de arsênio**

A biossorção e biometilação são dois importantes processos pelos quais os metalóides, inclusive As, são removidos da água e efluentes industriais usando microrganismos. No processo biossortivo geralmente falta especificidade na ligação do metalóide e é sensível às condições ambientais, tais como: pH, composição da solução e a presença de quelantes. Microrganismos geneticamente modificados que expressam uma proteína de ligação a um metalóide e um sistema de transporte específico para o mesmo tem obtido sucesso na seletividade para o acúmulo de um metalóide específico na presença de altas concentrações de outros metalóides e agentes quelantes em solução (CHEN & WILSON, 1997). Já foram descritas linhagens recombinantes de *E. coli* e *S. cerevisiae* capazes de acumular grandes quantidades de As quando comparadas às linhagens selvagens (KOSTAL et al., 2004). Estes organismos têm o potencial de aplicação para remover metalóides específicos de solos e sedimentos contaminados.

Vários adsorventes modificados quimicamente têm sido desenvolvidos e avaliados quanto a sua eficiência em remover metalóides. Loukidou e colaboradores (2003) examinaram o potencial de utilização da biomassa de *Penicillium chrysogenum*, subproduto residual da produção de antibiótico, para a remoção de As (V) de efluentes industriais. Eles observaram que o pré-tratamento da biomassa com surfactantes comuns como o brometo de hexadecil-trimetilamônio, a dodecilamina e um polieletrólito catiônico auxiliou na remoção de quantidades significativas de As (V) das águas. Em pH 3,0, as capacidades de remoção da biomassa modificada variaram de 33,3 a 56,1 mg de As/g de biomassa.

Certos fungos filamentosos, leveduras e bactérias são capazes de metilar o As e transformá-lo em derivados gasosos de arsinas. A aplicação comercial de biotransformação de metalóides na remediação de água contaminada com metalóide foi documentada por Bender e colaboradores (1995). Eles examinaram a remoção e transformação de metalóides usando reatores de leito fixo com biofilmes microbianos, formados a partir de inóculos de culturas puras de cianobactérias e amostras de sedimentos de um sítio contaminado. Quando amostras de água contendo altas concentrações de metais e metalóides passaram pelo biofilme, houve uma rápida remoção dos mesmos das amostras. O biofilme mostrou-se tolerante a altas concentrações de metais e metalóide tóxicos como: Cd, Pb, Cr, Se e As (até 350 mg/L). A remoção de metais e metalóide tóxicos pelo biofilme foi atribuída à deposição de compostos dos metais e metalóide nas superfícies celulares, tanto quanto, a modificação química do meio aquoso circundando o biofilme. As cianobactérias produziram grandes quantidades de polissacarídeos capazes de se ligarem aos metais e metalóide. Também a produção de oxigênio pela fotossíntese e posterior consumo heterotrófico nas regiões mais profundas resultou em gradientes verticais de potencial redox no biofilme. Adicionalmente, as bactérias redutoras de enxofre colonizaram os estratos inferiores, removendo e utilizando os sulfetos dos metais e metalóides. Então, dependendo da característica redox de regiões do biofilme, os metais e os metalóides seqüestrados podem ser oxidados, reduzidos ou precipitados com sulfetos ou óxidos (MAHIMAIRAJA et al., 2005).

#### **4.7 As classes de águas**

Os resultados referentes à qualidade das águas são interpretados de acordo com os limites de classe definidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), em sua Resolução n° 20/86, e pelo Conselho Estadual de Política Ambiental (COPAM), na Deliberação Normativa n° 10/86, que tomam por base os usos preponderantes das águas doces como: Classe Especial, são águas destinadas ao abastecimento doméstico, sem prévia ou com simples desinfecção, à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; Classe 1, são águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento simplificado, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho), à irrigação de hortaliças que são

consumidas cruas e de frutas que se desenvolvem rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana; Classe 2, são águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho), à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana; Classe 3, são águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas ou forrageiras, à dessedentação de animais; Classe 4, são águas destinadas à navegação, à harmonia paisagística e aos usos menos exigentes.

Esse sistema, denominado enquadramento dos cursos de água, estabelece o nível de qualidade (Classe) a ser mantido ou alcançado em um corpo de água ao longo do tempo, em termos dos usos possíveis com uma determinada segurança.

#### **4.8 O alto curso do rio das Velhas e a contaminação com arsênio**

Em estudo realizado pelo Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), órgão pertencente à Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Minas Gerais (SEMAD) no período de 2002 a 2004 no alto curso do rio das Velhas, mais especificamente no ribeirão Água Suja foram registradas concentrações de arsênio acima do limite permitido pela legislação vigente (CONAMA, Lei nº 357/05), que é de 0,01mg/L de As total, em 62,5% das amostras de água analisadas. O córrego da Mina, também localizado no alto curso do rio das Velhas registrou uma concentração de 0,44 mg/L de As em junho de 2004, valor bastante acima do limite estabelecido na legislação (IGAM, 2004).

Apesar das chuvas terem uma contribuição bastante significativa no aporte de sólidos e outros poluentes para os cursos de água, ressalta-se que os índices de contaminação no ribeirão Água Suja e Córrego da Mina revelam impactos das atividades de mineração desenvolvidas na região. Diagnósticos da bacia apontam que existe uma grande concentração de arsênio nos lençóis subterrâneos da região. Os trechos do ribeirão Água Suja e do Córrego da Mina que estão localizados na área de entorno da Mina Morro Velho possuem teores elevados de arsênio. Portanto, as atividades de extração e beneficiamento de minérios nessa sub-bacia, somadas às



atividades industriais, desenvolvidas principalmente no município de Nova Lima, constituem-se numa fonte potencial de metais pesados e substâncias tóxicas para o ribeirão Água Suja e Córrego da Mina (IGAM, 2004).

#### **4.9 Mecanismos de remoção de metais pesados e metalóides por leveduras e fungos filamentosos**

A estrutura complexa dos microrganismos revela que existem muitos modos dos metais serem incorporados pelas células microbianas. Há vários mecanismos de bioadsorção, porém estes não são completamente compreendidos até o presente momento. Os mesmos podem ser classificados de acordo com critérios como a dependência do metabolismo celular, tratamento da biomassa ou uso de linhagens recombinantes de microrganismos (AHALYA et al., 2003).

De acordo com a dependência do metabolismo celular, os mecanismos de bioadsorção podem ser divididos em: metabolismo dependente e metabolismo independente. Quanto à localização na qual o metal ou metalóide removido da solução é encontrado, o processo pode ser classificado como tendo: acúmulo ou precipitação extracelular, precipitação na superfície celular e acúmulo intracelular (AHALYA et al., 2003).

O transporte de metais ou metalóides através da membrana celular resulta no acúmulo intracelular, o qual é dependente do metabolismo celular. A partir deste fato, pode-se concluir que este mecanismo de bioadsorção ocorre apenas em células vivas (AHALYA et al., 2003). Este mecanismo está frequentemente associado com a resistência dos microrganismos aos metais ou metalóides.

O transporte de metais pesados ou metalóides através das membranas celulares microbianas pode ser mediado pelo mesmo mecanismo usado para transportar outros íons essenciais ao metabolismo celular como:  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Na^+$ . Os sistemas de transporte de metais podem ser confundidos pela presença de íons de metais pesados ou metalóides de mesmas cargas e raios iônicos semelhantes aos íons essenciais (NIES, 1999).

Durante a bioadsorção, ocorre a incorporação de metais ou metalóides a partir da solução por interações físico-químicas entre os metais ou metalóides e os grupos funcionais presentes na superfície da célula microbiana. Estas são baseadas em adsorção

física, troca iônica e complexação, as quais são independentes do metabolismo celular (AHALYA et al., 2003).

O desempenho do bioissorvente depende do estado iônico da biomassa e assim como as resinas sintéticas, os bioissorventes podem ser preparados com diferentes formas iônicas tais como: protonadas ou saturadas com cátions (p.ex.:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) por meio de pré-tratamento da biomassa com ácidos, bases e/ou sais inorgânicos. O tratamento varia com o tipo de biomassa e a espécie do metal a ser bioissorvido. Portanto, o conhecimento do mecanismo de ligação do metal ao bioissorvente é fundamental para compreensão do fenômeno de adsorção (GUPTA et al., 2000).

A ligação do metal ou metalóide parece ocorrer em duas etapas, na qual a primeira envolve uma interação estequiométrica entre o metal e os grupos químicos reativos na parede celular e a segunda constitui-se pelas deposições inorgânicas de grandes quantidades dos metais ou metalóides (BEVERIDGE & MURRAY, 1980). A parede celular consiste de uma variedade de polissacarídeos, lipídeos e proteínas, os quais oferecem um número de sítios ativos capazes de ligarem-se aos íons dos metais ou metalóides (KUYUCAK & VOLESKY, 1989), sendo considerada um trocador iônico complexo similar a uma resina comercial. As diferenças na composição da parede celular entre diferentes grupos de microrganismos (p.ex.: algas, bactérias, cianobactérias e fungos filamentosos) e dentro de um mesmo grupo podem causar diferenças significativas no tipo e na quantidade de íons dos metais ou metalóides ligados às diferentes paredes celulares.

Gourdon e colaboradores (1990) compararam as capacidades de bioissorção de  $\text{Cd}^{2+}$  por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As glicoproteínas presentes no lado externo das paredes celulares das bactérias Gram-positivas parecem ter mais sítios potenciais de ligação de  $\text{Cd}^{2+}$  do que os fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas paredes celulares das bactérias Gram-negativas, sendo responsáveis pela diferença observada entre os dois grupos bacterianos. Os grupos fosforil do LPS e dos fosfolipídeos têm sido demonstrados ser os mais prováveis sítios de ligação de cátions de metais e metalóides na membrana externa de *Escherichia coli* (STRAIN et al., 1983).

Em fungos filamentosos, o mecanismo de incorporação de urânio por *Rhizopus arrhizus* tem sido estudado em detalhe (TSEZOS & VOLESKY, 1982). A bioissorção de urânio envolve grupos aminos da quitina presente na parede celular do mesmo e ocorre em uma seqüência de eventos. Outros estudos em fungos filamentosos sugerem os

grupos fosfatos e carboxilatos da parede celular como sítios de ligação primários (TOBIN et al., 1990). Substâncias poliméricas, também podem se ligar seletivamente aos íons de metais ou metalóides, levando a grandes acúmulos dos mesmos no exterior das células. Alguns destes polímeros são carregados negativamente, portanto se ligam a cátions e às vezes formam cápsulas ou agregados ao redor das células (MCHALE, 1994).

O mecanismo de ligação dos metais à biomassa não é bem compreendido devido à natureza complexa da biomassa, a qual não é passível de análise instrumental imediata (KUYUCAK & VOLESKY, 1989). A localização dos metais tem sido feita utilizando análise dispersiva de raios-X (EDS) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Esta última é uma técnica relativamente nova para determinar a energia de ligação dos elétrons em átomos e moléculas, a qual depende da distribuição de cargas e, por conseguinte fornece informação sobre o estado de oxidação de um átomo ou íon (KUYUCAK & VOLESKY, 1989).

As observações sob microscópio eletrônico realizadas por Mullen e colaboradores (1989) revelaram a presença de  $Ag^{2+}$  como partículas discretas sobre ou próximas as paredes celulares de ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a presença de prata foi confirmada EDS. Em um trabalho sobre bioissorção de ferro utilizando a rodófito *Sargassum fluitans* realizado por Figueira e colaboradores (1999), os autores usando XPS observaram que o ferro estava presente em dois estados de oxidação. Em seguida, utilizando a análise de espectroscopia de infravermelho (IR), foi confirmado que os grupos carboxilas presentes na biomassa estavam envolvidos na incorporação de ambos  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  e os grupos sulfonatos na incorporação de  $Fe^{3+}$ .

Como o processo bioissorção envolve principalmente a superfície celular, modificações da parede celular podem alterar a ligação de íons dos metais e metalóides à biomassa. Vários métodos têm sido empregados para modificação das células microbianas a fim de aumentar a capacidade de ligação aos metais e metalóides da biomassa, e elucidar os mecanismos de bioissorção (GUPTA et al., 2000). Estas modificações podem ser introduzidas durante o crescimento do microrganismo ou após o mesmo. As condições nas quais os microrganismos crescem afetam seus fenótipos de superfície celular e seus potenciais de bioissorção (GADD, 1990).

Luef e colaboradores (1991) relataram que a biomassa de *Aspergillus niger* crescida na presença de altas concentrações do íon potássio em fermentadores para

produção de ácido cítrico, apresentou uma bioadsorção muito alta devido à mudança na composição da parede celular.

A biomassa crescida pode sofrer vários tratamentos físicos e químicos para modificar as propriedades de ligação aos metais e metalóides da biomassa para requerimentos específicos. Os tratamentos físicos incluem: aquecimento, congelamento e liofilização (PURANIK & PAKNIKAR, 1997; GADD, 1992). Os vários tratamentos químicos usados para modificação da biomassa incluem lavagem da biomassa com detergentes (FIGUEIRA et al., 1999; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1998), ligação cruzada com solventes orgânicos (HOLAN & VOLESKY, 1994) e tratamento com ácidos ou bases (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1998). Os pré-tratamentos podem modificar as características de superfície das células microbianas por meio da remoção ou bloqueio de grupos funcionais, ou exposição de mais sítios de ligação dos metais nas paredes celulares.

As leveduras em diferentes formas são usadas para diferentes finalidades em estudos de remoção de metais. São elas: sob a forma de células vivas ou células mortas, sendo que as células mortas apresentam a vantagem de removerem os metais ou metalóides sem o consumo de nutrientes (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995); como células intactas ou células lisadas, sendo que as células lisadas podem expor sítios adicionais de ligação aos metais e metalóides não expostos nas células intactas; como células imobilizadas ou células livres, sendo que as células imobilizadas podem ser reutilizadas em novos ciclos de remoção de metais ou metalóides de efluentes, após a dessorção dos metais ou metalóides da biomassa (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997); sob a forma de células nativas ou células tratadas por processos físico-químicos, sendo que as células tratadas podem aumentar o potencial de remoção de metais ou metalóides por meio de modificações da parede celular; células floculantes ou células não floculantes, sendo que as células floculantes podem ser removidas mais facilmente em ensaios de remoção de metais em batelada (MARQUES et al., 1999). Também linhagens recombinantes podem expressar sistemas de transporte e proteínas que se ligam aos metais e metalóides (metalotioneínas), os quais podem aumentar a capacidade de acúmulo de metais ou metalóides da célula, quando comparadas às linhagens selvagens. Enfim, têm sido realizados estudos utilizando linhagens das coleções de cultura ou isolados de efluentes industriais e, além disso, pode-se destacar que isolados de

ambientes contaminados com metais pesados apresentam alto potencial de remoção de metais (PARK et al., 2003).

O estudo dos fatores que afetam a bioissorção pela biomassa microbiana é essencial para aplicação industrial desses processos, pois os mesmos fornecem informações sobre a cinética de remoção, as quais são necessárias, para o desenvolvimento de reatores de coluna de leito fixo, por exemplo. Dentre os fatores que afetam a bioissorção pode-se citar: a temperatura, que parece não influenciar a capacidade de bioissorção na faixa de 20-35 °C (AKSU et al., 1992) e o pH, que parece ser o parâmetro mais importante no processo bioissorção, pois este pode afetar a especiação dos metais em solução, a atividade dos grupos funcionais na biomassa e a competição dos íons metálicos (FRIIS & MYERS-KEITH, 1986; GALUN et al., 1987).

Outro parâmetro importante é a concentração da biomassa em solução, a qual parece influenciar a taxa de incorporação específica de metais a partir da solução (FOUREST & ROUX, 1992; GADD et al., 1988). GADD e colaboradores (1988) sugeriram que um aumento na concentração da biomassa leva a interferência entre os sítios de ligação presentes na biomassa. Por outro lado, Fourest & Roux (1992) invalidaram esta hipótese atribuindo a responsabilidade da diminuição da incorporação específica à diminuição da concentração do metal em solução. Assim, este fator deve ser levado em consideração em qualquer aplicação de biomassa microbiana no tratamento de efluentes, nos quais mais de um tipo de íons metálicos estão presentes. Outro fator importante é que a remoção de um íon metálico pode ser influenciada pela presença de outros íons metálicos. Em um trabalho realizado por Sakaguchi & Nakajima (1991), a incorporação de urânio pela biomassa de bactérias, fungos filamentosos e leveduras não foi afetada pela presença de manganês, cobalto, cobre, cádmio, mercúrio e chumbo em solução, já a incorporação de cobalto por diferentes microrganismos pareceu ser completamente inibida pela presença de urânio, chumbo, mercúrio e cobre em solução. Por outro lado, em outro trabalho realizado por Tsezos & Volesky (1982), a presença de  $Fe^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  alterou a incorporação de urânio por *Rhizopus arrhizus*.

#### 4.10 Metabolismo de arsênio por procariotos

O arsênio pode potencialmente agir como um doador ou acceptor de elétrons e participar de cadeias transportadoras de elétrons em algumas bactérias. Entretanto sistemas de transporte específicos para o arsênio não evoluíram devido à toxidez extrema deste metalóide (STOLZ et al., 2006). O As (III) e o As (V) são normalmente internalizados por meio dos transportadores de glicerol e fosfato, respectivamente, devido à similaridade estrutural química de As (III) e de As (V) aos compostos referidos. Em *E. coli*, por exemplo, dois transportadores de fosfato (Pit e Pst) são usados para internalizar o As (V), com Pst sendo a via de internalização dominante (ROSEN & LIU, 2009). Sanders e colaboradores (1997) mostraram que o As (III) não carregado é internalizado pelo transportador de glicerol GlpF, um membro dos canais de glicerol da família da proteína intrínseca principal (MIP). Uma mutação em GlpF resultou em linhagens de *E. coli* tolerantes ao As (III). Transportadores homólogos ao GlpF têm sido identificados em *Leishmania major* e *Pseudomonas putida*, e provavelmente facilitam o transporte de As (III) através da membrana celular nestas espécies (GOURBAL et al., 2004).

##### 4.10.1 Mecanismos básicos de detoxificação

Muitas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam um mecanismo de resistência ao arsênio similar, baseado no operon *ars* (tipicamente *arsRDABC*) codificado por genes cromossômicos ou plasmidiais (XU et al., 1998). Em ambos os casos, há dois componentes necessários: uma enzima redutase (ArsC) para redução de As (V) a As (III), o qual é subsequente expelido usando uma bomba de efluxo (ArsB). Os genes adicionais *ars* supostamente surgiram por evolução paralela, ou seja, eventos de duplicações e recombinações gênicas e apresentam regulações complexas (BUTCHER et al., 2000). A fonte de poder redutor varia entre os procariotos; enquanto *E. coli* emprega a glutathiona (GSH) e glutaredoxina (SHI et al., 1999), *Staphylococcus aureus* utiliza tioredoxina (JI & SILVER, 1992). Durante o passo de redução, o arseniato liga-se ao domínio de reconhecimento compreendendo os resíduos de Arg da arseniato redutase (ArsC), resultando numa ligação dissulfeto entre os resíduos de

cisteína de ArsC e os equivalentes redutores. A redução da ligação dissulfeto via transferência de elétrons a partir da GSH, glutaredoxina ou tioredoxina resulta na redução de As (V) a As (III) (SILVER & PHUNG, 2005). ArsR e ArsD são componentes regulatórios que agem primariamente como repressor transcricional e regulador da atividade do operon, respectivamente (ROSEN, 2002). Estas proteínas regulatórias têm afinidade extremamente alta pelo As (III) e se ligam a ele via resíduos de cisteína, resultando na alteração de ligação ao DNA para ativação transcricional (ROSEN, 1999). ArsA é uma ATPase que auxilia ArsB no efluxo, ao fornecer a energia necessária via hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) (TISA & ROSEN, 1990). Interessantemente, o As (V) relativamente menos tóxico é convertido em As (III), que é mais tóxico para a célula, antes do efluxo. É possível que o sistema de efluxo de As (III) tenha evoluído primeiro em ambientes redutores. A partir do momento em que a atmosfera tornou-se oxidativa o sistema de redução de As (V) foi subsequentemente, ligado ao sistema de efluxo de As (III) para acomodar a toxidez de As (V) (ROSEN, 2002).

#### **4.10.1.1 Oxidação e redução de arsenito**

A oxidação de As (III) pode ser importante para remoção de arsênio, uma vez que o As (V) é menos solúvel e muito mais eficientemente removido por métodos físico-químicos (LEIST et al., 2000). Na natureza, os microrganismos realizam a oxidação de As (III) usando a enzima As (III) oxidase, a qual é classificada como um membro da família da dimetilsulfóxido (DMSO) redutase e foi identificada e sequenciada (ELLIS et al., 2001). A maioria das arsenito oxidases, como a (AoxAB) isolada de *Hydrogenophaga* sp. NT-14 funciona como um heterodímero e contém Fe e Mo no centro catalítico (ELLIS et al., 2001). Estudos de filogenia sugerem que a enzima teve origem primariamente como um mecanismo de resistência convertendo o mais tóxico As (III) no menos tóxico As (V). Entretanto, algumas bactérias quimiolitotróficas obtêm energia da oxidação de arsenito (SANTINI et al., 2000).

Além da redução intracelular de As (V) usando a arseniato redutase, a redução de arseniato pode também ser parte da respiração anaeróbia em algumas bactérias, como *Shewanella* sp ANA-3 (KRAFFT E MACY, 1998), na qual o arseniato atua como acceptor final de elétrons. A enzima envolvida, a arseniato redutase, composta de dois domínios (ArrA e ArrB), é ligada a membrana assim como outros membros da cadeia

transportadora de elétrons e contém um centro de molibdopterina em ArrA e um centro Fe-S em ArrB. Um mutante de *Shewanella* sp ANA-3 contendo mutações no conjunto de genes *arrAB* é incapaz de usar o As (V) comoceptor final de elétrons (SALTIKOV et al., 2003).

#### **4.10.1.2 Metilação/demetilação**

A metilação de metais foi originalmente sugerida como um passo nas detoxificações; entretanto, estudos sugerem que nem todos os produtos de arsênio metilados são menos tóxicos (BENTLEY & CHASTEEN, 2002). O modo primário de geração de arsinas e metil arsênicos é a redução de As (V) e subsequente adição oxidativa de grupos metil (DOMBROWSKI et al., 2005) de várias fontes, tais como, a metilcobalamina em muitos sistemas bacterianos (GADD & WHITE, 1993). As formas metiladas de arsênio são voláteis e rapidamente liberadas para o ambiente no qual a oxidação poderia convertê-las de volta a forma oxidada de As (V). Conhece-se muito pouco sobre as vias de demetilação; entretanto, a demetilação de compostos monometil e dimetil arsênicos tem sido demonstrada e até mesmo o uso de arsênicos metilados como fontes de carbono é possível (MAKI et al., 2004). O entendimento destes mecanismos não apenas esclarecerá a mobilização de arsênio em diferentes ambientes, mas também abrirá novos horizontes na engenharia metabólica, voltados para exploração dessas vias para remediação de arsênio (TSAI et al., 2009).

#### **4.10.1.3 A maquinaria de efluxo de arsênio**

O As (III) pode ser expelido via uma proteína transportadora de arsenito ou via uma bomba de efluxo de arsenito ArsB. A primeira via utiliza a energia do potencial de membrana, enquanto a última usa a energia fornecida pela ATPase ArsA via hidrólise de ATP (DEY et al., 1996). A maioria dos sistemas procariotos emprega o sistema ArsA/B, enquanto algumas bactérias podem usar apenas ArsB. A afinidade reduzida por As (III) após mutações nos resíduos de cisteína de ArsB, sugere que a ativação de ArsA pelo As(III) ocorre via complexo metal-tiolato formado entre os três resíduos de cisteína e As (III) (SILVER & PHUNG, 1996).



## **4.10.2 O metabolismo de arsênio pelos eucariotos**

### **4.10.2.1 A internalização de arsênio**

A internalização de arsênio por *Saccharomyces cerevisiae* ocorre por meio de três diferentes sistemas de transporte. O As (V), devido a sua similaridade ao fosfato (NIDHUBHGHAILL & SANDLER, 1991), é internalizado por meio de um transportador de fosfato, o Pho87p (PERSSON et al., 1999). Além disso, dois sistemas transportadores para o arsenito trivalente foram identificados. Similar aos sistemas bacterianos, o arsenito é internalizado por uma aquaglicerolporina Fps1p, um transportador de glicerol (WYSOCKI et al., 1997; WYSOCKI et al., 2001). A mutação no gene *FPS1* resultou na redução da internalização de arsenito, o que confirma o papel importante do canal Fps1p para internalização de arsenito (GHOSH et al., 1999; LIU et al., 2002). Entretanto, a linhagem com deleção no gene *FPS1* ainda permaneceu sensível ao arsenito na ausência de glicose, sugerindo a existência de um mecanismo de internalização pelo sistema de transporte de glicose (LIU et al., 2002). Em 2004, Liu e colaboradores descobriram que uma classe de permeases de hexoses de *S.cerevisiae* catalisa a internalização de arsenito (LIU et al., 2004). A internalização de arsenito foi reduzida em 80% na presença de glicose, quando *FPS1* foi deletado, confirmando que os transportadores de hexose são os principais responsáveis pela internalização de arsenito. Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que uma permease de glicose de mamífero GLUT também catalisou a internalização de arsenito quando foi expressa em levedura (LIU et al., 2006).

### **4.10.2.2 O metabolismo de arsênio**

Uma vez que o arsênio entra nas células, uma série de passos de detoxificação é usada para reduzir os efeitos citotóxicos agudos do mesmo. O mecanismo mais compreendido de tolerância ao arsênio é codificado por três genes contíguos: *ARR1*, *ARR2* e *ARR3*. O *ARR1* codifica um fator de transcrição que regula a transcrição da arseniato redutase Arr2p e o transportador de efluxo de arsenito Arr3p (GHOSH et al., 1999). Após o arseniato ser transportado para o interior das células de leveduras, ele é

reduzido a arsenito pela arseniato redutase Arr2p (MUKHOPADHYAY et al., 2000). Entretanto, ao contrário da arseniato redutase bacteriana ArsC (um monômero de 141 resíduos), Arr2p é um homodímero de dois monômeros de 131 resíduos. Foi mostrado que o gene de levedura *ARR2* pode complementar uma linhagem de *E. coli* com uma deleção no gene *arsC* cromossômico (MUKHOPADHYAY et al., 2000). Além disso, a falha de *ARR2* em *S.cerevisiae* eliminou a resistência ao arseniato (MUKHOPADHYAY & ROSEN, 1998). Portanto, a resistência das células ao arsênio tem sido baseada na redução do acúmulo de As (III), uma vez que nenhum transportador de efluxo de As (V) foi encontrado até o momento. Até o presente momento, Arr2p é a única arseniato redutase descrita em eucariotos e mais especificamente nenhum gene *ARR2* foi encontrado na levedura *Schizosaccharomyces pombe* ou em outros fungos investigados.

#### 4.10.2.3 O seqüestro intracelular

Questiona-se porque as células reduzem arseniato a arsenito, o qual é mais reativo e pelo menos 100 vezes mais tóxico (KNOWLES & BENSON, 1983). A resposta é que devido a sua alta reatividade química, o arsenito pode ligar-se a muitas proteínas ou peptídeos quelantes intracelulares contendo grupos tióis, tais como glutathiona reduzida (GSH), fitoquelatinas (PC) e metalotioneínas (MT) formando complexos inativos (COBBETT & GOLDSBROUGH, 2002; SINGHAL et al., 1987; NGU et al., 2008). Guo e colaboradores demonstraram que a super-expressão do gene *GSH1* de *S.cerevisiae* que codifica a  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -ECS), a primeira enzima na via de biossíntese de GSH (FOYER & NOCTOR, 2005), elevou a tolerância e o acúmulo de arsênio em *Arabidopsis thaliana* (GUO et al., 2008). As MT pertencem a uma família de proteínas ricas em cisteínas com a habilidade única de formar grupos metal-tiolato estáveis com os seus dois domínios ricos em cisteína de ligação ao metal (MORRIS et al., 1999), e são os principais ligantes de metais presentes em animais. Embora as MT de ligação ao As tenham sido descritas na alga *Fucus vesiculosus*, nenhuma foi isolada em bactérias (MERRIFIELD et al., 2004). A super expressão das PC sintases de tabaco na levedura *S.cerevisiae* resultou na tolerância aumentada ao Cd e As (KIM et al., 2005) sem qualquer aumento no acúmulo.

Entretanto, Singh e colaboradores (2008) registraram o aumento de acúmulo de As (III) por *S. cerevisiae* recombinante expressando as PC sintases de *Arabidopsis thaliana*.

Outra via de detoxificação intracelular consiste na formação de sulfeto a partir de sulfato extracelular, sendo que o primeiro age como um doador de elétrons para redução de As (V) (ROCHETTE et al., 2000). Esta via foi descrita por Thomas & Surdinkerjan (1997) e está presente em *Candida glabrata*. Em alguns eucariotos, a incorporação de sulfeto para formar um complexo sulfeto-metal-PC de alto peso molecular mais estável no vacúolo, têm sido demonstrado (KNEER & ZENK, 1997; MENDOZA-COZATL & MORENO-SANCHEZ, 2005; MENDOZA-COZATL, 2006). Além disso, a formação de partículas de sulfeto de metal em *Schizosaccharomyces pombe* é também parte da detoxificação intracelular (DAMERON & WINGE, 1990; KRUMOV et al., 2007). Por outro lado, as fitoquelatinas (PC) são pequenos peptídeos ricos em cisteínas, amplamente encontrados em plantas e leveduras, e têm sido mostradas ligarem-se ao As (III) eficientemente (MAITANI et al., 1996; SCHMOGER et al., 2000; WUNSCHMANN et al., 2007).

#### **4.10.2.4 Resistência ao arsênio via transporte intracelular e extracelular**

*S. cerevisiae* tem dois mecanismos diferentes para reduzir a citotoxicidade ao arsenito. Um deles é por meio da bomba de efluxo de arsenito Arr3p, a qual transporta os complexos As(III)-GSH para fora da membrana citoplasmática. A super expressão de Arr3p na levedura resulta em tolerância ao As (III) (BOBROWICZ et al., 1997), enquanto a deleção de *ARR3* resulta na sensibilidade a ambos As (V) e As (III) (WYSOCKI et al., 1997; WYSOCKI et al., 2001; GHOSH et al., 1999). Já a proteína Ycf1p associada com a membrana vacuolar é um membro da superfamília de transportadores ABC que são responsáveis pelo transporte intracelular dependente de ATP de uma ampla gama de substratos conjugados a GSH (tal como, As(GS)<sub>3</sub>) para dentro do vacúolo. Ambos os mecanismos são essenciais para sobrevivência em altas concentrações de arsênio, assim a deleção do gene *YCF1* resulta em hipersensibilidade ao arsênio. Análises genéticas posteriores suportam a hipótese de que essas duas vias funcionam de maneira sinérgica ao mostrarem uma hipersensibilidade aditiva das células de leveduras ao arsênio em um mutante faltando ambos os genes. Enquanto *S.*

*cerevisiae* transporta o complexo GSH-As para dentro do vacúolo, *S.pombe* transporta os complexos de alto peso molecular PC-Cd-S para dentro do vacúolo via o transportador Hmt1 (ORTIZ et al., 1995).

#### **4.11 Capacidade de remoção de metais pesados e metalóides por leveduras e fungos filamentosos**

Os microrganismos possuem vários mecanismos para responder ao estresse por metais pesados, tais como: transporte através da membrana celular, biossorção na parede celular e aprisionamento em cápsulas extracelulares, precipitação e reações de complexação e oxi-redução (RAI et al., 1981; MACASKIE & DEAN, 1989; HUANG et al., 1990; AVERY & TOBIN, 1993; BRADY & DUNCAN, 1994; BRADY et al., 1994; KRAUTER et al., 1996; VEGLIO et al., 1997). Os microrganismos são capazes de incorporar metais pesados de soluções aquosas, especialmente quando as concentrações dos metais no efluente variam de menos do que um até cerca de 20 mg/L (BRIERLEY, 1990). Aliando-se a flexibilidade dos microrganismos para lidar com os vários parâmetros físico-químicos dos efluentes à seletividade dos mesmos para remover apenas os metais e metalóides desejados e o baixo custo desse processo, têm-se então, um método alternativo de biorremediação bastante vantajoso. Algumas interações físico-químicas podem estar indiretamente ligadas ao metabolismo, especialmente via síntese de constituintes celulares ou metabólitos que podem atuar como eficientes quelantes de metais, tais como: glutathiona, fitoquelatinas e metalotioneínas (VOLESKY & MAY-PHILLIPS, 1995).

As leveduras são capazes de acumular grandes quantidades de metais pesados a partir do meio aquoso (GADD, 1986). Entre elas, *S. cerevisiae* tem sido bastante utilizada em ensaios de biorremediação de metais pesados (WANG & CHEN, 2006) tais como, ensaios de biossorção de Cd (VASUDEVAN et al., 2003; GOKSUNGUR et al., 2005; GOMES et al., 2002; PARK et al., 2003) e do metalóide As (NGUYÊN-NHU & KNOOPS, 2002). A biomassa de fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Trichoderma* podem remover metais pesados de soluções aquosas, podendo ser utilizada viva ou morta na biossorção de íons metálicos (GADD, 1990). Os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium* e as leveduras *Saccharomycopsis lypolitica* e *S. cerevisiae* foram

utilizados em estudo de bioabsorção de metais pesados de soluções aquosas e apresentaram potencial para serem usados na descontaminação de efluentes contendo metais pesados (MIHOVA & GODJEVARGOVA, 2000). Lo e colaboradores (1999), em um estudo utilizando a biomassa de uma linhagem do fungo filamentosso *Mucor rouxii*, observaram a seletividade dessa biomassa para a bioabsorção de  $Pb^{2+}$  na presença de outros íons como  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  mostrando potencial para remoção de  $Pb^{2+}$  de efluentes contaminados. Pokherl & Viraraghavan (2006) utilizaram biomassa não viável de *A. niger* coberta com óxido de ferro para avaliar seu potencial na remoção de arsênio a partir de soluções aquosas esta biomassa apresentou remoção máxima de aproximadamente 95% de As (V) e 75% de As (III) em pH 6,0. As capacidades de remoção de cádmio por fungos filamentosos, isolados de solos contaminados em La Plata na Argentina, foram avaliadas para as seguintes espécies: *A. terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* spp., *Talaromyces helicus* e *Trichoderma koningii*. Segundo os autores, os fungos avaliados nesse trabalho poderiam ser utilizados como biorremediadores para melhorar a desintoxicação de Cd de ambientes contaminados (MASSACCESI et al., 2002). Donmez & Aksu (2001) utilizaram *Candida* spp. para remoção de Ni de efluentes. Os autores observaram que o processo de remoção do metal foi influenciado pela concentração inicial do metal na solução e também pelo pH da mesma. Karna e colaboradores (1996) observaram em um estudo utilizando *Neurospora crassa* para remoção de Co da solução que o meio de cultura utilizado para crescimento prévio do fungo influenciou na capacidade de remoção do metal.

Para fungos e leveduras, a toxicidade dos metais pesados modifica a atividade biológica de componentes celulares como ácidos nucleicos, enzimas, aminoácidos e lipídeos (BRENNAN & SCHIESTL, 1996; ROMANDINI et al, 1992). Os íons metálicos podem ter efeitos tóxicos quando se acumulam em níveis extremamente altos. Os excessos de Fe e Cu podem gerar espécies reativas de oxigênio que degradam macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos. Os metais podem também inibir processos bioquímicos competindo com outros íons pelo sítio ativo das enzimas, transportadores intracelulares e outros ligantes de importância biológica (ALBERTINI, 1999; ASSMANN et al, 1996; SILVA, 2001).

Outra característica importante que confere a algumas leveduras e fungos filamentosos potencial para uso na biorremediação é a capacidade de desenvolverem-se

em condições adversas, como baixos e altos valores de pH, baixas temperaturas, pressões extremas, baixa umidade e alta salinidade (RASPOR & ZUPAN, 2006).

A utilização do potencial biotecnológico da tecnologia de bioissorção para remoção de metais ou metalóides depende da eficiência da regeneração do bioissorvente após a dessorção do metal ou metalóide. Portanto, a recuperação do metal ou metalóide a partir da biomassa por agentes que sejam baratos e que não destruam a biomassa para que possa ser reutilizada em novos ciclos de bioissorção é essencial. Às vezes a eluição seletiva do metal é desejável e pode ser alcançada pela compreensão do mecanismo de seqüestro do metal. Observou-se que para os íons de metais ou metalóides que apresentam uma grande dependência de pH para a ligação à biomassa, a dessorção dos íons ligados pode ser feita por meio de ajuste de pH (GUPTA et al., 2000).

#### **4.12 Diversidades de leveduras e fungos filamentosos em ambientes contaminados com metais e metalóides**

A diversidade metabólica dos microrganismos torna-os capazes de sobreviver em quase todos ambientes tais como: sedimentos e corpos d' água contaminados com metais pesados, regiões polares, fossas marinhas e regiões de clima árido dentre outros. Os microrganismos afetam a mobilidade nos solos e corpos d' água dos metais pesados por meio de reações de oxidação e redução realizadas pelos mesmos (LOVLEY, 2001).

