



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAOPÉBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Otimização do crescimento de *Aspergillus niger* na presença de cianeto

AUTORA: JANE APARECIDA MAPA NOGUEIRA

ORIENTADORA: ISABEL CRISTINA BRAGA RODRIGUES

Ouro Branco - MG

Novembro/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Otimização do crescimento de *Aspergillus niger* na presença de cianeto

Jane Aparecida Mapa Nogueira

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del-Rei.

Ouro Branco - MG

Novembro/2016

Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Jane Aparecida Mapa Nogueira, intitulado: “**Otimização do crescimento de *Aspergillus niger* na presença de cianeto**”, orientado pela Prof.^a Isabel Cristina Braga Rodrigues, apresentado à banca examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Engenharia de Bioprocessos da UFSJ, em 30 de novembro de 2016.

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Isabel Cristina Braga Rodrigues – Orientadora

Flávia Donária Reis Gonzaga – Examinador 1

Katialaine Corrêa de Araújo – Examinador 2

Ouro Branco, 30/11/2016

*“ O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se chegar
a um objetivo. Mesmo não atingindo um
alvo, quem busca e vence obstáculos, no
mínimo fará coisas admiráveis ”*

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida. Agora os desafios são outros. Porém, antes de alçar novos voos, esse é o momento de agradecer a **DEUS** e àqueles que estiveram à minha frente.

Aos meus pais, Cléria e Zé Nogueira, fontes inesgotáveis de amor e doação, dedico o que há de melhor em mim.

Aos meus anjos, Deusi e Nego, por terem me incentivado e ajudado a dar os primeiros passos na minha formação científica.

Ao meu marido Luciano, que não me deixou desistir e sempre me estendeu a mão.

Às minhas irmãs, pela amizade, incentivo e doação.

À professora Isabel que me ajudou com a sua orientação, paciência, dedicação e confiança durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) ao lado de outras agências de financiamento à pesquisa FAPEMIG e CAPES pelos recursos oferecidos.

Aos técnicos Priscila e Wesley, pela dedicação e paciência durante os ensaios no laboratório.

Aos professores da UFSJ (*campus* Alto Paraopeba) pelos ensinamentos eternizados.

Aos amigos da faculdade e irmãos de coração: Ana Flávia, Leidilene, Guilherme e Rayane que sempre acreditaram em mim.

Aos meus familiares e amigos, agradeço pelas palavras de incentivo.

Aos meus colegas de graduação e de trabalho pela graça de conviver com as diferenças.

Enfim, quase **Engenheira de Bioprocessos!**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Geração do cianeto pelas indústrias siderúrgicas	3
2.2	Toxicidade do íon CN^- para os processos biológicos	5
2.3	Tratamentos biológicos para degradação do cianeto	7
2.4	Aplicação do <i>Aspergillus niger</i> para degradação de compostos tóxicos	8
2.5	Planejamento Fatorial	10
3.	OBJETIVOS	13
3.1	Objetivo geral	13
3.2	Objetivos específicos:	13
4.	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Micro-organismo e meio de cultivo	14
4.2	Adaptação de <i>A. niger</i> e preparo de pré-inóculo	14
4.3	Determinação da biomassa microbiana	15
4.4	Cinética de crescimento	15
4.5	Dosagem de cianeto livre	15
4.6	Relação do volume do inóculo com a massa	16
4.7	Otimização da remoção de cianeto através do planejamento fatorial 2^2	16
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1	Adaptação de <i>A. niger</i> e preparo de pré-inóculo	18
5.2	Cinética de crescimento <i>A. niger</i>	18
5.3	Curva padrão para dosagem de CN^- livre	22
5.4	Relação do volume do inóculo com a massa	23
5.5	Planejamento fatorial	23
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	31
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

COPAM – Conselho Estadual de Política Ambiental

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

GRAS – Geralmente reconhecido como seguro (do inglês *Generally Recognized as Safe*) – é a designação da *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos para produto químico, substância ou micro-organismos adicionados ao alimento que são considerados seguros por especialistas

