

## II-088 – CARACTERIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE ADSORÇÃO NA BIOMASSA DE *Aspergillus niger* UTILIZADO PARA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS

**Maria do Socorro Vale<sup>(1)</sup>**

Graduada em Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará. Mestre em Química Inorgânica pela Universidade Federal do Ceará. Doutoranda em Engenharia Civil - área de concentração em Saneamento Ambiental na Universidade Federal do Ceará.

**Suzete Roberta da Silva<sup>(2)</sup>**

Graduanda em Engenharia de Pesca na Universidade Federal do Ceará.

**Sandro Thomaz Gouveia<sup>(3)</sup>**

Graduado em Química pela Universidade Federal do Ceará. Mestre em Química pela Universidade Federal de São Paulo (USP). Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

**Sandra Tédde Santaella<sup>(4)</sup>**

Graduada em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Mestre em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Doutora em Engenharia Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP).

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Instituto de Ciências do Mar - Av. da Abolição, 3207- Meireles- Fortaleza- Ceará- CEP: 60165-Brasil- Tel: 85-3366-7031- Fax: 85- 3366-7002- e-mail: [svaleufc@gmail.com](mailto:svaleufc@gmail.com)

### RESUMO

Os microrganismos têm papel significante na biorremediação de águas residuárias contaminadas com metais pesados. Neste estudo, a biomassa do fungo *Aspergillus niger* isolado do efluente de uma indústria petroquímica foi caracterizada quanto à presença de sítios ativos aptos a se ligarem a íons metálicos. Para identificação dos sítios foi utilizada espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Na biomassa foi verificada a presença de grupos carboxílicos, hidroxil, aminos e fosfatos, indicando que esta pode ser usada para bioadsorção de metais. Os grupos funcionais envolvidos na bioadsorção de  $Zn^{2+}$  são grupos carboxil, hidroxil e fosfato. A biomassa mostrou potencial de remoção de  $Zn^{2+}$  de 62,59%.

**PALAVRAS-CHAVE:** fungo filamentoso, bioadsorção, FTIR, zinco.

### INTRODUÇÃO

A poluição por metais pesados é um problema ambiental grave que ocorre em todo o planeta. Várias técnicas como precipitação, resinas de troca iônica e adsorção são usadas convencionalmente para remoção destes poluentes. A bioadsorção empregando microrganismos vivos ou mortos como material adsorvente de metais tem sido proposta como uma alternativa promissora em substituição à remoção convencional de metais pesados em águas residuárias.

Embora os processos biossorbitivos não sejam completamente entendidos (MUKHOPADHAYAY et al., 2008) sabe-se que a bioadsorção de metais ocorre, principalmente, através das interações entre os íons metálicos e os compostos orgânicos reativos presentes na superfície da biomassa. Grande parte desses sítios reativos encontra-se na parede celular dos microrganismos que é formada por polissacarídeos, proteínas, glucana e pigmentos que têm boa capacidade para ligar-se a metais (VOLESKY, 2007, BALDRIAN, 2003, FISCHER, 2006).

O fungo *Aspergillus niger*, bastante usado para produção de enzimas e ácidos orgânicos, tem sido utilizado para degradação de poluentes diversos, como cor, matéria orgânica, compostos recalcitrantes e também para remoção de metais em efluentes. Além de possuir capacidade metabólica notória, o *Aspergillus niger* possui, na parede celular, grande quantidade de substâncias com propriedades ligantes de metais, o que o torna potencialmente adequado para processos biossorbitivos. Este trabalho teve como objetivo identificar os sítios de adsorção presentes na biomassa do *Aspergillus niger*, para posterior uso da mesma em tratamento de efluentes industriais com metais pesados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAL ADSORVENTE

A espécie fúngica utilizada neste trabalho foi o *Aspergillus niger* obtido a partir do efluente de uma refinaria de petróleo e isolado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa - Agroindústria Tropical do Nordeste.

### PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO

O meio de crescimento foi preparado de acordo com as especificações do fabricante, para cada litro de caldo foram adicionados 8g de caldo nutritivo da marca Difco, 20 mg de glicose, 1ml de solução de Vishniac e 0,05g de cloranfenicol. Após a adição de nutrientes e do antibiótico para inibir a proliferação de bactérias, a mistura foi autoclavada por 30 min a  $121 \pm 2^\circ\text{C}$  e 1 atm.