Estudos recentes mostram que linhagens de leveduras e fungos filamentosos isoladas de solos e efluentes contaminados apresentam capacidades excelentes de remover quantidades significativas de metais pesados e metalóides de águas superficiais, subterrâneas e efluentes industriais. Neste contexto, o estudo da diversidade de leveduras e fungos filamentosos torna-se relevante pela possibilidade de encontrar espécies novas presentes nesses ambientes e de seus potenciais biotecnológicos (MALIK, 2004).

Investigações no Rio Tinto, localizado na Espanha, que apresenta alta contaminação com metais pesados e metalóides (As, Cu, Cr, Zn) e alta acidez, revelaram uma diversidade de microrganismos eucariotos que superou a dos microrganismos procariotos (ZETTLER et al., 2002). Entre os eucariotos, os fungos parecem desempenhar um papel importante em ambientes com baixo pH, pois junto com outros microrganismos eles são capazes de formar biofilmes na superfície de

substratos como as rochas. Os biofilmes são sítios de precipitação de metais e minerais e fornecem um substrato para outras populações microbianas (GONZÁLEZ-TORIL et al., 2003). Os fungos apresentam resistência aos metais e podem sequestrá-los especificamente (DÚRAN et al., 1999). Tais propriedades são importantes para o ecossistema inteiro, pois o sequestro de metais pode permitir a sobrevivência e proliferação de espécies menos tolerantes. Além disso, mostrou-se que a oxidação do íon ferroso feita por *Thiobacillus ferrooxidans* foi estimulada pela levedura basidiomicética *Rhodotorula mucilaginosa* (FOURNIER et al., 1999). A diversidade de microeucariotos em São Domingos, em uma mina abandonada localizada em Portugal, também dentro do Cinturão Ibérico de Pirita como a região do rio Tinto na Espanha (GADANHO & SAMPAIO, 2006). Descobriu-se que várias espécies microbianas presentes no Rio Tinto, estavam também presentes em São Domingos, sugerindo que algumas espécies desenvolveram adaptações para meio acídicos contendo altas concentrações de metais pesados (GADANHO et al., 2006).

As leveduras são definidas como fungos pertencentes aos filos Ascomycota ou Basidiomycota que geralmente apresentam o brotamento ou fissão como meio de reprodução assexuada, e que apresentam estágios sexuais não fechados em corpos de frutificação (Kurtzman et al., 2011). O crescimento unicelular é bem adequado para explorar substratos líquidos ou para crescer em habitats com alta umidade. A ubiquidade de leveduras é demonstrada pelo seu isolamento de vários meios, como solo, água (marinha ou doce), filoplanos ou outros habitats associados a plantas e animais (LACHANCE & STARMER, 1998). Entretanto, estudos sobre a ocorrência de leveduras em ambientes extremos são escassos. Os registros disponíveis citam psicrófilos (NAKAGAWA et al., 2004), ambientes abissais de oceanos (NAGAHAMA et al., 2001), fossas hidrotérmicas (GADANHO & SAMPAIO, 2005) e nos meios aquáticos hiperacídicos do Rio Tinto (LÓPEZ et al., 2001; 2004) e de São Domingos (GADANHO & SAMPAIO, 2006).

As leveduras freqüentemente tornam-se os microrganismos predominantes em corpos d'água contaminados com metais pesados (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1981). *Candida* spp. foram isoladas de efluentes de siderúrgicas e de sedimentos acídicos de minas (SUIHKO & HOEKSTRA, 1999; LOPEZ-ARCHILLA et al., 2004).

#### 4.13 Imobilização de células microbianas

As leveduras e os fungos filamentosos imobilizados têm-se mostrado como ótimos ligantes de metais ou metalóides presentes em águas industriais, devido ao maior poder de adesão conferida às células (FRY & MELHORN, 1994; WANG & CHEN, 2006). A imobilização de material biológico é um método alternativo de tratamento de águas residuais, aplicado em conjunto com métodos convencionais para tratamento de água contaminada com metais pesados (COSTA & FRANÇA, 1996). Todos esses sistemas de células imobilizadas constam da utilização de substratos baratos e obtiveram bons resultados na produção de enzimas, devido à facilidade de manuseio e baixo custo para as indústrias, sobretudo quando comparados aos sistemas que utilizam células livres (COSTA & FRANÇA, 1996). Segundo Hartmeier (1988), existem seis métodos de imobilização aplicados para células viáveis ou não, enzimas ou organelas, que são: adsorção, ligação iônica, ligação covalente com e sem espaçamento, ligação cruzada, confinamento em membrana e por encapsulamento numa matriz polimérica. Estes métodos podem ser combinados entre si, originando novas técnicas.

No método de adsorção, as células são ligadas diretamente ao suporte a partir de forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio, com pouca alteração da estrutura celular (KOLOT, 1981). Uma das limitações deste método é a ocorrência de dessorção das células do suporte durante o processo de lavagem e operação. A ligação cruzada é outro método de imobilização onde ocorrem ligações intermoleculares entre as células microbianas ou destas ao suporte, com o auxílio de um agente reticulante formando uma rede polimérica insolúvel; geralmente é utilizado o glutaraldeído. Nos métodos de encapsulamento e confinamento em membrana, as células ficam presas nos interstícios de um gel ou encapsuladas por uma membrana semipermeável, respectivamente, minimizando a perda de células. Uma das limitações deste método é que a difusão do substrato para o interior das células é prejudicada, devido à barreira física do gel.

As matrizes de suporte utilizadas para a imobilização de células podem ser orgânicas ou inorgânicas (KOLOT, 1981). Dentre as orgânicas, as mais utilizadas são: alginato, k- carrageno, pectina, ágar, celulose (polissacarídeos); colágeno e gelatina (proteínas); e resinas fenólicas, poliestireno, poliácridamida, cloreto de polivinila e resinas de troca iônica (polímeros sintéticos). As inorgânicas mais utilizadas são: alumina, sílica, vidro, zircônia e aço inoxidável. Outros suportes também utilizados são



os óxidos de titânio, cerâmica monolítica (GHOMMIDH, 1982), fibras de polipropileno, serragem, zeólitas, celite, bagaço, fragmentos de madeira e palha (KOLOT, 1981), argila montmorilonita, crisotila e vermiculita (ZEROUAL et al., 2001).

A escolha do suporte a ser empregado na imobilização de células viáveis deve seguir alguns critérios básicos, quais sejam: atoxidade, não exercer influência negativa no metabolismo celular, elevada capacidade de retenção microbiana, ser química e bioquimicamente inerte, conferir estabilidade na temperatura e pH de operação, alta difusão de reagentes e produtos, resistência mecânica adequada às necessidades do processo, facilidade de conformação em tamanho e formas específicas, possibilidade de regeneração e baixo custo (GHOMMIDH, 1982; HARTMEIER, 1988).

Vários benefícios têm sido sugeridos para o uso de células imobilizadas (CASSIDY E TREVORS, 1996; DWYER et al., 1986). São eles: aumento da estabilidade e atividade metabólica; proteção dos efeitos adversos de fatores bióticos (predadores) e abióticos (pH, temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e presença de substâncias tóxicas); maior viabilidade celular, permitindo o estoque prolongado dos inoculantes e a produção em grande quantidade; facilidade de contenção das células microbianas em caso de acidente; possibilidade reduzida de contaminação do inoculante durante o estoque, transporte e aplicação quando comparado a células livres. Por outro lado, a tecnologia de imobilização pode apresentar algumas limitações. Em algumas situações, a difusão de gases e solutos para o interior das cápsulas pode ser restringida (GUISELEY, 1989); alterações morfológicas e/ou metabólicas das células microbianas podem ter efeitos deletérios ao processo catalítico (KEWELOH et al., 1989, SHREVE E VOGEL, 1993); as células microbianas podem não estabelecer colônias fora das cápsulas, requerendo repetidas aplicações do inoculante; e as células podem ter a sua taxa de crescimento no interior das cápsulas alterada (BABU et al., 1992).

Uma das matrizes que têm sido usadas para bio-sorção de metais por ambas as células vivas ou mortas por meio do aprisionamento das mesmas na matriz insolúvel é o alginato de cálcio. Colunas de leito fixo de células de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* imobilizadas em Ca-alginato foram usadas com sucesso para recuperar ouro de soluções contendo  $\text{AuCl}_4$  e outros sais (BEVERIDGE, 1985).

A utilização de células imobilizadas por encapsulamento em polímeros naturais, tais como o alginato e k-carrageno, apresenta características que facilitam a introdução e estabelecimento do microrganismo no ambiente poluído. McLoughlin (1994) sugeriu que o micro ambiente fornecido pelas cápsulas pode inicialmente proteger as células das flutuações das condições ambientais externas. Isto pode aumentar a sobrevivência e atividade metabólica das células por períodos prolongados, sendo os microrganismos liberados lentamente das cápsulas após a adaptação às condições do novo ambiente. A incorporação de argilas, nutrientes e gomas nas cápsulas pode aumentar a resistência mecânica das cápsulas e a sobrevivência dos microrganismos encapsulados (JUNG et al., 1982; ENGLAND et al., 1993).

#### **4.14 As esferas macroporosas de alumina ativada**

A alumina ativada é outro adsorvente que apresenta grande afinidade por vários poluentes orgânicos e inorgânicos e pode ser facilmente regenerada e reutilizada. Registrou-se que a alumina ativada foi eficiente na remoção de As (V) (CHAKRABOTTI et al., 1999; SINGH et al., 2001).

Segundo Singh e Pant (2004) a alumina ativada é um adsorvente adequado para remoção de As (III) a partir da água potável. Em um estudo realizado por estes autores a adsorção foi influenciada pelo pH, tempo de contato e a quantidade de alumina ativada utilizada. Um máximo de 96,2% de remoção de As (III) foi encontrado em pH 7,6. Os resultados desse trabalho sugerem que a remoção de As (III) por meio de alumina ativada é um processo complexo, no qual a adsorção de superfície e difusão do íon do metalóide no interior das partículas influenciaram na velocidade de remoção de As (III); além disso o processo de adsorção foi espontâneo e diminuiu com o aumento de temperatura, o que mostrou a natureza exotérmica da adsorção. Considerando estas características, a alumina tem sido utilizada na confecção de esferas, as quais podem ser utilizadas na remoção de metais diretamente, ou após a incorporação de células microbianas.

As esferas macroporosas de alumina ativada usadas neste trabalho são uma mistura de hidróxido de alumínio com alumina de transição. O hidróxido de alumínio é, normalmente, denominado como óxido hidratado de alumínio,  $Al_2O_3 \cdot xH_2O$ . Ele contém teores variados de água em sua rede estrutural que dependem das suas condições de

síntese como pH e temperatura. Estes óxidos hidratados podem conter uma molécula de água na forma de  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , denominada bohemita ou na forma de  $\beta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , denominada diáspora e três moléculas de água nas formas de  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , denominada hidrargilita ou gibbisita;  $\beta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , denominada bayerita; e nova  $\beta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , denominada nordstrandita. Estes óxidos hidratados podem ser obtidos a partir da precipitação química de sais de alumínio e de aluminatos alcalinos em condições de temperatura que inibam o crescimento das partículas hidratadas, de modo a preservar sua característica coloidal na forma de gel. As partículas coloidais do gel de alumina são altamente hidrofílicas, característica esta que favorece a difusão de cátions de metais pesados até os sítios ativos (SENT et al., 2002).

Quando o gel de alumina sofre tratamento térmico em temperaturas crescentes, mas inferiores a 1.200 °C, ele perde a água estrutural e assume modificações estruturais que passam a ser denominadas de alumina de transição. Neste trabalho, obtiveram-se predominantemente a alumina de transição  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . As partículas ultrafinas desta alumina de transição possuem elevada superfície específica de 100 a 300 m<sup>2</sup>/g. Esta alumina tem elevada capacidade de reidratação sem destruir seu arranjo estrutural de rede original e sem mostrar nenhum inchamento (FREITAS, 2006).

A mistura de um gel de alumina com alumina de transição apresenta, portanto, uma fina estrutura de poros que facilita a difusão de íons metálicos até os sítios ativos (KIRK & OTHMER, 1967); elevada hidrofiliabilidade causada pela natureza polar da superfície da alumina que, também, facilita a difusão de íons metálicos até os sítios ativos (KIRK & OTHMER, 1963) e uma composição química que torna o adsorvente capaz de adsorver seletivamente metais pesados, já que ele possui os grupos funcionais Al-OH, denominados aluminóis, em sua superfície, os quais podem reagir tanto com meios ácidos quanto com meios básicos, embora a carga superficial da alumina seja positiva (YABE & OLIVEIRA, 2003; KOSMULSKI, 1996). Outra vantagem é a presença dos grupos funcionais Al-OH na superfície da partícula de alumina, que propicia a formação de complexos com os metais pesados sem depender da presença de outros ânions complexantes (YABE & OLIVEIRA, 2003; KOSMULSKI, 1996; SEN et al., 2002). Está bem estabelecido que a adsorção de íons metálicos em solução aquosa pela alumina é controlada pelo acesso aos grupos funcionais aluminóis ou a outros grupos funcionais adicionados intencionalmente à superfície da alumina e pelo valor de

pH da solução (YABE & OLIVEIRA, 2003; KOSMULSKI, 1996; SEN et al., 2002; ARIAS et al., 2002).

As esferas macroporosas de alumina ativada podem ser usadas na forma gel, logo após a precipitação em meio amoniacal e sucessivas lavagens com água destilada. Além disso, as esferas macroporosas de alumina ativada podem ser calcinadas em diferentes temperaturas, o que permite a formação de diferentes porosidades nas mesmas com diferentes características como resistência à fratura, densidade, volume total de poros e superfície específica.

Outra vantagem das esferas macroporosas de alumina ativada é a existência de macroporos na superfície e interior das mesmas que possibilita a imobilização de microrganismos, como as leveduras. Uma vez imobilizadas, as leveduras podem ser empacotadas em colunas de leito fixo e mais facilmente manuseadas, além é claro de apresentarem sítios ativos adicionais aos presentes nas esferas, os quais podem ter efeito aditivo na adsorção de metais pesados e metalóides.

#### **4.15 Parâmetros importantes e influentes na capacidade de captura de metais pesados e metalóides pelo adsorvente**

A adsorção ocorre quando colocamos em contato um adsorvente e uma solução aquosa contendo, como adsorvatos, íons ou moléculas de metais pesados ou metalóides. Tal fenômeno é dependente de gradientes de concentrações de metais pesados ou metalóides e da facilidade de difusão destes dentro do adsorvente (FREITAS et al., 2006).

Portanto, a extensão da adsorção de um adsorvato em um adsorvente, sob condições específicas, é característica de cada sistema adsorvente-adsorvato. Estas condições específicas são: a temperatura, a concentração de metais ou metalóides, o valor de pH, os tipos de ânions e cátions presentes, o tamanho de partícula do adsorvente, a acessibilidade aos poros, a força iônica, os íons competidores pelos sítios de ligação ao adsorvente, a agitação do sistema adsorvente-fluído e a forma de montagem do sistema de adsorção em batelada, em colunas de leito fixo ou em colunas de leito fluidizado (FREITAS et al., 2006).

#### **4.15.1 Formação de complexos no sistema adsorvente-adsorvato**

A difusão do adsorvato através da rede de microporos do adsorvente até os sítios ativos depende do tamanho e forma do íon ou molécula do adsorvato. Isto significa que se deve ter condições de pH, temperatura e concentrações de íons, dentre outras, apropriadas para ter formas complexadas dos adsorvatos que facilitem o seu acesso aos sítios ativos. Assim, formas complexadas dos adsorvatos são importantes na solubilidade das mesmas, mas também no tamanho e formato do complexo resultante, já que elas difundem através da rede de microporos do adsorvente até os sítios ativos (FREITAS, 2006).

Os termos complexos de esfera interna e complexos de esfera externa são usados para distinguir a natureza da ligação adsorvato-adsorvente, se predominantemente covalente (complexos de esfera interna, característicos de metais da primeira e segunda série de transição) ou eletrostática (complexos de esfera externa). Os ligantes com natureza covalente atuam em uma posição imediatamente adjacente ao cátion metálico. Nos ligantes com natureza eletrostática, os íons de carga oposta são atraídos e aproximam-se uns dos outros até uma distância crítica, formando efetivamente um par de íons. Em complexos de esfera externa, o íon metálico ou os ligantes ou ambos geralmente retêm suas águas de coordenação quando o complexo é formado, isto é, o íon metálico e o ligante são mais frequentemente separados por uma ou mais moléculas de água (AHMED et al., 1998; DAVIS et al., 2003; PADILHA et al., 2005; COTTON & WILKINSON et al., 1980; BUTTLER, 1964).

#### **4.15.2 Influência do valor de pH na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato**

O pH da solução do metal ou metalóide (adsorvato) é de extrema importância no processo de adsorção, pois é ele que define o tipo de espécies químicas presentes. Por exemplo, complexos metálicos de As (III) ou As (V), variam em tamanho podendo obstruir, total ou parcialmente, a microporosidade do adsorvente, o que refletiria na

capacidade total de adsorção de cada uma destas espécies químicas, assim como diminuiria suas afinidades pelos sítios ativos nos adsorventes (FREITAS et al., 2006).

Outro efeito do valor de pH é a promoção da ionização dos sítios ativos no adsorvente, a qual pode ter efeito na atração ou repulsão dos íons presentes na fase aquosa. O valor de pH influencia a eluição (dessorção) do metal pesado ou metalóide. Neste caso, é importante aumentar o pH de modo a favorecer a competição dos íons  $\text{OH}^-$  com os íons As (V) adsorvidos, o que favorece o retorno dos ânions do metalóide à solução aquosa (FREITAS, 2006).

#### **4.15.3 Influência da concentração de metais pesados ou metalóides na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato**

A força promotora de ligação de íons  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^-$  e dos íons metálicos presentes numa solução aquosa a um sítio ativo é a diferença de concentração de um íon em relação ao outro (MATHEICAL et al., 1999; CRUZ, 2004). Isto significa que a determinação da afinidade e a competitividade de um cátion ou ânion de metalóide em relação a outro pelos sítios ativos do adsorvente demanda que ambos estejam distribuídos de modo equimolar na solução aquosa ou que a concentração de um aumente em relação à do outro ou que o perfil de adsorção seja feito para cada íon individualmente (no qual se considera a influência da relação tamanho do íon aquoso versus acesso aos sítios ativos), nas mesmas condições experimentais (temperatura, pH), de modo a avaliar a máxima capacidade de adsorção deste íon particular com o aumento da concentração de metal ou metalóide na solução aquosa (FREITAS, 2006).

#### **4.15.4 Influência da temperatura na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato**

A temperatura do meio de adsorção pode ser importante para mecanismos dependentes de energia. A maioria dos mecanismos envolvidos em adsorção são processos exotérmicos, nos quais um aumento de temperatura pode diminuir a capacidade adsortiva. Considera-se, no entanto, que sendo o processo exotérmico ou

endotérmico, um aumento de temperatura pode favorecer um deslocamento das moléculas de água dos aqua-íons, diminuindo o seu raio de hidratação, o que favorece a difusão deste aqua-íon, viabilizando a sua captura por sítios ativos antes indisponíveis e, com isto, aumentando a capacidade de captura de metais pesados ou metalóides pelo adsorvente (INGLEZAKIS et al., 2004; EL-KAMASH et al., 2005). Constatou-se, no entanto, que a capacidade adsorptiva parece não ser afetada na faixa de temperatura entre 20 °C e 35 °C (FREITAS, 2006).

#### **4.15.5 Influência da força iônica na capacidade adsorptiva do sistema adsorvente-adsorvato**

A presença de altas concentrações do eletrólito fosfato num meio aquoso, contendo íons As (V), gera alta força iônica, o que reduz a captura do metalóide pelo adsorvente. Assim, a mudança da força iônica influencia a adsorção no mínimo de duas maneiras: por afetar o potencial interfacial e, portanto, a atividade dos íons do eletrólito e da adsorção e por afetar a competição dos íons do eletrólito e ânions de adsorção pelos sítios de adsorção disponíveis. O fosfato não será ligado covalentemente e, portanto, não competirá diretamente com a ligação covalente do metalóide pelo adsorvente. Logo, o efeito da força iônica pode ser explicado como resultado da competição de íons fosfato com os íons As (V) por ligações eletrostáticas ao adsorvente (FREITAS, 2006).

Em processos reais, diferentes espécies de sais estão misturadas num efluente aquoso, aumentando a sua resistência iônica. Em alta força iônica, sítios de adsorção são circundados por íons de carga contrária, no qual eles perdem parcialmente, sua carga, e isto enfraquece a força de ligação por uma interação eletrostática. Assim, este efeito pode tornar o mecanismo de troca iônica inativo entre o íon do metal ou do metalóide e os sítios ativos do adsorvente (JEON et al., 2005; FIOL et al., 2006; MATHEICKAL et al., 1999).

#### **4.15.6 Influência do tamanho de partícula do adsorvente na capacidade adsortiva do sistema adsorvente-adsorvato**

O processo de adsorção tem sua eficiência aumentada quando as partículas do adsorvente com o menor tamanho possível são aglomeradas preferencialmente de forma esférica, sendo facilmente acessadas pelos íons de metal pesado ou metalóide, para permitir o máximo de adsorção em seus sítios ativos. Acrescenta-se a isto, a necessidade de inibir a lixiviação de constituintes importantes destas partículas que possam diminuir a capacidade adsortiva das partículas adsorventes por meio da perda de sítios ativos nestes constituintes ou por meio do bloqueio de poros entre as partículas, causado por tais constituintes. Este fato inibe a difusão de metais pesados e metalóides até os sítios ativos remanescentes na partícula adsorvente (FREITAS, 2006).



## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo Geral**

Estudar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos presentes em corpos d'água na região do Córrego da Mina (Nova Lima/MG) e usar leveduras selecionadas tolerantes ao arsênio como biossorbentes na forma de células livres e imobilizadas em esferas macroporosas de alumina ativada.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Produzir esferas macroporosas de alumina gama ativada;
- Caracterizar as esferas produzidas quanto à resistência mecânica, porosidade e distribuição de tamanho de poros, fases presentes e presença de grupos funcionais;
- Realizar estudos de adsorção de arsênio usando as esferas macroporosas de alumina gama ativada;
- Isolar, identificar e analisar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos presentes nas amostras de água contaminadas com arsênio;
- Verificar a influência da exposição às concentrações crescentes de As (V) sobre o crescimento de leveduras e fungos filamentosos;
- Avaliar a influência de As (V) nos níveis de resíduos sulfrílicos totais das leveduras selecionadas;
- Imobilizar as leveduras selecionadas em esferas macroporosas de alumina ativada e determinar a eficiência de remoção de arsênio.

## **6. Materiais e Métodos**

### **6.1 Isolamento e identificação de leveduras e fungos filamentosos da região do Córrego da Mina**

#### **6.1.1 Amostragem**

Três amostras de água foram coletadas em cada um dos três pontos na região do Córrego da Mina em Nova Lima-MG, sendo dois destes dentro do sistema de tratamento de rejeitos da mineradora AngloGold Ashanti. O ponto 1 foi denominado de lagoa de contenção de rejeitos Cucuruto, o ponto 2 foi denominado lago final do sistema de tratamento e o ponto 3 foi denominado Córrego da Mina. As amostras de água foram coletadas por trimestre durante o período de um ano, perfazendo um total de 36 amostras, sendo que a primeira coleta foi realizada em julho de 2007, a segunda em outubro de 2007, a terceira em fevereiro de 2008 e a quarta em maio de 2008. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras – ICB/UFMG e processadas em um período máximo de 24h após a coleta. As amostras também foram caracterizadas quanto ao pH e às concentrações de arsênio (As) total, por meio de espectroscopia de absorção atômica.

#### **6.1.2 Isolamento de leveduras e fungos filamentosos**

Uma alíquota de 0,1 mL das amostras de água foi plaqueada em triplicata no meio ágar extrato de malte – YMA (peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, glicose 1,0% e ágar 2,0%), adicionado de 200 mg/L de cloranfenicol. Paralelamente, amostras de água de 1 e 10 mL foram filtradas em triplicata em membranas estéreis de 0,45 µm com auxílio de uma bomba de vácuo. As membranas foram colocadas na superfície do meio de cultura ágar extrato de malte – YMA, acrescido de 200 mg/L de cloranfenicol. As placas foram incubadas em aerobiose por até sete dias a 28 °C. Os diferentes isolados de leveduras foram contados, purificados, codificados sequencialmente e preservados em criotubos (1,5 mL) contendo caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 0,3% e fosfato monobásico de potássio 0,01%) adicionado de glicerol estéril na concentração final de 15% (v/v). Os diferentes isolados de fungos filamentosos foram contados, purificados e codificados sequencialmente. Todos os diferentes isolados de fungos filamentosos foram armazenados em água destilada estéril (CASTELLANI, 1967) e mantidos por

repiques sucessivos em ágar fubá a 4 °C, os isolados de fungos filamentosos também foram preservados em criotubos (1,5 mL) contendo caldo YM (peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, glicose 1,0%) adicionado de glicerol estéril na concentração final de 15% (v/v). Os criotubos foram armazenados a -80 °C na Coleção de Microrganismos e Células do ICB-UFMG. A quantificação dos diferentes isolados de leveduras e fungos filamentosos foi expressa em unidades formadoras de colônia por litro (UFC/L) da amostra de água analisada.

## **6.2 Identificação das leveduras por métodos dependentes de cultivo**

A identificação das leveduras isoladas foi realizada com base em critérios morfológicos e testes fisiológicos, com auxílio das chaves presentes em Kurtzman e colaboradores (2011). A seguir foi realizada PCR *fingerprinting* para agrupamento dos isolados por perfil de bandejamento, segundo Silva-Filho et al. (2005), seguida de sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S rRNA de representantes de cada grupo segundo Kurtzman & Robnett (1998). A extração de DNA dos isolados foi realizada segundo o protocolo descrito por De Barros Lopes et al. (1996). Para tanto, uma colônia isolada de cada cultura pura, cultivada em ágar YM por 24h a 28 °C foi suspensa em 100 µL de Triton X-100 0,7% (v/v) (Sigma) e aquecida a 100 °C por 10 min. As suspensões contendo o DNA foram armazenadas a -20 °C.

### **6.2.1 Amplificação pela PCR *fingerprinting* com uso do iniciador (GTG)<sub>5</sub>**

Os grupos de leveduras formados com base em critérios morfológicos e testes fisiológicos foram submetidos a PCR *fingerprinting* para agrupamento por perfil de bandejamento utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão 10X, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada), 1 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> a 10 pmol/µL (MWG Biotech), 1 a 5 µL do DNA (50-500 ng), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) e água deionizada estéril q.s.p 25 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos,

seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94° C, 45 segundos de anelamento do iniciador a 55° C e 90 segundos de extensão a 72° C, e uma extensão final por 10 minutos a 72° C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5X, durante aproximadamente 1 hora a 100 V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,01 v/v), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, France).

### **6.2.2 Amplificação pela PCR da região D1/D2 do gene 26S rRNA**

A partir das leveduras que apresentaram perfis moleculares distintos, um isolado foi selecionado para o seqüenciamento da região D1/D2 do gene 26S rRNA utilizando os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), segundo Lachance et al. (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR High fidelity 10X, 2 µL de MgSO<sub>4</sub> 50mM, 2 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada), 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol/µL (MWG Biotech), 1 a 5 µL do DNA (50-500 ng), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) (Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) e água DPEC q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95° C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94° C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54° C e 20 segundos de extensão a 68° C, e uma extensão final por 10 minutos a 68° C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X, durante aproximadamente 1 hora a 120 V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,01 v/v), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, France).

### **6.3 Identificação dos fungos filamentosos por métodos dependentes de cultivo**

A identificação dos isolados de fungos filamentosos foi realizada por meio de seqüenciamento das regiões espaçadoras intergênicas ITS1 e ITS2 e do gene 5.8S do

rRNA. Os fungos foram cultivados por sete dias em placas de Petri, contendo ágar Sabouraud. A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por De Hoog et al. (2003). Pequenos fragmentos de micélio do fungo foram colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL acrescido de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%) e mantido a – 20 °C por 10 min. O micélio foi então triturado com o auxílio de um pistilo e foram acrescentados 5 µL de proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi mantido por 30 min a 60 °C em banho maria. Após essa etapa, foi adicionado 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização, sendo o tubo incubado por 10 min a 65 °C. A seguir, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (v/v). Após homogeneização, o tubo foi mantido por 30 min em gelo. Em seguida, foi realizada centrifugação a 13.400 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL sendo acrescentado 10% do volume de acetato de sódio 3M. O tubo foi cuidadosamente invertido para homogeneização e incubado em gelo por 30 min. A seguir, nova centrifugação a 13.400 rpm foi realizada por 10 min foi realizada. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo adicionado 50% do volume de isopropanol. Foi realizada uma centrifugação a 13.400 rpm por 5 min e o sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado para lavar a parede do tubo. Novamente foi realizada centrifugação a 13.400 rpm por 5 min e o sobrenadante foi desprezado. Após o tubo secar por aproximadamente 30 min foram adicionados 100 µL de TE (Tris-HCl 0,01M e EDTA 0,001 M pH 8,0). As amostras foram armazenadas em freezer – 20 °C. Os iniciadores ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação pela PCR da região ITS do rDNA, conforme descrito por White et al. (1990).

#### **6.4 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento**

Os produtos de PCR foram purificados por meio da técnica com polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M e deixado em banho-maria à 37° c por 15

minutos. O tubo foi então centrifugado a 13.400 rpm por 15 minutos e o sobrenadante retirado e descartado com auxílio de micropipeta. A seguir, foram adicionados 125 µl de etanol 70-80% gelado, o tubo centrifugado a 13.400 rpm por dois minutos e o etanol retirado com auxílio da micropipeta. Este último passo foi repetido mais uma vez. Uma nova centrifugação a 13.400 rpm por um segundo foi realizada (spin down) e o tubo deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Adicionou-se 10 µl de água e o conteúdo do tubo foi homogeneizado em “vortex” por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37°C por 10 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As reações de sequenciamento foram realizadas usando o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM – UFMG).

### **6.5 Análise *in silico* das sequências**

As sequências parciais obtidas em formato ESD foram compactadas em formato ZIP, enviadas e analisadas pelo programa PHRED (EWING & GREEN, 1998) disponível em: <http://helix.biomol.unb.br/phph/>. As sequências com valor de qualidade maior que 20 e com tamanho superior a 200 pares de bases foram selecionadas para busca por similaridade utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology (ALTSCHUL et al., 1997). Para o alinhamento das sequências nucleotídicas foi utilizado o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

### **6.6 Análises de diversidade**

A diversidade de espécies de leveduras e fungos filamentosos nas coletas foram medidas em termos de riqueza e de diversidade pelo índice de Shannon-Wiener: (1) Shannon-Wiener  $H' = -\sum (ni/n) \ln (ni/n)$ , nos quais  $ni$  é o número de indivíduos da

espécie  $i$  e  $n$  é o número total de indivíduos. Todos os resultados foram obtidos com intervalo de confiança de 95% e valores de re-amostragem (*bootstrap*) foram calculados a partir de 1.000 interações. A riqueza de espécies refere-se ao número de espécies na comunidade e o índice de diversidade de Shannon-Wiener avalaia não apenas a riqueza, mas também a representatividade das espécies na comunidade. A abundância relativa de espécies refere-se ao percentual de densidade de uma determinada espécie em relação a densidade total de espécies em uma coleta ou ponto amostrado. Os cálculos dos índices foram feitos usando o programa PAST, versão 1.90 (RYAN et al., 1995).

### **6.7 Ensaio de tolerâncias de leveduras ao As (V) em meio líquido**

Para o preparo do inóculo, as leveduras foram crescidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, foram pré-incubadas a uma temperatura de 28°C, 160 rpm, por um período de 24h em caldo YM (peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0% e extrato de malte 0,3%). Após esta etapa, foi feita a leitura da densidade óptica (D.O.) a 600 nm a partir de três alíquotas de 1 mL retiradas dos frascos Erlenmeyer, para determinação da D.O. média. Em seguida, o meio foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em meio mínimo mineral líquido em tubos de microcentrífuga, de forma a obter a D.O. de 0,03 e volume final de 1 mL (3,4 g/L de  $K_2HPO_4$ ; 4,3 g/L de  $KH_2PO_4$ ; 0,5 g/L de NaCl; 0,5 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 3,0 g/L de  $NH_4NO_3$ ; 0,002 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,002 g/L de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 1,0 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,05 g/L de extrato de levedura e 5 mL de uma solução de elementos traços -1 mg/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,6 mg/L de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 2,6 mg/L  $CaCl_2 \cdot H_2O$ ; 6 mg/L de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) adicionado de concentrações crescentes de arsênio (0,10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 mM de As (V)). Após 48 h, foi feita a leitura da D.O. final em cada triplicata para cada concentração, este experimento foi repetido duas vezes.

### **6.8 Avaliações das viabilidades celulares das leveduras**

No início (tempo 0 h) e ao final (tempo 48h) do ensaio de tolerância foram retiradas três alíquotas de 10 µL dos tubos de microcentrífuga nas concentrações de 0,

50, 150 e 300 mM e adicionadas em meio ágar YM (peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato de malte 0,3% e ágar 2,0 %) por meio da técnica de migrogota (JETT et al., 1997) e incubadas a 28 °C por 48 h. Após este período as unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foram contadas.

## **6.9 Avaliações da influência de As (V) nos níveis de resíduos sulfidrílicos totais de leveduras selecionadas**

### **6.9.1 Preparo das amostras para dosagem de resíduos sulfidrílicos totais**

As células foram pré-incubadas a uma temperatura de 28°C, a 160 rpm por um período de 48 horas, em meio líquido YM. Após este período, o meio foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante descartado e as células transferidas para novo meio YM por um período de 24 horas. As células foram então incubadas em meio YM, na condição controle e acrescido das concentrações 1 e 5 mM de As (V) a 28°C e a 160 rpm, durante período de 24 horas, sendo coletadas por filtração a vácuo usando filtros de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro. O pellet foi removido do filtro com espátula e transferido para papel alumínio, congelado em nitrogênio líquido e estocados em freezer -20°C para as posteriores determinações experimentais.

### **6.9.2 Obtenção de extratos celulares**

Após a realização da incubação descrita no item 5.7, as células (condição controle e adicionadas de 1 e 5 mM de As (V)) foram ressuspendidas em tampão de lise (Tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), adicionando-se, a seguir, pérolas de vidro. O rompimento das células foi realizado por seis ciclos de 30 segundos de agitação vigorosa em vórtex, intercalados com períodos de repouso em gelo. Após a lise celular, centrifugou-se a suspensão a 3000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado nas dosagens de interesse.



### **6.9.3 Dosagem de proteínas**

O conteúdo protéico dos extratos brutos de cada amostra foi determinado de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma solução de soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

### **6.9.4 Resíduos sulfidrílicos totais**

Os resíduos sulfidrílicos totais foram determinados pelos métodos de Ellman (1959) e Davidson e colaboradores (2001), adaptado por Costa-Moreira (2007), usando 5-5'ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) - DTNB. Na presença do grupamento tiol livre, a solução de DTNB forma 5-tio-2-nitrobenzoato, produzindo uma coloração amarela característica que pode ser determinada espectrofotometricamente a 412 nm. Os extratos celulares foram preparados de acordo com o item 6.9.2. e a concentração de proteínas em cada extrato foi determinada de acordo com o item 6.9.3. As alíquotas de extratos celulares contendo 0,5 mg de proteína foram diluídas em 1 mL de tampão 0,1 M de fosfato de sódio com pH 7,0. Retiraram-se 200 µL de cada preparação de extrato diluído, aos quais foram adicionados 0,01 M de tampão fosfato de sódio, p.H. 8,0 e 7 µL de reagente Ellman (0,04 g de DTNB em tampão de fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0). A absorbância foi determinada a 412 nm após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. O coeficiente de extinção molar para o DTNB é 13.600/M.cm, sendo utilizado para determinar a concentração de resíduos sulfidrílicos totais. Os resultados foram expressos em micromoles de resíduos sulfidrílicos por miligrama de proteína (µmol/mg proteína).

### **6.10 Testes de tolerância de fungos filamentosos ao As (V) em meio sólido**

A partir de colônias dos isolados de fungos filamentosos crescidos previamente em ágar fubá (Hymedia) por sete dias a 28°C, foram retirados discos de 6,4 mm das extremidades dos micélios e adicionados em meio ágar YM acrescido de concentrações

crecentes de As (V) (0, 50, 150 e 300 mM), sendo um disco por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata a 28 °C durante sete dias. Após este período, os diâmetros foram medidos por meio de paquímetro digital (Mitutoyo), e os valores obtidos foram usados nos cálculos de médias, desvios padrão e percentuais de reduções de crescimentos, sendo estes últimos calculados por meio da seguinte fórmula:  $[(Dc) - (Dx - 6,4)] \times 100/Dc$ , na qual Dc (mm) é a média dos diâmetros das colônias das placas com 0 mM de As (V) e Dx (mm) é a média dos diâmetros das colônias das placas em uma das outras concentrações de As (V) (50, 150 e 300 mM).