CCD – *Central Composite Design*

RESUMO

Compostos cianídricos estão presentes, nas mais diferentes concentrações, em diversos tipos de águas residuárias, como as geradas pelas indústrias siderúrgicas, de galvanoplastia e de extração e recuperação do ouro. A busca por processos biológicos para tratamento de efluentes industriais com alta carga tóxica, como é o caso do cianeto, torna-se cada vez mais evidente nas linhas de pesquisas. E os fungos são uma forte aposta para compor o processo biológico, pois os mesmos possuem maior robustez para crescerem e se adaptar em meios que recebem cargas de compostos tóxicos, e através da secreção de enzimas podem tolerar ou assimilar a presença desses compostos. Em vista disso, o presente trabalho propôs a otimização do crescimento do *Aspergillus niger* na presença de cianeto. Através do planejamento fatorial, o pH e a concentração de cianeto foram avaliados em diferentes níveis, com o objetivo de otimizar o crescimento de *A. niger*. Os resultados dos experimentos permitiram inferir que o pH e a concentração de cianeto influenciaram de maneira significativa a produção de biomassa, sendo a mesma otimizada quando os níveis máximos de ambos os fatores são utilizados. A interação entre estes fatores não se mostrou significativa. Já a metodologia para dosagem de cianeto não foi validada, logo os resultados que avaliaram a remoção do íon no meio de cultivo foram inconclusivos. Enfim, *Aspergillus niger* apresentou boa adaptação em meio contendo cianeto e, dessa forma, os resultados indicam a possibilidade de utilizar este micro-organismo nos processos de biodegradação deste contaminante.

Palavras chave: Cianeto, *Aspergillus niger*, otimização, biodegradação.

1. INTRODUÇÃO

Embora a industrialização tenha trazido grandes avanços para a sociedade, cresceu-se o número e a magnitude de impactos ambientais devido ao descarte inadequado dos efluentes gerados (DUTRA et al., 2002). Assim, a demanda por tratamentos que reduzam a concentração dos contaminantes presentes nos efluentes industriais tem crescido e também as restrições legais em relação aos limites para lançamentos de efluentes. Estes fatores fazem com que as fontes geradoras busquem tecnologias de tratamento dos rejeitos que sejam mais adequadas, para atingirem os níveis de descarte exigidos pela legislação, e que sejam economicamente viáveis ao seu processo (RITCEY, 2005).

Cada atividade produtiva demanda diferentes matérias-primas e reagentes, e é notável que estes caracterizarão o efluente final gerado pelos diferentes tipos de indústrias. Por exemplo, o processo siderúrgico que utiliza o carvão mineral como combustível nos altos-fornos, produz efluentes gasosos que contém além dos finos de carvão, uma série de produtos oriundos da queima deste carvão, dentre eles o cianeto. A lavagem desses gases evita que esses compostos tóxicos cheguem à atmosfera, no entanto, geram efluentes líquidos contaminantes dos cursos d'água (SANTOS, 2010).

O cianeto presente em águas residuárias é potencialmente tóxico e o limite aceitável para descarte no curso d'água é mínimo. E diferentes órgãos ambientais estabelecem as normativas definindo os valores máximos toleráveis deste composto químico nos corpos receptores. Como é o caso do CONAMA, que é o órgão consultivo e deliberativo do Meio Ambiente de extensão federal, o FEEMA é o órgão de controle ambiental do Estado do Rio de Janeiro e CETESB que é a Companhia Ambiental, vinculada ao estado de São Paulo. No entanto, observa-se que a concentração e a faixa de pH estabelecidos são iguais para todos os órgãos, sendo $0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ para a concentração de cianeto e a faixa de pH entre 5 a 9 (DUTRA et al., 2002).