### PREPARO DOS “PELLETS”

Em um erlenmeyer de 250mL adicionaram-se 100mL de caldo nutritivo e  $2,5 \times 10^6$  esporos/mL, de *Aspergillus niger*. O erlenmeyer foi fechado com algodão hidrófobo e submetido à agitação orbital, a 120 rpm por 72 horas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 1a). Os “pellets” formados estão mostrados na Figura 1b.



(a)



(b)

**Figura 1: (a) Mesa agitadora contendo erlenmeyers com pellets do fungo *Aspergillus niger*. (b) “Pellets” em agitação orbital na mesa agitadora. (b) “Pellets” formados após 72 horas de agitação orbital a 120 rpm.**

Após lavagem com água destilada em abundância e peneiramento para retirada do excesso de umidade; esta biomassa foi utilizada nos experimentos de espectroscopia no infravermelho, no experimento de bioadsorção de metal e no experimento de decomposição da amostra por via úmida.

### BIOSSORÇÃO DE $\text{Zn}^{2+}$ EM BATELADA.

De posse de estudos prévios sobre a influência do pH e da massa de bioadsorvente na bioadsorção de  $\text{Zn}^{2+}$ , para o *Aspergillus niger* estudado, foram determinadas as variáveis pH, tempo e quantidade de bioadsorvente utilizado no experimento.

A partir da solução estoque de 1000mg/L de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foi preparada uma solução de 300mg  $\text{Zn}^{2+}$ /L em meio de tampão de fosfato e ácido cítrico de pH 2,5.

Em Erlenmeyers de 250mL foram adicionados 50mL de solução de nitrato de zinco (300mg  $\text{Zn}^{2+}$ /L) e 8g de biomassa. A mistura foi submetida à agitação orbital a 120 rpm em mesa agitadora por 24 horas, e temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após as 24h, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtragem em papel de filtro qualitativo. O experimento foi feito em triplicata e branco.

A biomassa resultante também foi utilizada para obtenção dos espectros no infravermelho após bioadsorção.



A quantidade de  $Zn^{2+}$  retido pela biomassa foi medida por absorção atômica. A amostra foi pré-tratada por decomposição por via úmida para que fosse possível fazer a quantificação de metal retido na biomassa.

## DECOMPOSIÇÃO DA BIOMASSA POR VIA ÚMIDA ASSISTIDA POR MICROONDAS

O experimento foi realizado em triplicata com a biomassa antes e após a bioabsorção. Primeiro a biomassa foi seca a 60°C por 24 h, em seguida macerada com gral e pistilo, para uniformização das partículas.

Para este estudo utilizaram-se 200mg de biomassa seca, em um frasco de quartzo, onde foram adicionados 3mL de HCl concentrado e 1mL  $H_2O_2$ . O sistema foi fechado e colocado no interior da cavidade do forno de microondas de seis cavidades (modelo Multiwave da Anton Par - Áustria) sendo submetido ao programa de aquecimento mostrado na Tabela 1:

**Tabela 1: Programa de aquecimento utilizado para decomposição da biomassa por via úmida.**

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Potência (W)
1	100	5	500
2	800	15	800
3	0	15	0

A solução resultante foi transferida para tubos Falcon, o volume foi aferido para 25mL com água deionizada e, em seguida, determinou-se a concentração de zinco por absorção atômica em espectrômetro de absorção atômica (AAS) modelo GBC3 933 *plus*.

## DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE ADSORÇÃO

A espectroscopia no infravermelho é uma ferramenta versátil que é aplicada à determinação qualitativa e quantitativa de todos os tipos de espécies moleculares. Neste experimento foi utilizado um espectrômetro Shimadzu FTIR – 8300.

Após obtenção dos “pellets”, a biomassa foi seca em estufa a 60°C por 5 horas e pulverizada com gral e pistilo para uniformizar o tamanho das partículas. Após secagem, a biomassa foi analisada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para determinação dos sítios de adsorção de metais. Esse mesmo procedimento foi realizado com a biomassa após a bioabsorção.