## **6.11 Estudos de remoção de As utilizando células livres e imobilizadas em esferas macroporosas de alumina ativada com carvão**

### **6.11.1 Produção de esferas macroporosas de alumina ativada**

O método de fabricação de esferas macroporosas adsorventes foi baseado no processo de gelatinização externa. Por meio deste método, as micropartículas de alumina gama com ou sem partículas formadoras de macroporos (p.ex.: fuligem, pó de serra) são aglomeradas na forma esférica. As partículas sólidas previamente referidas são coladas com moléculas de álcool polivinílico (PVA) e nanopartículas de bohemita. Essas nanopartículas de bohemita são obtidas a partir de uma reação de transformação sol-gel aplicada à mistura feita com sol de alumina, micropartículas de alumina gama, PVA, etanol e opcionalmente com partículas do formador de macroporos (pó de serra de aglomerado do tipo MDF). Uma composição típica desta mistura é: 50g de alumina gama ativada; 92g de sol de alumina; 5g ou 0g de pó de serra; 48g de solução de PVA e 4g de etanol. A mistura resultante foi dispersa como gotas uniformes no ar antes de passar pelos meios de precipitação com amônia gasosa (NH<sub>3</sub>) e líquida (75% v/v de água + 25% v/v de solução de NH<sub>3</sub> mín. 25% p/p). A transformação sol-gel acontece à temperatura ambiente, primeiro na superfície da gota, ao passar pelo meio gasoso (NH<sub>3</sub>). Nesta passagem, é formada a película gelatinosa (constituída por hidróxido de alumínio, Al(OH)<sub>3</sub>=Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. xH<sub>2</sub>O, no qual x pode ter valores 1 e 3, gerando por exemplo bohemita, α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.1H<sub>2</sub>O ou gibbsita, α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O (GRAYSON, 1967) na superfície da gota, conferindo à ela elasticidade e resistência mecânica ao impacto na superfície do meio de precipitação líquido. A reação de transformação sol-gel continua no meio

líquido, no qual é agora controlada pelo gradiente de concentração de eletrólitos através da membrana gelatinosa formada. Tal gradiente pode ser responsável pela formação de esferas ocas ou com rachaduras, dependendo da concentração deste meio, do tempo de permanência no meio e das condições posteriores de tratamento (duração do envelhecimento, temperatura de envelhecimento, concentração do meio de envelhecimento, secagem e calcinação) das esferas géis (LIU et al., 1995). As esferas géis produzidas foram submetidas ao envelhecimento em meio amoniacal (95% v/v de água + 5% v/v de solução de  $\text{NH}_3$  mín. 25% p/p a  $90^\circ\text{C}/1\text{h}$ ) para aumentar a reidratação e colagem das micropartículas de alumina gama. Então, elas foram lavadas com solução amoniacal (solução de água 95% v/v + solução de  $\text{NH}_3$  min.25% p/p 5% v/v, seis lavagens, 15 min. para cada lavagem à temperatura ambiente) para eliminar nitrato de amônio (um subproduto da reação química na transformação sol-gel). As esferas géis resultantes foram tratadas termicamente nas seguintes condições: apenas secas ( $60^\circ\text{C}/\text{ar}/12\text{h}$ , sem e com MDF, respectivamente DS1 e DS2); secas e calcinadas sob atmosfera de argônio ( $600^\circ\text{C}/\text{Ar}/2\text{h}$ , sem e com MDF, respectivamente, CS1 e CS2); secas e calcinadas ( $600^\circ\text{C}/\text{Ar}/2\text{h}$ ) e então calcinadas ao ar ( $600^\circ\text{C}/\text{ar}/2\text{h}$ , sem e com MDF, respectivamente, CS3 e CS4). Adicionalmente, realizaram-se outras seguintes calcinações: CS3 calcinada a  $800^\circ\text{C}$ ,  $1100^\circ\text{C}$  e  $1250^\circ\text{C}/\text{ar}/2\text{h}$  resultando, respectivamente, nas esferas CS5, CS7 e CS9; CS4 calcinada a  $800^\circ\text{C}$ ,  $1100^\circ\text{C}$  e  $1250^\circ\text{C}/\text{ar}/2\text{h}$  resultando, respectivamente, nas esferas CS6, CS8 e CS10.

Foram feitas várias caracterizações nas esferas como esfericidade, resistência à fratura, densidade, distribuição e tamanho de poros, a fim de verificar características presentes em bons adsorventes. A influência da composição dos meios de precipitação na obtenção de esferas ocas foi estudada usando-se dois meios de precipitação PM1 e PM2. Os meios de precipitação PM1 e PM2 foram constituídos, respectivamente, de solução amoniacal concentrada (A)- água (W) e de solução amoniacal concentrada (A)- etanol (ET), com conteúdos crescentes de solução amoniacal concentrada (A) variando entre 1% v/v e 100% v/v. Produziram-se cinco tipos de esferas secas no meio de precipitação PM1, aos quais foram atribuídos os códigos PM1-1 a PM1-5. Essas esferas foram obtidas a partir da seguinte mistura: 50g de alumina gama-ativada; 50g de sol de alumina; 0 g de MDF, 20g de solução de PVA, 5 g de água, e 8 g de etanol. As esferas géis foram envelhecidas no meio de precipitação a temperatura ambiente ao ar por 12h. Então, elas foram envelhecidas em meio amoniacal (água 95% v/v + solução de  $\text{NH}_3$

min. 25% p/p a 5% v/v a 90°C por 1h), lavadas com solução amoniacal ( água 95% v/v + solução de NH<sub>3</sub> mín. 25% p/p a 5%, seis lavagens, 15 min. para cada lavagem a temperatura ambiente) e secas a 60°C/ar/12h.

Produziram-se 20 tipos de esferas secas nos meios de precipitação PM2A a PM2D, aos quais atribuíram-se os códigos PM2A-1 a PM2A-5, PM2B-1 a PM2B-5, PM2C-1 a PM2C-5 e PM2D-1 a PM2D-5. As esferas dos grupos PM2A a PM2C/PM2D foram ,respectivamente, obtidas a partir da seguinte mistura: 50/50g de alumina gama-ativada, 75/100g de sol de alumina, 0/5g de MDF, 20/40g de solução de PVA, 5/5g de água, 8/8g de etanol. As esferas géis foram envelhecidas no meio de precipitação a temperatura ambiente por 0,5h (PM2A e PM2B) e por 2,5h (PM2C e PM2D). Então, elas foram secas a 60°C/ar/12h, e apenas as esferas do PM2B provenientes das esferas do PM2A foram calcinadas a 600°C/air/2h.

As micropartículas do pó de alumina gama foram obtidas por meio de precipitação química à temperatura ambiente de uma solução aquosa de nitrato de alumínio com solução amoniacal concentrada. O gel precipitado resultante foi lavado duas vezes com água deionizada, por 30 min. a cada vez. O gel precipitado lavado foi seco a 150°C/ar/12h, em seguida moído manualmente e teve seus grânulos secos ativados a 400°C/ar/2h. Os grânulos de alumina ativados foram moídos com o auxílio de moinho de panela de aço (código AM1). Além disso, a amostra AM1 foi calcinada a 1250°C/ar/2h resultando na amostra de pó de alumina-alfa (AM2).

O sol de alumina concentrado (86g/L Al, pH entre 2 e 3), o qual originou as nanopartículas de bohemita previamente mencionadas foi preparado parcialmente por meio de neutralização química a quente de uma solução de nitrato de alumínio concentrado (sal de pureza analítica) com solução amoniacal (solução de NH<sub>3</sub> mín. 25%, pureza analítica).

A dissolução de partículas de PVA (Hoechst, tipo Mowiol 56-98) em água quente (95°C) resultou na solução de PVA concentrada (79g/L).

As micropartículas de pó de serra (MDF) foram coletadas na serraria do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). Elas foram peneiradas para determinar a faixa de tamanho e usadas sem qualquer tratamento adicional.

### 6.11.2 Caracterização das esferas macroporosas ocas de alumina ativada

Os pós e as diferentes esferas obtidas foram caracterizados quanto: às fases presentes, via difração de raios-X (difratômetro de raios-X, Rigaku, mod. Geigerflex, semi-automático, dispositivo monocromático formado por um cristal grafite, tubo de raios-X com radiação Cu K $\alpha$ ,  $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$  e uma bandeja de amostras giratória); aos sítios ativos presentes, via espectroscopia de absorção infravermelho (Bomem), modelo MB102, resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ , 64 amostras preparadas na forma de pastilhas KBr); à resistência à fratura (RF), por meio do teste de compressão de dez esferas com o auxílio do equipamento de tração-compressão Instron (modelo Floor-Model TT.DM); à distribuição de diâmetro (D) e esfericidade ( $D_{\text{menor}}/D_{\text{maior}}$ ), por meio de imagem do comparador óptico de 20 esferas em posições diametrais ortogonais; à presença de macroporosidade e estimativa da espessura da película formada nas esferas, via microscopia eletrônica de varredura (MEV, Jeol, model JFM 840A) das secções polidas das esferas embebidas na resina; área superficial específica ( $S_g$ ,  $\text{m}^2/\text{g}$ ) e porosidade ( $d_{\text{médio}}/d_{\text{máximo}}$ ), via método BET (Quantachrome, mod. Nova1000, gás nitrogênio). A distribuição de tamanho de poros foi obtida de acordo com o método Barret-Joyner-Halenda (BJH) (Barett et al., 1951) a partir da curva de dessorção; densidade ( $\rho$ ,  $\text{g}/\text{cm}^3$ ), determinada pela razão massa/volume; composição elementar qualitativa, via EDS (espectrometria de dispersão de energia, Jeol, model JXA 8900 RL).

### 6.11.3 Ensaio de remoção de Cd, Cu, Zn e As pelas esferas macroporosas de alumina ativada

Os testes de adsorção foram realizados em frascos de polietileno de 250 ml. Dentro destes frascos foram colocados 100 ml de solução de íons metálicos ( $\text{Cd}^{2+}$ , via  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , via  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ , via  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )(Vetec) ou metalóide ( $\text{As}^{3+}$ , via  $\text{NaAsO}_2$ ) (Merck), no qual também foram adicionados cerca de 1,0 g de sólido (pós adsorventes ou esferas adsorventes), obtendo-se uma relação de sólidos (S) / líquido (L), S / L, de cerca de 10 g / L. Os frascos de plástico contendo a solução de metal ou metalóide e o adsorvente foram agitados (cerca de 100 ciclos / min) em um banho termostático tipo Dubnoff a  $30^\circ \text{C}$  por 6 h. O valor de pH foi mantido no

intervalo de 4 a 5 por meio de adição de solução de HNO<sub>3</sub> (1 mol/L) ou NaOH (1 mol/L), e o valor de pH foi medido através de um pHmetro convencional. Após 6 h de adsorção, o conteúdo dos frascos foi filtrado. A solução filtrada foi acondicionada em frascos de polietileno, e acidificada com solução de HNO<sub>3</sub> concentrado até atingir pH ≤ 2,0, as concentrações (inicial C<sub>i</sub> e final C<sub>f</sub>, ambas em mg / L) das soluções utilizadas nos experimentos de adsorção foram determinadas com o auxílio de espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Spectrometer, Aanalyst modelo 200 - Perkin Elmer, Versão 6.0, equipado com gerador de hidretos). A eficiência de remoção, RE (%) (Bhattacharya et al.,2006) e a capacidade adsortiva, q (mg / g) ou (mmol / g) (da Silva et al., 2002), foram calculadas, respectivamente, pelas equações:

$$(1) \quad RE (\%) = [(C_i - C_f) / C_i] \times 100;$$

$$(2) \quad q (\text{mg} / \text{g}) = [(C_i - C_f) / m] \times V;$$

nas quais C<sub>i</sub> e C<sub>f</sub>, em mg / L, são, respectivamente, as concentrações do metal ou metalóide presentes na solução antes e após a adsorção no sólido adsorvente; m é a massa em gramas, (g), do sólido adsorvente e V é o volume em litros, (L), da solução contendo metal ou metalóide utilizado no processo de adsorção. Os valores de ER (%) e q (ml / g) ou (mmol / g) são valores médios obtidos dos testes de adsorção realizados em duplicata.

#### **6.11.4 Produção e caracterização de esferas macroporosas de alumina com carvão ativado**

As esferas macroporosas de alumina ativada com carvão ativado foram produzidas pela mesma rota de síntese descrita no item 6.9.1, porém com um teor de 20% de carvão na fase sólida. Estas foram também caracterizadas pelos mesmos métodos descritos no item 6.9.2.

O carvão ativado foi introduzido na produção das esferas visando melhorar a distribuição, homogeneidade e conectividade dos poros, o que facilitaria a imobilização da levedura selecionada. As esferas foram usadas na forma gel e secas para os experimentos de adsorção e imobilização.

## **6.12 Imobilizações das leveduras em esferas macroporosas de alumina com carvão ativado**

Os pré-inóculos dos isolados das leveduras *A.strictum* L6-3, *Candida* sp. L5-1, *H. uvarum* L2, *C. oleophila* L16-3 e *R. toruloides* L56-1 foram preparados crescendo as leveduras em meio YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1,0% glicose) por 48h a 28 °C sob agitação a 180 rpm. Para promover a imobilização de *R. toruloides* L56-1 nas esferas gel de alumina ativada com carvão ativado e de todas as leveduras selecionadas nas esferas secas de alumina ativada com carvão, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm e as células lavadas e depois ressuspensas em 30 mL de meio YM com a D.O. ajustada para 2,0, este valor de D.O. foi padronizado previamente sendo correspondente a aproximadamente  $10^8$  UFC/L. Os frascos foram acrescidos de 0,3 g de esferas e incubados por 96 h a 28 °C sob agitação branda de 70 rpm. Após este período, as esferas foram removidas e analisadas quanto ao crescimento da levedura na superfície externa e interna. Eletromicrografias de microesferas secas à temperatura ambiente, inteiras e seccionadas, devidamente metalizadas com ouro, foram obtidas com auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL). Para quantificação das biomassas imobilizadas, as esferas secas a 70 °C, com e sem biomassa, foram colocadas nos porta-amostras circulares do espectrômetro e recobertas com um filme plástico e analisadas via espectrometria de dispersão de energia (EDX) (Shimadzu, modelo 900 HS), os resultados foram obtidos por meio de balanço de massas.

## **6.13 Ensaios de remoção com células de leveduras livres e imobilizadas em esferas macroporosas de alumina com carvão ativado**

Os ensaios de remoção foram feitos com as esferas gel, as secas, as gel imobilizadas com células de *R.toruloides* L56-1, as secas imobilizadas com células de *R.toruloides* L56-1 ou com cada uma das seguintes leveduras: *A.strictum* L6-3, *Candida* sp. L5-1, *H. uvarum* L2, *C. oleophila* L16-3 e com as células livres de *R.toruloides* L56-1. Os mesmos foram feitos em triplicata em frascos Erlenmeyer contendo 30 mL de solução de As (V) na concentração de 970 mg/L. A cada frasco foi adicionado 0,3 g de esferas de alumina ativada contendo carvão ativado, 0,5 g (0,3 g de esferas acrescidos

de 0,2 g de células) de esferas contendo células imobilizadas ou 5 mL de meio YM inoculado com a levedura *R. toruloides* L56-1 com a D.O. ajustada para 2.0; após a adição das massas de esferas ou volumes o pH foi ajustado para 4. Após 48 h a 28°C sob agitação a 100 rpm, o sobrenadante de cada frasco foi filtrado por meio de papel Whatman nº 4, acondicionado em tubos de centrifuga de 50 mL e mantido a 4 °C até ser analisado. Após 24 h das amostras serem filtradas, foram retiradas alíquotas dos mesmos para análise da concentração final de As (V) (mg/L) total via espectroscopia de absorção atômica.



## 7. Resultados e Discussão

### 7.1 Caracterizações das esferas macroporosas de alumina ativada

O pó de serra utilizado neste estudo é principalmente constituído com mais de 90% de MDF. Tipicamente o aglomerado MDF é formado por pó de vários tipos de madeira, no qual as partículas foram aglomeradas com uma quantidade substancial de resina e prensada na forma de lâmina.

A Tabela 1 apresenta os dados de caracterização dos pós e das esferas de alumina. As partículas de MDF apresentaram um diâmetro apropriado (177  $\mu\text{m}$ ) que pode gerar macroporos entre as micropartículas de alumina gama coladas (38  $\mu\text{m}$ ). A presença de MDF influenciou as características das esferas adsorventes: redução do diâmetro em 13-18%; praticamente não afeta a esfericidade; pequeno aumento da densidade ( $\leq 9\%$ ); aumento da resistência mecânica em 14% nas esferas secas e diminuição em até aproximadamente 32% nas esferas calcinadas e obstrução da microporosidade das micropartículas de alumina gama fazendo sua área de superfície cair de 268 nas micropartículas de alumina gama (AM1) para 257  $\text{m}^2/\text{g}$  nas esferas secas com MDF (DS2).

É conveniente lembrar que tanto o MDF quanto o PVA são transformados em carbono durante a calcinação a 600°C/Ar/2h, o qual é completamente eliminado a uma temperatura maior que 600°C/ar/2h. Nestas situações, a transformação e a perda de carbono levam a uma queda sistemática na área superficial específica das esferas sem/com MDF, respectivamente (de 266/257 para 121/121  $\text{m}^2/\text{g}$ ) e um aumento na porosidade total (de 0,27/0,24 para 0,36/0,34) até alcançar 800°C/ar/2h. Após os aumentos de temperatura superiores a 800°C/ar/2h, observou-se um processo de sinterização com densificação, com drástica redução de volumes de poros total (de 0,36/0,34 para 0,01/0,02) e da área superficial específica ( de 121/121 para 7/11  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Em parte, estas situações também foram observadas por Fajardo et al. ao caracterizarem esferas mesoporosas de alumina.

A leitura dos dados da Tabela 1 mostra que o processo de aglomeração das micropartículas de alumina gama ativada preserva suas principais características, a estrutura de poros, como será visto em maiores detalhes, posteriormente, com o auxílio de isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio. Além disso, este confere as esferas

um grande diâmetro acima de 2 mm, alta esfericidade ( $\geq 0,94$ ), alta resistência mecânica ( $\geq 0,68$  kgf/esfera) e baixa densidade ( $\leq 0,71$  g/cm<sup>3</sup>), os quais tornam as esferas adsorventes apropriadas para serem usadas em reatores de coluna de leito fixo.

A Figura 1 apresenta isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio para as amostras de pó de  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (AM1, Fig. 1a) e de esferas de alumina (DS1-DS2/CS1-CS10, Fig. 1b-g).

A Fig. 1a mostra uma isoterma do tipo II praticamente sem um circuito de histerese. A ausência de histerese não significa ausência de porosidade, uma vez que algumas formas de poros podem resultar em processos similares de adsorção e dessorção. Neste caso específico, a ausência de histerese significa uma baixa dispersão de tamanho de poros (ALLEN, 1999). Esta baixa dispersão mencionada é o resultado da aglomeração de partículas coloidais de alumina (representadas aqui por Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. x H<sub>2</sub>O, na faixa de tamanho de até 1000 Å) durante o processo de transformação sol-gel e o tratamento térmico desta  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, de acordo com o mecanismo de geração de partículas múltiplas com diferentes tamanhos, separadas por tamanhos de poros distintos, como explicado na teoria fractal (ONODA et al., 1986).

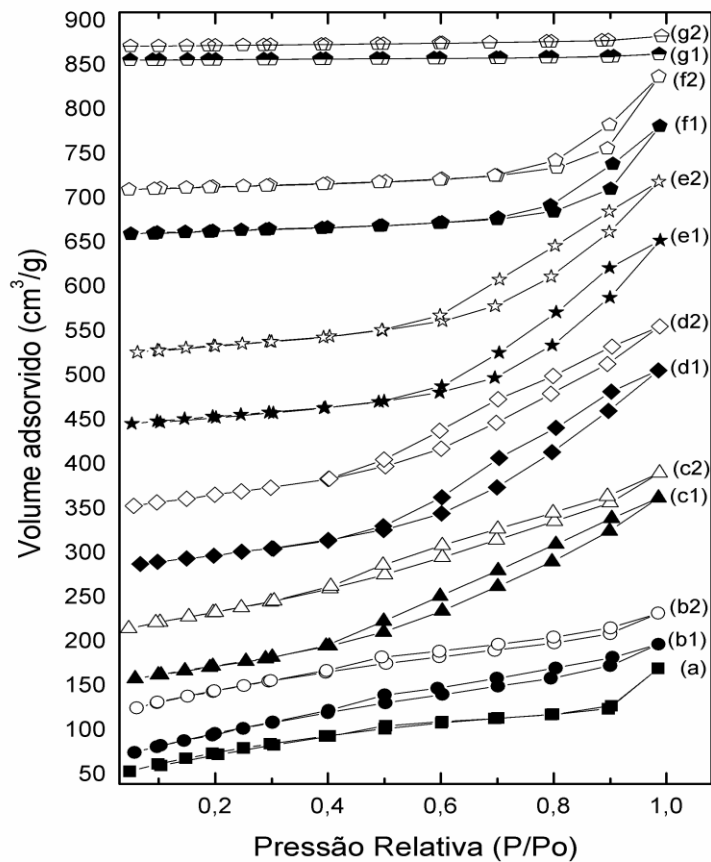
**Tabela 1 - Dada de caracterização dos pós e das esferas de alumina**

<b>Código<sup>a</sup></b>	<b>D<sup>b</sup></b> (mm)	<b>Dmenor/ D<sub>maior</sub><sup>c</sup></b>	<b>ρ</b> (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>d</sup>	<b>RF</b> (kgf/esfera)	<b>S<sub>g</sub></b> (m <sup>2</sup> /g)	<b>dmédio/ d<sub>máximo</sub> (Å)</b>	<b>V<sub>P</sub></b> (cm <sup>3</sup> /g)
<b>MDF</b>	≤177x10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	-	-
<b>AM1</b>	≤38x10 <sup>-3</sup>	-	-	-	268	39.22/773.10	0.26
<b>DS1</b>	3.30±0.17	0.94±0.05	0.60±0.01	2.98±0.73	266	39.90/780.09	0.27
<b>CS1</b>	3.17±0.22	0.96±0.05	0.53±0.01	1.26±0.15	213	71.72/783.17	0.38
<b>CS3</b>	3.13±0.19	0.94±0.04	0.50±0.01	1.11±0.25	174	90.67/787.02	0.40
<b>CS5</b>	3.21±0.15	0.94±0.03	0.49±0.01	1.91±0.55	121	118.14/1729.48	0.36
<b>CS7</b>	3.08±0.12	0.94±0.03	0.53±0.02	0.85±0.08	48	168.32/1640.91	0.20
<b>CS9</b>	2.85±0.12	0.94±0.04	0.65±0.03	3.22±0.79	7	70.59/1528.81	0.01
<b>DS2</b>	2.71±0.07	0.97±0.02	0.65±0.01	3.53±1.06	257	37.79/768.58	0.24
<b>CS2</b>	2.61±0.06	0.96±0.03	0.57±0.01	1.22±0.45	237	57.55/874.17	0.34
<b>CS4</b>	2.71±0.21	0.95±0.06	0.52±0.01	0.97±0.35	185	80.34/923.51	0.37
<b>CS6</b>	2.64±0.04	0.98±0.01	0.53±0.03	1.32±0.32	121	111.66/1450.17	0.34
<b>CS8</b>	2.56±0.06	0.97±0.02	0.56±0.01	0.68±0.09	47	179.71/1442.93	0.21
<b>CS10</b>	2.40±0.06	0.96±0.02	0.71±0.02	2.75±0.43	11	77.03/2351.90	0.02

<sup>a</sup> Códigos: MDF= micropartículas de pó de serra; AM1= micropartículas de alumina calcinadas a 400 °C/ar/2 h; DS1 e DS2= esferas secas, sem e com MDF respectivamente; CS1 e CS2= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h), sem e com MDF, respectivamente; CS3 e CS4= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h) e então calcinadas ao ar (600 °C/ar/2 h), sem e com MDF respectivamente; CS5 e CS6= CS3 e CS4, calcinadas ao ar a 800 °C/ar/2 h, respectivamente; CS7 e CS8= CS3 e CS4, calcinadas ao ar a 1100 °C/ar/2 h respectivamente, e; CS9 e CS10= CS3 e CS4, calcinadas ao ar a 1250 °C/ar/2 h, respectivamente

<sup>c</sup> V<sub>P</sub>: volume total de poros

A Fig. 1b-f mostra a isoterma tipo IV que é típica de sólidos mesoporosos e macroporosos, nos quais o processo de evaporação é diferente do processo de condensação, portanto resultando em “loops” de histerese. Nota-se um aumento do fenômeno de histerese, o qual é típico de sistemas com grande dispersão de tamanhos de poros. Neste caso, o aumento da dispersão de tamanhos de poros é produzido pela introdução de partículas de  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  ( $\leq 38 \mu\text{m}$ ) e partículas grossas de MDF ( $\leq 177 \mu\text{m}$ ) de acordo com o mecanismo de formação de poros explicado na teoria fractal (ONODA et al., 1986; ALLEN, 1999). Este aumento da dispersão dos tamanhos de poros é também promovido pelo aumento da temperatura de calcinação, o qual causa: decomposição e/ou eliminação de produtos voláteis, tais como: água, etanol, PVA e MDF presentes no pó de alumina e esferas (ALMEIDA et al., 2006; FAJARDO et al., 2005); a mudança de fase e reestruturação da alumina, na qual é importante destacar que nossa síntese do gel de alumina é feita em  $\text{pH} > 10$  favorecendo a obtenção de fases de baixa



**Figura 1 - Isothermas de adsorção-dessorção das amostras** (a) AM1= micropartículas de alumina calcinadas a 400 °C/ar/2 h; (b1) DS1 e (b2) DS2= esferas secas , respectivamente, sem e com MDF; (c1) CS1 e (c2) CS2= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h), respectivamente,sem e com MDF; (d1) CS3 e (d2) CS4= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h) e então calcinadas ao ar (600 °C/ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; (e1) CS5 e (e2) CS6= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 800 °C/ar/2 h; (f1) CS7 e (f2) CS8= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1100 °C/ar/2 h, e; (g1) CS9 e (g2) CS10= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1250 °C/ar/2 h.

cristalinidade e também cristalinas com uma molécula de água (bohemita) e três moléculas de água (por exemplo, bayerita), na qual as transições de fases são:

$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3 \Rightarrow \delta\text{-Al}_2\text{O}_3 \Rightarrow \alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (no caso da bohemita) e  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3 \Rightarrow \theta\text{-Al}_2\text{O}_3 \Rightarrow \alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (no caso da bayerita) ; e sinterização de aglomerados (Fig. 1f e g) como consequência da conglocação de microporos por mesoporos e de mesoporos por macroporos resultando em redução total da porosidade.

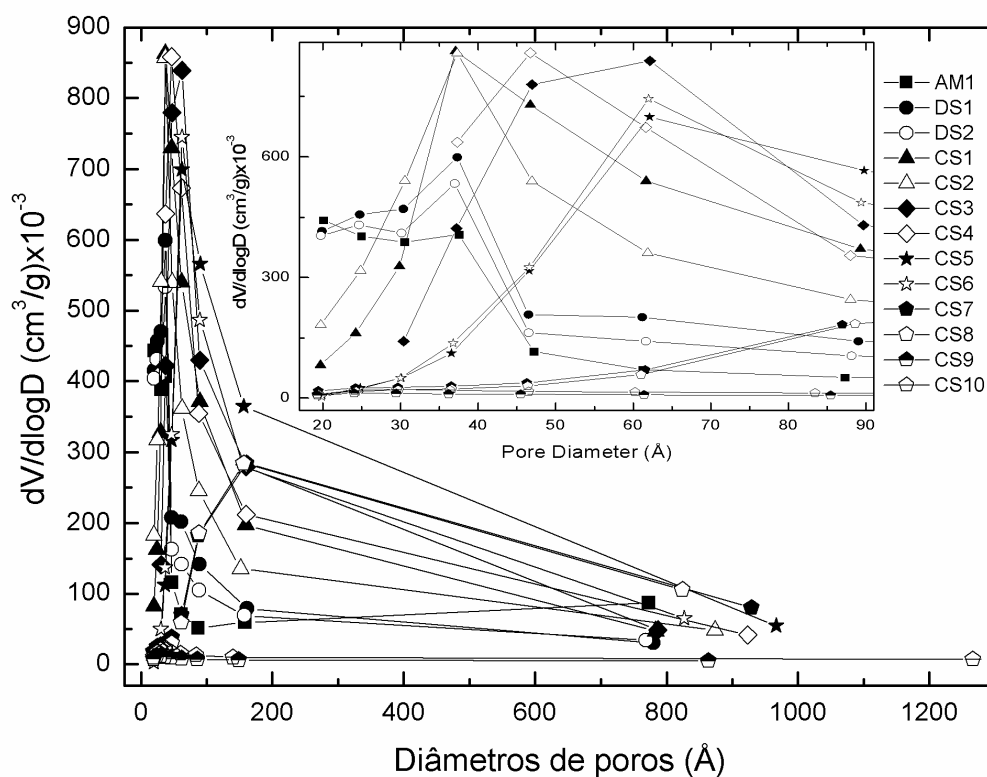
O melhor exemplo do processo de sinterização é dado pela isoterma da Fig. 1g, a qual tem as características de isotermas do tipo II representativas neste caso de sólidos adsorventes não porosos.

A Fig. 2 mostra a distribuição de tamanhos de poros obtida pelo método BJH para amostras de pó de  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  (AM1) e esferas de alumina (DS1-DS2/CS1-CS10). Nesta figura, o quadro mostra uma escala de amplificação da faixa de diâmetro de poros entre 20 e 90 Å. Esta figura também mostra símbolos abertos e fechados representando, amostras com e sem MDF respectivamente. As curvas do pó de alumina gama e das esferas secas mostram distribuição estreita de tamanho de poros, centrada em  $\approx 38$  Å (ver tamanho médio de poros na Tabela 1), o qual prova a natureza mesoporosa desses materiais e não difere da alumina mesoporosa reportada por Liu et al. (2007). Pode-se confirmar na Tabela 1, que a calcinação das esferas aumenta a distribuição de tamanho de poros, resultando na obtenção de valores de tamanhos médios de poros maiores até a calcinação de 1100°C. A temperatura de calcinação a 1250°C claramente fecha a maioria dos poros abertos na superfície das partículas constituintes das esferas como confirmado pela já citada acentuada queda dos valores de área de superfície.

O processo de aglomeração referido, também preserva outras características. Como pode ser visto na Fig. 3, o material obtido é composto principalmente de fases de muito baixa cristalinidade, além de fases cristalinas identificáveis nas micropartículas de alumina ativada,  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  e  $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , as quais também predominam nas esferas secas (Fig. 3b e Fig. 3c) e entre outras fases de alumina de transição elas continuam a existir nas esferas calcinadas até 800°C (Fig. 3d-i). Nas esferas calcinadas a 1100°C, as únicas fases presentes são  $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (principalmente) e  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . A transformação de fases completa acontece a 1250°C com a obtenção da fase cristalina de  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Esta via de transformação de fases é similar àquela reportada por Kirk e Othmer (45). A existência

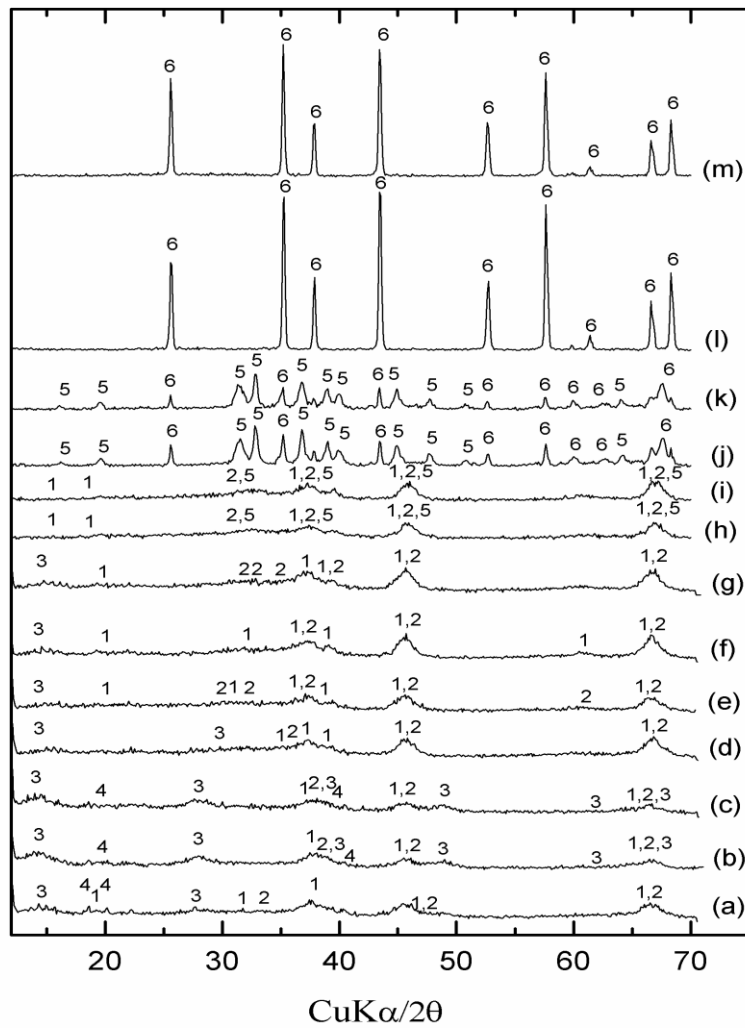
de macroporos pode ser notada na superfície de esferas secas sem e com MDF mesmo após a calcinação. Nos aumentos feitos na superfície das esferas secas sem e com MDF, nota-se que as micropartículas de alumina gama ativada foram coladas e preservaram seu tamanho original ( $\leq 38 \mu\text{m}$ ). Nesses aumentos podem-se medir os macroporos (representados por trincas, contornos de micropartículas de alumina gama ativada e outros defeitos de colagem) gerados e encontrar valores da ordem de  $10.000 \text{ \AA}$ .

Esta macroporosidade é muito mais alta dentro das esferas secas sem (Fig. 4) e com (figura não mostrada) MDF e está preservada nas esferas calcinadas. Este tipo de macroporosidade é devido à diferença na velocidade de gelatinização da mistura presente na superfície e no interior da gota esférica original (LIU & WILCOX, 1995), como será melhor mostrado posteriormente nos resultados sobre a influência da composição do meio de precipitação na formação de esferas ocas. A esfera resultante tem, portanto, uma rede de microporos, mesoporos e macroporos conectando a superfície ao centro. A existência deste tipo de rede de porosidade explica o significativo decréscimo de resistência à fratura nas esferas calcinadas. Esta rede de porosidade conectada é desejada e pode favorecer o acesso (INGLEZAKIS et al., 2004; SANCHEZ et al., 1983) de metais pesados tais como Cd, Cu, Zn e metalóides tais como As aos sítios ativos das micropartículas de alumina presentes no centro da esfera, como será demonstrada posteriormente com os resultados dos testes de adsorção preliminares que foram feitos nos pós e esferas de alumina adsorventes. A Fig. 3, com uma inserção mostrando a ampliação do espectro infravermelho das amostras calcinadas em temperaturas superiores a  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  mostra o espectro infravermelho do pó de alumina AM1 (Fig. 3) e das esferas DS1-DS2/CS1-CS10 sem MDF (Fig. 3 b,d,f,h,j,l) e com MDF (Fig. 3 c,e,g,i,k,m). Particularmente, nas amostras calcinadas em temperaturas abaixo de  $800^\circ\text{C}$ , podem-se identificar seis picos representativos. De acordo com Socrates (1997), os picos 1 e 3,  $3.100\text{-}3.600 \text{ cm}^{-1}$  e  $\approx 1.650 \text{ cm}^{-1}$ , mostram as vibrações de estiramento O-H da água cristalizada tanto quanto as vibrações de estiramento O-H resultantes de uma ligação química intramolecular da alumina produzida; o pico 2,  $\approx 2.350 \text{ cm}^{-1}$ , é típico de pico espúrio resultante de uma contaminação de  $\text{CO}_2$  presente no ar ambiente; o pico 4,  $1340\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ , mostra a existência de uma decomposição incompleta do nitrato inorgânico presente no processo de obtenção das esferas; o pico 5,  $1050\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ , sugere uma contaminação com sílica; o pico 6,  $490\text{-}850 \text{ cm}^{-1}$ , revela a presença de



**Figura 2 - Distribuição de tamanho de poros das amostras de pós e esferas pelo método BJH** AM1= micropartículas de alumina calcinadas a 400 °C/ar/2 h; DS1 e DS2= esferas secas, respectivamente, sem e com MDF; CS1 e CS2= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; CS3 e CS4= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h) e então calcinadas ao ar (600 °C/ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; CS5 e CS6= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 800 °C/ar/2 h; CS7 e CS8= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1100 °C/ar/2 h, e; CS9 e CS10= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1250 °C/ar/2 h. Símbolos abertos e fechados para as amostras sem e com MDF, respectivamente.