A literatura fornece diversas opções para o tratamento de efluentes que contém cianeto, como precipitação, complexação, adsorção e oxidação (SCHNEIDER,

2009). No entanto, estes métodos apresentam inconvenientes como o alto consumo de produtos químicos, formação de intermediários tóxicos e custo elevado (TIONG et al., 2013).

Por esse motivo, os processos biológicos têm se mostrado atrativos, uma vez que já são descritos micro-organismos que toleram a presença de compostos tóxicos e que dispõem de vários mecanismos para utilizar as mais diversas fontes de carbono e energia para o seu crescimento, como é o caso do fungo *Aspergillus niger* (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). A utilização de um agente biológico no tratamento de efluente é uma proposta atraente do ponto de vista econômico, uma vez que requer equipamentos simples e de fácil controle operacional, economia de reagentes e capacidade de tratamento de efluentes com alta concentração de substâncias orgânicas (GRANATO, 1995; DASH et al., 2009).

Assim, o presente trabalho busca a otimização da remoção biológica de cianeto, utilizando *Aspergillus niger*. Tem-se como propósito fornecer subsídios para o desenvolvimento de tecnologia de biodegradação de cianeto presente nos efluentes líquidos gerados pelas indústrias siderúrgicas. Para avaliar as melhores condições de crescimento desse fungo foi utilizado planejamento fatorial 2^n , sendo n o número de variáveis analisadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Com a finalidade de se obter definições adequadas dos assuntos e métodos utilizados, este capítulo apresenta uma breve revisão da literatura relacionada ao conceito de geração do cianeto nas etapas de produção na siderurgia, toxicidade do íon CN^- , algumas aplicações biológicas, a bioquímica dos micro-organismos frente a esse íon e a ferramenta estatística conhecida como planejamento fatorial utilizada no processo de otimização proposto neste trabalho.

2.1 *Geração do cianeto pelas indústrias siderúrgicas*

Os cianetos são compostos químicos que contêm o grupo ciano (CN), como parte da sua estrutura molecular, sendo altamente reativo. Os compostos de cianeto de maior acesso no meio ambiente são o cianeto de hidrogênio, cianeto de sódio e cianeto de potássio. Algumas plantas produzem naturalmente alguns compostos à base de cianeto conhecidos como glicosídeos cianogênicos. Quando são hidrolisados ou digeridos, formam cianeto de hidrogênio. Os cianetos formam complexos fortes com vários metais e é empregado em grandes concentrações em alguns processos industriais (CETESB, 2014).

Embora o cianeto seja um reagente altamente requerido e essencial no processo de lixiviação de metais preciosos como o ouro e no acabamento superficial de alguns metais como a prata (ANDRADE e MARTINS, 2005) na indústria siderúrgica este composto é gerado como subproduto de forma indesejável e potencialmente agressiva. O cianeto de hidrogênio é produzido durante a queima de materiais contendo carbono, nitrogênio, hidrogênio e metais alcalinos. As áreas da indústria siderúrgica mais propensas a liberar compostos cianídricos são a coqueria e o alto-forno (PELETIN, 2008).

O processo de coqueificação consiste na mistura de carvões a uma alta temperatura, próxima de 1.100°C , numa câmara sem circulação de ar dotada de uma abertura superior por onde saem as matérias voláteis, estas são recolhidas para tratamento e para aproveitamento de substâncias com valor agregado. Desta

forma, a coqueificação consiste em submeter uma mistura de carvões de características adequadas a uma destilação na ausência do ar. O resíduo sólido, poroso, infusível e basicamente constituído de carbono, resultante deste processo é o coque (MACHADO, 2006).

Já o alto forno é um tipo de forno de cuba empregado na produção de ferro gusa, pela fusão redutora de minérios de ferro em presença de carvão vegetal ou coque e fundente. Estes reagentes são carregados no topo do forno e, na descida, são transformados pela ação dos gases ascendentes, provenientes da combustão do carvão com o oxigênio soprado pelas ventaneiras. Obtém-se, dessa forma, escória e ferro gusa líquidos pelo cadinho, parte inferior do forno, e material particulado e gases no topo do mesmo (MACHADO, 2006). A maioria dos cianetos formados no alto-forno são os compostos CN^- , HCN, KCN e NaCN (PELETIN, 2008).