O procedimento de obtenção dos espectros na região do infravermelho consistiu em dispersar a biomassa seca e pulverizada, em KBr, utilizando-se pistilo e pedra de ágata. Em seguida, a mistura foi colocada em prensa para formar uma pastilha que foi analisada em FTIR para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho. As bandas de absorção foram identificadas e determinaram-se os sítios de ligação dos metais.

## RESULTADOS

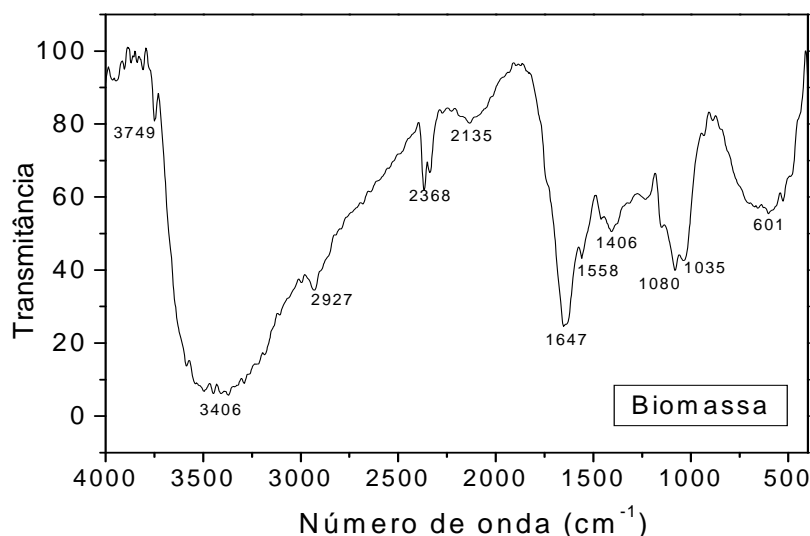
### DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE ADSORÇÃO NA BIOMASSA, ANTES E DEPOIS DA ADSORÇÃO COM $Zn^{2+}$ EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.

A interpretação de um espectro no infravermelho envolve a correlação entre bandas de absorção do espectro de um composto desconhecido com frequências de absorção conhecidas para tipos de ligações. Os fatores que identificam a fonte de adsorção de uma banda são a intensidade, a forma e a posição da banda no espectro. (PANDEY et al., 2009).

O espectro na região do infravermelho para a biomassa de *Aspergillus niger* está apresentado na Figura 2. Este foi obtido para a avaliação dos grupos funcionais presentes na biomassa do fungo, que possam estar envolvidos na bioabsorção e bioacumulação de zinco; estes grupos funcionais estão apresentados na Tabela 2.

Observou-se uma banda em  $2368\text{ cm}^{-1}$ , que é característica da presença de  $CO_2$ , e é detectada corriqueiramente nos espectros de FTIR. Esta banda não foi considerada no estudo por tratar-se de

contaminação da amostra pelo CO<sub>2</sub> do ambiente, apesar de ter sido realizado teste em branco pela leitura da pastilha de KBr sem amostra.



**Figura 2: Espectro na região do infravermelho da biomassa de *Aspergillus niger* em pastilha de KBr.**

As bandas que aparecem no espectro da biomassa foram atribuídas a diversos grupos e ligações de acordo com os seus respectivos comprimentos de onda como reportado na literatura (SILVERSTEIN, 1994; MUNGASAVALLI et al., 2007; AMINI et al., 2009ab; SUN et al., 2009).

**Tabela 2: Comprimento de onda absorvido na região do infravermelho e grupos funcionais correspondentes.**

Número de onda observado (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
3406	$\nu_{\text{assimétrico}}$ de NH <sub>2</sub> de amina e grupos –OH de hidroxilas.
2925	Grupo C-H de alifáticos
2135	Grupo C $\equiv$ C
1647	$\nu$ C=O de amida primária
1558	$\delta$ N-H de amida secundária
1406	$\delta$ Ânion carboxilato (-COO <sup>-</sup> )
1080	Fosfato (P-O-C)
1035	Fosfato (P-OH)
601	$\delta$ N-H fora do plano.

$\nu \rightarrow$  Estiramento;  $\delta \rightarrow$  Deformação angular.