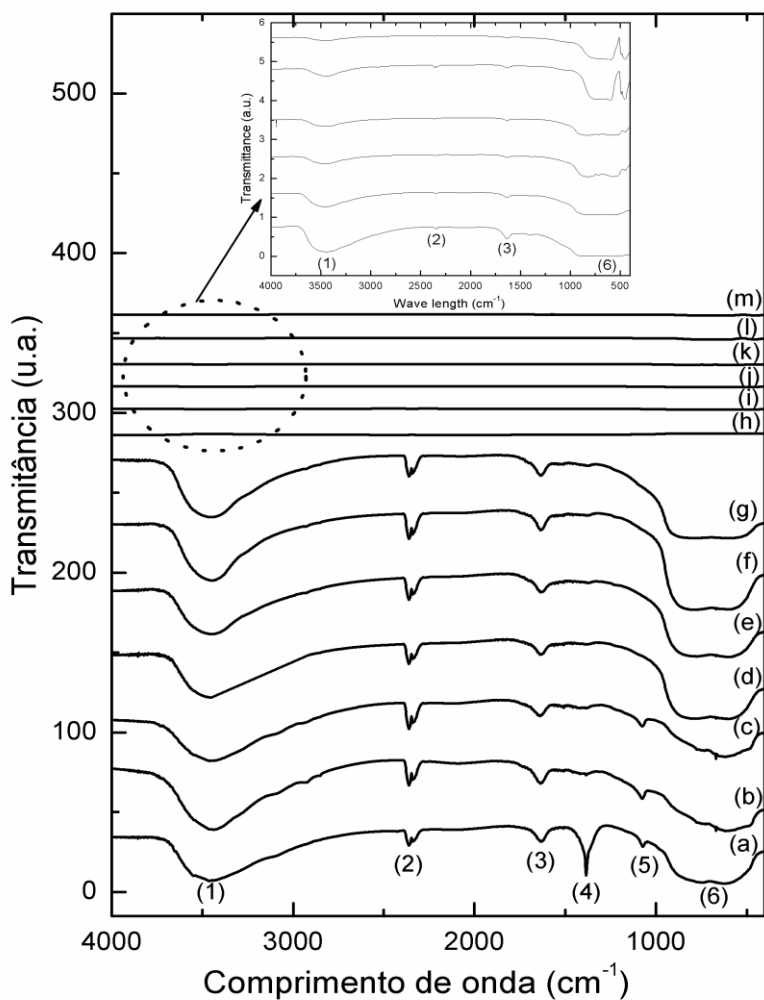




**Figura 3 Padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras** (a) AM1= micropartículas de alumina calcinadas a 400 °C/ar/2 h; (b) DS1 e (c) DS2= esferas secas , respectivamente, sem e com MDF; (d) CS1 e (e) CS2= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; (f) CS3 e (g) CS4= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h) e então calcinadas ao ar (600 °C/ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; (h)CS5 e (i) CS6= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 800 °C/ar/2 h; (j) CS7 e (k) CS8= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1100 °C/ar/2 h, e; (l) CS9 e (m) CS10= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1250 °C/ar/2 h. 1,  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 2,  $\delta$ - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 3,  $\alpha$ - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. 1H<sub>2</sub>O; 4,  $\beta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.3 H<sub>2</sub>O; 5,  $\theta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 6,  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



**Figura 4 Eletromicrografia da secção polida da esfera mostrando a macroporosidade dentro do núcleo das esferas de alumina gama secas sem MDF**



**Figura 5 Espectros infravermelho (IV) das amostras** (a) AM1= micropartículas de alumina calcinadas a 400 °C/ar/2 h; (b) DS1 e (c) DS2= esferas secas , respectivamente, sem e com MDF; (d) CS1 e (e) CS2= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; (f) CS3 e (g) CS4= esferas calcinadas (600 °C/Ar/2 h) e então calcinadas ao ar (600 °C/ar/2 h), respectivamente, sem e com MDF; (h)CS5 e (i) CS6= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 800 °C/ar/2 h; (j) CS7 e (k) CS8= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1100 °C/ar/2 h, e; (l) CS9 e (m) CS10= CS3 e CS4, respectivamente, calcinadas ao ar a 1250 °C/ar/2 h.

vibrações de estiramento Al-O. Estas vibrações de estiramento Al-O são normalmente representadas por  $\equiv\text{Al-OH}$  caracterizando o sítio de alumina ativada, o qual é responsável pela captura e ligação química, por exemplo de Cd (KOSMULSKI, 1996) durante o processo de adsorção.

A análise qualitativa da composição elementar via EDS do pó de alumina gama e das esferas secas e calcinadas mostra os picos característicos de alumínio e oxigênio. A presença significativa de carbono é apenas detectada nas amostras tratadas até 600°C/ar/2h. Os traços do elemento fósforo estão presentes em amostras de pó da alumina gama. Nas esferas com MDF, foi detectada a presença de Si, Mg e Ca.

A Tabela 2 resume os dados de caracterização das esferas no meio de precipitação PM1. As esferas géis do meio de precipitação 1% v/v A-99% v/v W permaneceram intactas até serem depositadas no recipiente plástico no qual foram acumuladas e as camadas de esferas começaram a aumentar. Neste momento, começaram a desintegrar na forma de partículas gelatinosas devido à baixa resistência mecânica da fina película gelatinosa formada na superfície da gota. Também foi observada uma erupção de um jato gelatinoso localizado em um ponto da superfície da gota logo que a mesma penetra no meio de precipitação. Esta erupção é consequência do desbalanço osmótico entre a solução coloidal presente na mistura dentro da gota e o meio de precipitação, numa perfeita combinação com o modelo de interdifusão de meios, responsável pelo aumento da espessura da película gelatinosa inicialmente formada, como descrito por Liu e Wilcox (1995). O meio de precipitação 5% v/v A-95% v/v W tornou possível que as esferas sobrevivam, aparentemente com um núcleo descolado, o qual parece ser formado por partículas coladas firmemente que foram parcialmente ou totalmente eliminadas durante o processo de embutimento, lixamento e polimento. No caso das esferas nesse meio de precipitação, nota-se o começo de uma formação localizada de sulcos na superfície gelatinosa da gota, os quais progridem para rachaduras nas esferas géis afundadas no meio de precipitação. Felizmente, a espessura da película gelatinosa formada é larga o bastante ( $\geq 300 \mu\text{m}$ ) e garante a integridade das esferas géis em um posterior processamento, embora não seja uniforme. O meio de precipitação 15% v/v A-85% v/v W apenas gera sulcos internos nas esferas (PM1-2),

**Tabela 2 Dados de caracterização das esferas de alumina obtidas no meio de precipitação química PM1**

Código <sup>a</sup>	Meios de precipitação <sup>b</sup> (% v/v - % v/v)	T (°C) <sup>c</sup>	Dados de caracterização			
			D (mm) <sup>d</sup>	D <sub>menor</sub> / D <sub>maior</sub> <sup>e</sup>	ρ (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>f</sup>	RF <sup>g</sup> (kgf/esfera)
	5% A – 95% W		2.89±0.13	0.95±0.03	0.51±0.03	0.45±0.19
	15% A – 85% W		2.71±0.12	0.92±0.04	0.65±0.02	3.24±0.67
<b>PM1</b>	25% A – 75% W	60	2.76±0.16	0.91±0.05	0.65±0.02	3.10±0.28
	50% A – 50% W		2.74±0.14	0.93±0.04	0.63±0.03	3.33±0.19
	100% A – 0% W		2.68±0.12	0.95±0.03	0.65±0.01	4.01±0.16

<sup>a</sup> Código: PM1=meio de precipitação química consistindo de solução de NH<sub>3</sub> min. 25% p/p e água.

<sup>b</sup> A: solução NH<sub>3</sub> min. 25% p/p, e; W: água.

<sup>c</sup> HT: tratamento térmico

<sup>d</sup>D: diâmetro

<sup>e</sup> D<sub>menor</sub>/D<sub>maior</sub>: esfericidade

<sup>f</sup> ρ: densidade

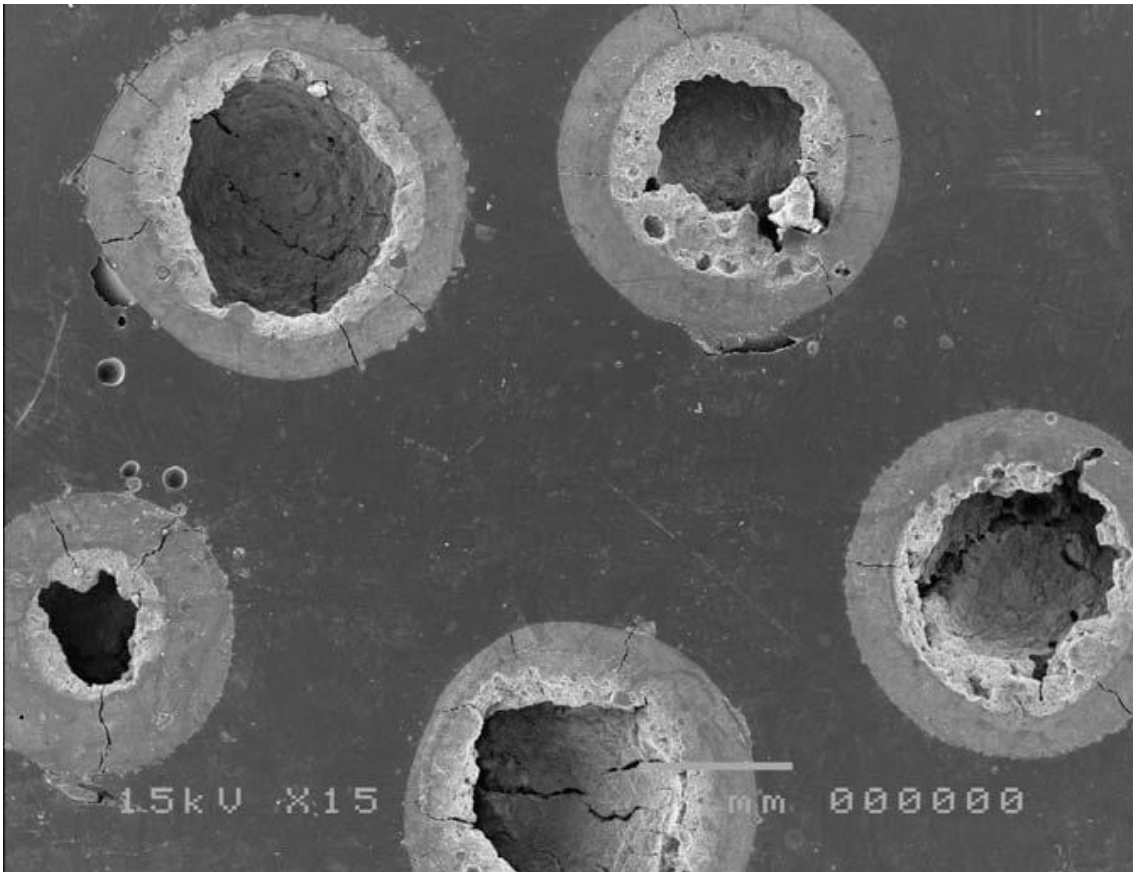
<sup>g</sup> RF: resistência à fratura

sem dano aparente na superfície e sem núcleo deslocado. Em outros meios, as esferas (PM1-3 a PM1-5) são densas e sem quaisquer sulcos na superfície. Portanto, nota-se que a variação da concentração amoniacal no meio de precipitação aquoso, limitado até a composição 15% A-85% W, é responsável por induzir defeitos como sulcos e formação de esferas ocas com núcleo deslocado. Deste modo, os defeitos de sulcos internos e núcleo deslocado descrito nas esferas com ou sem MDF (Fig. 4) pode ser atribuído a variação de concentração do meio de precipitação recém preparado e do meio de precipitação usado 25% v/v-75% v/v W, por meio da evaporação da amônia, acentuados pelo uso da mesma solução em mais de uma precipitação de esferas géis, tanto quanto o uso do sistema de exaustão gás localizado no topo da coluna de vidro contendo o meio de precipitação referido.

A Tabela 3 resume os dados de caracterização das esferas no meio de precipitação PM2. As esferas géis no meio de precipitação 1% v/v A-99% v/v ET não resistiram ao impacto na superfície do meio e elas foram desintegradas na forma de particulados gelatinosos. O meio de precipitação 5% v/v A- 95% v/v ET tornou viável a obtenção de esferas ocas (PM2A-1/PM2B-1/PM2C-1) com a superfície seriamente rachada e aparentemente com o núcleo deslocado, o qual parece ser formado por partículas fragilmente agregadas que são parcialmente ou totalmente eliminadas durante o embutimento, lixamento e polimento. Embora a espessura da película gel formada seja pequena ( $\geq 100 \mu\text{m}$ ) e não uniforme, ela é resistente o bastante para garantir a integridade das esferas géis em procedimentos posteriores (particularmente após o estágio de calcinação, como os feitos com as esferas PM2B-1, Tabela 3). Já o meio de precipitação 15% v/v A-85% v/v ET gera menos rachaduras acentuadas na superfície das esferas (PM2A-2/PM2B-2/PM2C-2) e aparentemente com um núcleo deslocado (Fig. 6, esferas PM2A-2), as quais também parecem ser formadas por partículas agregadas frágeis que são parcialmente ou totalmente eliminadas durante o embutimento em resina, lixamento e polimento. A espessura da película gelatinosa continua a ser não uniforme, porém mais espessa ( $\geq 300 \mu\text{m}$ ), como mostrado na Fig. 6. Iniciando em um meio de precipitação 25% v/v A-75% v/v ET, praticamente não se observa esferas com defeitos no núcleo como rachaduras e outras imperfeições na colagem das partículas de alumina gama.

**Tabela 3 - Dados de caracterização das esferas de alumina obtidas no meio de precipitação química PM2**

Códigos <sup>a</sup>	Meios de precipitação <sup>b</sup> (% v/v - % v/v)	T (°C)	Dados de caracterização			
			D (mm)	D <sub>menor</sub> / D <sub>maior</sub>	ρ (g/cm <sup>3</sup> )	RF (kgf/esfera)
<b>PM2A</b>	5% A – 95% ET	60	3.17±0.16	0.97±0.03	0.50±0.01	0.26±0.13
	15% A -85% ET		3.09±0.08	0.98±0.02	0.52±0.01	0.21±0.08
	25% A – 75% ET		2.99±0.07	0.96±0.03	0.57±0.02	0.52±0.21
	50% A – 50% ET		2.80±0.09	0.95±0.03	0.66±0.03	1.49±0.53
	75% A – 25% ET		2.69±0.10	0.94±0.04	0.53±0.01	2.45±0.20
<b>PM2B</b>	5% A – 95% ET	600	3.09±0.10	0.95±0.03	0.44±0.01	0.04±0.01
	15% A -85% ET		3.02±0.09	0.96±0.03	0.36±0.02	0.06±0.03
	25% A – 75% ET		2.95±0.11	0.95±0.03	0.40±0.03	0.30±0.17
	50% A – 50% ET		2.69±0.10	0.94±0.03	0.52±0.01	1.12±0.14
	75% A – 25% ET		2.66±0.12	0.94±0.04	0.72±0.01	1.74±0.39
<b>PM2C</b>	5% A – 95% ET	60	3.07±0.11	0.95±0.03	0.49±0.01	0.04±0.02
	15% A -85% ET		2.78±0.11	0.95±0.03	0.49±0.01	0.36±0.08
	25% A – 75% ET		2.73±0.12	0.96±0.04	0.49±0.01	0.47±0.19
	50% A – 50% ET		2.58±0.18	0.90±0.04	0.58±0.02	2.21±0.43
	75% A – 25% ET		2.71±0.18	0.90±0.04	0.58±0.03	2.96±0.27
<b>PM2D</b>	5% A – 95% ET	60	3.06±0.14	0.94±0.04	0.37±0.01	0.12±0.04
	15% A -85% ET		2.68±0.16	0.93±0.04	0.52±0.02	0.99±0.24
	25% A – 75% ET		2.54±0.20	0.92±0.05	0.60±0.02	2.22±0.55
	50% A – 50% ET		2.54±0.17	0.92±0.06	0.62±0.03	5.29±0.58
	75% A – 25% ET		2.50±0.16	0.92±0.05	0.71±0.01	4.64±0.29



**Figura 6 Eletromicrografia das esferas de alumina gama secas sem MDF (PM2-A), obtida no meio de precipitação química PM2A, envelhecida por 0,5 h e seca a 60 °C/ar/2 h**



Observaram-se rachaduras na superfície das esferas e o núcleo apresenta-se crescentemente mais denso. A espessura da película gelatinosa formada continua a ser não uniforme e cresceu ainda mais ( $\geq 600 \mu\text{m}$ ) até não ser praticamente notada no meio de precipitação. Nota-se que diferentemente do meio completamente aquoso, o meio alcoólico favorece a formação de rachaduras e de núcleo deslocado (Fig. 6, PM2A-2) nas concentrações de 25% de ET a-75% de ET. A partir desta composição, obtiveram-se esferas sem rachaduras conspícuas na superfície. As observações que foram feitas nas esferas sem MDF (PM2A/PM2B/PM2C), também se aplicam às esferas com MDF (PM2D-1 a PM2D-5 Tabela 3).

A análise dos dados de caracterização das Tabelas 2 e 3 apresentam a resistência à fratura como única característica que claramente distingue a influência da composição do meio. O meio alcoólico produz esferas adsorventes mais frágeis devido ao fato de as mesmas terem mais defeitos como rachaduras e núcleo deslocado em seu interior, causados pela inibição de colagem e agregação das micropartículas de alumina gama. Esta inibição é promovida pela ação surfactante do etanol que age na superfície dessas micropartículas, reduzindo ou mesmo eliminando sua reidratação e sua colagem eficiente. Entretanto, é importante mencionar que há uma diferença da velocidade de crescimento da película gelatinosa inicialmente formada, maior no meio aquoso e menor no meio alcoólico, a qual é a principal consequência do poder de reidratação em meio aquoso (ou por outro lado, pela ação surfactante do etanol) do que da concentração do íon  $\text{NH}_4^+$  (no meio aquoso com uma concentração 15% A-85% W; no meio alcoólico, as esferas mais densas são apenas obtidas com uma concentração 75% A-25% ET), e do tempo de permanência das esferas no meio de precipitação.

## **7.2 Ensaios de adsorção de $\text{Cd}^{2+}$ pelos pós de alumina e pelas esferas de alumina ativada**

A eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  (Tabela 4) pelas partículas do pó de alumina AM1 sofre uma expressiva queda quando essas partículas são calcinadas a  $1250 \text{ }^\circ\text{C}$  (AM2) diminuindo de 38% para 14% a eficiência de remoção. Neste ponto, notam-se os efeitos da limitação de acesso do íon  $\text{Cd}^{2+}$  aos sítios ativos presentes no interior das partículas causada pelo fechamento e/ou eliminação dos poros durante o procedimento de sinterização, o qual acontece no tratamento térmico das partículas do pó de alumina. Uma vez que esta situação, também acontece nas esferas, considera-se necessário

apontar a conexão entre as condições de obter partículas de alumina na forma de pó e esferas, o processo de sinterização mencionado e a eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$ , determinada experimentalmente.

O pó de alumina é formado da aglomeração de partículas de alumina coloidais via precipitação química, lavagem, secagem, moagem e calcinação ( $400^\circ\text{C}/\text{ar}/2\text{h}$ , AM1), resultando em partículas com diâmetro de  $38\ \mu\text{m}$  e também em um aglomerado de partículas menores (ONODA & TONER, 1986). Como mostrado na Fig. 5, as partículas de alumina AM1, ainda apresentam nitrato que não foi totalmente decomposto e eliminado, assim como a água adsorvida. De acordo com Ready (1988), a presença de tais produtos voláteis dentro de um aglomerado reforça o transporte de vapor, o qual é responsável pelo crescimento do grão e pelo crescimento de partículas menores (envelhecimento Ostwald) durante os estágios inicial e intermediário de sinterização (READY, 1988; THÜMMLER & THOMMA, 1967; BROOK, 1988). Se este engrossamento de partículas ocorre, a taxa de densificação diminui devido à redução da área superficial. É bom lembrar que a capacidade de densificação (significa eliminar poros no aglomerado ou num compacto) e crescimento (significa crescer grão) passa a agir como mudanças competitivas levando à redução da energia interfacial do sistema que será sinterizado (READY, 1988; THÜMMLER & THOMMA, 1967; BROOK, 1988). Acredita-se que as situações descritas no estágio inicial de sinterização descrevem bem o que aconteceu com a amostra AM1, uma situação típica que ainda favorece o acesso significativo de íons  $\text{Cd}^{2+}$  aos sítios ativos das partículas presentes no interior do aglomerado AM1. Por outro lado, nas partículas AM2, acredita-se que como um resultado de aumento expressivo de temperatura de calcinação para  $1250^\circ\text{C}$  está acontecendo tanto as situações descritas no estágio intermediário de sinterização quanto as situações que estão acontecendo no estágio final de sinterização (READY, 1988; THÜMMLER & THOMMA, 1967; BROOK, 1988). Na verdade, o aumento de temperatura favorece os mecanismos de transporte de material que são responsáveis pela eliminação da porosidade e, assim, favorecem a densificação do compacto (THÜMMLER & THOMMA, 1967).

A eficiência de remoção de íon  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas DS1 e DS2 mostra um perfil distinto entre elas e significativamente diferente do perfil de adsorção previamente descrito para as partículas de pó de alumina AM1, as quais estão presentes nessas

esferas (Tabela 4). A eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  das esferas DS1 é cerca de duas vezes maior do que a das esferas DS2 e aproximadamente 1,9 vez maior do que a do pó

**Tabela 4 - Resultados de adsorção de Cd nos pós e esferas de alumina gama a 30 °C por 6 h**

Dados de adsorção							
Códigos <sup>a</sup>	C <sub>i</sub> (mg/l) <sup>b</sup>	C <sub>f</sub> (mg/l) <sup>c</sup>	S/L (g/l) <sup>d</sup>	pH	ER(%) <sup>e</sup>	q <sup>f</sup>	
						(mg/g)	(μmol/g)
AM1	125.00±0.54	78.07±0.22	10.24±0.01	4.5	37.54±0.01	4.58±0.00	40.75±0.00
AM2	71.35±0.87	61.65±0.59	10.35±0.02	4.4	13.58±0.01	0.94±0.00	8.35±0.00
DS1	125.00±0.54	35.89±0.35	10.07±0.01	4.9	71.28±0.02	8.85±0.02	78.69±0.02
DS2	125.00±0.54	86.30±0.47	10.14±0.01	4.5	30.96±0.01	3.81±0.01	33.94±0.01
CS1	125.00±0.54	24.56±0.37	10.49±0.02	5.1	80.35±0.02	9.57±0.02	85.16±0.02
CS2	125.00±0.54	72.73±0.49	10.05±0.01	4.6	41.81±0.01	5.19±0.01	46.24±0.01
CS3	125.00±0.54	95.46±0.66	10.34±0.03	4.5	23.64±0.01	2.85±0.01	25.42±0.01
CS4	125.00±0.54	90.49±0.70	10.45±0.01	4.4	27.60±0.01	3.30±0.01	29.38±0.01
CS5	125.00±0.54	67.93±0.35	10.01±0.01	4.7	45.65±0.01	5.67±0.01	50.46±0.01
CS6	125.00±0.54	76.65±0.55	10.14±0.02	4.5	38.68±0.01	4.77±0.01	42.41±0.01
CS7	125.00±0.54	71.30±0.28	10.18±0.01	4.6	42.96±0.01	5.27±0.00	46.95±0.00
CS8	125.00±0.54	83.74±0.44	10.11±0.03	4.5	33.01±0.03	4.08±0.03	36.30±0.03
CS9	73.63±0.92	62.24±0.41	10.68±0.01	4.4	15.47±0.07	1.07±0.07	9.49±0.07
CS10	71.35±0.87	61.28±0.68	10.41±0.01	4.5	13.54±0.06	0.92±0.06	8.25±0.06

<sup>a</sup>Códigos: amostras de pós e esferas <sup>b</sup>C<sub>i</sub>: concentração inicial. <sup>c</sup>C<sub>f</sub>: concentração final. <sup>d</sup>S/L(g/l): razão sólido/líquido. <sup>e</sup>RE (%): eficiência de remoção <sup>f</sup>q (mg/g or μmol/g): capacidade adsortiva mg/g

de alumina AM1. É interessante observar que a adição de MDF torna a adsorção de  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas DS2 menos eficiente do que pelas partículas de pó de alumina AM1. Entende-se que o aumento da eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas DS1 deve ser atribuído principalmente à presença de nanopartículas de alumina, contendo principalmente fases de material de baixa cristalinidade, e a maior acessibilidade às partículas AM1. Acredita-se também que o envelhecimento a quente das esferas DS2 torna possível uma maior oclusão de poros das referidas nanopartículas de alumina e das partículas AM1 pela resina constituinte do MDF e conseqüentemente menor acesso aos sítios ativos dessas partículas de alumina, explicando então, a queda substancial da capacidade adsortiva de DS2 em relação a DS1 e AM1.

A eficiência de remoção do íon  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas CS1 e CS2 mostra um comportamento distinto entre ambas e uma diferença significativa de comportamento de adsorção de  $\text{Cd}^{2+}$  tanto em relação às partículas do pó de alumina quanto às esferas secas (DS1 e DS2) das quais CS1 e CS2 se originaram. A eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  das esferas CS1 é aproximadamente 1,9 vez maior do que a das esferas CS2 e aproximadamente 2,1 vezes maior do que a do pó de alumina AM1. Nota-se que ao calcinar as esferas DS1 e DS2 a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Ar}/2\text{h}$ , tem-se um processo de sinterização, o qual favorece o PVA, a resina presente no MDF, e as próprias partículas de MDF transformarem-se em partículas de carvão ativo. Portanto, tanto estas partículas de carvão ativo quanto as nanopartículas de alumina e as partículas do pó de alumina AM1 mostram a mesma situação de reforço do transporte de vapor e sua conseqüência no processo de sinterização nas esferas CS1 e CS2, previamente descrito na obtenção das partículas AM1. Acredita-se que as situações descritas no estágio inicial de sinterização refletem bem o que aconteceu com as esferas CS1 e CS2 isto é, crescimento de contato entre as partículas (representada por alumina-alumina, alumina-carvão ativo e carvão ativo-carvão ativo) constiuintes dessas esferas e diminuição considerável da atividade superficial dessas partículas em contato, situação que ainda favorece o significativo acesso de íons  $\text{Cd}^{2+}$  aos sítios ativos das referidas partículas presentes no interior das esferas CS1 e CS2. De acordo com Mohan e Pittman (2007), estas condições favorecem a formação de carvão ativado, o qual é uma forma bruta de grafite com uma estrutura de poros não organizada ou altamente amorfa e que tem uma grande faixa de tamanhos de poros na qual o tamanho pode variar entre o tamanho de rachaduras visíveis e fissuras com dimensões moleculares. Por causa disto, o aumento da eficiência de remoção de

$\text{Cd}^{2+}$  de 11% e 26% observado, respectivamente, em CS1 e CS2, em relação a DS1 e DS2, pode estar relacionado ao conteúdo diferenciado de carbono ativo nessas esferas calcinadas, na qual seu conteúdo em CS2 é maior do que em CS1.

A eficiência de remoção do íon  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas CS3 e CS4 mostram um comportamento distinto entre ambas e uma diferença significativa de comportamento de adsorção de  $\text{Cd}^{2+}$  tanto em relação às partículas do pó de alumina AM1 das esferas quanto das esferas CS1 e CS2 das quais CS3 e CS4 se originam. A eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  das esferas CS3 é aproximadamente 1,2 vezes menor do que a das esferas CS4 e aproximadamente 1,6 e 3,3 vezes menor do que as do pó de alumina AM1 e das esferas CS1, respectivamente. Nota-se que ao calcinar as esferas CS1 e CS2 a  $600^\circ\text{C}/\text{ar}/2\text{h}$ , reforça-se o transporte de vapor com a transformação de carbono ativo em  $\text{CO}_2$  e portanto, favorece o crescimento das nanopartículas depositadas na superfície das partículas AM1 e o fechamento de microporos e sua transformação em mesoporos e/ou macroporos ( Figs. 1d e 2 CS3/CS4). Acredita-se que as situações descritas nos estágios iniciais e intermediários de sinterização refletem o que aconteceu às esferas CS3 e CS4. Esta densificação maior não favorece um acesso significativo do íon  $\text{Cd}^{2+}$  aos sítios ativos das partículas presentes no interior das esferas CS3 e CS4. É conveniente reforçar que tais esferas ainda apresentam oclusão de produtos voláteis (carbono, água e nitrato, conforme apresentado nas Fig. 5f e g) que continuam a influenciar o comportamento de sinterização dessas esferas em temperaturas maiores que  $600^\circ\text{C}$ .

A eficiência de remoção do íon  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas CS5/CS6 e CS7/CS8 apresentam comportamento distinto entre elas e uma diferença significativa de comportamento de adsorção de  $\text{Cd}^{2+}$  tanto nas partículas do pó de alumina AM1 quanto nas esferas calcinadas CS3 e CS4. A eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  nas esferas CS5/CS7 é aproximadamente 1,2/1,3 vezes maior do que nas esferas CS6/CS8 e aproximadamente 1,2/1,1 vezes maior do que o pó de alumina AM1. De acordo com Brook (53), estas esferas previamente tratadas sob atmosfera de argônio podem ser consideradas um compósito tendo uma matriz de pó (alumina) e uma fase de inclusão (carbono ativo) que não densifica. O encolhimento da matriz é restringido pela presença de partículas de inclusão e por esta razão uma tensão contrária na forma de tensão hidrostática foi desenvolvida na matriz. Como consequência, a densificação da matriz é diminuída, na qual esta diminuição é superada, por exemplo, por um aumento de temperatura. Se níveis diferentes de densificação ocorrem em regiões compactas

diferentes, então as tensões aparecem. Mesmo se essas tensões forem pequenas, elas podem por meio de concentração de tensão resultar em falhas de empacotamento, causando dano e dilaceramento locais (o que significa formar rachaduras e fissuras de diferentes tamanhos, similar as ocorridas com o carvão ativo). Acredita-se que esta é a situação criada nas esferas CS5-CS8 aumentando-se a temperatura de 800 °C para 1.100 °C, com uma contribuição adicional das tensões acontecendo na mudança de fase (Fig. 3). Conseqüentemente, favorece-se o acesso de  $\text{Cd}^{2+}$  a um número maior de sítios ativos no interior das esferas, mesmo se ela causa crescimento das partículas de alumina AM1, fechamento de microporos e sua transformação em mesoporos e/ou macroporos (Fig. 1e e 1f e Fig.2 CS5-CS8) e maior densificação, situações típicas descritas nos estágios de sinterização iniciais e intermediários.

A eficiência de remoção de íons  $\text{Cd}^{2+}$  pelas esferas CS9 e CS10 apresenta um comportamento de adsorção de  $\text{Cd}^{2+}$  equivalente ao obtido pelas partículas do pó de alumina AM2. A eficiência de remoção de  $\text{Cd}^{2+}$  caiu drasticamente, indo de 71% para 31% nas esferas secas DS1/DS2 e para 15%/14% nas esferas calcinadas CS9/CS10. Nota-se que a elevação da temperatura para 1250 °C pode eliminar os danos locais e a dilaceração da matriz previamente referidos, promover a densificação e crescimento do grão na matriz (Fig. 3). Portanto, como foi discutido para AM2, acredita-se como um resultado do aumento expressivo da temperatura de calcinação para 1250 °C, que está ocorrendo nessas esferas as situações descritas nos estágios de sinterização intermediários e finais. Então a adsorção de  $\text{Cd}^{2+}$  seria limitada aos sítios ativos acessados na superfície das partículas de alumina crescidas que compõem as esferas.

### **7.3 Ensaio de adsorção de Cd, Cu, Zn e As no pó (AM1) e nas esferas secas (DS1 e DS2) de alumina**

Na Tabela 5 foram reunidos os resultados de adsorção de Cd, Cu, Zn e As no pó (AM1) e nas esferas secas (DS1 e DS2) de alumina. Comparando-se os resultados da capacidade adsorptiva,  $q$  ( $\mu\text{mol/g}$ ), de Cd, Cu e Zn, descobriu-se a relação  $q_{\text{Zn}} \geq q_{\text{Cd}} > q_{\text{Cu}}$ , a qual sugere que o pó de alumina e as esferas tenham maior afinidade pelo Zn e que a presença de MDF reforça esta afinidade. Considerando que estes resultados, ainda não exploram a capacidade máxima,  $q_{\text{max}}$  ( $\text{mg/g}$ ), fornecida a partir de uma curva de equilíbrio de adsorção, esses resultados da capacidade adsorptiva de Cd, Cu, Zn e As

**Tabela 5 - Resultados de adsorção de Cd, Cu, Zn e As no pó e esferas de alumina gama a 30 °C por 6 h**

Dados de adsorção								
Metais/As	Códigos <sup>a</sup>	C <sub>i</sub> (mg/l) <sup>b</sup>	C <sub>f</sub> (mg/l) <sup>c</sup>	S/L (g/l) <sup>d</sup>	pH	ER (%) <sup>e</sup>	q <sup>f</sup>	
							(mg/g)	(μmol/g)
Cd	AM1	125.00±0.54	78.07±0.22	10.24±0.01	4.5	37.54±0.01	4.58±0.00	40.75±0.00
	DS1	125.00±0.54	35.89±0.35	10.07±0.01	4.9	71.28±0.02	8.85±0.02	78.69±0.02
	DS2	125.00±0.54	86.30±0.47	10.14±0.01	4.5	30.96±0.01	3.81±0.01	33.94±0.01
Cu	AM1	101.26±0.15	87.07±0.35	10.24±0.01	4.1	13.99±0.03	1.38±0.03	22.10±0.03
	DS1	124.00±0.15	93.14±0.21	10.09±0.00	4.3	24.88±0.01	3.06±0.01	47.22±0.01
	DS2	124.00±0.15	107.27±0.37	10.19±0.01	4.2	13.49±0.02	1.64±0.02	25.83±0.02
Zn	AM1	111.26±1.20	69.68±1.58	10.13±0.02	4.4	37.37±0.03	4.10±0.03	63.60±0.03
	DS1	111.26±1.20	57.37±1.35	10.38±0.03	4.7	48.44±0.02	5.26±0.02	80.37±0.02
	DS2	111.26±1.20	44.55±1.34	10.26±0.02	4.6	59.95±0.02	6.42±0.02	98.21±0.02
As	AM1	60.00±0.12	29.00±0.28	10.34±0.01	4.8	51.66±0.01	2.99±0.01	40.04±0.01
	DS1	73.50±0.14	41.4±0.27	10.15±0.01	4.5	43.67±0.01	3.16±0.01	42.22±0.01
	DS2	73.50±0.14	41.25±0.19	10.25±0.02	4.4	43.87±0.01	3.14±0.01	41.99±0.01

<sup>a</sup> AM1= micropartículas de alumina gama calcinadas a 400 °C/ar/2 h; DS1 and DS2= esferas secas, respectivamente, sem e com MDF. <sup>b</sup> C<sub>i</sub>: concentração inicial. <sup>c</sup> C<sub>f</sub>: concentração final. <sup>d</sup> S/L(g/l): razão sólido/líquido. <sup>e</sup> RE (%): eficiência de remoção <sup>f</sup> q (mg/g or μmol/g): capacidade adsortiva mg/g para o Cd, Cu, Zn e As.



nestas esferas mostram-se promissores quando comparados com aqueles reportados na literatura. Rengaraj et al. relatam um  $q_{max}$  de 8,55 mg/g para o Cu. Bhattacharya et al. (2006) relatam um  $q_{max}$  de 13,69 mg/g para o Zn. Floroiu et al. apenas mencionaram um comportamento de adsorção de Cd em alumina gama, representado por uma curva de adsorção com o formato tipo S. Em relação a adsorção do arsenito, é interessante notar que a capacidade adsortiva  $q$  (mg/g) obtida no pó (AM1) e nas esferas secas (DS1 e DS2), respectivamente, 2,9 mg/g, 3,6 mg/g e 3,14 mg/g é maior que a capacidade máxima,  $q_{max}$  (mg/g), 1,42 mg/g em pH 4,9, reportado por Lin e Wu (2001). Este resultado para As sugere que estas esferas podem substancialmente aumentar a capacidade adsortiva para  $As^{3+}$  se as condições ótimas de pH de adsorção (pH>7) forem usadas (LIN & WU, 2001; MOHAN & PITTMAN JR., 2007). Os resultados de adsorção de Cd, Cu, Zn e As também mostram que o processo de aglomeração desenvolvido aumenta a capacidade adsortiva das partículas individuais de AM1.

Uma investigação cuidadosa do meio de transformação sol-gel, envelhecimento, secagem e condições de calcinação permitiram o aumento da macroporosidade dentro das esferas, para produzi-las com núcleo descolado ou mesmo ocas. A possibilidade de adicionar teores crescentes de biomassa ao adsorvente torna o processo mais barato. As esferas macroporosas ocas de alumina gama apresentaram alta eficiência nos ensaios de remoção de As. Estas podem apresentar grande potencial de adsorção do mesmo em ensaios de remoção realizados sob condições ótimas.

#### **7.4 Caracterizações das esferas macroporosas de alumina contendo carvão ativado**

A partir dos dados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que a inclusão de 20% de carvão resulta na obtenção de esferas com diâmetros da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos nas esferas com e sem adição de MDF (veja Tabela 1). Além disto, não houve alteração da esfericidade. No entanto, o mesmo não se pode dizer da resistência à fratura. As esferas contendo carvão ativado são muito mais frágeis do que as com MDF. A resistência à fratura decresceu de 0,65 (esfera seca, DCA1) para 0,08 kgf/esfera (esfera calcinada, 1.100 °C, CCA6). Já na esfera calcinada a 1.250 °C a resistência a fratura volta a aumentar para 0,20 kgf/esfera, devido ao processo de sinterização. Observa-se também a redução da superfície específica de 315 (pó de alumina, seco a 150 °C) para 262 m<sup>2</sup>/g (esfera calcinada, 400 °C). Nota-se, assim, que

as esferas obtidas com carvão ativado possuem uma estrutura com mais microporos e mesoporos do que as esferas obtidas com MDF (185 m<sup>2</sup>/g, calcinadas a 400°C). Em outras palavras, as partículas de MDF com tamanho maior ( $\leq 177 \mu\text{m}$ ) do que as partículas de carvão ativado ( $\leq 5 \mu\text{m}$ ) permitem preservar uma estrutura mais macroporosa nas esferas, razão da diminuição da superfície específica.