Peletin (2008) mostra que existe um excesso de carbono e de nitrogênio no alto-forno. Nota-se que abaixo de $1.000^{\circ}C$, não há formação de cianeto na cuba do alto-forno. Na faixa de temperatura entre $1.000^{\circ}C$ e $1.300^{\circ}C$, com um meio redutor, onde a relação de carbono para o oxigênio é maior ou igual a um ($C / O \geq 1$), são formados cianetos. Enquanto em condições oxidativas, onde a relação de carbono para o oxigênio é menor do que um ($C / O < 1$), não há praticamente nenhum conteúdo de cianeto. Em condições ideais, onde a temperatura interna da fornalha fica em torno de 1.200 a $1.300^{\circ}C$ e a relação de carbono e oxigênio é maior ou igual a dois ($C / O \geq 2$), o rendimento de ácido cianídrico corresponde a mais de 80%. Assim, cerca de 3% do hidrogênio que alimenta o alto forno está envolvido na formação de HCN.

Uma vez gerados, esses compostos tornam-se presentes em meio aos outros gases gerados no interior do forno. Porém, quando submetida a limpeza destes gases com água do sistema de lavagem, esse efluente passa a transportar muitos materiais contaminantes, entre eles está o cianeto. Sendo assim, antes do reuso da água dentro do processo industrial ou mesmo antes de enviar para o tratamento biológico essas substâncias tóxicas precisam ter suas concentrações reduzidas (MACHADO, 2006). No entanto, esse refino do sistema de lavagem, em grande parte é feito através de tratamento físico-químico. Observa-se que os processos físico-químicos de tratamento possuem custos relativamente mais elevados que os

biológicos que também têm a vantagem de exercer menor efeito adverso sobre o meio ambiente (PELETIN, 2008).

2.2 Toxicidade do íon CN^- para os processos biológicos

Tanto o íon cianeto (CN^-), quanto o ácido cianídrico (HCN) interferem de forma negativa nos os processos biológicos em geral. Essa toxicidade está relacionada com a ação rápida e letal que estes compostos desencadeiam no organismo em decorrência do bloqueio da cadeia respiratória e, por conseguinte, a síntese de ATP. A ação tóxica do íon CN^- e do HCN está relacionada pela sua afinidade com o íon férrico (Fe^{3+}) da citocromo c oxidase, último transportador da cadeia respiratória, impedindo que ocorra o consumo de oxigênio (PERUZZO e CANTO, 2010).

Quando ocorre o descarte indevido do efluente com essa carga tóxica em um corpo receptor, os peixes são os mais afetados, uma vez que eles estão em contato direto com a água. No estudo feito por Eisler (1991) concentrações entre 5,0 e 7,2 mg L⁻¹ de cianeto livre é tolerado pelos peixes, no entanto, podem provocar efeitos adversos sobre sua natação e reprodução. Enquanto concentrações de 200 mg L⁻¹ foram letais para a maioria das espécies de peixes. Por outro lado, os estudos mostram que alguns micro-organismos, como culturas mistas com *Rhodotorula rubra* (LINARDI et al., 1995); grânulos imobilizados de *Rhodococcus* (MANIYAM et al., 2013); e *Methanosarcina* sp. (NOVAK et al., 2013) foram capazes de tolerar a presença desse composto tóxico e expressar mecanismos para utilizar as mais diversas fontes de carbono e energia para o seu crescimento (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Embora, existam micro-organismos que toleram e que degradam esses compostos tóxicos no ambiente natural, a necessidade de tratamento e adequação dos parâmetros químicos, por parte da fonte geradora não deixa de existir. Mas quando se conhece os efeitos de alguns parâmetros sobre a formação de uma espécie mais agressiva, muitos riscos podem ser evitados. Como é o caso dos reagentes a base de cianeto, que ao serem manipulados deve-se atentar para a

faixa de pH, uma vez que este contribui para a formação do HCN e CN^- , sendo a toxicidade do HCN ainda maior (SMITH e MUDDER, 1991). A figura 2.1 relaciona a proporção relativa das três formas de cianeto (CNO^- , HCN e CN^-) em decorrência do pH e do potencial redox do sistema.