A banda em 3406 cm<sup>-1</sup> representa o estiramento assimétrico de NH<sub>2</sub> de amina e o arredondamento dessa banda indica a presença de grupos hidroxila (-OH). De acordo com a literatura (FISCHER et al., 2006; SUN et al., 2009) estes grupos são decorrentes da presença de proteínas e grupos acetamina da fração quitina contida na parede celular de fungos e também de glicose (BAI e ABRAHAM, 2002). Bandas nessa região também foram observadas por Mungasavalli et al. (2007) em estudos com biomassa de *Aspergillus niger* para biossorção de cromo. Estes autores observaram que o estiramento do grupo-OH pode ocorrer também devido à presença de ácidos carboxílicos (-COOH), que podem ser identificados em bandas muito largas, na faixa de 3430 a 3400 cm<sup>-1</sup>.



A banda em  $2925\text{ cm}^{-1}$  representa o estiramento C-H de compostos alifáticos referentes a carboxilas. Kapoor e Viraraghavan (1997) observaram banda em comprimento de onda semelhante. A banda em  $2135\text{ cm}^{-1}$  é característica de grupos  $C \equiv C$  de alcino (SILVERSTEIN, 1994).

Outras bandas importantes identificadas foram  $1647$  e  $1558\text{ cm}^{-1}$  que representam amidas primárias e secundárias, respectivamente (característica de vibração de estiramento  $-C=O$  de proteínas) e a banda em  $3406\text{ cm}^{-1}$ ; estas bandas também foram observadas por Mungasavalli e colaboradores (2007) e reportadas como responsáveis pelo seqüestro de diferentes metais pela biomassa. A banda de intensidade fraca em  $1406$  foi identificada como banda de deformação axial simétrica de ânion carboxilato ( $-COO^-$ ).

Outro grupo funcional importante para bioabsorção de metais são os fosfatos ( $-PO_4^{3-}$ ), identificados no espectro pela presença das bandas de absorção em  $1080\text{ cm}^{-1}$  (P-O-C) e banda em  $1035\text{ cm}^{-1}$  (P-OH) também foram identificadas por Mungasavalli, Viraraghavan e Jin (2007) para biomassa de *Aspergillus niger*, o que é esperado, tendo em vista que a membrana celular de fungos é composta de fosfolipídios.

Tobin, Cooper e Neufeld (1984) têm reportado que grupos funcionais semelhantes a amidas ( $-NH_2$ ), fosfatos ( $-PO_4^{3-}$ ), carboxil ( $-COOH$ ), e hidroxilas ( $-OH$ ) são responsáveis por seqüestro de metais pela biomassa fúngica, como por exemplo, de Cr, Th, Mo, V, Ni.

Outra banda encontrada que evidencia a presença de amins e amidas é a banda em  $601\text{ cm}^{-1}$ , que representa a deformação angular da ligação N-H fora do plano. A região entre  $900$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  é identificada como a região de identidade de microrganismos (FISCHER et al. 2006).

A presença dessas bandas de absorção confirma a capacidade do fungo em remover metais do meio aquoso, pois íons metálicos presentes em solução se ligam a esses grupos funcionais, seja por formação de complexos ou por atração eletrostática. Segundo Mungasavalli e colaboradores (2007) os grupos amina são os principais responsáveis pela remoção de íons cromato em solução ácida. A carga negativa dos íons cromato é eletrostaticamente atraída pela carga positiva de amins protonadas presentes na parede celular de *Aspergillus niger*. Entretanto, cátions metálicos são removidos principalmente por grupos carboxila e hidroxilas.