A Fig. 7a apresenta uma isoterma do tipo II, praticamente sem um circuito de histerese. Neste caso, a ausência de histerese significa baixa dispersão de tamanho de poros (ALLEN, 1999). As Figs. 7b-g mostram isotermas do tipo IV, típicas de sólidos mesoporosos e macroporosos, com a presença de um circuito de histerese muito menos acentuado do que no caso das esferas de alumina com MDF, indicando uma menor dispersão de tamanho dos poros. A isoterma da Fig. 7h tem as características de isotermas do tipo II, representativas neste caso, de sólidos adsorventes porosos com uma dispersão de tamanho de poros maior (ALLEN, 1999).

A Fig.8 mostra a distribuição de tamanhos de poros obtida pelo método BJH para o pó de alumina  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  (AP1) e para as esferas de alumina (DCA1-CCA6). Nesta figura, a figura pequena inserida mostra uma ampliação da escala da faixa de diâmetros de poros entre 10 e 100 Å, para facilitar a visualização das curvas. Nota-se que o tamanho médio dos poros e o volume total de poros para as esferas com carvão ativado (35 Å e 0,27 cm<sup>3</sup>/g, 400 °C) são um pouco menores do que os das esferas com MDF (37,5 Å e 0,34 cm<sup>3</sup>/g, 400 °C).

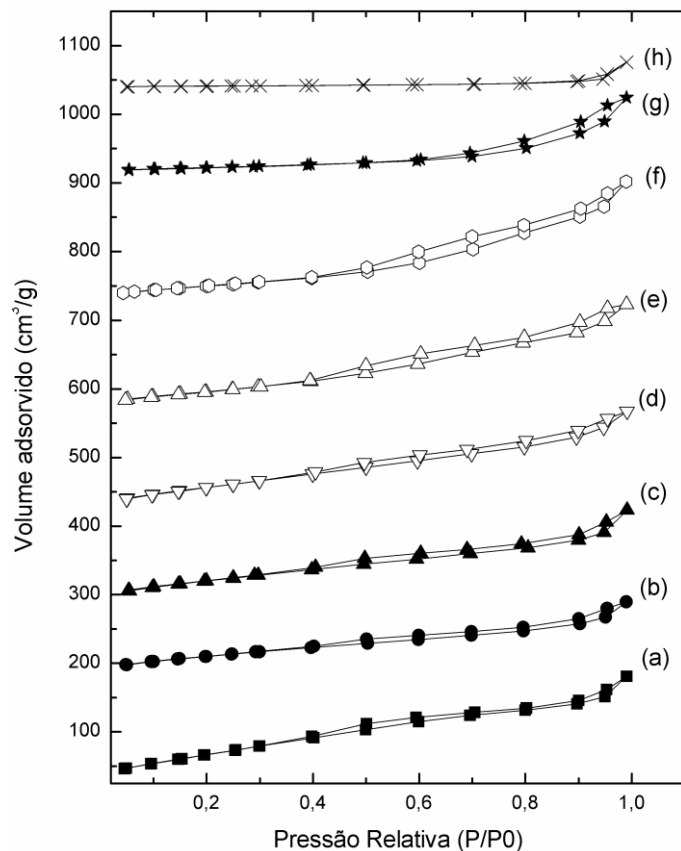
A Fig. 9 mostra que as esferas com carvão ativado seguem o mesmo padrão de fases encontrado nas esferas com MDF. Elas são compostas de fases de muito baixa cristalinidade, além de fases cristalinas identificadas nas micropartículas de alumina ativada,  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  e  $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , as quais também predominam nas esferas secas (Fig. 9b e Fig. 9c). Estas fases de alumina de transição continuam a existir nas esferas calcinadas até 800°C (Fig. 9d-i). Nas esferas calcinadas a 1100°C, as únicas fases presentes são  $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (principalmente) e  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . A completa transformação de fases acontece a 1250°C com a obtenção da fase cristalina estável,  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ .

**Tabela 6 - Dados de caracterização do pó de alumina e das esferas de alumina com carvão ativado**

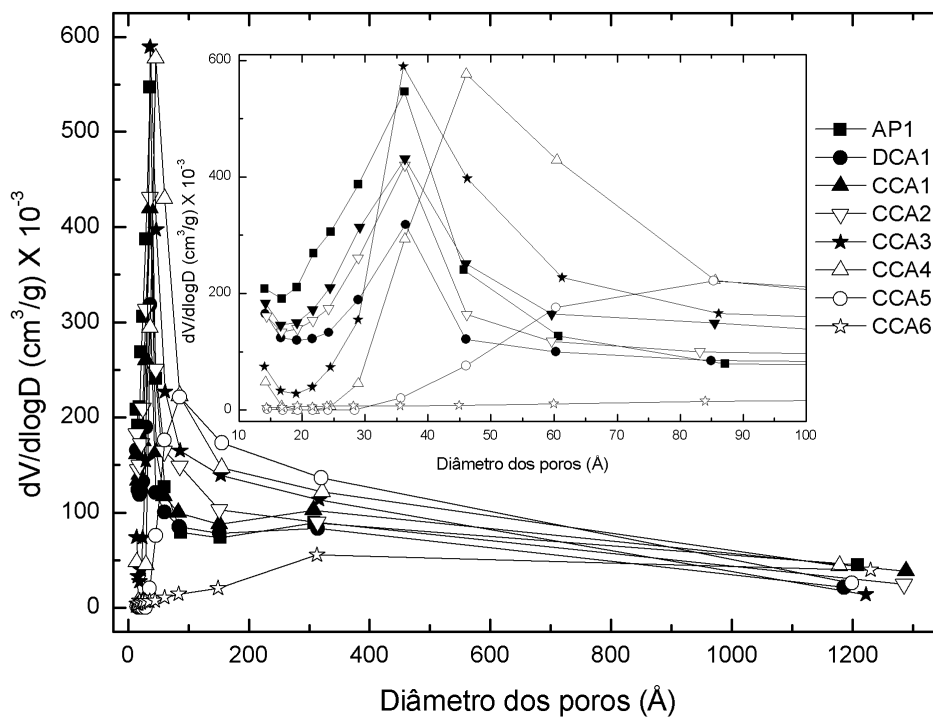
<b>Amostras<sup>a</sup></b>	<b>D</b> <b>(mm)</b>	<b>D<sub>menor</sub>/</b> <b>D<sub>maior</sub></b>	<b>ρ</b> <b>(g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>RF</b> <b>(kgf/esfera)</b>	<b>S<sub>g</sub></b> <b>(m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>V<sub>p</sub></b> <b>(cm<sup>3</sup>/g)<sup>c</sup></b>
<b>API</b>					315	0.30
<b>DCA1</b>	3.21±0.10	1.00±0.02	0.43±0.01	0.65±0.19	189	0.20
<b>CCA1</b>	3.22±0.11	1.00±0.02	0.39±0.01	0.31±0.14	222	0.24
<b>CCA2</b>	3.23±0.12	1.00±0.02	0.33±0.01	0.08±0.02	262	0.27
<b>CCA3</b>	3.20±0.09	0.99±0.02	0.30±0.01	0.04±0.02	207	0.28
<b>CCA4</b>	3.20±0.08	0.99±0.02	0.30±0.02	0.04±0.01	177	0.31
<b>CCA5</b>	3.10±0.07	0.99±0.03	0.32±0.03	0.08±0.02	62	0.18
<b>CCA6</b>	2.88±0.04	0.99±0.02	0.38±0.01	0.20±0.07	13	0.06

<sup>a</sup>Amostras: API= micropartículas de alumina calcinadas a 150 °C/ar/2 h; DCA1 = esferas secas com carvão ativo; CCA1 = esferas com carvão ativo calcinadas (200 °C/ar/2 h); CCA2= esferas com carvão ativo calcinadas (400°C/ar/2 h) ; CCA3= esferas com carvão ativo calcinadas( 600 °C/ar/2 h); CCA4= esferas calcinadas (800 °C/ar/2 h); CCA5= esferas com carvão ativo calcinadas(1.100 °C/ar/2 h); CCA6= esferas calcinadas (1.250°C)

<sup>b</sup>V<sub>p</sub>: volume total de poros

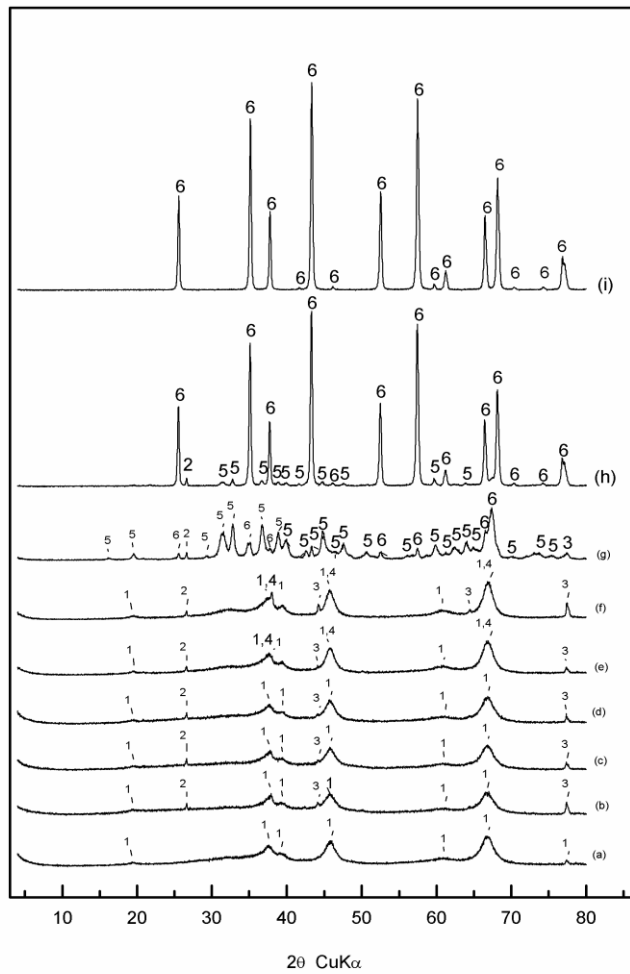


**Figura 7** Isotermas de adsorção-desorção das amostras (a) AP1= micropartículas de alumina calcinadas (150 °C/ar/2 h); (b) DCA1= esferas secas com carvão ativo; (c) CCA1= esferas com carvão ativo calcinadas (200 °C/ar/2 h); (d) CCA2= com carvão ativo calcinadas (400°C/ar/2 h); (e) CCA3= esferas com carvão ativo calcinadas (600 °C/ar/2 h) ;(f) CCA4=; esferas com carvão ativo calcinadas (800 °C/ar/2 h); (g) CCA5= esferas com carvão ativo calcinadas(1.100 °C/ar/2 h); (h) CCA6= esferas com carvão ativo calcinadas (1.250°C).

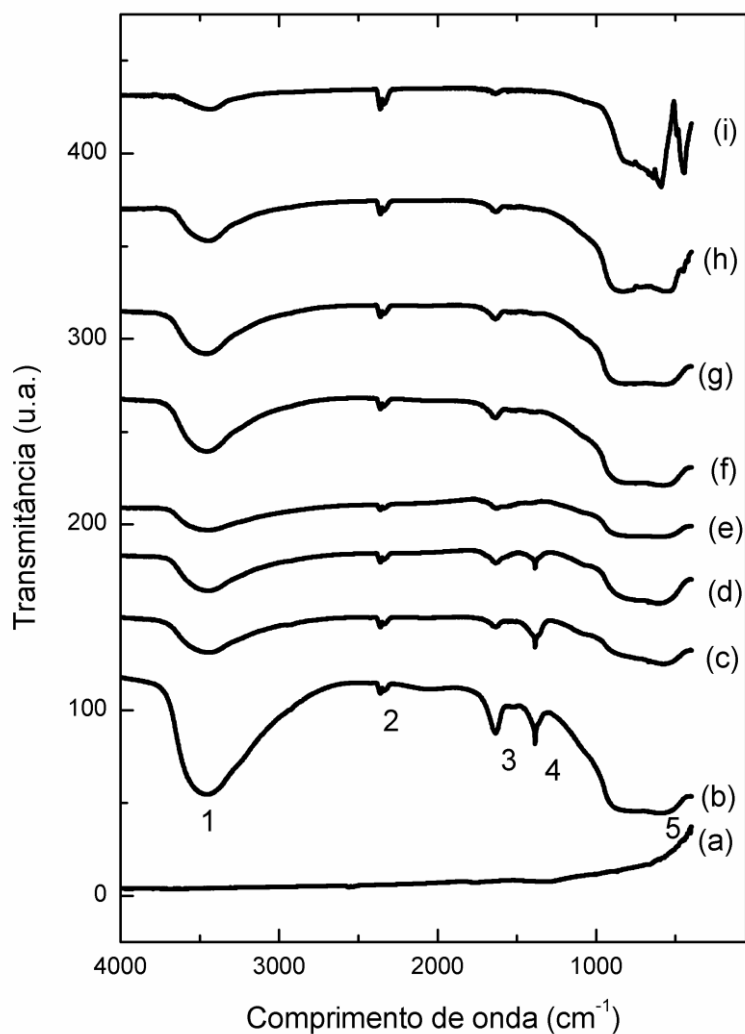


**Figura 8** Distribuição de tamanho de poros das amostras de pó e das esferas

Códigos: AP1= micropartículas de alumina calcinadas a 150 °C/ar/2 h; DCA1 = esferas secas com carvão ativo; CCA1 = esferas com carvão ativo calcinadas (200 °C/ar/2 h); CCA2= esferas com carvão ativo calcinadas (400°C/ar/2 h) ; CCA3= esferas com carvão ativo calcinadas( 600 °C/ar/2 h); CCA4= esferas calcinadas (800 °C/ar/2 h); CCA5= esferas com carvão ativo calcinadas(1.100 °C/ar/2 h); CCA6= esferas calcinadas (1.250°C). Símbolos abertos e fechados são usados para diferenciar as amostras.



**Figura 9 Padrões de difratometria de raios-X (DRX)** (a) AP1= micropartículas de alumina calcinadas (150 °C/ar/2 h); (b) DCA1= esferas secas com carvão ativo; (c) CCA1= esferas com carvão ativo calcinadas (200 °C/ar/2 h); (d) CCA2= com carvão ativo calcinadas (400°C/ar/2 h); (e) CCA3= esferas com carvão ativo calcinadas (600 °C/ar/2 h) ;(f) CCA4=; esferas com carvão ativo calcinadas (800 °C/ar/2 h); (g) CCA5= esferas com carvão ativo calcinadas(1.100 °C/ar/2 h); (h) CCA6= esferas com carvão ativo calcinadas (1.250°C); (i) AP1= micropartículas de alumina calcinadas (1.250°C//ar/2h). 1,  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 2,  $\delta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 3,  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ ; 4,  $\beta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 5,  $\theta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 6,  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



**Figura 10 Espectros infravermelho das amostras** (a) CA= partículas de carvão ativo; (b) AP1= micropartículas de alumina calcinadas (150 °C/ar/2 h); (c) DCA1= esferas secas com carvão ativo; (d) CCA1= esferas com carvão ativo calcinadas (200 °C/ar/2 h); (e) CCA2= com carvão ativo calcinadas (400°C/ar/2 h); (f) CCA3= esferas com carvão ativo calcinadas (600 °C/ar/2 h) ;(g) CCA4=; esferas com carvão ativo calcinadas (800 °C/ar/2 h); (h) CCA5= esferas com carvão ativo calcinadas(1.100 °C/ar/2 h); (i) CCA6= esferas com carvão ativo calcinadas (1.250°C).

## **7.5 Ensaio de adsorção de As (V) pelas esferas macroporosas de alumina ativada contendo carvão ativado sob diferentes condições de pH e concentrações iniciais do íon As (V)**

### **7.5.1 O efeito do pH**

A Figura 11 mostra o efeito do pH na adsorção de As (V) pelas esferas macroporosas de alumina ativada com carvão ativado. Nota-se que a adsorção máxima de íons As (V) ocorreu ao redor do pH 4,0. A eficiência de remoção de As (V) cresce de 92,41% (pH = 2) para 94,90% (pH = 4). A partir do pH = 4, esta eficiência decresce sistematicamente: 78,53% (pH = 6), 59,69% (pH = 8) e 38,42% (pH = 10). Este comportamento está intimamente ligado ao comportamento de atração e repulsão entre as cargas elétricas presentes nos sítios ativos da alumina ( $\equiv\text{Al-OH}$ ) e nas espécies químicas de As(V) presentes em cada faixa de pH. Os sítios ativos da alumina são carregados positivamente e atraem fortemente as espécies de As(V) predominantes nesta faixa de pH (2-6),  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ , na qual se verifica os maiores valores de adsorção de As(V). À medida que o pH aumenta para um valor dentro da faixa de pH entre 7 e 10,5 passa a predominar a fase  $\text{HAsO}_4^{2-}$ . Nesta situação, observa-se o começo de uma forte repulsão eletrostática já que as cargas superficiais dos sítios ativos da alumina passam a assumir uma carga negativa, em função do aumento da concentração dos íons  $\text{OH}^-$  que competem fortemente com o íon  $\text{HAsO}_4^{2-}$  pelos mesmos sítios ativos. Em valores de pH maiores, esta situação tende a favorecer a adsorção dos íons  $\text{OH}^-$  em prejuízo das espécies de As predominantes  $\text{HAsO}_4^{2-}$  (pH~7-10,5) e  $\text{AsO}_4^{3-}$  (pH>11).

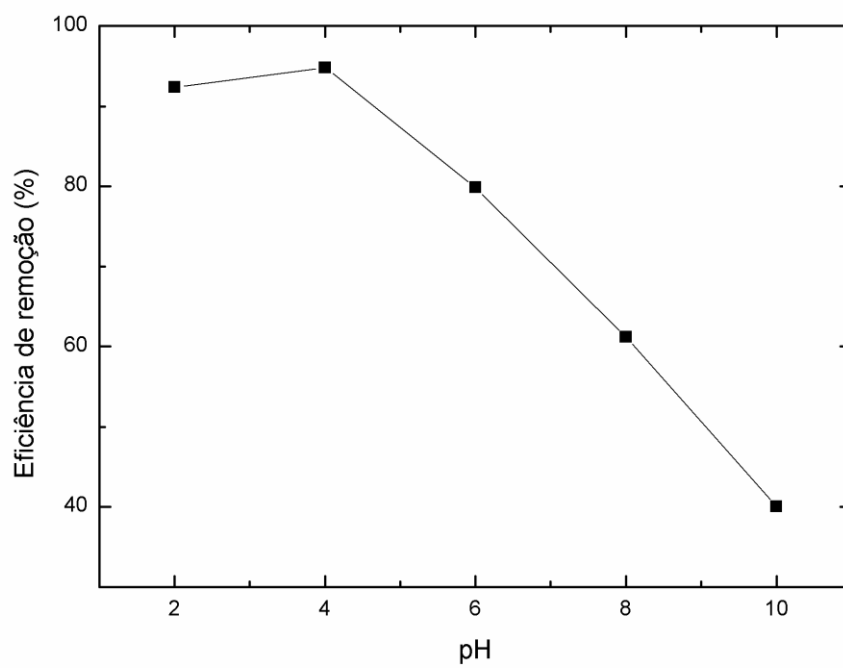
O valor pH de 4, no qual se obteve elevada eficiência de remoção de As(V) nas esferas mesoporosas obtidas com carvão ativado ( $\approx 95\%$ ), está coerente com a faixa de pH determinada por Kim et al. (2008), entre 2 e 5, em pó de alumina mesoporosa, onde eles reportam uma capacidade adsortiva de  $\sim 120 \text{ mgAs(V)/g}$ . Em outro trabalho realizado por Xu et al. (2004) também usando alumina mesoporosa granular para remoção de As (V), o pH ótimo encontrado foi 5,2.



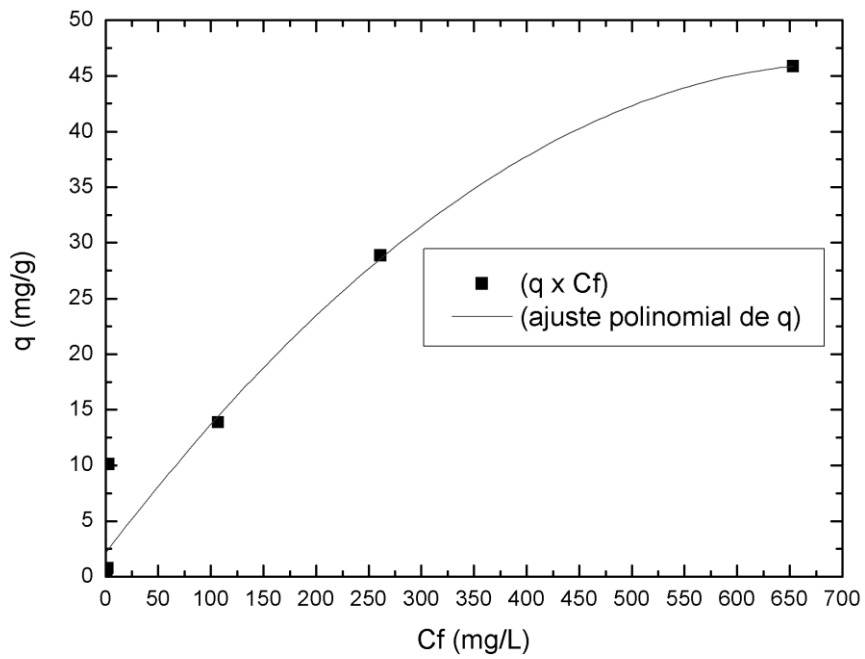
### 7.5.2 O efeito da concentração inicial do íon As (V)

A Figura 12 apresenta a capacidade máxima de saturação dos sítios ativos presentes nas esferas de alumina com carvão ativado (CCA2). A quantidade de íons As (V) adsorvidos por unidade de massa do adsorvente, isto é, a capacidade adsortiva, aumentou com o aumento da concentração inicial de íons As (V) em solução até a concentração final limite de 650 mg/L de As (V).

Nestes ensaios a capacidade adsortiva máxima experimental ( $q_{exp}$ ) foi de aproximadamente 46 mg de As (V)/g. Este valor é cerca de três vezes menor que aquele obtido por Kim et al. (2008) usando pó de alumina mesoporosa, a capacidade máxima adsortiva obtida pelos mesmos foi de 120 mg de As (V)/g, porém deve-se destacar que o pó de alumina não é a forma mais apropriada para tratamento de grandes volumes de líquidos contendo As (V). Assim pode-se constatar que o adsorvente desenvolvido neste trabalho apresenta grande potencial para aplicação em sistemas de coluna de leito fixo não só pela forma apropriada (esférica), mas também por apresentar alto valor de capacidade adsortiva.



**Figura 11** Eficiência de remoção de As (V) em diferentes valores pH pelas esferas de alumina ativada com carvão



**Figura 12** Determinação de  $q$  experimental das esferas de alumina ativada com carvão em função de diferentes concentrações iniciais

## 7.6 Parâmetros químicos das amostras de água

Os parâmetros químicos das amostras de água estão resumidos na Tabela 7. Os valores de pH foram quase constantes nas quatro coletas com valores médios entre 7,1 e 7,7. O valor 6,6 obtido no ponto 3, na segunda coleta, foi a única exceção. Houve diferenças nas concentrações de arsênio em cada coleta e entre os pontos amostrados na segunda, terceira e quarta coletas. Os maiores valores de concentrações de As (V) encontrados para o ponto 1 em relação aos pontos 2 e 3 podem ser explicados pela maior proximidade daquele ao sistema de tratamento de efluentes da mineradora. Porém, ao examinarem-se as densidades totais de leveduras e fungos filamentosos, não é possível estabelecer relações entre as concentrações de As (V) e as mesmas.

Talvez outros fatores, como a disponibilidade de nutrientes no meio ou fatores climáticos podem ter tido maior influência sobre o crescimento destes microrganismos. Em um estudo de diversidade de leveduras presentes em ambientes aquáticos ácidos na Patagonia, Argentina, o aumento do valor de pH e a conseqüente diminuição na concentração de metais pesados na água, explicaram um aumento nas densidades de leveduras presentes nos ambientes aquáticos amostrados. Também, em outros pontos amostrados no mesmo estudo, a diminuição das densidades de leveduras pode ser explicada pela diminuição na concentração de nutrientes disponíveis (RUSSO et al., 2008). Foi observada a influência das estações seca e chuvosa na densidade de leveduras em um estudo sobre a comunidade de microrganismos em rios da bacia do médio Rio Doce. Neste estudo observou-se que a densidade mais alta de leveduras (460 UFC/mL) no Rio Piracicaba ocorreu na estação seca e no Rio Severo (190 UFC/mL) na estação chuvosa (PETRUCIO et al., 2005).

## 7.5 Diversidade de leveduras isoladas na região do Córrego da Mina

As Tabelas 8, 9, 10 e 11 mostram as densidades e as abundâncias relativas das espécies de leveduras isoladas. A partir de um total de 135 isolados foram identificados 12 gêneros e 26 espécies. Os gêneros identificados foram *Hanseniaspora*, *Candida*, *Acremonium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Rhodospiridium*, *Issatchenkia*, *Kodamaea*, *Trichosporon* e *Cryptococcus*. A ocorrência de alguns destes gêneros foi observada por Medeiros e colaboradores (2008) em isolados de ambientes

aquáticos dulcícolas no Brasil. Observou-se que, em ecossistemas dulcícolas tropicais, a maioria das espécies pertencentes a estes gêneros eram mesófilas e cresciam melhor quando submetidas a temperaturas de crescimento entre 20°C e 30°C (BRANDÃO et al., 2010; DE ALMEIDA, 2005; HAGLER et al., 1986; HAGLER & AHERN, 1987; HAGLER & MENDONÇA- HAGLER, 1981; MORAIS et al., 1996; ROSA et al., 1995). Também nestes ecossistemas, a maioria das espécies isoladas da água está associada às plantas, aos solos e às fontes de poluição orgânica, com o predomínio de espécies basidiomicéticas (BRANDÃO et al., 2009). Isto se deve ao fato de as leveduras basidiomicéticas serem nutricionalmente mais versáteis, e tolerarem melhor as condições ambientais extremas em relação às leveduras ascomicéticas (SAMPAIO, 2004). Nagahama (2006) também observou que as espécies comumente isoladas são *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Cr. laurentii*, *Debaryomyces hansenii* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Estas espécies de leveduras foram isoladas de ecossistemas aquáticos em várias partes do mundo, incluindo ambientes oligotróficos, mesotróficos e eutróficos, e provavelmente originaram-se de ambientes terrestres.

A densidade e a riqueza de leveduras exibiram variação temporal nos pontos amostrados. Observaram-se densidades totais de leveduras nas faixas de  $10^5$  UFC/L na primeira e terceira coletas, estas apresentaram os menores valores de riqueza, que foram de cinco e sete espécies, respectivamente. Já a segunda e quarta coletas apresentaram densidades totais de leveduras nas faixas de  $10^6$  UFC/L e os maiores valores de riqueza, com 13 e 17 espécies, respectivamente (Tabela 12).

As espécies isoladas variaram não apenas temporalmente, mas também espacialmente. A densidade de leveduras em ambientes aquáticos naturais, cerca de  $10^3$  UFC/L, comparadas a outros ambientes, é normalmente baixa (Nagahama, 2006). Entretanto, tem sido relatado que em ambientes aquáticos com poluição orgânica, as densidades de leveduras ascomicéticas são maiores do que as basidiomicéticas, podendo alcançar em alguns casos, valores da ordem de  $10^6$  UFC/L ou maiores. Algumas espécies deste grupo apresentaram associação com alto conteúdo de matéria orgânica na água (p.ex.: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*) (HAGLER & AHERN, 1987).

**Tabela 7 Parâmetros químicos das amostras de água**

Coletas	Pontos de coleta					
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	1	2	3
	pH			As (mg/L)		
1	7,6±0,6	7,7±0,7	7,6±0,8	0,16±0,02	0,14±0,01	0,15±0,02
2	7,1±0,6	7,2±0,5	6,6±0,2	0,68±0,07	0,57±0,05	0,10±0,01
3	7,5±0,1	7,4±0,4	7,3±0,2	0,69±0,08	0,13±0,01	0,11±0,01
4	7,2±0,4	7,4±0,2	7,4±0,2	0,63±0,05	0,26±0,03	0,17±0,02

<sup>a</sup>Lagoa de contenção de rejeitos (Cucuruto);

<sup>b</sup>Ponto intermediário do sistema de tratamentos de rejeitos;

<sup>c</sup>Córrego da Mina.

**Tabela 8 Densidades e abundâncias relativas de espécies de leveduras na primeira coleta**

Espécie	Ponto1 (UFC/L)	Ponto2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>Acremonium strictum</i> <sup>a</sup>		3,2 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup> - (9,1)
<i>Candida boidinii</i>		4,5 x 10 <sup>4</sup>		4,5 x 10 <sup>4</sup> - (29,2)
<i>Candida sp.</i>	3,8 x 10 <sup>3</sup>	7,7 x 10 <sup>4</sup>		8,0 x 10 <sup>4</sup> - (51,9)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>			3,0 x 10 <sup>3</sup>	0,3 x 10 <sup>4</sup> - (1,9)
<i>Pichia guilliermondii</i>	6,7 x 10 <sup>3</sup>	5,7 x 10 <sup>3</sup>		1,2 x 10 <sup>4</sup> - (7,8)
Densidade total por ponto	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>
Riqueza de espécies por ponto	2	4	2	

<sup>a</sup> Forma leveduriforme do fungo filamentoso

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta

**Tabela 9 Densidades e abundâncias relativas de espécies de leveduras na segunda coleta**

Espécie	Ponto 1 (UFC/L)	Ponto 2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>Aureobasidium pulullans</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>		1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup> - (0,1)
<i>Candida cylindracea</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup> - (0,3)
<i>C. diversa</i>	3,0 x 10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup> - (6,6)
<i>C. oleophila</i>	3,0 x 10 <sup>4</sup>	5,2 x 10 <sup>4</sup>	8,4 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup> - (8,0)
<i>C. palmioleophila</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>		2,0 x 10 <sup>4</sup>	3,0 x 10 <sup>4</sup> - (1,4)
<i>Debaryomyces hansenii</i>			3,2 x 10 <sup>4</sup>	3,2 x 10 <sup>4</sup> - (1,5)
<i>Geotrichum klebahnii</i>	5,0 x 10 <sup>3</sup>		3,4 x 10 <sup>4</sup>	3,9 x 10 <sup>4</sup> - (1,8)
<i>H.uvarum</i>			2,4 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>4</sup> - (1,1)
<i>P.guillermondii</i>		5,0 x 10 <sup>4</sup>		5,0 x 10 <sup>4</sup> - (2,3)
<i>P. kluyveri</i>	6,5x10 <sup>4</sup>	7,2 x 10 <sup>4</sup>	5,6x 10 <sup>5</sup>	6,3 x 10 <sup>5</sup> - (29,6)
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	2,0 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup> - (12,2)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	1,0x10 <sup>5</sup>	2,0 x10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>	7,0 x 10 <sup>5</sup> - (32,9)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>		3,6 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup> - (2,2)
Densidade total por ponto	2,6 x 10 <sup>5</sup>	5,8 x 10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>	3,2 x 10 <sup>6</sup>
Riqueza de espécies por ponto	10	7	12	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta



**Tabela 10 Densidades e abundâncias relativas de espécies de leveduras na terceira coleta**

Espécie	Ponto1 (UFC/L)	Ponto2 (UFC/L)	Ponto3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>C. intermédia</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup> – (12)
<i>C. palmioleophila</i>	7,0 x 10 <sup>4</sup>		1,1 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup> – (30,9)
<i>C. parapsilosis</i>			1,1 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup> – (18,9)
<i>Issatchenkia occidentalis</i>			6,0 x 10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup> – (10,3)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	3,0x 10 <sup>4</sup>		2,0 x 10 <sup>4</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup> – (8,6)
<i>P. kluyveri</i>	3,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup> – (17,2)
<i>Rh. Mucilaginoso</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>		2,4 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>4</sup> – (2,1)
Densidade total por ponto	1,5 x 10 <sup>5</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>	3,8 x 10 <sup>5</sup>	5,8 x 10 <sup>5</sup>
Riqueza de espécies por ponto	5	2	7	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta

**Tabela 11 Densidades e abundâncias relativas de espécies de leveduras na quarta coleta**

Espécie	Ponto 1 (UFC/L)	Ponto 2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta – (%) <sup>b</sup>
<i>A.pulullans</i>	2,0 x 10 <sup>3</sup>			2,0 x 10 <sup>3</sup> - (0,1)
<i>C. blattae</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>		5,0 x 10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup> - (3,8)
<i>C.cylindracea</i>	4,1 x 10 <sup>4</sup>		5,0 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup> - (2,9)
<i>C. intermédia</i>	2,0 x 10 <sup>4</sup>	3,3x10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	6,3 x 10 <sup>4</sup> - (4,0)
<i>C. natalensis</i>	2,0 x 10 <sup>4</sup>			2,0 x 10 <sup>4</sup> - (1,3)
<i>C. oleophila</i>	2,3 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	1,9 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup> - (2,9)
<i>C. palmioleophila</i>	9,0 x 10 <sup>4</sup>		3,0 x 10 <sup>5</sup>	3,9 x 10 <sup>5</sup> - (24,6)
<i>C. parapsilosis</i>			4,0 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup> - (25,2)
<i>C. pseudointermedia</i>			8,6 x 10 <sup>4</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup> - (5,4)
<i>C. tropicalis</i>	3,5 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup> - (12)
<i>Cryptococcus luteolus</i>	3,4 x 10 <sup>4</sup>			3,4 x 10 <sup>4</sup> - (2,1)
<i>K. ohmeri</i>	2,4 x 10 <sup>4</sup>		6,0 x 10 <sup>4</sup>	8,4 x 10 <sup>4</sup> - (5,3)
<i>P. kluyveri</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>		3,5 x 10 <sup>4</sup>	3,6 x 10 <sup>4</sup> - (2,3)
<i>P. pastoris</i>	1,2 x 10 <sup>4</sup>		2,3 x 10 <sup>4</sup>	3,5 x 10 <sup>4</sup> - (2,2)
<i>R. toruloides</i>	2,0 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	2,6 x 10 <sup>4</sup> - (1,6)
<i>Rh. Mucilaginoso</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>		7,0 x 10 <sup>3</sup>	8,0 x 10 <sup>3</sup> - (0,5)
<i>Trichosporon asahii</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>		5,0 x 10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup> - (3,8)
Densidade total por ponto	3,4 x 10 <sup>5</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>
Riqueza de espécies por ponto	15	4	14	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta

Neste trabalho optou-se por abordar a distribuição temporal e espacial das leveduras tendo em vista que tanto a época de coleta quanto os pontos amostrados influenciaram na distribuição das espécies. Em cada coleta houve também variação de abundância e riquezas de espécies entre os pontos amostrados.

No presente trabalho as densidades mais altas de leveduras ocorreram durante a primavera e outono ( $10^6$  UFC/L); em um estudo sobre a ocorrência sazonal de leveduras no rio Danúbio as maiores densidades de leveduras também ocorreram no outono, este fato pode estar ligado à menor amplitude térmica nestes períodos em relação aos extremos de temperatura verificados no inverno e verão (SLÁVIKOVÁ & VADKERTIOVÁ, 1997).

Na primeira coleta, *Candida* sp. foi a espécie mais abundante ( $\approx 52\%$ ), já na segunda coleta, *P. kluyveri* foi a mais abundante ( $\approx 30\%$ ), porém nas coletas subsequentes esta continuou a apresentar altas densidades, entretanto não foi a espécie mais abundante. Na terceira coleta, *C. palmioleophila* foi a espécie mais abundante ( $\approx 31\%$ ), mas apresentou abundância menor na quarta coleta. *C. parapsilosis* foi a espécie mais abundante na quarta coleta ( $\approx 25\%$ ) e também apresentou altas densidades na terceira coleta.

As análises comparativas das coletas usando o índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e a riqueza de espécies ( $S$ ) estão na Tabela 12. A primeira e quarta coletas apresentaram o menor e maior valor de diversidade, respectivamente. Considerando-se que o cálculo deste índice baseia-se na riqueza de espécies em cada coleta, podem-se relacionar os valores obtidos com a menor e maior riqueza, respectivamente nos mesmos pontos. A primeira coleta foi realizada no inverno, caracterizado por temperaturas mais baixas, em torno de  $18^\circ\text{C}$ , e baixa pluviosidade, cerca de 10 mm; já a terceira coleta foi realizada no verão, caracterizado por temperaturas mais altas, em média  $23^\circ\text{C}$  e alta pluviosidade, aproximadamente 300 mm (INPE, 2010). Estes dados climáticos explicam em parte os menores valores de riqueza e abundância de espécies nestes períodos.