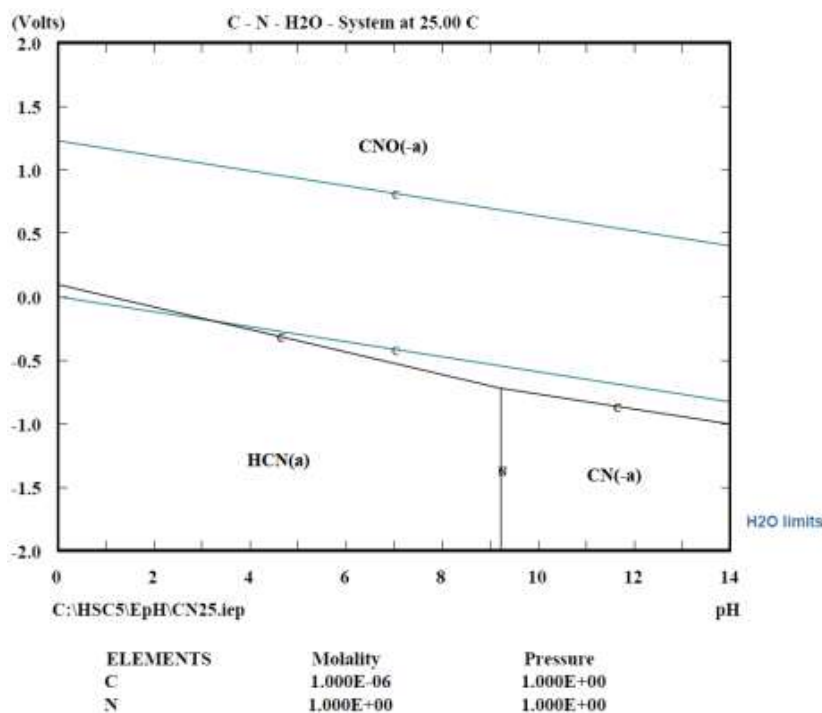


FIGURA 2.1: Diagrama do potencial redox do meio (Eh, dado em volts) *versus* pH do meio para as diferentes espécies de cianeto (SMITH e MUDDER, 1991).

A figura 2.1 também mostra que em meio aquoso com pH 9,3 o cianeto se apresenta equitativamente distribuído, como HCN e CN^- e abaixo deste pH ocorre predominância da espécie hidrogenada. Na presença de um agente oxidante, o cianeto livre pode ser oxidado para cianato (CNO^-), em toda faixa de pH.

Dessa forma, a toxicidade das soluções depende da quantidade de íon cianeto livre presente e do pH do meio. Sendo assim, alguns complexos que apresentam alta solubilidade em solução aquosa são altamente tóxicos, em condições de pH menor que 9, por causa da disponibilidade do HCN. Os cianetos mais tóxicos são geralmente os sais simples como o NaCN, KCN, $\text{Ca}(\text{CN})_2$ e $\text{Hg}(\text{CN})$ (SMITH e MUDDER, 1991).

2.3 *Tratamentos biológicos para degradação do cianeto*

A literatura cita diferentes tratamentos para efluentes contendo cianeto, cada um com suas vantagens e limitações. No entanto, a aplicação de tratamentos físico-químicos para esse fim, ainda sobressai se comparado com os métodos biológicos (SCHNEIDER, 2009). Isso porque ainda falta uma compreensão de como se processa a degradação biológica frente a um composto tão tóxico (EBBS, 2004).