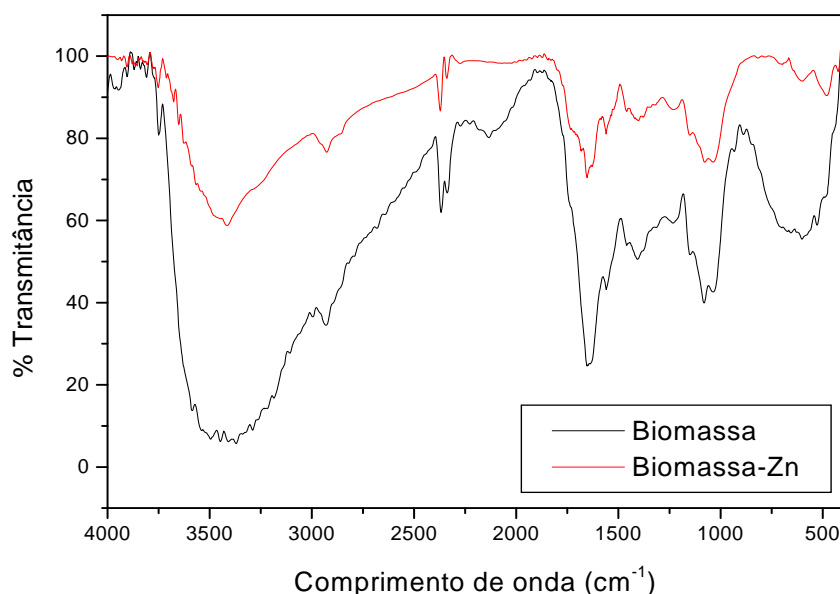
A confirmação de grupos amino, fosfato e carboxil sugere que o bioabsorvente é composto principalmente por quitina e glucana. A parede celular do fungo pode ser considerada como um mosaico de diferentes grupos funcionais que atuam como complexos de coordenação quando em presença de íons metálicos (SANGHI et al., 2009).

Os espectros da biomassa antes e depois da bioabsorção com  $300\text{mg Zn}^{2+}/\text{L}$  estão apresentados na Figura 3.

Analisando os espectros da Figura 3, observa-se que houve redução de intensidade em todas as bandas de absorção do espectro da biomassa após a bioabsorção de  $\text{Zn}^{2+}$  com relação ao espectro da biomassa antes da bioabsorção.

A diferença mais marcante entre os dois espectros é a intensidade das bandas em  $3406$ ,  $1647$ ,  $1080$  e  $1035\text{ cm}^{-1}$  identificadas como grupos hidroxil, carboxil e fosfatos. Tem sido reportado na literatura (AMINI et al., 2009a, AMINI et al., 2009b; VOLESKY, 2007) que grupos hidroxil estão envolvidos na bioabsorção de cátions metálicos, como no caso o  $\text{Zn}^{2+}$ . Os grupos funcionais referidos possuem cargas negativas que interagem com as cargas positivas dos íons metálicos, promovendo a ligação metal-biomassa.

Bandas na região de baixo comprimento de onda ( $<800\text{ cm}^{-1}$ ) foram identificadas no espectro da biomassa após bioabsorção de  $\text{Zn}^{2+}$ . Segundo AKAR, et al. (2009), bandas arredondadas na região de baixo comprimento de onda ( $<800\text{ cm}^{-1}$ ) podem ser atribuídas à interação entre  $\text{Zn}^{2+}$  e os bioligantes contendo nitrogênio.



**Figura 3: Espectro na região do infravermelho da biomassa de *Aspergillus niger* em pastilha de KBr, após bioissorção com solução de 300 mg  $Zn^{2+}$ /L por 24h .**

### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO METAL RETIDO NA BIOMASSA

A determinação de  $Zn^{2+}$  na biomassa foi realizada para confirmar a remoção de metal pela biomassa. Na Tabela 3 estão apresentados os teores de  $Zn^{2+}$  retidos na biomassa antes e depois do experimento de bioissorção.

**Tabela 3: Concentração de metal retido na biomassa.**

Biomassa	Concentração média ( $\mu g Zn^{2+}/g$ de biomassa)
Antes da bioissorção	$0,2220 \pm 0,007$
Após bioissorção	$1,3957 \pm 0,009$

A concentração de metal retido pela biomassa foi calculada pela diferença entre a concentração de zinco na biomassa após bioissorção e a concentração de zinco na biomassa antes da bioissorção, ambas apresentadas na Tabela 3. Com base na Tabela 3, calculou-se a concentração de  $Zn^{2+}$  retida em 1g de biomassa, que correspondeu a 1,1737 mg  $Zn^{2+}$ . Como a quantidade de biomassa utilizada no experimento de bioissorção foi de 8g tem-se que a quantidade de  $Zn^{2+}$  retida em 8g de biomassa (que foi a massa utilizada no experimento de bioissorção em batelada) foi de 9,3896 mg  $Zn^{2+}$ .