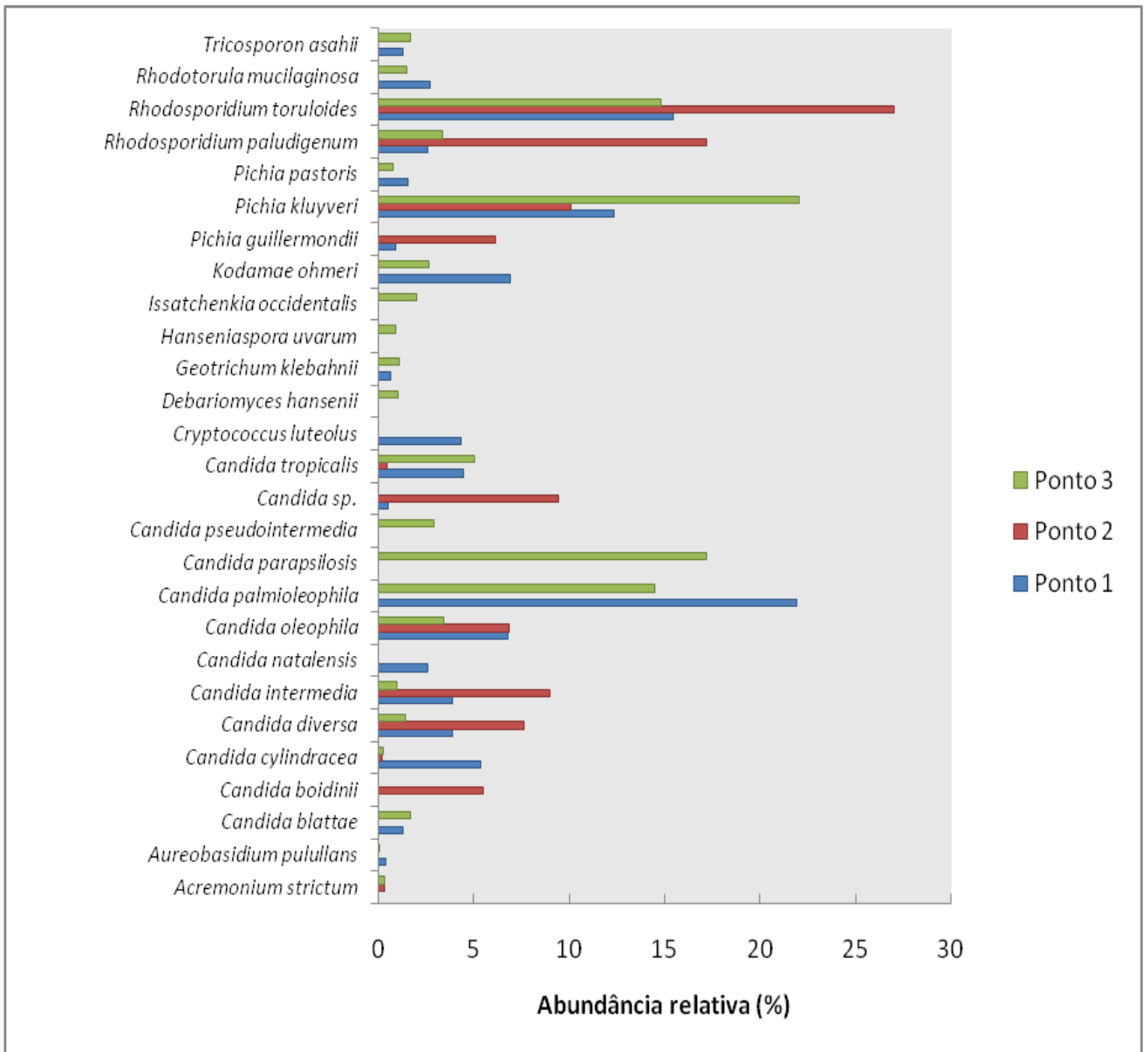
Para avaliar o efeito da distribuição espacial na riqueza e abundância de espécies foram feitas análises considerando apenas os pontos de coleta. Na Figura 14 foram apresentados os valores de abundância de espécies isoladas nos três pontos. No primeiro ponto, *C. palmioleophila* foi a espécie mais abundante ( $\approx 22\%$ ), já no segundo ponto, *R. toruloides* foi a mais abundante ( $\approx 27\%$ ) e no terceiro ponto, *P. kluyveri* foi a espécie mais abundante ( $\approx 22\%$ ). Destaca-se também que as espécies *C. diversa*, *C.*

*intermedia*, *C. oleophila*, *C. tropicalis*, *P. kluyveri*, *R. paludigenum* e *R. toruloides* ocorreram nos três pontos amostrados. Já as espécies como *C. boidinii*, *C. natalensis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudointermedia*, *Cr. luteolus*, *D. hansenii*, *H. uvarum* e *I. occidentalis* ocorreram apenas em um ponto. Ao analisarem-se os valores de diversidade obtidos nos três pontos (Tabela 13), observa-se que estes apresentaram valores semelhantes, porém os pontos 1 e 3 apresentaram valores de riqueza maiores.

**Tabela 12 Índice de diversidade de leveduras por coleta**

Índices	Coletas			
	1	2	3	4
Shannon-Winer $H'$	1,2	1,8	1,8	2,3
	(1,1/1,5) <sup>a</sup>	(1,6/2,4)	(1,3/2,1)	(2,2/2,7)
Riqueza $S$	5	13	7	17

<sup>a</sup> Os números entre parêntesis representam os valores inferiores e superiores dos índices de diversidade, com intervalo de confiança de 95% e valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 interações.



**Figura 13** Abundância relativa das espécies de leveduras nos três pontos

**Tabela 13 Índice de diversidade de leveduras por pontos**

Índices	Pontos		
	1	2	3
Shannon-Wiener	2,5	2,1	2,4
$H'$	(2,1/2,5) <sup>a</sup>	(1,8/2,1)	(2,1/2,4)
Riqueza $S$	20	12	22

<sup>a</sup> Os números entre parêntesis representam os valores inferiores e superiores dos índices de diversidade, com intervalo de confiança de 95% e valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 interações.

As leveduras ascomicéticas foram mais abundantes neste trabalho em todos os pontos e todas as coletas. Na primeira coleta, as espécies mais abundantes, foram as leveduras *Hanseniaspora uvarum*, *Candida boidinii*, *Candida* sp. e *Pichia guilliermondii*; na segunda coleta foram as leveduras *Candida oleophila*, *Pichia kluyveri*, *Candida cylindracea*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida palmioleophila* e *Candida diversa*; na terceira coleta foram as leveduras *Issatchenkia occidentalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Candida palmioleophila*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* e *Pichia kluyveri*; na quarta coleta foram as leveduras *Candida oleophila*, *Candida blattae*, *Pichia kluyveri*, *Candida pseudointermedia*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilosis*, *Candida natalensis*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Kodamaea ohmeri* e *Pichia pastoris*. Este fato pode estar ligado à poluição orgânica no ponto 3 pelo fato de receber aporte de esgotos sanitários, foi constatado em estudo realizado pelo IGAM entre os anos de 2003 e 2004 altos índices de coliformes fecais, fosfato total, amônia não ionizável, metais pesados e arsênio, além do aumento da demanda bioquímica de oxigênio durante alguns períodos do estudo, estando todos estes parâmetros em desconformidade com os padrões ambientais (IGAM, 2004). Nonato e colaboradores (2007) constataram por meio de análise de componentes principais envolvendo parâmetros físico-químicos e biológicos de qualidade da água, que este ponto possui a pior qualidade de água da rede de monitoramento do IGAM no alto curso do Rio das Velhas. A poluição deste ponto pode ser discriminada por parâmetros que caracterizam rejeitos de mineração e também de poluição doméstica e industrial. Neste trabalho as espécies com as mais altas densidades (na faixa de  $10^5$  UFC/L) foram as leveduras ascomicéticas *Candida oleophila*, *Pichia kluyveri*, *Candida diversa*, *Candida palmioleophila*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e as leveduras basidiomicéticas *Rhodospiridium paludigenum* e *Rhodospiridium toruloides*. As leveduras basidiomicéticas predominantes em muitos ambientes aquáticos são membros dos gêneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Sporobolomyces* (NAGAHAMA et al., 2001).

Gadanho et al. (2006) também isolaram leveduras do mesmos gêneros e espécies encontrados neste trabalho a partir de habitats aquáticos com baixo pH e altas concentrações de metais pesados, provenientes de drenagens de rochas do Cinturão de Pirita Ibérico, como por exemplo, leveduras acidófilas como *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus* sp. e espécies que ocorreram em situações intermediárias de acidez e



tolerância aos metais pesados (Cu, Zn e Pb) como *Candida fluvialis*, *Rhodospiridium toruloides* e três leveduras não identificadas em nível de espécie pertencentes aos gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus*.

A maioria das espécies de leveduras isoladas não seguiu um padrão de distribuição espacial e temporal nos pontos de coleta, este fato indica que provavelmente muitas das mesmas não são nativas destes ambientes aquáticos.

### **7.7 Ensaio de tolerância ao As (V) pelas leveduras**

A Tabela 13 mostra as densidades celulares, expressas pelas medidas de absorvância a 600 nm e os percentuais de reduções de crescimentos dos isolados de leveduras em relação ao controle (meio mínimo mineral sem adição de As (V)) obtidos a partir do ensaio de tolerância ao As (V).

Foram submetidos ao ensaio de tolerância ao As (V) 54 isolados representativos das diferentes espécies de leveduras. Observou-se que 10 isolados (cerca de 18 % dos isolados totais) cresceram até a concentração limite de 300 mM; também 10 isolados (aproximadamente 18 % dos isolados) cresceram até a concentração limite de 200 mM; 11 isolados (cerca de 21 % dos isolados) cresceram até a concentração limite de 150 mM; 18 isolados (cerca de 33 % dos isolados) cresceram até a concentração limite de 50 mM; dois isolados (aproximadamente 4 % dos isolados) cresceram até a concentração limite de 25 mM e três isolados (aproximadamente 6 % dos isolados) cresceram até a concentração limite de 10 mM

A maioria dos isolados de leveduras avaliadas quanto à tolerância ao As(V) no presente trabalho apresentaram o limite de tolerância acima de 50 mM de As (V). Anderson e Cook (2004) isolaram e caracterizaram bactérias redutoras de arseniato a partir de sítios contaminados com arsênio na Nova Zelândia. Os isolados dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Exiguobacterium*, apresentaram o limite de tolerância de até 100 mM de As (V).

Em um trabalho realizado por Drewniak e colaboradores (2008) com isolados de bactérias isolados a partir de uma antiga mina de ouro na Polônia, os autores obtiveram resultados muito semelhantes aos encontrados no presente trabalho quanto a faixa de tolerância ao As (V) apresentada pelos isolados, exceto para um isolado que tolerou até 500 mM de As (V). Dos isolados restantes, 10 isolados toleraram entre 150 e 350 mM

de As (V) e os demais apresentaram limites mais baixos de tolerância ao As (V), entre 25 e 100 mM.

De forma geral, foi observado para todos os isolados de leveduras avaliados um efeito inibitório progressivo de As (V) sobre o crescimento dos mesmos com o aumento da concentração de As (V). Diferentes isolados identificados como pertencentes à mesma espécie como, por exemplo aqueles das espécies, *H. uvarum*, *Ac. strictum*, *D. hansenii*, *C. oleophila*, *R. toruloides*, *C. palmiophila* e *C. intermedia* apresentaram limites de tolerância distintos, estes isolados apresentaram esta variação no limite de tolerância ao As (V) provavelmente por constituírem linhagens diferentes, uma vez que apresentaram perfis moleculares distintos pela PCR *fingerprinting* com o uso do iniciador GTG<sub>5</sub>.

No presente trabalho os isolados de leveduras apresentaram grande variação quanto ao padrão de tolerância ao As (V) sendo que alguns isolados cresceram até o limite de tolerância de 300 mM de As (V) e outros por sua vez cresceram somente até o limite de tolerância de 10 mM de As (V), em um trabalho realizado por Bachate et al. (2009) para isolamento e caracterização de bactérias resistentes ao arsênio isoladas de solos agrícolas de Bangladesh, os autores também obtiveram isolados que variaram em relação ao seu padrão de tolerância ao As (V). Os isolados *Arthrobacter* sp. Dhal A e *Alcaligenes* sp. Dhal L e Dhal N exibiram tolerância de até 350 mM de As (V). O isolado, *Oceanimonas doudoroffi* Dhal Rw, foi altamente tolerante ao As (V) (> 650 mM de As (V)). Os isolados (Dhal B, Dhal C, Rice D, Rice E, Rice F e Rice G), todos representantes do gênero *Microbacterium*, embora derivem de dois solos distintos, tiveram o mesmo padrão de tolerância e toleraram até 150 mM de As (V).

É interessante destacar que o isolado *C. oleophila* L16-3 teve uma redução aproximada de apenas 54% em seu crescimento com o aumento da concentração de 0 para 300 mM de As (V). Também, Collinet e Morin (1990) caracterizaram duas linhagens de *Thiobacillus*, *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans* quanto à tolerância ao As (V), neste trabalho pode-se observar um efeito inibitório progressivo sobre o crescimento de ambas as linhagens à medida que a concentração de As (V) é aumentada até o limite de aproximadamente 530 mM de As (V).

No presente trabalho 47% dos isolados de leveduras tiveram limite de tolerância acima de 100 mM de As (V). Jackson e colaboradores (2005) enumeraram e caracterizaram bactérias resistentes ao arseniato presentes em um grande estuário em

Louisiana, EUA. Neste trabalho mais de 40% dos isolados bacterianos cresceram em meio líquido acrescido de arsênio com concentrações superiores a 100 mM de As (V), além desses, sete isolados toleraram concentrações superiores a 300 mM de As (V).

No presente trabalho os isolados *C. intermedia* L44-2, *Cr. luteolus* L57-1, *Candida* sp. L80 toleraram somente até 10 mM de As (V) e *H. uvarum* L24-1 e *C. intermedia* L73 até 25 mM de As (V). Fan e colaboradores (2008) isolaram bactérias capazes de oxidar arsenito e reduzir arseniato a partir de águas subterrâneas com altas concentrações de arsênio (1,93 mg de As/L) no noroeste da China, no entanto estas bactérias apresentaram uma baixa tolerância ao As (V), cerca de 5 mM.

O perfil de tolerância ao As (V) mostrou-se variado entre as diferentes espécies de leveduras analisadas e entre isolados diferentes da mesma espécie. Entre os diferentes isolados de fungos filamentosos analisados, também houve diferença quanto ao perfil de tolerância.

**Tabela 14 Ensaio de tolerância ao As (V) pelas leveduras**

Espécies	Isolados	Limites de tolerância	Densidades ópticas médias/ Percentuais de reduções de crescimentos (%)							
			Concentrações de As (mM)							
			0	10	25	50	100	150	200	300
<i>H. uvarum</i>	L2		1,22±0,02/0	1,09±0,02/12,8	0,92±0,02/27,1	0,81±0,01/36,0	0,76±0,01/39,8	0,65±0,00/48,9	0,41±0,00/68,8	0,20±0,00/86,0
<i>Ac. Strictum</i>	L4		0,87±0,01/0	0,74±0,02/17,9	0,66±0,02/27,3	0,55±0,01/39,6	0,45±0,01/51,3	0,34±0,01/63,9	0,25±0,02/75,0	0,15±0,03/85,7
<i>Candida sp.</i>	L5-1		1,45±0,02/0	1,25±0,02/15,8	0,49±0,00/68,0	0,38±0,00/76,1	0,35±0,01/77,9	0,32±0,00/80,1	0,31±0,00/80,9	0,20±0,01/88,2
<i>P. guilliermondii</i>	L5-2	300 mM de As	1,67±0,01/0	1,35±0,01/21,4	0,73±0,01/58,1	0,66±0,01/62,4	0,37±0,01/79,5	0,26±0,01/86,4	0,18±0,00/90,8	0,08±0,02/97,1
<i>Ac. Strictum</i>	L6-3		1,60±0,00/0	1,29±0,01/21,3	1,14±0,00/30,5	0,95±0,00/42,1	0,83±0,00/49,7	0,51±0,00/70,2	0,18±0,00/90,9	0,07±0,00/97,2
<i>D. hansenii</i>	L14-2		1,47±0,01/0	1,32±0,01/12,5	1,28±0,01/15,3	1,21±0,00/20,0	1,06±0,00/29,7	0,53±0,01/66,1	0,35±0,02/78,1	0,16±0,01/91,0
<i>C. oleophila</i>	L16-3		1,52±0,00/0	1,47±0,01/4,7	1,35±0,00/12,8	1,24±0,01/20,0	1,16±0,01/25,4	1,06±0,00/31,8	0,97±0,01/38,0	0,73±0,02/53,8
<i>C. oleophila</i>	L17		1,95±0,00/0	1,90±0,00/4,1	1,81±0,00/8,9	1,65±0,00/16,9	1,31±0,00/34,6	1,05±0,00/47,9	0,63±0,01/69,1	0,24±0,02/89,2
<i>P. guilliermondii</i>	L22-3		1,66±0,01/0	1,57±0,01/7,3	1,45±0,03/14,7	1,34±0,02/21,4	1,23±0,02/27,9	1,09±0,03/36,1	0,97±0,01/43,7	0,65±0,03/62,7
<i>R. toruloides</i>	L56-1		0,97±0,04/0	0,76±0,02/24,5	0,65±0,04/36,5	0,51±0,01/50,3	0,47±0,01/55,6	0,35±0,01/67,3	0,26±0,00/76,7	0,21±0,00/81,8

**Tabela 14 Ensaio de tolerância ao As (V) pelas leveduras (continuação)**

		Densidades ópticas médias/ Percentuais de reduções de crescimentos (%)								
Espécies	Isolados	Limites de tolerância	Concentrações de As (V) mM							300
			0	10	25	50	100	150	200	
<i>C. boidinii</i>	L3	200 mM de As	1,42±0,01/0	0,88±0,00/40,0	0,64±0,01/57,3	0,31±0,00/80,5	0,15±0,00/91,3	0,10±0,00/95,3	0,07±0,01/97,0	
<i>Ac.strictum</i>	L06-2		1,51±0,00/0	1,10±0,00/29,5	0,89±0,00/43,4	0,48±0,01/70,4	0,19±0,00/89,7	0,12±0,00/93,9	0,09±0,01/96,2	
<i>Rh. mucilaginosa</i>	L08-1		0,96±0,03/0	0,86±0,00/13,8	0,80±0,00/19,4	0,66±0,00/33,9	0,53±0,00/47,6	0,22±0,03/79,8	0,07±0,02/95,4	
<i>Rh. mucilaginosa</i>	L08-2		0,82±0,01/0	0,81±0,00/5,6	0,80±0,00/6,2	0,75±0,04/12,4	0,65±0,02/24,4	0,23±0,02/76,0	0,14±0,00/87,1	
<i>C. blatae</i>	L43-1		0,93±0,02/0	0,64±0,03/34,6	0,55±0,01/44,1	0,22±0,02/79,2	0,16±0,02/86,4	0,12±0,01/90,8	0,08±0,01/94,8	
<i>R. toruloides</i>	L23-3		0,95±0,03/0	0,78±0,01/20,9	0,64±0,01/35,5	0,51±0,01/49,1	0,47±0,01/54,0	0,21±0,01/81,3	0,06±0,02/96,5	
<i>C. cylindracea</i>	L49		0,66±0,03/0	0,38±0,00/47,6	0,22±0,02/70,7	0,16±0,01/80,8	0,13±0,01/85,6	0,09±0,00/90,2	0,08±0,00/91,8	
<i>T.asahii</i>	L46		0,87±0,00/0	0,77±0,01/14,7	0,62±0,01/32,0	0,53±0,02/42,9	0,20±0,00/81,0	0,14±0,00/87,5	0,07±0,00/95,4	
<i>C. palmioleophila</i>	L51-1		1,65±0,00/0	0,98±0,01/42,3	0,63±0,01/63,8	0,50±0,00/71,2	0,48±0,01/72,7	0,11±0,01/95,3	0,07±0,00/97,6	
<i>R. toruloides</i>	L64		1,10±0,04/0	0,84±0,03/26,6	0,65±0,02/43,8	0,50±0,00/56,9	0,37±0,02/69,2	0,25±0,03/79,6	0,17±0,00/87,0	
<i>P. kluyveri</i>	L22-1		1,14±0,02/0	0,97±0,02/18,1	0,86±0,02/27,6	0,79±0,01/33,7	0,23±0,01/82,9	0,14±0,04/90,3		
<i>R. paludigenum</i>	L23-1		0,86±0,03/0	0,74±0,02/17,0	0,66±0,02/27,0	0,58±0,01/36,3	0,41±0,01/55,3	0,14±0,03/87,0		
<i>R. toruloides</i>	L23-2		0,85±0,03/0	0,75±0,03/15,0	0,63±0,00/28,8	0,53±0,00/41,4	0,34±0,02/63,7	0,14±0,03/87,2		
<i>C. palmioleophila</i>	L24-2		0,96±0,03/0	0,74±0,02/25,9	0,64±0,03/36,1	0,55±0,03/45,9	0,23±0,01/79,10	0,11±0,01/91,8		
<i>H. uvarum</i>	L24-3		1,04±0,01/0	0,81±0,00/24,8	0,68±0,00/37,8	0,57±0,00/47,6	0,25±0,00/78,5	0,11±0,00/92,4		
<i>C. palmioleophila</i>	L30-2		0,95±0,00/0	0,64±0,02/35,6	0,55±0,03/45,4	0,46±0,03/55,2	0,27±0,01/74,7	0,11±0,00/92,0		
<i>P. kluyveri</i>	L39	1,03±0,01/0	0,55±0,02/48,8	0,47±0,03/57,2	0,31±0,00/72,2	0,22±0,01/81,6	0,11±0,00/91,8			
<i>C. natalensis</i>	L40	1,32±0,00/0	0,99±0,00/26,9	0,67±0,01/51,3	0,55±0,01/60,5	0,25±0,02/83,3	0,13±0,03/92,3			
<i>C. oleophila</i>	L41	0,96±0,03/0	0,74±0,03/26,7	0,53±0,01/47,9	0,21±0,00/81,1	0,11±0,01/92,0	0,08±0,00/94,3			
<i>C. pseudointermedia</i>	L45-1	0,95±0,00/0	0,54±0,01/46,6	0,47±0,01/53,7	0,34±0,01/67,4	0,23±0,02/79,3	0,07±0,01/95,4			
<i>C. tropicalis</i>	L70-1	1,05±0,01/0	0,51±0,02/51,5	0,47±0,03/55,6	0,31±0,00/72,2	0,22±0,01/81,6	0,11±0,00/91,8			

**Tabela 14 Ensaio de tolerância ao As (V) pelas leveduras (continuação)**

Densidades ópticas médias/Percentuais de reduções de crescimentos (%)						
Espécies	Isolados	Limite de tolerância	Concentrações de As (mM)			
			0	10	25	50
<i>Rh. mucilaginosa</i>	L09	50 mM de As	1,07±0,02/0	0,77±0,02/30,7	0,34±0,02/71,3	0,16±0,03/88,1
<i>A. pullulans</i>	L12-1		0,34±0,02/0	0,24±0,01/35,8	0,17±0,02/59,4	0,08±0,00/85,4
<i>D. hansenii</i>	L14-1		0,96±0,02/0	0,74±0,00/26,3	0,44±0,01/57,1	0,21±0,00/81,2
<i>A. pullulans</i>	L16-1		1,06±0,00/0	0,83±0,03/24,1	0,50±0,00/55,4	0,26±0,01/78,0
<i>A. pullulans</i>	L16-2		1,50±0,00/0	0,65±0,01/58,9	0,25±0,01/85,04	0,15±0,01/91,8
<i>G. klebahnii</i>	L19		0,63±0,00/0	0,45±0,03/33,1	0,30±0,00/56,8	0,26±0,01/64,4
<i>C. diversa</i>	L24-4		0,74±0,01/0	0,65±0,03/16,3	0,22±0,02/73,6	0,14±0,00/85,3
<i>C. diversa</i>	L24-5		1,09±0,03/0	0,85±0,01/24,1	0,43±0,02/63,0	0,11±0,01/92,5
<i>I. occidentalis</i>	L25-1		1,25±0,02/0	1,01±0,01/17,1	0,82±0,00/36,6	0,15±0,02/90,3
<i>I. occidentalis</i>	L25-2		1,05±0,00/0	0,86±0,00/20,7	0,55±0,02/50,3	0,28±0,00/75,8
<i>K. ohmeri</i>	L26		1,15±0,01/0	0,97±0,00/18,4	0,87±0,02/27,0	0,35±0,03/72,5
<i>C. palmiophila</i>	L29-1		0,86±0,03/0	0,64±0,02/29,9	0,24±0,03/75,4	0,06±0,00/96,1
<i>C. intermedia</i>	L31-2		1,23±0,01/0	0,75±0,04/41,1	0,23±0,01/83,7	0,15±0,03/90,6
<i>C. parapsilosis</i>	L33		1,07±0,02/0	0,70±0,00/37,1	0,58±0,01/48,6	0,36±0,02/69,2
<i>P. pastoris</i>	L43-2		0,61±0,00/0	0,22±0,00/69,1	0,13±0,01/83,0	0,06±0,01/94,6
<i>C. palmiophila</i>	L48		2,23±0,02/0	1,27±0,01/44,3	1,15±0,00/49,8	0,32±0,01/87,1
<i>C. palmiophila</i>	L51-2		1,11±0,01/0	0,24±0,00/81,5	0,14±0,02/89,9	0,07±0,00/96,0
<i>A. pullulans</i>	L84-2		0,65±0,00/0	0,46±0,01/32,8	0,33±0,02/53,2	0,17±0,02/77,6

**Tabela 14 Ensaio de tolerância ao As (V) pelas leveduras (continuação)**

Espécies	Isolados		0	10	25
<i>H. uvarum</i>	L24-1	25mM	0,52±0,01/0	0,08±0,00/89,9	0,07±0,00/91,6
<i>C. intermedia</i>	L73		0,89±0,00/0	0,50±0,00/46,4	0,19±0,00/81,8
<i>C. intermedia</i>	L44-2	10 mM de As	0,33±0,00/0	0,09±0,00/80,8	
<i>Cr. luteolus</i>	L57-1		0,25±0,02/0	0,14±0,01/55,3	
<i>Candida</i> sp.	L80		0,242±0,01/0	0,112±0,00/66,12	

## 7.8 Ensaio de viabilidade celular de leveduras em presença de As (V)

Para avaliar o efeito do aumento da concentração de As (V) na viabilidade das células foram selecionados de cada uma das espécies os isolados que apresentaram os maiores limites de tolerância ao As (V). Estes foram crescidos em meio mínimo mineral acrescido de concentrações crescentes do metalóide (0, 50, 100 e 300 mM de As (V)) e quantificados em UFC/L após 48 h de incubação.

A Tabela 15 mostra a viabilidade das leveduras nos ensaios de tolerância ao As (V). Os isolados *Cr. luteolus* L57-1, *P. kluyveri* L39, *P. pastoris* L43-2 permaneceram viáveis apenas em meio líquido sem As (V).

Os isolados *A. pullulans* L12-1, *G. klebahnii* L19, *I. occidentalis* L25-1 e *K. ohmeri* L26 permaneceram viáveis após incubação em meio líquido acrescido de As (V) até a concentração de 50 mM de As (V).

Os isolados *Ac. strictum* L4, *C. blattae* L43-1, *C. boidinii* L3, *C. cylindracea* L21, *C. diversa* L24-4, *C. intermedia* L31-1, *C. oleophila* L16-3, *C. palmioleophila* L24-2, *C. parapsilosis* L34, *C. pseudointermedia* L45-1, *Candida* sp. L5-1, *C. tropicalis* L70-1, *D. hansenii* L14-2, *H. uvarum* L2, *P. guilliermondii* L5-2, *Rh. mucilaginosa* L8-1 e *T. asahii* L46 permaneceram viáveis após incubação em meio líquido acrescido de As (V) até a concentração de 100 mM de As (V).

O isolado *R. toruloides* L56-1 foi o único que permaneceu viável após o ensaio de tolerância em meio líquido acrescido de As (V) até a concentração de 300 mM de As (V).

As menores reduções nas densidades celulares (10 vezes) foram observadas nos isolados *Ac. strictum* L4, *A. pullulans* L12-1, *C. boidinii* L3, *C. intermedia* L31-1, *C. pseudointermedia* L45-1, *G. klebahnii* L19, *I. occidentalis* L25-1, *K. ohmeri* L26, *R. toruloides* L56-1, *Rh. mucilaginosa* L8-1 e *T. asahii* L46. Estas reduções nas densidades celulares são explicadas pelo efeito tóxico do As (V) ser cada vez maior com o aumento da concentração do mesmo.

Ao relacionarem-se os dados do ensaio de tolerância ao As (V) com os dados do ensaio de viabilidade para os isolados analisados neste último, observa-se que o isolado *P. kluyveri* L39 apresentou uma redução de crescimento de 72,2% na concentração de 50 mM no ensaio de tolerância e que nesta mesma concentração as células morreram no ensaio de viabilidade, o que revela um efeito fungicida do arsênio nesta concentração.



Todos os outros isolados apresentaram reduções de crescimento medidas de maneira indireta pelas reduções de densidades ópticas nos ensaios de tolerância e medidas de maneira direta pelas reduções de densidades celulares apresentadas nos ensaios de viabilidade com o aumento da concentração de As (V). Esta relação parece indicar uma confiabilidade na metodologia utilizada para verificação de influência da exposição às concentrações crescentes de arsênio sobre o crescimento de levedura.

**Tabela 15 Viabilidade de leveduras em ensaios de tolerância ao As (V)**

Espécie	Isolado	Concentração mM de As (V)	Tempo 0 h (UFC/mL)	Tempo 48 h (UFC/L)
<i>Ac. strictum</i>	L4	0	$3,4 \times 10^6$	$6,2 \times 10^8$
		50	$3,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^8$
		100	$3,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$
		300	$3,5 \times 10^6$	0
<i>A. pullulans</i>	L12-1	0	$2,5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^8$
		50	$2,3 \times 10^6$	$5,1 \times 10^7$
		100	$2,1 \times 10^6$	0
		300	$2,2 \times 10^6$	0
<i>C. blattae</i>	L43-1	0	$2,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^8$
		50	$2,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^7$
		100	$2,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6$
		300	$2,1 \times 10^5$	0
<i>C. boidinii</i>	L3	0	$3,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^8$
		50	$3,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^8$
		100	$3,2 \times 10^6$	$6,6 \times 10^7$
		300	$3,3 \times 10^6$	0
<i>C. cylindracea</i>	L21	0	$2,7 \times 10^5$	$5,4 \times 10^8$
		50	$2,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^7$
		100	$2,2 \times 10^5$	$4,4 \times 10^6$
		300	$2,3 \times 10^5$	0
<i>C. diversa</i>	L24-4	0	$3,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^8$
		50	$3,4 \times 10^6$	$6,8 \times 10^7$
		100	$3,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$
		300	$3,1 \times 10^6$	0
<i>C. intermedia</i>	L31-2	0	$2,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^9$
		50	$2,7 \times 10^6$	$6,2 \times 10^8$
		100	$2,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^8$
		300	$2,5 \times 10^6$	0

**Tabela 15 Viabilidade de leveduras em ensaios de tolerância ao As (V)  
(continuação)**

Espécie	Isolado	Concentração mM de As (V)	Tempo 0 h (UFC/mL)	Tempo 48 h (UFC/L)
<i>C. oleophila</i>	L16-3	0	$9,5 \times 10^5$	$8,9 \times 10^8$
		50	$8,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^7$
		100	$6,3 \times 10^5$	$8,5 \times 10^6$
		300	$6,2 \times 10^5$	0
<i>C. palmioleophila</i>	L24-2	0	$5,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$
		50	$5,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^8$
		100	$6,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
		300	$4,6 \times 10^6$	0
<i>C. parapsilosis</i>	L34	0	$1,3 \times 10^7$	$4,7 \times 10^9$
		50	$1,2 \times 10^7$	$7,1 \times 10^8$
		100	$1,3 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
		300	$9,5 \times 10^6$	0
<i>C. pseudointermedia</i>	L45-1	0	$3,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^8$
		50	$2,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^8$
		100	$2,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$
		300	$2,3 \times 10^6$	0
<i>Candida</i> sp.	L5-1	0	$2,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^8$
		50	$2,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^7$
		100	$2,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
		300	$2,4 \times 10^6$	0

**Tabela 15 Viabilidade de leveduras em ensaios de tolerância ao As (V)  
(continuação)**

Espécie	Isolado	Concentração mM de As (V)	Tempo 0 h (UFC/mL)	Tempo 48 h (UFC/L)
<i>C. tropicalis</i>	L70-1	0	$2,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$
		50	$2,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
		100	$2,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
		300	$2,9 \times 10^6$	0
<i>Cr. luteolus</i>	L57-1	0	$6,1 \times 10^6$	$8,2 \times 10^7$
		50	$5,1 \times 10^6$	0
		100	$4,6 \times 10^6$	0
		300	$4,8 \times 10^6$	0
<i>D. hansenii</i>	L14-2	0	$5,3 \times 10^6$	$7,5 \times 10^8$
		50	$5,1 \times 10^6$	$7,4 \times 10^7$
		100	$5,4 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$
		300	$5,5 \times 10^6$	0
<i>G. klebahnii</i>	L19	0	$6,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^7$
		50	$6,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$
		100	$6,1 \times 10^5$	0
		300	$6,3 \times 10^5$	0
<i>H. uvarum</i>	L2	0	$4,3 \times 10^6$	$8,0 \times 10^8$
		50	$4,2 \times 10^6$	$7,4 \times 10^7$
		100	$4,2 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$
		300	$4,1 \times 10^6$	0

**Tabela 15 Viabilidade de leveduras em ensaios de tolerância ao As (V)**  
(continuação)

Espécie	Isolado	Concentração mM de As (V)	Tempo 0 h (UFC/mL)	Tempo 48 h (UFC/L)
<i>I. occidentalis</i>	L25-1	0	$3,1 \times 10^6$	$6,5 \times 10^8$
		50	$3,3 \times 10^6$	$6,6 \times 10^7$
		100	$3,0 \times 10^6$	0
		300	$3,2 \times 10^6$	0
<i>K. ohmeri</i>	L26	0	$2,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^8$
		50	$2,0 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$
		100	$2,2 \times 10^6$	0
		300	$2,1 \times 10^6$	0
<i>P. guilliermondii</i>	L5-2	0	$3,5 \times 10^5$	$6,1 \times 10^8$
		50	$3,3 \times 10^5$	$6,3 \times 10^7$
		100	$3,4 \times 10^5$	$6,7 \times 10^6$
		300	$3,1 \times 10^5$	0
<i>P. kluyveri</i>	L39	0	$6,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^7$
		50	$5,7 \times 10^6$	0
		100	$4,5 \times 10^6$	0
		300	$4,8 \times 10^6$	0
<i>P. pastoris</i>	L43-2	0	$2,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^8$
		50	$2,8 \times 10^6$	0
		100	$2,5 \times 10^6$	0
		300	$2,7 \times 10^6$	0

**Tabela 15 Viabilidade de leveduras em ensaios de tolerância ao As (V)  
(continuação)**

Espécie	Isolado	Concentração mM de As (V)	Tempo 0 h (UFC/mL)	Tempo 48 h (UFC/L)
<i>R. toruloides</i>	L56-1	0	$3,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$
		50	$2,0 \times 10^6$	$7,4 \times 10^7$
		100	$4,0 \times 10^6$	$6,7 \times 10^7$
		300	$3,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^7$
<i>Rh. mucilaginosa</i>	L8-1	0	$4,8 \times 10^6$	$5,1 \times 10^8$
		50	$4,6 \times 10^6$	$4,2 \times 10^8$
		100	$4,4 \times 10^6$	$6,2 \times 10^7$
		300	$3,8 \times 10^6$	0
<i>T. asahii</i>	L46	0	$1,4 \times 10^6$	$5,1 \times 10^7$
		50	$1,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$
		100	$2,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
		300	$9,0 \times 10^6$	0

## 7.9 Dosagens de resíduos sulfidrílicos totais

Alguns compostos envolvidos nas respostas celulares de leveduras ao estresse oxidativo causado por As são ricos em resíduos sulfidrílicos, como exemplo de tais compostos, pode-se citar a glutathiona. Estes compostos celulares podem ser quantificados pela dosagem de resíduos sulfidrílicos totais por meio de leitura espectrofotométrica, os quais podem fornecer indícios sobre as respostas celulares ao estresse oxidativo causado por As apresentadas pelas leveduras (DEMASI *et al.*, 2006, COSTAMOREIRA, 2007). Neste trabalho foram selecionados dois isolados de leveduras, uma ascomicética e a outra basiodiomycética, que apresentaram tolerância a As (V) de até 300 mM para dosagem de resíduos sulfidrílicos totais e investigação das respostas celulares ao As (V).

Os resultados apresentados na Figura 13a mostram que a levedura *R. toruloides* L56-1 após exposição a 1 mM de As (V) aumentou significativamente ( $p=0,002$ ) os níveis dos resíduos sulfidrílicos totais em cerca de 130% em relação ao controle, passando de 0,31  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína para 0,72  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. Entretanto, quando exposta a 5 mM, houve uma redução significativa ( $p=0,002$ ) dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais em cerca de 45% em relação ao controle, passando de 0,31  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína/ para 0,17  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína.