Quando se aplicam processos biológicos na degradação de cianetos, avalia-se a capacidade dos micro-organismos (bactérias, fungos ou algas) metabolizarem e transformarem estes íons tóxicos em produtos menos agressivos ao meio ambiente, sendo o mesmo convertido em amônia e nitratos. Outra possibilidade é a decomposição completa do CN^- com a incorporação dos átomos de carbono e/ou nitrogênio à biomassa microbiana (GRANATO, 1995).

A existência de rotas metabólicas microbianas, que são capazes de incorporar o íon CN^- , tem permitido o desenvolvimento de biotecnologias para degradar os compostos que liberam este íon nos fluxos de resíduos industriais. As vias de degradação são sensíveis à forma e concentração dos compostos de cianeto, às condições físico-químicas do meio e à presença de substâncias interferentes ou inibitórias (EBBS, 2004).

Um dos primeiros relatos de processo biotecnológico para tratamento de efluente contendo cianeto, com aplicação bem-sucedida, ocorreu na *Homestake Mining Company* em Dakota do Sul (EUA), explorando a oxidação biológica para tratar efluentes de minas e fábricas. O processo desenvolveu-se em dois estágios: i) primeiro ocorreu a oxidação bacteriana de CN^- e SCN^- liberando CO_3^{2-} , SO_4^{2-} e NH_4^+ com a participação dos micro-organismos nativos que foram adaptados a meios contendo cianeto e tiocianato; ii) O segundo estágio empregou as bactérias *Nitrosomonas* para a nitrificação da NH_3 gerada no processo, e *Nitrobacter* para desnitrificação do NO_3^{2-} e liberação de N_2 , reduzindo, dessa forma, os teores de cianeto e nitrogênio do efluente. O processo apresentou eficiência na remoção de cianeto superior a 95% (RITCEY, 2005).

Outro estudo promissor que avaliou o emprego de um biorreator no processo de degradação de efluentes contendo cianetos, foi desenvolvido pelo CETEM/CNPq. Os ensaios de degradação foram realizados em reatores de mistura completa, operados em regime contínuo, em escala de laboratório, e diferentes concentrações de poluentes no afluente sintético a ser tratado $[\text{CN}^-]$ entre 20 e 44 mg L^{-1} , $[\text{SCN}^-]$ entre 22 e 35 mg L^{-1} , além de alguns metais como ferro, zinco e cobre. A redução nas concentrações de cianocomplexos, pela biomassa, foi superior a 96%, com a produção de efluentes aptos para descarte nos corpos receptores. No entanto, a publicação não traz dados sobre os tipos de micro-organismos empregados e nem sobre a variação do pH do sistema (GRANATO, 2005).

Outra aplicação similar foi utilizando o *tricking filter*, um tipo de reator que retém micro-organismos que apresentam taxas de crescimento lentas, como as bactérias que degradam cianeto e tiocianato. Os estudos, realizados em escala piloto, com as concentrações de cianeto e tiocianato na entrada do biofiltro de aproximadamente 30 mg L^{-1} , atingiram elevada eficiência de remoção de cianeto, acima de 97% ao final do processo (SILVA, 2008).

No entanto, Ebbs (2005) deixa claro que o futuro das tecnologias de biodegradação de cianeto dependerá da sua capacidade de competir com as tecnologias físico-químicas ou de preencher necessidades específicas associadas ao tratamento de efluentes industriais. Mas esse questionamento, é repreendido pela exposição dos resultados apresentados por Granato (1995) ao designar que os processos biológicos requerem equipamentos simples e de fácil controle operacional, oferecem economia de reagentes e capacidade de tratamento de efluentes contendo além de compostos tóxicos oriundos dos processos industriais, alta concentração de substâncias orgânicas.

2.4 Aplicação do *Aspergillus niger* para degradação de compostos tóxicos

A exploração dos fungos pelo homem não é recente e a sua aplicação na produção de produtos comerciais vem se destacando desde o século passado

(PAPAGIANNI, 2004). Dentre os diversos gêneros fúngicos destaca-se o *Aspergillus* pela vasta capacidade de produção de enzimas extracelulares de aplicação industrial (BON, 2008).