Levando-se em consideração que em 50mL de solução de 300mg  $Zn^{2+}$ /L tem-se 15 mg  $Zn^{2+}$ /L e sendo esta a concentração inicial de metal na solução (adsorvato), pode-se concluir que houve uma retenção de 62,59% de  $Zn^{2+}$  pela biomassa.

De acordo com os resultados expostos na Tabela 3 é observado que a biomassa removeu o  $Zn^{2+}$  da solução sintética.





## CONCLUSÕES

De acordo com a análise dos espectros no infravermelho, foram identificados vários grupos funcionais que atuam como sítios de adsorção para metais. Dentre os grupos funcionais identificados, estão grupos hidroxil, carboxílicos e carbonílicos, fosfatos e amino. Portanto, a biomassa do fungo *Aspergillus niger* pode ser usada como bioissorvente para metais pesados de efluentes.

Pela comparação dos espectros da biomassa antes e após bioissorção, verificou-se que os grupos funcionais envolvidos na bioissorção de  $Zn^{2+}$ , pelo *Aspergillus niger* estudado, são grupos hidroxil, carboxil e fosfatos.

Através da determinação de metais na biomassa foi verificado que o a biomassa do fungo *Aspergillus niger* alcançou um potencial de remoção de  $Zn^{2+}$  de 62,59%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKAR, S. T.; GORGULO, A.; ANILAN, B.; KAYNAK, Z.; AKAR, T. Investigation of the biosorption characteristics of lead(II) ions onto *Symphoricarpos albus*: Batch and dynamic flow studies. *Journal of hazardous materials*. v. 165, p. 126-133. 2009.
2. AMINI, M.; YOUNESI, H.; BAHRAMIFAR, N. Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus niger*: response surface methodology and isotherm study. *Chemosphere*. v. 75, p. 7483-1491. 2009a.
3. AMINI, M.; YOUNESI, H.; BAHRAMIFAR, N. Statistical modeling and optimization of the cadmium biosorption process in an aqueous solution using *Aspergillus niger*. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*. v. 337, p. 67-73. 2009b.
4. BAI, R. S.; ABRAHAM, T. E. Studies on enhancement of Cr (VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. *Water Research*. v. 36, p. 1224-1236. 2002.
5. BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and microbial technology*. v. 32, p. 78-91. 2003.
6. FISCHER, G.; BRAUN, S.; THISSEN, R.; DOTT, W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of microbiological methods*. v. 64, p. 63- 67. 2006.
7. KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. v. 61, p. 221-227. 1997.
8. MUKHOPADHYAY, M. Role of surface properties during biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass. *Colloids and surface A: physicochemical and engineering aspects*. v. 239, p. 95-99. 2008.
9. MUNGASAVALLI, D. P.; VIRARAGHAVAN, T.; JIN, Y. C. Biosorption of chromium from aqueous solutions by pretreated *Aspergillus niger*: batch and column studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 301, p. 214-223. 2007.
10. PANDEY, P. K.; CHOUBEY, S.; VERMA, Y.; PANDEY, M.; CHANDRASHEKHAR, K. Biosorptive of removal arsenic from drinking water. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 634-637. 2009.
11. SANGHI, R.; SANKARARAMAKRISHNAN, N.; DAVE, B. C.; Fungal bioremediation of chromates: conformational changes of biomass during Sequestration, Binding, and Reduction of hexavalent chromium Ions. *Journal of hazardous materials*. Dóí: 10.1016/j.jhazmat.2009.04.056.
12. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5 ed., Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro. 1994. p. 387.
13. SUN, X.; WANG, S.; ZHANG, X.; CHEN, J. P.; LI, X.; GAO, B.; YUE, M. Spectroscopic study of  $Zn^{2+}$  and  $Co^{2+}$  binding to extracellular polymeric substance (EPS) from aerobic granules. *Journal of colloid and interface science*. doi: 101016/j.jcis.2009.03.088.
14. TOBIN, J. M.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied Environmental Microbiology*. Canada, v. 47, p. 821-824. 1984.
15. VOLESKY, B. Biosorption and me. *Water resource*. v. 41, p. 4017-4029. 2007.