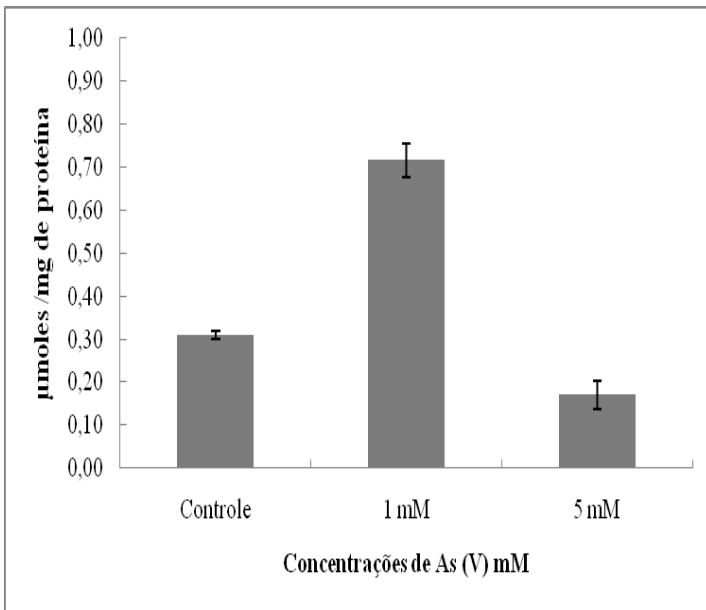
O aumento dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais em *R. toruloides* L56-1 quando exposta a 1 mM de As (V) pode ser explicado pelo fato de que algumas leveduras quando expostas a baixas concentrações de metais ou metalóides, podem aumentar sua tolerância pela indução de mecanismos de defesa, como as defesas antioxidantes não-enzimáticas, reveladas por um aumento da concentração de grupos tióis livres. O As (V) reage com os grupos tióis intracelulares, como cisteína e glutathiona, levando ao estresse oxidativo indireto por monopolizar as defesas contra os radicais livres gerados pelo metabolismo celular. A glutathiona reduzida (GSH) é o principal reservatório de grupos tióis não protéico (NOCTOR, 2006), e a disponibilidade de GSH é importante na redução de As (V) tanto quanto no transporte de As (III) para os vacúolos (WYSOCKI *et al.*, 2003).

Já a redução dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais em *R. toruloides* L56-1 quando exposta a 5 mM de As (V) pode ser explicada provavelmente, pelo fato que na presença de concentrações mais altas de metais ou metalóides, estes são internalizados

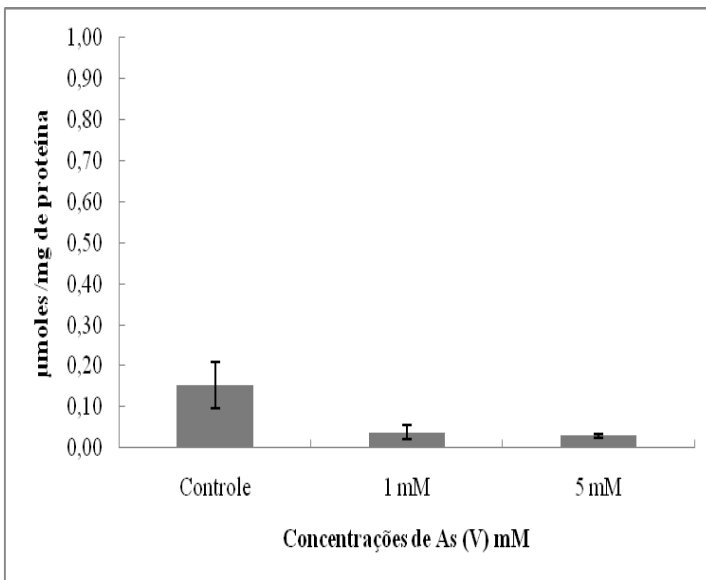
em excesso e oxidam rapidamente os compostos com grupos sulfidrílicos livres, reduzindo assim os níveis de resíduos sulfidrílicos totais.

Os resultados apresentados na Figura 13b mostram as reduções significativas ( $p=0,041$ ) em *P.guilliermondii* L5-2 dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais, quando exposta a 1 mM de As (V) de cerca de 75% em relação ao controle passando de 0,15  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína para 0,04  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína, e quando exposta a 5 mM de As (V) de cerca de 80% em relação ao controle passando de 0,15  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína para 0,03  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. Esta levedura apresentou 21,4% de redução de crescimento em ensaio de tolerância na concentração de 10 mM de As (V) e manteve-se viável até a concentração de 100 mM por 48h. Estes dados revelam que apesar desta levedura apresentar redução dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais nas concentrações referidas acima, ela permanece ainda viável e ativa. Este fato sugere provavelmente que talvez esta levedura possa apresentar outros mecanismos de tolerância ao As (V), como as defesas antioxidantes enzimáticas.





(a)



(b)

**Figura 14** Dosagem dos níveis de resíduos sulfidrídicos totais em: (a) *R. toruloides* L56-1 e (b) *P. guilliermondii* L5-2

## 7.10 Diversidade de fungos filamentosos isolados na região do Córrego da Mina

Um total de 105 morfotipos de fungos filamentosos foi obtido das 36 amostras coletadas na região do Córrego da Mina (Nova Lima/MG). Porém destes morfotipos, quatro não cresceram novamente após a preservação, cinco foram contaminados com outros microrganismos, o que impossibilitou a purificação dos mesmos. Para seis isolados não se obtiveram sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 de boa qualidade. As Tabelas 16, 17, 18 e 19 mostram as densidades das espécies, classe ou ordem de fungos filamentosos isolados. A partir de um total de 89 morfotipos foram identificados 27 gêneros e 51 espécies. Os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie quando apresentaram valores de identidade  $\geq 99\%$  e do mesmo gênero quando apresentaram valores entre 93% e 98% nos resultados de busca por similaridade do GenBank. Os gêneros identificados foram *Paraconiothyrium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Plectosphaerella*, *Leptosphaeria*, *Penicillium*, *Hypocrea*, *Alternaria*, *Microsphaeropsis*, *Epicoccum*, *Stemphylium*, *Rhizomucor*, *Neurospora*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Cochliobolus*, *Mucor*, *Cylindrocladiella*, *Bionectria*, *Phaeosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, *Discostroma*, *Daldinia* e *Bipolaris*. Além disso, alguns isolados foram identificados pela ordem como Pleosporales sp. e pela classe como Dothideomycetes sp. por apresentarem valores de identidade abaixo de 93% na busca por similaridade no GenBank (GARDES & BRUNS, 1995).

A ocorrência dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus* e *Fusarium*, também foi verificada por Iram e colaboradores (2009) em amostras de solos de minas contaminadas com metais pesados e arsênio em Wiesloch, na Alemanha, e de solos contaminados com esgoto doméstico e efluentes industriais em Lahore no Paquistão. A análise da comunidade eucariota metabolicamente ativa presente em efluentes ácidos provenientes de minas contaminadas com metais pesados e arsênio no norte da Califórnia (EUA) revelou a presença de fungos filamentosos pertencentes à classe Dothideomycetes, assim como no presente trabalho (BAKER et al., 2004).

A partir da análise das tabelas referidas acima se pode inferir que tanto a época de coleta quanto os pontos amostrados tiveram influência nas densidades totais, na riqueza e na abundância de espécies de fungos. As densidades totais de fungos

filamentosos nas duas primeiras coletas foram cerca de dez vezes menor em relação às contagens das duas últimas coletas. Na primeira coleta foi *Fusarium* sp. a espécie mais abundante ( $\approx 51\%$ ), já na segunda coleta *Fusarium chlamydosporum* foi a mais abundante ( $\approx 55\%$ ), na terceira coleta *Microdochium* sp. a foi a espécie mais abundante ( $36\approx\%$ ) e *Cladosporium sphaerospermum* foi a mais abundante na quarta coleta ( $\approx 16\%$ ).

A maioria das espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras coletadas neste trabalho são encontradas normalmente associadas às plantas e amplamente distribuídas em diferentes solos, o que sugere que estes fungos presentes nestes corpos d' água sejam provenientes de matéria orgânica alóctone (SHEARER et al., 2006).

As análises comparativas das coletas usando o índice Shannon-Wiener ( $H'$ ) e a riqueza de espécies ( $S$ ) estão na Tabela 14. A terceira e a quarta coletas apresentaram os maiores índices de Shannon-Wiener ( $H'$ ), também foi observado o maior valor (19) de riqueza para ambas. Quando se compara a riqueza de espécies de leveduras à de fungos nas quatro coletas, observa-se um padrão diferente, o que sugere que as leveduras e fungos filamentosos respondem diferentemente as variações ambientais provocadas pelas mudanças climáticas.

Para avaliar o efeito da distribuição espacial na riqueza de espécies foram feitas análises considerando apenas os pontos de coleta. Ao analisarem-se os índices de Shannon-Wiener ( $H'$ ) obtidos nos três pontos (Tabela 15), observa-se que estes apresentaram valores semelhantes, porém os pontos 1 e 2 apresentaram valores de riqueza maiores. Talvez os fungos filamentosos sejam menos tolerantes a poluição decorrente do despejo de esgotos domésticos, industriais e efluentes de mineração presente no ponto 3, o que pode ser refletido na menor riqueza de espécies encontrada neste ponto.

### 7.11 Ensaios de tolerância ao As (V) pelos fungos filamentosos

Os isolados representantes das diferentes espécies/gêneros foram submetidos ao ensaio de tolerância ao arseniato em meio YM sólido acrescido de arseniato de sódio em concentrações crescentes (0, 50, 100, 150 e 300 mM de As (V)) e os resultados foram apresentados na Tabela 16. Observou-se que: 45 isolados (aproximadamente 51% dos isolados) cresceram apenas em meio sólido não acrescido de arseniato (Anexo A); 13 isolados (aproximadamente 15% dos isolados) cresceram até o limite de 50 mM de As (V); 10 isolados (aproximadamente 11% dos isolados) cresceram até o limite de 100 mM de As (V); 12 isolados (aproximadamente 13% dos isolados) cresceram até o limite de 150 mM de As (V) e nove isolados (aproximadamente 10% dos isolados) cresceram até o limite de 300 mM. A resistência microbiana às diferentes espécies de arsênio é disseminada na natureza, mas as resistências às concentrações de As (V) maiores que 100 mM são consideradas muito altas (JACKSON et al., 2005).

Dentre os isolados que cresceram em meio sólido acrescido de 300 mM de As (V), os isolados *Plectosphaerella cucumerina* UFMG CB 3426 e *Rhizomucor variabilis* UFMG CB 3455 apresentaram os menores percentuais de redução de crescimento, respectivamente, 39,09% e 55,84%. Esta concentração é cerca de 30 vezes maior do que aquela suportada por microrganismos de referência como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*, e 300 vezes maior do que aquela tolerada por *Aspergillus niger* (CÁNOVAS et al., 2002).

Este comportamento foi descrito em estudo realizado por Cernansky e colaboradores (1997). Os autores selecionaram um isolado do fungo filamentoso microscópico da espécie *Neosartorya fischeri* para ensaio de tolerância aos As(III) e As (V) nas concentrações de 0,05 mM, 0,1 mM e 0,5 mM. Ambos, arsênio trivalente e pentavalente reduziram o crescimento radial do fungo somente na concentração de 0,5 mM, e os efeitos sobre crescimento usando 0,05 mM, 0,1 mM de arsênio foram muito similares aos obtidos com os controles sem adição de arsênio aos meios. Estes resultados obtidos pelos autores mostram que o isolado fúngico utilizado pelos mesmos é muito mais sensível ao As (V) quando comparado aos isolados tolerantes do presente trabalho.

**Tabela 16 Densidades e abundâncias relativas de espécies de fungos filamentosos da primeira coleta**

Espécies	Ponto 1 (UFC/L)	Ponto 2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>Alternaria tenuissima</i>	3,0 x 10 <sup>3</sup>			3,0 x 10 <sup>3</sup> - (1,0)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5,2 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup> - (3,8)
<i>Cladosporium</i> sp.	4,2 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>		5,9 x 10 <sup>4</sup> - (20,2)
<i>Curvularia</i> sp.	1,7 x 10 <sup>3</sup>			1,7 x 10 <sup>3</sup> - (0,7)
<i>Epicoccum</i> sp.	4,0 x 10 <sup>3</sup>	3, 5 x 10 <sup>3</sup>		7,5 x 10 <sup>3</sup> - (2,7)
<i>Fusarium</i> sp.	7,2 x 10 <sup>4</sup>	2,9x 10 <sup>4</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup> - (51,4)
<i>Hypocrea lixii</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup>		7,0 x 10 <sup>3</sup> - (2,4)
<i>Leptosphaeria</i> sp.	3,2 x 10 <sup>3</sup>	3,5 x 10 <sup>3</sup>		6,8 x 10 <sup>3</sup> - (2,4)
<i>Microsphaeropsis</i> sp.		2,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup> - (1,4)
<i>Mucor racemosus</i>	2,5x 10 <sup>3</sup>	3,4 x 10 <sup>3</sup>	1,6 x 10 <sup>3</sup>	7,5 x 10 <sup>3</sup> - (2,7)
<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>		9,0 x 10 <sup>3</sup>		9,0 x 10 <sup>3</sup> - (3,1)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1,6 x 10 <sup>4</sup>	2,3 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup> - (4,5)
<i>Penicillium</i> sp.		3,0 x 10 <sup>3</sup>		3,0 x 10 <sup>3</sup> - (1,0)
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>			3,5x 10 <sup>3</sup>	3,5 x 10 <sup>3</sup> - (1,4)
Pleosporales sp.		2,2 x 10 <sup>3</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>	4,3 x 10 <sup>3</sup> - (1,4)
Densidade total por ponto	1,5 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	4,1 x 10 <sup>5</sup>
Riqueza de species por ponto	10	12	7	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta

**Tabela 17 Densidades e abundâncias relativas de espécies de fungos filamentosos da segunda coleta**

Espécies	Ponto 1 (UFC/L)	Ponto 2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>Alternaria alternate</i>	9,4 x 10 <sup>3</sup>	2,7 x 10 <sup>3</sup>		1,2 x 10 <sup>4</sup> - (4,4)
<i>Alternaria</i> sp.	5,4 x 10 <sup>3</sup>	5,6 x 10 <sup>3</sup>	6, 2 x 10 <sup>3</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup> - (6,2)
<i>Amylomyces rouxii</i>	6,5 x 10 <sup>3</sup>			6,5 x 10 <sup>3</sup> - (2,6)
<i>Aspergillus</i> sp.	8,0 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup> - (6,6)
<i>C. cladosporioides</i>	4,2 x 10 <sup>3</sup>	3,3 x 10 <sup>3</sup>		7,5 x 10 <sup>3</sup> - (2,9)
<i>Cladosporium</i> sp.	2,5 x 10 <sup>3</sup>	3,2 x 10 <sup>3</sup>		5,7 x 10 <sup>3</sup> - (2,2)
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	6,5 x 10 <sup>4</sup>	7,3 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup> - (54,9)
<i>Leptosphaeria</i> sp.	2,0 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>		3,5 x 10 <sup>3</sup> - (1,5)
<i>Neurospora discrete</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	4,2 x 10 <sup>3</sup>	8,2 x 10 <sup>3</sup> - (2,9)
<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	6,3 x 10 <sup>3</sup>	6,5 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup> - (5,1)
Pleosporales sp.		5, 0 x 10 <sup>3</sup>		5,0 x 10 <sup>3</sup> - (1,8)
<i>Rhizomucor variabilis</i>	7,4 x 10 <sup>3</sup>		1,4 x 10 <sup>3</sup>	8,8 x 10 <sup>3</sup> - (3,3)
<i>Stemphylium</i> sp.	5,5 x 10 <sup>3</sup>	4,2 x 10 <sup>3</sup>	5,8 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>4</sup> - (5,5)
Densidade total por ponto	6,8 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup>
Riqueza de species por ponto	12	11	7	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta

**Tabela 18 Densidades e abundâncias relativas de espécies de fungos filamentosos da terceira coleta**

Espécies	Ponto1 (UFC/L)	Ponto 2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>Bionectria ochroleuca</i>			6,0 x10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup> - (3,0)
<i>C. cladosporioides</i>	7,1 x 10 <sup>4</sup>	6,5 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup> - (7,5)
<i>Cochliobolus homomorphus</i>	3,0 x 10 <sup>4</sup>			3,0 x 10 <sup>4</sup> - (1,5)
<i>Curvularia intermedia</i>	3,4 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>		4,5 x 10 <sup>4</sup> - (2,2)
<i>Curvularia. sp.</i>	2,6 x 10 <sup>4</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup>	6,6 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup> - (6,5)
<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	2,4 x10 <sup>4</sup>	2,6 10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup> - (3,5)
<i>Dothideomycetes sp.</i>	1,2 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>		8,2 x 10 <sup>4</sup> - (4,1)
<i>Epicoccum nigrum</i>		4,4 x 10 <sup>4</sup>		4,4 x 10 <sup>4</sup> - (2,2)
<i>F. chlamydosporum</i>	5,5 x 10 <sup>4</sup>			5,5 x 10 <sup>4</sup> - (2,7)
<i>F. oxysporum</i>	1,5 x 10 <sup>4</sup>			1,5 x 10 <sup>4</sup> - (0,7)
<i>Fusarium. sp.</i>	7,0 x 10 <sup>4</sup>			7,0 x 10 <sup>4</sup> - (3,5)
<i>H. lixii</i>	5,0 x 10 <sup>4</sup>	3,6 x10 <sup>4</sup>	7,2 x10 <sup>4</sup>	1,6 x 10 <sup>5</sup> - (8,0)
<i>Leptosphaeria sp.</i>		3,5 x 10 <sup>4</sup>		3,5 x 10 <sup>4</sup> - (1,7)
<i>Microdochium sp.</i>			7,3 x 10 <sup>4</sup>	7,3 x 10 <sup>5</sup> - (36,4)
<i>Mucor circinelloides</i>	2,7 x 10 <sup>4</sup>		1,4 x 10 <sup>4</sup>	4,1 x 10 <sup>4</sup> - (2,0)
<i>Pestalotiopsis. sp.</i>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	3,1 x 10 <sup>4</sup>	3, 0 x 10 <sup>4</sup>	7,2 x 10 <sup>4</sup> - (3,6)
<i>Phaeosphaeria oryzae</i>			4,4 x 10 <sup>4</sup>	4,4 x 10 <sup>4</sup> - (2,2)
<i>Phaeosphaeria sp.</i>	5,3 x10 <sup>4</sup>		8,1 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup> - (6,5)
<i>Rhizomucor sp.</i>	3,0 x 10 <sup>4</sup>		1,3 x 10 <sup>4</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup> - (2,1)
Densidade total por ponto	5,1 x 10 <sup>5</sup>	3,6 x 10 <sup>5</sup>	4,8 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>
Riqueza de espécies por ponto	14	10	11	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta

**Tabela 19 Densidades e abundâncias relativas de espécies de fungos filamentosos da quarta coleta**

Espécies	Ponto1 (UFC/L)	Ponto 2 (UFC/L)	Ponto 3 (UFC/L)	Densidade total por coleta - (%) <sup>b</sup>
<i>Bipolaris</i> sp.	3,5 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	7,3 x 10 <sup>3</sup> - (0,7)
<i>C. cladosporioides</i>	3,6 x 10 <sup>4</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>	5,9 x 10 <sup>4</sup> - (6,0)
<i>C. perangustum</i>	4,2 x 10 <sup>4</sup>		4,3 x 10 <sup>4</sup>	8,5 x 10 <sup>4</sup> - (8,7)
<i>Cladosporium</i> . sp.		1,1 x 10 <sup>4</sup>	6,4 x 10 <sup>4</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup> - (7,6)
<i>C. sphaerospermum</i>	3,5 x 10 <sup>4</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup>	5, 5 x 10 <sup>4</sup>	1,6 x 10 <sup>5</sup> - (16,3)
<i>Curvularia sichuanensis</i>	4,6 x 10 <sup>3</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup> - (1,0)
<i>Daldinia placentiformis</i>	1,5 x 10 <sup>3</sup>		1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>3</sup> - (0,3)
<i>Discostroma fuscillum</i>	2,4 x 10 <sup>3</sup>		9,1 x 10 <sup>4</sup>	9,3 x 10 <sup>4</sup> - (9,5)
Dothideomycetes sp.	2,4 x 10 <sup>3</sup>		1,9 x 10 <sup>3</sup>	4,3 x 10 <sup>3</sup> - (0,4)
<i>F. chlamydosporum</i>	3,1 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup> - (15,3)
<i>Leptosphaeria</i> . sp.	5,1 x 10 <sup>3</sup>	4,4 x 10 <sup>3</sup>		9,5 x 10 <sup>3</sup> - (1,0)
<i>M. circinelloides</i>			1,8 x 10 <sup>4</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup> - (1,8)
<i>Penicillium dipodomycicola</i>	1,5 x 10 <sup>4</sup>	5, 3 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>4</sup>	8,0 x 10 <sup>4</sup> - (8,1)
<i>Pestalotipsis clavispora</i>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	7,2 x 10 <sup>3</sup>	4,3 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>4</sup> - (1,6)
<i>Pestalotipsis palmarum</i>		1,3 x 10 <sup>3</sup>		1,3 x 10 <sup>3</sup> - (0,1)
<i>Phoma multirostrata</i>		8,3 x 10 <sup>4</sup>		8,3 x 10 <sup>4</sup> - (8,5)
<i>Phoma</i> sp.		5,2 x 10 <sup>4</sup>		5,2 x 10 <sup>4</sup> - (5,3)
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	2,4 x 10 <sup>3</sup>	6,3 x 10 <sup>4</sup>		6,5 x 10 <sup>4</sup> - (6,6)
<i>Rhizomucor variabilis</i>			1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup> - (1,1)
Densidade total por ponto	1,5 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>	4,8 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>
Riqueza de species por ponto	14	14	15	

<sup>b</sup> Abundância relativa de espécie por coleta



**Tabela 20 Índice de diversidade de fungos filamentosos por coleta**

Índices	Coletas			
	1	2	3	4
Shannon $H'$	1,7 (1,4/2,1) <sup>a</sup>	1,8 (1,6/2,7)	2,4 (2,1/2,7)	2,5 (2,0/3,0)
Riqueza $S$	15	13	19	19

<sup>a</sup> Os números em parêntesis representam os valores inferiores e superiores dos índices de diversidade, com intervalo de confiança de 95% e valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 interações.

**Tabela 21 Índice de diversidade de fungos filamentosos por ponto**

Índices	Pontos		
	1	2	3
Shannon $H'$	3,0 (2,8/3,1) <sup>a</sup>	3,0 (2,8/3,1)	2,9 (2,9/3,1)
Riqueza $S$	36	34	33

<sup>a</sup> Os números em parêntesis representam os valores inferiores e superiores dos índices de diversidade, com intervalo de confiança de 95% e valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 interações.

Neste trabalho os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram capazes de crescer em meio sólido acrescido de As até a concentração de 100 mM de As (V). Cánovas e colaboradores (2002) em estudo realizado com o fungo filamentoso *Aspergillus* sp. P37, obtido a partir de amostras de água do rio Tinto na Espanha, observaram que o mesmo foi capaz crescer até uma concentração de 200 mM de As (V), porém deve-se destacar que os meios sólidos usados pelos autores foram diferentes daqueles usados no presente trabalho. Este rio possui alta acidez e altas concentrações de metais pesados e metalóides (As, Cu, Cr e Zn), sendo considerado um ambiente extremo.

Uma vez que trabalhos sobre a tolerância ao As (V) pelos fungos filamentosos são escassos na literatura e como já foi discutido no item 6.7 pode-se observar que a tolerância ao As (V) varia também entre os clados leveduras, fungos filamentosos e bactérias, e também dentro de suas espécies e linhagens. A maioria dos fungos filamentosos do presente trabalho apresentaram baixa tolerância ao As (V); Huysmans e Frankenberger (1990) isolaram bactérias resistentes ao arsênio a partir de águas drenadas de plantações agrícolas e sedimentos de poços. Os autores também observaram as baixas tolerâncias de seus isolados, refletidas pelas diminuições das densidades celulares, quando as concentrações de As (III) foram maiores que 0,013 mM.

Por outro lado, os fungos que apresentaram tolerância até 300 mM de As (V) no presente trabalho, apresentaram a mesma faixa de tolerância ao As (V) relatada por Mateos e colaboradores (2006), para os isolados bacterianos *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 e *C. glutamicum* ATCC 13869.

**Tabela 22 Ensaio de tolerância ao As (V) pelos fungos filamentosos**

Espécies	Isolados UFMG CB	Diâmetros médios (mm)/Percentuais de reduções de crescimentos(%)				
		Concentrações de As (V) (mM)				
		0	50	100	150	300
<i>Pl. cucumerina</i>	3426	41,8±0,1/0	39,4±0,4/20,9	38,9±0,5/22,1	33,9±0,7/34,1	31,9±0,3/39,1
<i>C. cladosporioides</i>	3438	30,7±0,6/0	20,4±0,7/54,2	16,8±0,3/66,1	13,5±0,2/76,9	9,4±0,5/90,2
<i>R. variabilis</i>	3455	31,2±0,2/0	29,7±0,3/25,5	27,1±0,1/33,9	25,6±0,2/38,4	20,2±0,1/55,8
Pleosporales sp.	3462	32,2±0,1/0	15,4±0,2/72,2	13,4±0,1/78,3	9,6±0,3/90,0	8,6±0,5/93,2
<i>Am. rouxii</i>	3477	24,5±0,4/0	12,7±0,1/74,2	10,1±0,1/85,0	8,8±0,1/90,2	7,8±0,1/94,2
<i>M. circinelloides</i>	3509	80,5±0,1/0	70,4±0,1/20,4	20,0±0,1/83,2	12,5±0,1/92,4	10,4±0,1/96,0
<i>C. cladosporioides</i>	3524	37,9±0,2/0	23,8±0,3/54,2	16,1±0,1/74,5	11,2±0,6/87,5	9,9±0,5/90,8
<i>F. chlamydosporum</i>	3538	56,8±0,6/0	50,2±0,2/22,9	41,7±0,1/37,9	25,8±0,5/65,9	10,6±0,2/92,6
<i>P. dipodomycicola</i>	3563	48,6±0,2/0	34,2±0,1/42,8	21,5±0,3/68,9	13,8±0,7/84,8	9,6±0,5/93,4
<i>Curvularia. sp.</i>	3420	52,6±0,3/0	8,24±0,1/97,0	7,7±0,1/97,6	7,3±0,2/98,4	
<i>P. chrysogenum</i>	3428	54,7±0,3/0	46,1±0,4/27,4	34,2±0,1/49,2	7,6±0,3/96,0	
<i>F. chlamydosporum</i>	3479	80,4±0,1/	78,4±0,5/10,4	45,7±0,3/51,1	12,6±0,1/92,3	
<i>C. cladosporioides</i>	3482	80,4±0,3/0	20,1±0,1/83,0	15,6±0,3/88,6	8,6±0,1/97,2	
<i>F. oxysporum</i>	3487	80,7±0,1/0	46,7±0,1/50,1	34,8±0,1/64,9	9,1±0,1/96,6	
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	3496	64,8±0,4/0	35,8±0,5/54,6	14,9±0,2/86,9	9,5±0,3/95,2	
<i>M. circinelloides</i>	3505	80,3±0,1/0	28,6±0,2/72,3	13,1±0,1/91,6	10,1±0,1/95,4	
<i>Rhizomucor sp.</i>	3506	80,6±0,1/0	20,6±0,1/82,3	15,3±0,1/88,9	10,4±0,1/95,1	
<i>Leptosphaeria sp.</i>	3527	54,6±0,3/0	42,8±0,4/33,3	37,6±0,5/42,9	11,4±0,3/90,8	
<i>Phaeosphaeria. sp.</i>	3528	58,3±0,8/0	43,3±0,1/36,7	35,7±0,4/49,7	10,7±0,3/92,6	
<i>Microdochium sp.</i>	3529	46,2±0,1/0	34,5±0,3/39,2	21,8±0,6/66,7	9,7±0,4/92,9	
<i>Discostroma fuscillum</i>	3540	43,7±0,3/0	32,8±0,2/39,6	17,9±0,4/73,7	8,7±0,1/94,7	

**Tabela 22 Ensaio de tolerância ao As (V) pelos fungos filamentosos (continuação)**

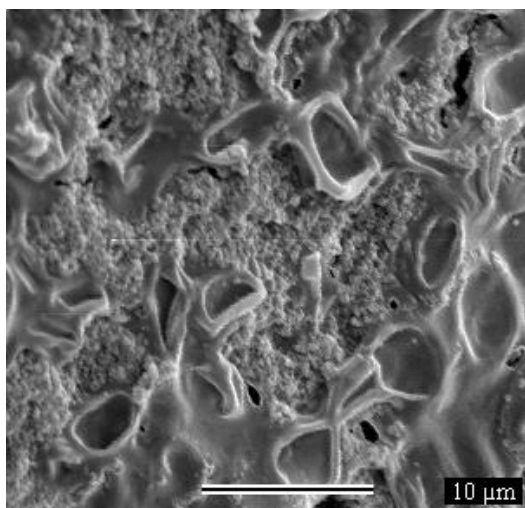
Espécies	Isolados UFMGCB	Diâmetros médios (mm)/Percentuais de reduções de crescimentos(%)				
		Concentrações de As (V) (mM)				
		0	50	100	150	300
<i>Alternaria</i> sp.	3440	25,4±0,8/0	9,9±0,3/86,2	8,5±0,3/91,8		
<i>Aspergillus</i> sp.	3481	84,4±0,1/0	32,6±0,2/68,9	15,7±0,1/89,0		
<i>Cladosporium</i> sp.	3425	62,4±0,3/0	14,8±0,3/86,5	13,4±0,5/88,8		
<i>Cy. lageniformis</i>	3511	36,2±0,1/0	12,6±0,4/82,9	8,7±0,3/93,7		
<i>E. nigrum</i>	3508	76,7±0,1/0	20,3±0,1/81,9	10,6±0,1/94,5		
<i>F. chlamydosporum</i>	3495	52,8±0,2/0	25,7±0,2/63,5	7,8±0,5/97,4		
<i>M. circinelloides</i>	3546	58,6±0,1/0	25,8±0,2/66,9	11,6±0,3/91,1		
<i>N. discrete</i>	3470	55,7±0,5/0	42,3±0,1/35,6	10,8±0,7/92,1		
<i>Po. multirostrata</i>	3536	38,7±0,3/0	16,8±0,7/73,1	7,9±0,4/96,1		
<i>Rhizomucor</i> sp.	3506	42,3±0,1/0	29,6±0,3/45,2	9,4±0,2/92,9		
<i>Bipolaris</i> sp.	3580	49,7±0,4/0	8,6±0,2/95,6			
<i>C. cladosporioides</i>	3424	29,3±0,5/0	15,6±0,3/68,6			
<i>C. perangustum</i>	3577	34,6±0,3/0	9,8±0,5/90,2			
<i>Cladosporium</i> sp.	3439	22,8±0,4/0	7,7±0,2/94,2			
<i>Cladosporium</i> sp.	3441	48,6±0,3/0	8,7±0,5/95,3			
<i>Cladosporium</i> sp.	3483	84,6±0,1/0	35,7±0,1/65,4			
<i>Cladosporium</i> sp.	3569	44,5±0,3/0	7,6±0,6/97,3			
Dothideomycetes sp.	3499	53,8±0,6/0	11,1±0,1/91,3			
<i>Fusarium</i> sp.	3423	76,8±0,1/0	17,3±0,3/85,8			
<i>Fusarium</i> sp.	3491	49,1±0,1/0	10,7±0,1/91,2			
<i>H. lixii</i>	3514	80,4±0,1/0	53,5±0,1/41,4			
<i>H. lixii</i>	3518	56,5±0,2/0	8,6±0,2/96,1			
<i>Leptosphaeria</i> sp.	3453	45,9±0,8/0	8,8±0,3/94,8			
<i>Pleosporales</i> sp.	3434	39,7±0,3/0	9,8±0,2/91,4			

## 7.12 Imobilização de leveduras em esferas macroporosas de alumina com carvão ativado

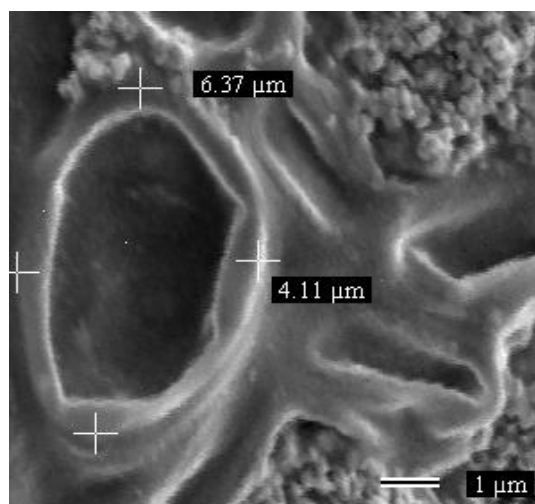
Conforme mostra a Figura 13, o processo de imobilização foi bem sucedido. Ocorre uma infiltração do meio de cultura para o interior da esfera de alumina através da estrutura de poros, possibilitando o crescimento de colônias de leveduras (veja Figura 13 a, b.) O crescimento destas colônias também ocorre na superfície da esfera (veja Figura 13c). Estas colônias de leveduras mostram estar firmemente aderidas às superfícies externas e internas das esferas, pois as mesmas permaneceram nas esferas após três lavagens com solução salina (0,85% p/v) por cerca de três minutos cada. Os mecanismos de ligação da levedura com a superfície das partículas de alumina ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, suspeita-se da atuação dos mesmos mecanismos de adsorção física e química existentes entre o arsênio e um adsorvente (YABE & OLIVEIRA, 2003; KOSMULSKI, 1996; SEN et al., 2002; ARIAS et al., 2002).

A biomassa imobilizada de *R.toruloides* L56-1 foi calculada em 0,0461 g de célula/g de esfera a partir de um teor aproximado de 9,21% de matéria orgânica presente em 0,5 g de esfera gel imobilizada e foi calculada em 0,0466 g de célula/g de esfera a partir de um teor aproximado de 9,32% de matéria orgânica presente em 0,5 g de esfera seca imobilizada. A biomassa imobilizada de *Ac. strictum* L6-3 foi calculada em 0,0458 g de célula/g de esfera a partir de um teor aproximado de 9,15% de matéria orgânica presente em 0,5 g de esfera seca imobilizada. A biomassa imobilizada de *C. oleophila* L16-3 foi calculada em 0,0425 g de célula/g de esfera a partir de um teor aproximado de 8,52% de matéria orgânica presente em 0,5g de esfera seca imobilizada. A biomassa imobilizada de *Candida* sp. L5-1 foi calculada em 0,0412 g de célula/g de esfera a partir de um teor aproximado de 8,25% de matéria orgânica presente em 0,5 g de esfera seca imobilizada. A biomassa imobilizada de *H. uvarum* L2 foi calculada em 0,0375 g de célula/g de esfera a partir de um teor aproximado de 7,5% de matéria orgânica presente em 0,5 g de esfera seca imobilizada.

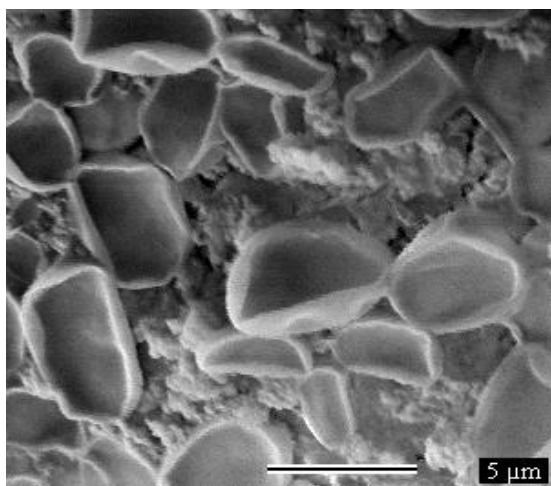
Em um estudo comparativo realizado por Kiyohara e colaboradores (2003) entre leveduras imobilizadas em esferas de alumina e membranas de alumina, os autores também obtiveram a imobilização por livre contato das células com ambas.



(a)



(b)



(c)

**Figura 15** Eletromicrografias da levedura imobilizada em esferas de alumina com **carvão ativo** (a) Células de *R. toruloides* na superfície externa da esfera em aumento de 3.000 x; (b) Célula de *R. toruloides* em detalhe na superfície interna da esfera, aumento de 10.000 x; (c) Células de *R. toruloides* na superfície interna da esfera em aumento de 3.000 x.

### 7.13 Ensaios de remoção de As (V) com células livres e imobilizadas de leveduras em esferas macroporosas de alumina com carvão ativado

As células livres de *R.toruloides* L56-1 apresentaram eficiência de remoção de As (V) de 84,95% (Tabela 23). Este valor de eficiência de remoção de As (V) foi superior ao encontrado em um trabalho realizado por Cernansky e colaboradores (2007) utilizando o fungo filamentosso *Neosartorya fischeri*, no qual foi observado uma taxa de biossorção de 31,5% de As (V) a partir de uma solução com a concentração inicial de 0,5 mg de As (V)/mL. O valor de eficiência de remoção de As (V) pelas células livres de *R.toruloides* L56-1 também foi superior ao obtido por Sathishkumar e colaboradores (2004), a qual foi de 20%, em um trabalho no qual foi utilizado biomassa modificada de *Aspergillus fumigatus* a partir de uma solução com concentração inicial de 0,9 mg de As (V)/L.

Inicialmente foram selecionados cinco isolados de leveduras dentre os que apresentaram maior tolerância ao As (V) para a imobilização em esferas secas e ensaios de remoção de As (V). Todas as células dos cinco isolados de leveduras imobilizadas em esferas secas apresentaram eficiências de remoção inferiores às das esferas secas (70,72%), as quais foram de (67,53%) para *R. toruloides* L56-1, de (58,35%) para *Ac. strictum* L6-3, de (60,41%) para *Candida* sp. L5-1, de (64,74%) para *H. uvarum* L2 e de (19,38%) *C. oleophila* L16-3. Estas diferenças nas eficiências de remoção entre os isolados de leveduras podem estar relacionadas às especificidades das estruturas celulares das diferentes espécies (p.ex., paredes celulares) o que está diretamente ligado a adsorção de As (V). A partir destes resultados optou-se pelo desenvolvimento de esferas gel para imobilização de células de leveduras, e dentre os isolados, *R. toruloides* L56-1 foi selecionado por ter apresentado o melhor resultado dentre aqueles imobilizados nas esferas secas.

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 23 pode-se observar que as esferas gel apresentaram 91,24% de eficiência de remoção de As (V) e uma capacidade adsortiva ( $q$ ) de 88,5 mg de As (V)/g de esfera gel, estes valores foram superiores aqueles apresentados pelas esferas secas, respectivamente, 70,72% e 68,6 mg de As (V)/g de esfera seca. Este aumento da adsorção pode ser explicado pela preservação do caráter hidrofílico das esferas gel e, portanto, pela preservação de parte da alumina no estado de nanopartículas de hidróxido de alumínio. Esta hidrofilicidade



possibilita um aumento da acessibilidade do arsênio e, portanto, aumento do seu gradiente de concentração nos sítios ativos da alumina.

Quando se comparam os valores de capacidades adsorptivas de ambas as esferas, com o valor de capacidade adsorptiva máxima experimental ( $q_{exp}$ ) (Figura 12) apresentado pela esfera de alumina com carvão ativo calcinada a 400 °C CCA2 ( $\approx$  46 mg de As (V)/g de esfera CCA2), observa-se que os valores das primeiras foram superiores aos da última. Nota-se que ao calcinar as esferas a 400 °C, reforça-se o transporte de vapor com a transformação de carbono ativo em CO<sub>2</sub> e, portanto, favorece o crescimento das nanopartículas depositadas na superfície das partículas de alumina e o fechamento de microporos e sua transformação em mesoporos e/ou macroporos, as mesmas não favorece um acesso significativo do íon As (V) aos sítios ativos das partículas presentes no interior das esferas.

As células de *R. toruloides* L56-1 imobilizadas em esferas gel apresentaram 97,11% de eficiência de remoção, este valor foi maior do que aquele apresentado pelas esferas gel (91,24%). Este fato pode ser explicado pelo efeito aditivo de sítios ativos para adsorção de As (V) presentes nas células em relação às esferas.

A taxa de remoção das células livres de *R. toruloides* L56-1 mostrou-se bastante promissora, uma vez que este experimento foi realizado apenas sob uma condição definida sem investigação sobre as condições ótimas de adsorção. Diversos autores têm mostrado ganho significativo na eficiência de remoção quando foram usadas condições otimizadas. Por exemplo, em trabalho realizado Halttunen e colaboradores (2007), as formas nativas e metiladas de três linhagens de *Lactobacillus* não foram eficientes na remoção de As (V) da água com pH 7,0. Apenas sob condições otimizadas de pH, tempo de contato e concentração, foi possível aumentar a taxa de remoção de forma significativa.

As esferas desenvolvidas neste trabalho apresentaram excelentes resultados de remoção de As (V) em batelada, mas destaca-se que por apresentarem características importantes de um bom adsorvente como, alta esfericidade, alta resistência à fratura, elevada porosidade, o que permite a imobilização de células, estas esferas seriam excelentes para aplicação em reatores de coluna de leito fixo para ensaios de remoção de As (V).

**Tabela 23 Eficiência de remoção das esferas, das células de *R.toruloides* L56-1 livres e das células de leveduras imobilizadas**

Amostras	$C_i^a$ As(V) (mg/L)	$C_f^b$ As(V) (mg/L)	Eficiência de remoção de As (V)	$q^c$ (mg/g)
Esferas gel	970±1	85±2	91,24%	88,5
Esferas secas	970±1	284±2	70,72%	68,6
<i>R. toruloides</i> L56-1	970±1	146±2	84,95%	82,4
<i>R. toruloides</i> L56-1 imobilizada em esferas gel	970±1	28±3	97,11%	94,2
<i>R. toruloides</i> L56-1 imobilizada em esferas secas	970±1	315±3	67,53%	65,5
<i>Ac .strictum</i> L6-3 imobilizado em esferas secas	970±1	404±2	58,35%	56,6
<i>C. oleophila</i> L16-3 imobilizada em esferas secas	970±1	782±1	19,38%	18,8
<i>Candida</i> sp. L5-1 imobilizada em esferas secas	970±1	384±2	60,41%	58,6
<i>H. uvarum</i> L2 imobilizada em esferas secas	970±1	342±2	64,74%	62,8

<sup>a</sup> $C_i$ : concentração inicial de As (V); <sup>b</sup> $C_f$ : concentração final de As (V); <sup>c</sup> $q$ : capacidade adsortiva (mg/g)

## 8. Conclusões

As leveduras e fungos filamentosos presentes nas amostras de água e identificadas por métodos dependentes de cultivo apresentaram-se bastante diversas com algumas espécies ocorrendo apenas em uma das coletas.

Os isolados de leveduras e fungos filamentosos testados quanto à tolerância ao As (V) apresentaram perfil de tolerância variado tanto em nível específico quanto intra-específico.

A maioria dos isolados de fungos filamentosos analisados quanto à tolerância ao As (V) mostraram-se mais sensíveis ao metalóide do que os isolados de leveduras, pois a maioria dos isolados de leveduras foi capaz de tolerar até 100 mM de As (V) e por outro lado a maioria dos isolados de fungos filamentosos cresceram apenas em meio não acrescido de As(V).

O processo de aglomeração das micropartículas de alumina gama desenvolvido foi eficiente na preservação das características de microporosidade nas esferas. Além disso, foi possível obter esferas com características adequadas para o uso em colunas de leito fixo, as quais são usadas em sistemas de tratamento de efluentes de grandes volumes contendo metais ou metalóides tóxicos como o As. A rede de microporos, mesoporos e macroporos que liga a superfície ao centro das esferas adsorventes proporciona um aumento substancial do acesso desses metais ou metalóides tóxicos aos sítios da alumina ativada.

As esferas macroporosas alumina gama obtidas com carvão apresentaram as propriedades necessárias para um bom adsorvente como alto valor de superfície específica, porosidade distribuída de forma mais homogênea, todas estas propriedades são importantes tanto para a adsorção quanto para a imobilização de leveduras.

As esferas gel de alumina com carvão foram muito eficientes na adsorção de As (V), além de terem servido como excelente substrato para a imobilização de células de leveduras.

A abordagem assumida neste trabalho, por meio do estudo de diversidade e tolerância ao As (V) de leveduras e fungos filamentosos, isolados de ambientes aquáticos contaminados com As, permitiu a seleção dentre os mesmos de isolados para o desenvolvimento de um adsorvente composto inovador contendo células de leveduras imobilizadas em esferas de alumina com carvão ativado, que foi eficiente na remoção de As (V) a partir da água.

## 9. Referências bibliográficas

ACHARYA, S. K.; CHAKRABORTY, P.; LAHIRI, S.; RAYMAHASHAY, B.C.; GUHA, S; BHOWMIK, A. Arsenic poisoning in the Ganges delta *Nature*, v. 40, p. 545, 1999.

ADRIANO, D. C. *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals*. Editora Springer, 2<sup>a</sup> edição, New York, 2001.

ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA BECERRIL J. M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Reviews in Environmental Science Biotechnology*, pp. 71-90, v. 3, 2004.

ANDREAE, M. O. & KLUMP, D. Biosynthesis and release of organoarsenic compounds by marine algae. *Environmental Science Technology*, v. 13, pp. 738-741, 1979.

BENDER, J.; LEE, R. F.; PHILIPS, P. Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 14, pp. 113-118, 1995.

BENTLEY R, CHASTEEN TG Microbial methylation of metalloids arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v.66, pp. 250-271, 2002.

BERETKA, J. & NELSON, P. *The current state of utilization of fly ash in Australia*. In Ash: a valuable resource, v.1, pp. 51-63, South African Coal Ash Association, 1994.

BERG, M.; TRAN, H. C.; NGUYEN, T. C.; PHAM, H. V.; SCHERTENLEIB, R.; GIGER, W. Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: A human health threat. *Environmental Science Technology*, v. 35, pp. 2621-2626, 2001.

BISHOP, P. L. *Pollution prevention: fundamentals and practice*. Beijing: Tsingua University Press, 2002.

BOBROWICZ P, WYSOCKI R, OWSIANIK G, GOFFEAU A, ULASZEWSKI S Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 13, pp.819-828, 1997.

BOLAN, N. S. & THIYAGARAJAN, S. Retention and plant availability of chromium in soils as affected by lime and organic amendments. *Australian Journal of Soil Research*, v.39, pp. 1091-1103, 2001.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Revista Escola de Minas*, v. 57 (1), p. 45-51, 2004.

BOSE, P. & SHARMA, A. Role of iron in controlling speciation and mobilization of arsenic in subsurface environment. *Water Research*, v. 36, pp. 4916-4926.

BUTCHER BG, DEANE SM, RAWLINGS DE The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, pp. 1826-1833, 2000.

CHAKRABORTI, D.; RAHMAN, M. M.; PAUL, K.; CHOWDHURY, U. K.; SENGUPTA, M. K.; LODH, D.; CHANDA, C. R.; SAHA, K. C.; MUKHERJEE, S. C. Arsenic calamity in the Indian subcontinent: What lessons have been learned? *Talanta*, v. 58, pp. 3-22, 2002.

CHATTERJEE, A.; DAS, D.; MANDAL, B. K.; CHOWDHURY, T. R.; SAMANTA, G.; CHAKRABORTI, D. Arsenic in ground-water in 6 districts of West-Bengal, India – the biggest arsenic calamity in the world. 1. Arsenic species in drinking-water and urine of the affected people. *Analyst*, v. 120, pp. 643-650, 1995.

CLEMENT, W. H. & FAUST, S. D. The release of arsenic from contaminated sediments and muds. *Journal of Environmental Science Health A16*, v. 1, pp. 87-91, 1981.

COBBETT C, GOLDSBROUGH P Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Reviews in Plant Biology*, v.53, pp. 159-182, 1987.

COSTA-MOREIRA, L.M. Papel da trealose na proteção durante o estresse oxidativo causado por cádmio e a resposta adaptativa ao estresse em *Saccharomyces cerevisiae*. 2007. 111p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências e Tecnologia das

Radiações Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2007.

DAMERON CT, WINGE DR Peptide-mediated formation of quantum semiconductors. *Trends in Biotechnology*, v. 8, pp. 3-6, 1990.

DAS, D.; SAMANTA, G.; MANDAL, B.K.; CHOWDHURY, T. R.; CHANDA, C. R. *A simple household device to remove arsenic from groundwater and two years performance report of arsenic removal plant for treating groundwater with community participation*. School of Environmental Studies. Jadavpur University, Calcutta, India.

DEL RAZO, L. M.; RELLANO, M. A.; CEBRIAN, M. E. The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environmental Pollution*, v. 64, pp. 143-153, 1990.

DEY S, OUELLETTE M, LIGHTBODY J, PAPADOPOULOU B, ROSEN BP An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 93, pp.2192-2197, 1996.

DOMBROWSKI PM, LONG W, FARLEY KJ, MAHONY JD, CAPITANI JF, DI TORO DM Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environmental Science Technology*, v. 39, pp. 2169-2176, 2005.

DREWNIAK, L.; STYCZEK, A.; MAJDER-LOPATKA, M.; SKLODOWSKA, A. Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution *Environmental Pollution*, vol. 156, pp. 1069-1074, 2008.

EISLER, R. Arsenic hazards to humans, plants, and animals from gold mining. *Reviews in Environmental Contamination Toxicology*, v. 180, pp. 133-165, 2004.

ELLIS PJ, CONRADS T, HILLE R, KUHN P Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 angstrom and 2.03 angstrom. *Structure*, v. 9, pp. 125-132, 2001.

FERGUSON, J. F. & GAVIS, J. A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Research*, v.6, pp. 1259-1274, 1972.

FOSTER, A. L.; BROWN, G. E.; PARKS, G. A.; TINGLE, T. N.; VOIGT, D. E.; BRANTLEY, S. L. XAFS determination of As (V) associated with Fe (III) oxyhydroxides in weathered mine tailings and contaminated soil from California, USA. *Journal de Physique IV*, v. 7, pp. 815-816, 1997.

FOYER CH, NOCTOR G Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environment*, v. 28, pp. 1056-1071, 2005.

FRYXELL, G. E.; LIU, J.; HAUSER, T. A.; NIE, Z.; FERRIS, K. F.; MATTIGOD, S.; GONG, M.; HALLEN, R. T. Design and synthesis of selective mesoporous anion traps. *Chemistry of Materials*, v. 11, pp. 2148-2154, 1999.

GADANHO M, LIBKIND D & SAMPAIO JP (2006) Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microb Ecol* 52: 552–563.

GADD GM, WHITE C Microbial treatment of metal pollution — a working biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 11, pp.353-359, 1993.

GARDES M, BRUNS TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **2**, 113–118.

GHOSH AS, KAR AK, KUNDU M Impaired imipenem uptake associated with alterations in outer membrane proteins and lipopolysaccharides in imipenem-resistant *Shigella dysenteriae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 43, pp.195-201, 1999.

GHOSH M, SHEN J, ROSEN BP Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 96, pp. 5001-5006, 1999.

GILMORE, J. T. & WELLS, B. R. Residual effects of MSMA on sterility in rice cultivars. *Agronomy Journal*, v. 72, pp. 1066-1067.

GOURBAL B, SONUC N, BHATTACHARJEE H, LEGARE D, SUNDAR S, OUELLETTE M, ROSEN BP, MUKHOPADHYAY R Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *Journal Biological Chemistry*, v. 279, pp. 31010-31017, 2004.



GULLEDGE, J. H.; O'CONNOR, J. T. Removal of Arsenic (V) from Water by Adsorption on Aluminum and Ferric Hydroxides. *Journal American Water Works Association*, v. 65 (8), pp. 548-552, 1973.

GUO JB, DAI XJ, XU WZ, MA M Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, v. 72, pp.1020-1026, 2008.

HAGLER AN & AHEARN DG (1987) Ecology of aquatic yeasts. The Yeasts, Vol. 2, Yeasts and the Environment (Rose AH & Harrison JS, eds), pp. 181–205. Academic Press, London.

HAGLER AN & MENDONÇA, A-HAGLER LC (1981) Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 41:173–178.

HAGLER AN (2006) Yeasts as indicators of environmental quality. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (Rosa CA & Gábor P, eds), pp. 519–536. Springer-Verlag, Berlin.

HAN, J. T. & FYFE, W. S. Arsenic removal from water by iron-sulphide minerals. *Chinese Scientific Bulletin*, v. 45, pp. 1430-1434, 2000.

HARVEY, C. F.; SWARTZ, C. H.; BADRUZZAMAN, A. B. M.; KEON-BLUTE, N.; YU, W.; ALI, M. A.; JAY, J.; BECKIE, R.; NIEDAN, V.; BRABANDER, D.; OATES, P. M.; ASHFAQUE, K. N.; ISLAM, S.; HERMOND, H. F.; AHMED, M. F. Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh *Science*, v. 298, pp. 1602-1606, 2002.

HERING, J. G.; CHEN, P. Y.; WILKIE, J. A. *Arsenic removal from drinking water by coagulation: The role of adsorption and effects of source water composition*. In Arsenic: Exposure and Health Effects (C. O. Abernathy; R. L. Calderon; W. R. Chappell, Eds.), pp. 369-381, Chapman & Hall, New York, 1997.

HOPENHAYN-RICH, C.; BIGGS, M. L.; SMITH, A. H. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Cordoba, Argentina. *International Journal of Epidemiology*, v. 27, pp. 561-569, 1998.

JI G.Y, SILVER S Reduction of arsenate to arsenite by the Arsc protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid-Pi258. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 89, pp. 9474-9478, 1992.

JOHNSON, D. L. Bacterial reduction of arsenate in sea water. *Nature*, v. 240, pp. 44-45, 1972.

KIM YJ, CHANG KS, LEE MR, KIM JH, LEE CE, JEON YJ, CHOI JS, SHIN HS, HWANG SB Expression of tobacco cDNA encoding phytochelatin synthase promotes tolerance to and accumulation of Cd and As in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Plant Biology*, v. 48, pp. 440-447, 2005.

KIM, Y.; KIM, C.; CHOI, I.; RENGARAJ, S.; YI, J. Arsenic removal using mesoporous alumina prepared via a templating method. *Environmental Science Technology*, v. 38, pp. 924-931, 2004.

KNEER R, ZENK MH The formation of Cd–phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry*, v.44, pp. 69-74, 1997.

KNOWLES FC, BENSON AA The biochemistry of arsenic. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 8, pp.178-180, 1983.

KORTE, N. E. & FERNANDO, Q. A review of arsenic (III) in groundwater. *Critical Reviews in Environmental Control*, v. 21, pp. 1-39, 1991.

KOSTAL, J.; YANG, R.; WU, C. H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, pp. 4582-4587, 2004.

KRAFFT T, MACY JM Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, v. 255, pp.647-653, 1998.

KRUMOV N, ODER S, PERNER-NOCHTA I, ANGELOV A, POSTEN C Accumulation of CdS nanoparticles by yeasts in a fed-batch bioprocess. *Journal of Biotechnology*, v.132, pp. 481-486, 2007.

KURTZMAN CP & FELL JW (1998) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- KURTZMAN CP & ROBENETT CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- LACHANCE M-A & STARMER WT (1998) Ecology and yeasts. The Yeasts, a Taxonomic Study (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 21–30. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- LEIST M, CASEY RJ, CARIDI D The management of arsenic wastes problems and prospects. *Journal of Hazardous Materials*, v. 76, pp.125-138, 2000.
- LEONARD, A. *Arsenic In Metals and their compounds in the environments: occurrence, analysis, and biological relevance*, pp. 751-773, Ed. E. Merian, 2<sup>nd</sup> edition, Weinheim, VCH.
- LIU J, LIU YP, POWELL DA, WAALKES MP, KLAASSEN CD Multidrug resistance *mdr1a/1b* double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. *Toxicology*, v. 170, pp.55-62, 2002.
- LIU ZJ, BOLES E, ROSEN BP Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, pp. 17312-17318, 2004.
- LIU ZJ, SANCHEZ MA, JIANG X, BOLES E, LANDFEAR SM, ROSEN BP Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsenous acid. *Biochemistry Biophys Research Communications*, v. 351, pp. 424-430, 2006.
- LOEPPERT, R. H. *Arsenate, arsenite retention and release in oxide and sulfide dominated systems*. Technical Report n° 176, Texas Water Resources Institute, College Station, TX, 1997.
- LOUKIDOU, M. X.; MATIS, K. A.; ZOUBOULIS, A. I.; KYRIAKIDOU, M. L. Removal of As (V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. *Water Research*, v. 37, pp. 4544-4552, 2003.
- LU, F. J. Blackfoot disease: Arsenic or humic acid? *Lancet*, v. 336, pp. 115-119, 1990.

- MAEDA, S.; INOUE, R.; KOZONO, T.; TOKUDA, T.; OHKI, A.; TAKESHITA, T. Arsenic metabolism in a freshwater food chain. *Chemosphere*, v. 20, pp. 101-110, 1990.
- MAHIMAIRAJA, S.; BOLAN, N. S.; ADRIANO, D. C.; ROBINSON, B. Arsenic Contamination and its risk management in complex environmental settings. *Advances in Agronomy*, v. 86, p. 1-81, 2005.
- MAITANI T, KUBOTA H, SATO K, YAMADA T The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology*, v.110, pp.1145-1150, 1996.
- MAKI T, HASEGAWA H, WATARAI H, UEDA K Classification for dimethylarsenate-decomposing bacteria using a restrict fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Analytical Science*, v. 20, pp. 61-68, 2004.
- MANDAL, B. K.; CHOWDHURY, T. R.; SAMANTA, G.; BASU, G. K.; CHOUDHURY, P. P.; CHANDA, C. R.; LODH, D.; KARAN, N. K.; DHAR, R. K.; TAMILI, D. K.; DAS, D.; SAHA, K. C.; CHAKRABORTI, D. Arsenic in groundwater in seven districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. *Current Science*, v. 70, pp. 976-986, 1996.
- MARTHUR, J. M.; RAVENSCROFT, P.; SAFIULLAH, S.; THIRLWALL, M. F. Arsenic in groundwater: Testing pollution mechanisms for sedimentary aquifers in Bangladesh. *Water Resources Research*, v. 37, pp. 109-117, 2000.
- MCBRIDE, G. L.; HOLLAND, P.; WILSON, K. *Investigation of contaminated sheep dipping sites in the Waikato*. In Proceedings of Waste Management Institute New Zealand Conference, pp. 129-137. Waste Management Institute
- MCLAREN, R. G.; NAIDU, R.; SMITH, J.; TILLER, K.G. Fractionation and distribution of arsenic in soils contaminated by cattle dip. *Journal of Environmental Quality*, v. 27, pp. 348-354, 1998.
- MCLAUGHLIN, M. J.; TILLER, K. G.; NAIDU, R.; STEVENS, D. P. The behavior and environment impact of contamination in fertilizers. *Australian Journal of Soil Research*, v. 34, pp. 1-54, 1996.

- MEDEIROS AO, KHOLER LM, HAMDAN JS, MISSAGIA BS, BARBOSA FAR & ROSA CA (2008) Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Res* 42: 3921–3929.
- MENDOZA-COZATL DG, MORENO-SANCHEZ R Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica Biophysica Acta Bioenergetics*, v.1706, pp.88-97, 2005.
- MENDOZA-COZATL DG, RODRIGUEZ-ZAVALA JS, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, MENDOZA-HERNANDEZ G, BRIONES-GALLARDO R, MORENO-SANCHEZ R Phytochelatin–cadmium–sulfide highmolecular-mass complexes of *Euglena gracilis*. *FEBS Journal* 2006,273:5703-5713.
- MERRIFIELD ME, NGU T, STILLMAN MJ Arsenic binding to *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 324, pp.127-132, 2004.
- MERRY, R. H.; TILLER, K. G., AND ALSTON, A. M. Accumulation of copper, lead, and arsenic in some Australian orchard soils. *Australian Journal of Soil Research*, v. 21, pp. 549-561, 1983.
- MORAIS PB, RESENDE MA, ROSA CA & BARBOSA FAR (1996) Occurrence and diel distribution of yeasts in a paleo-karstic lake of southeastern Brazil. *Rev Microbiol* 27: 182–188.
- MORRIS CA, NICOLAUS B, SAMPSON V, HARWOOD JL, KILLE P Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochemical Journal*, v. 338, pp. 553-560, 1999.
- MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiology Letters*, v.168, pp. 127-136, 1998.
- MUKHOPADHYAY R, SHI J, ROSEN BP Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *Journal Biological Chemistry*, v. 275, pp. 21149-21157, 2000.
- NAGAHAMA T (2006) Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments. *Yeasts Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Rosa CA & G´arbor P, eds), pp.241–262. Springer-Verlag, Berlin.

- NEKU, A. & TANDUKAR, N. An overview of arsenic contamination in groundwater of Nepal and its removal at household level. *Journal de Physique*, v. 107, pp. 941-944, 2003.
- NICKSON, R. T., MCARTHUR, J. M., RAVENSCROFT, P.; BURGESS, W. G.; AHMED, K. M. Mechanisms of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal *Applied Geochemistry*, v. 15, pp. 403-413, 2000.
- NIDHUBHGHAILL OM, SADLER PJ The structure and reactivity of arsenic compounds — biological-activity and drug design. *Structural Bond*, v.78, pp.129-190, 1991.
- NOCTOR G Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environment*, v. 29, pp.409-425, 2006.
- NRIAGU, J. O. & PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature*, v.333, pp. 133-139, 1988.
- ORTIZ DF, RUSCITTI T, MCCUE KF, OW DW Transport of metal-binding peptide by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane-protein. *Journal of Biological Chemistry* , v. 270, pp. 4721-4728, 1995.
- PENROSE, W. R. Arsenic in the marine and aquatic environments: Analysis, occurrence and significance. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, v. 4, pp. 465-482, 1974.
- PERSSON BL, PETERSSON J, FRISTEDT U, WEINANDER R, BERHE A, PATTISON J Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim Biophysics Acta Review Biomembranes*, v.1422, pp.255-272, 1999.
- PERYEA, F. J. & CREGER, T. L. Vertical distribution of lead and arsenic in soils contaminated with lead arsenate pesticide residues. *Water Air Soil Pollution*, v.78, pp. 297-306, 1994.

- PETRUCIO M M; MEDEIROS, A. O.; ROSA, C. A.; BARBOSA, F. A. R. Trophic state and microorganisms community of major sub-basins of the middle Rio Doce basin, southeast Brazil. *Braz. arch. biol. technol.* vol.48 no.4 Curitiba July 2005.
- ROBERTSON, F. N. Arsenic in groundwater under oxidizing conditions, southwest United States. *Environmental Geochemistry Health*, v. 11, pp. 171-185, 1989.
- ROBINSON, B. H.; BROOKS, R. R.; OUTRED, H. A.; KIRKMAN, J. H. The distribution and fate of arsenic in the Waikato River System, North Island, New Zealand. *Chemical Speciation and Bioavailability*, v.7, pp. 89-96, 1995.
- ROCHETTE EA, BOSTICK BC, LI GC, FENDORF S Kinetics of arsenate reduction by dissolved sulfide. *Environmental Science Technology*, v.34, pp. 4714-4720, 2000.
- ROSA CA, RESENDE MA, BARBOSA FAR, MORAIS PB & FRANZOT SP (1995) Yeast diversity in a mesotrophic lake on the karstic plateau of Lagoa Santa, MG-Brazil. *Hydrobiologia* 308: 103–108.
- ROSEN BR, LIU ZJ. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environmental International*, v. 35, pp. 512-515, 2009.
- ROSEN, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, v 529, pp.86-92, 2002.
- ROSEN, B.P. Families of arsenic transporters. *Trends in Microbiology*, v. 7, pp. 207-212, 1999.
- ROTHBAUM, H. P. & BUISSON, D. H. Removal and potential recovery of arsenic from geothermal discharge waters after adsorption on iron-floc. Department of Scientific and Industrial Research, Report n° C.D. 2252, New Zealand, 1977.
- RUSSO G, LIBKIND D, SAMPAIO JP & VAN BROOCK MR (2008) Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol Ecol* 65:415–424
- SALTIKOV CW, CIFUENTES A, VENKATESWARAN K, NEWMAN DK The ars detoxification system is advantageous but not required for As (V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, pp. 2800-2809, 2003.

SANDERS OI, RENSING C, KURODA M, MITRA B, ROSEN BP Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, v. 179, pp. 3365-3367, 1997.

SANDERS, J. G. & WINDOM, H. L. The uptake and reduction of arsenic species by marine algae. *Estuarine Coastal Marine Science*, v. 10, pp. 555-567, 1980.

SANDERS, J. G. Role of marine phytoplankton in determining the chemical speciation and biogeochemical cycling of arsenic. *Canadian Journal of Fishing and Aquatic Sciences*, v. 40, pp. 192-196, 1983.

SANTINI JM, SLY LI, SCHNAGL RD, MACY JM A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a goldmine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, pp. 92-97, 2000.

SCHMOGER MEV, OVEN M, GRILL E Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiology*, v.122, pp.793-801, 2000.

SEIDL, A.; WAYPA, J. J.; ELIMELECH, M. Role of charge exclusion in removal of arsenic from water by a negatively charged porous nanofiltration membrane. *Environmental Engineering Science*, v. 18, pp. 105-113, 2001.

SHEN, Y. S. Study of arsenic removal from drinking water. *Journal American Water Works Association*, v. 65 (8), pp. 543-548.

SHI J, VLAMIS-GARDIKAS V, ASLUND F, HOLMGREN A, ROSEN BP Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from Escherichia coli shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *Journal of Biological Chemistry* v. 274, pp. 36039-36042, 1999.

SILVER S, PHUNG LT Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews in Microbiology*, v.50, pp. 753-789, 1996.

SILVER S, PHUNG LT Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, pp.599-608, 2005.



SINGH S, LEE W, DASILVA NA, MULCHANDANI A, CHEN W Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Biotechnology Bioengineering*, v. 99, pp. 333-340,

Singh S, Mulchandani A, Chen W: Highly selective and rapid

SLÁVIKOVÁ E & VADKERTIOVÁ R (1997a) Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 77–80.

SMEDLEY, P. L. & KINNIBURGH, D. G. A review of the sources, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, v. 17, pp. 259-284, 2002.

SMITH, A. H.; GOYCOLEA, M.; HAQUE, R.; BIGGS, M. L. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of northern Chile due to arsenic in drinking water. *American Journal of Epidemiology*, v. 147, pp. 660-669, 1998.

SMITH, A. H.; LINGAS, O. E.; RAHMAN, M. Contamination of drinking water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. *Bulletin of World Health Organization*, v. 78, pp. 1093-1103, 2000.

SMITH, D. G. *Heavy metals in the New Zealand aquatic environment: A review*. National Water and Soil Conservation Authority, Wellington, New Zealand. Water and Soil Miscellaneous Publication n° 100, 1986.

SPARKS, D. L. *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, San Diego, CA, 345p., 1995.

STOLZ JE, BASU P, SANTINI JM, OREMLAND RS. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annual Reviews of Microbiology*, v. 60, pp. 107-130, 2006.

TAYLOR, G. F. *Exploration, mining and mineral processing*. In Contaminants and the soil environment in the Australasia-Pacific Region, pp. 213-266, Kluwer Academic Publishers, London, 1996.

THOMAS D, SURDINKERJAN Y Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v. 61, pp. 503-512, 1997.

TISA LS, ROSEN BP Molecular characterization of an anion pump —the Arsb protein is the membrane anchor for the Arsa protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, pp. 190-194, 1990.

VOLESKY, B. *Biosorption and Biosorbents. Biosorption of Heavy Metals*. Editora Florida CRC, pp. 3-5, 1990.

WALSH, P. R.; DUCE, R. A.; FASCHING, J. L. Consideration of the enrichment, sources, and flux of arsenic of arsenic in the troposphere *Journal Geophysis Research*, v. 84, pp. 1719-1723, 1979.

WANG, G. Arsenic poisoning from drinking water in Xinjiang. *Chinese Journal of Prevention Medicine*, v. 18, pp. 105-107, 1984

WANG, J. L. *Immobilization techniques for biocatalysts and water pollution control*. Editora Science, Beijing, 2002.

WHO, World Health Organization Environmental Health Criteria. 18: Arsenic, World Health Organization, Geneva, 1981.

WILKIE, J. A. & HERING, J. G. Adsorption of arsenic onto hydrous ferric oxide: Effects of adsorbate/adsorbent ratios and co-occurring solutes. *Colloids Surfaces A Physiochemistry Engineering Aspects*, v. 107, pp. 97-110, 1996.

WUNSCHMANN J, BECK A, MEYER L, LETZEL T, GRILL E, LENDZIAN KJ Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 581, pp.1681-1687, 2007.

WYSOCKI R, BOBROWICZ P, ULASZEWSKI S The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *Journal Biological Chemistry*, v. 272, pp.30061-30066, 1997.

WYSOCKI R, CHERY CC, WAWRZYCKA D, VAN HULLE M, CORNELIS R, THEVELEIN JM, TAMAS MJ The glycerol channel Fps1p mediate the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, v.40, pp.1391-1401, 2001.

WYSOCKI R, CLEMENS S, AUGUSTYNIAK D, GOLIK P, MACIASZCZYK E, TAMA´ S MJ, DZIADKOWIEC D Metalloid tolerance based on phytochelatins is not

functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 304, pp. 293-300, 2003.

XU C, ZHOU TQ, KURODA M, ROSEN BP Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *Journal of Biochemistry*, v. 123, pp.16-23, 1998.

YAN-CHU, H. *Arsenic distribution in soils. In Arsenic in the Environment, Part I: Cycling and Characterization*, pp. 17-49, Wiley, New York, 1994.

YOKOTA, H.; TANABE, K.; SEZAKI, M.; AKIYOSHI, Y; MIYA, T.; KAWAHARA, K; TSUSHIMA, S.; HIRONKA, H.; TAKAFUJI, H.; RAHMAN, M.; AHMAD, S. A.; SAYED, M. H.S.U.; FARUQUEE, M. H. Arsenic contamination of ground and pond water and water purification system using pond water in Bangladesh. *Engineering Geology*, v. 60, pp. 323-331, 2001.

YOSHIDA, I.; KOBAYASHI, H.; UENO, K. Selective adsorption of arsenic ions on silica gel impregnated with ferric hydroxide. *Analytical Letters*, v.9, 1125, 1976.

YUAN, T.; HU, J. Y.; ONG, S. L.; LUO, Q. F.; NG. W. J. Arsenic removal from household drinking water by adsorption. *Journal of Environmental Science Health*, v. 37, pp. 1721-1736.

ZOU, B. J. Arsenic in soil. *Tarangxue Jin Zhan*, v. 14(2), pp. 8-13, 1986.

## 10. Anexo A

**Tabela 16 Densidades e abundâncias relativas de espécies de fungos filamentosos da primeira coleta (continuação)**

Diâmetros médios (mm)/Percentuais de reduções de crescimentos(%)		Concentrações de As (V) (mM)				
Espécies	UFMGCB	0	50	100	150	300
<i>Alternaria alternata</i>	3476	69,6±0,3/0				
<i>Alternaria</i> sp.	3488	49,8±07/0				
<i>Alternaria tenuissima</i>	3431	40,3±0,9/0				
<i>Aspergillus fumigates</i>	3460	43,7±0,5/0				
<i>C. oxysporum</i>	3466	45,5±0,2/0				
<i>C. tenuissimum</i>	3430	51,6±0,3/0				
<i>Cladosporium</i> sp.	3439	44,1±0,1/0				
<i>Cladosporium</i> sp.	3458	72,3±0,5/0				
<i>Cu. Intermédia</i>	3489	82,6±0,2/0				
<i>Curvularia</i> sp.	3448	72,3±0,3/0				
<i>Epicoccum</i> sp.	3437	64,3±0,4/0				
<i>Fusarium</i> sp.	3436	56,2±0,2/0				
<i>Hypocrea. Lixii</i>	3429	77,5±0,1/0				
<i>Hypocrea. Lixii</i>	3472	76,5±0,1/0				
<i>Leptosphaeria. sp.</i>	3427	26,8±0,8/0				
<i>Leptosphaeria</i> sp.	3444	30,2±0,5/0				
<i>Mucor racemosus</i>	3433	24,4±0,5/0				
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	3432	60,3±03/0				
<i>Mucor racemosus</i>	3446	35,7±0,6/0				
<i>Neurospora discreta</i>	3470	21,5±0,3/0				
<i>Neurospora</i> sp.	3447	64,2±0,2/0				
<i>Penicillium. sp.</i>	3435	77,5±0,1/0				
<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	3419	52,9±0,6/0				
<i>Perisporiopsis</i> sp.	3490	80,4±0,1/0				
<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	3443	53,1±0,1/0				
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	3481	48,7±0,7/0				
<i>Stemphylium</i> sp.	3454	65,1±0,2/0				

**Tabela 16 Densidades e abundâncias relativas de espécies de fungos filamentosos da primeira coleta (continuação)**

Diâmetros médios (mm)/Percentuais de reduções de crescimentos(%)		Concentrações de As (V) (mM)				
Espécies	UFMGCB	0	50	100	150	300
<i>Cochliobolus homomorphus</i>	3502	55,4±0,4/0				
<i>Curvularia</i> sp.	3503	43,8±0,5/0				
<i>Rhizomucor</i> sp	3507	41,6±0,2/0				
<i>Epicoccum nigrum</i>	3508	54,3±0,6/0				
<i>Hypocrea lixii</i>	3510	80,5±0,1/0				
<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	3511	75,4±0,2/0				
<i>Bionectria ochroleuca</i>	3513	61,6±0,1/0				
<i>Hypocrea lixii</i>	3515	47,3±0,3/0				
<i>Phaeosphaeria oryzae</i>	3525	35,5±0,1/0				
<i>Microdochium</i> sp.	3533	62,8±0,2/0				
<i>Rhizomucor variabilis</i>	3535	64,6±0,5/0				
<i>Phoma</i> sp.	3541	54,8±0,4/0				
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	3545	52,6±0,3/0				
<i>Dothideomycete</i> sp.	3552	64,8±0,8/0				
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	3566	52,5±0,3/0				
<i>Daldinia placentiformis</i>	3567	51,6±0,5/0				
<i>Dothideomycete</i> sp	3572	42,9±0,7/0				
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3581	29,6±0,2/0				
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3583	34,8±0,4/0				

## 11. Anexo B