O gênero inclui aproximadamente 200 espécies, entre as quais se destaca o *Aspergillus niger*. O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é geralmente reconhecido como GRAS, que significa “geralmente reconhecido como seguro”, do inglês *Generally Recognized as Safe*, é a designação da *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos para produto químico, substância ou micro-organismos adicionados ao alimento que são considerados seguros por especialistas. É uma estirpe utilizada em uma ampla gama de processos industriais, podendo participar nas indústrias de alimentos, enzimas, compostos orgânicos e farmacêutica. Entre os compostos orgânicos, produzidos por esta espécie, podem destacar-se a produção de ácido cítrico e glucônico. Já as enzimas sintetizadas por estes fungos incluem a glucoamilase, amilase, protease, celulase, lipase, hemicelulase e glicose-oxidase (LU, 2015).

Uma característica destacável deste organismo filamentoso é a sua morfologia complexa. Em diferentes cultivos duas formas de crescimento podem ser observadas, a micelial e a forma peletizada. Um estudo da morfologia fúngica é altamente recomendado para otimização de qualquer processo, pois esta pode fornecer indicações sobre a utilização e/ou tolerância à presença de determinado composto tóxico (WUCHERPFENNIG, 2011).

Os fungos do gênero *Aspergillus* têm demonstrado grande potencial para o tratamento de águas residuária com compostos tóxicos devido a sua capacidade de produção de enzimas (RODRIGUES, 2011). A tabela 2.1, apresenta algumas pesquisas com o uso do *Aspergillus niger* para remoção de diferentes poluentes.

TABELA 2.1: Algumas pesquisas que envolveram o uso do *Aspergillus niger* para remoção de poluentes.

Referência	Reator	Poluente
Assadi e Jahangiri, 2001	<i>Airlift</i>	Corantes têxteis
Price <i>et al.</i> , 2001	Batelada	Metais pesados
Rao e Viraraghavan, 2002	Reator de coluna com vazão descendente	Fenol
Sampaio, 2005	Batelada	Metil paration e atrazina

No entanto, ainda são poucos os estudos que tratam da utilização de *Aspergillus niger* na biodegradação de cianeto. Das e Santra (2009) comprovaram em seu estudo de escala laboratorial, utilizando frascos agitados, que a espécie *Aspergillus niger* tolerou até 40 mg L⁻¹ de cianeto. Os autores obtiveram uma eficiência de 96% na remoção do cianeto para uma concentração inicial de 15 mg L⁻¹ e 85,3% na remoção do cianeto para uma concentração 20 mg L⁻¹, num período de 9 dias.

A alta eficiência de remoção de poluentes, a robustez dos cultivos e o baixo custo dos tratamentos biológicos são alguns dos motivos pelo quais se tem intensificado os estudos sobre reatores biológicos com fungos para o tratamento de águas residuárias industriais, bem como sua utilização em combinação com sistemas anaeróbios e tratamentos químicos, uma vez que os fungos melhoram a eficiência global de remoção de vários poluentes (RODRIGUES, 2011).

2.5 Planejamento Fatorial

A falta de planejamento muitas vezes é a causa do insucesso de uma investigação. E uma opção viável e que permite alcançar bons resultados na estruturação da base experimental é através dos modelos estatísticos. A técnica de

planejamento fatorial investiga as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Além disso, Neto (2010) esclarece que o estudo dos dados através do planejamento possibilita a manipulação de diversos fatores simultâneos em apenas uma análise, economizando tempo de trabalho e recursos financeiros, frente a sistemas univariados de análise. Reforçando esse conceito, Marinho (2005) afirma que o uso de planejamento experimental baseado em princípios estatísticos consente aos pesquisadores a extração máxima de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos.

A primeira etapa a ser conduzida para o processamento experimental parte da triagem que determina as variáveis experimentais e as interações entre variáveis que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Em uma etapa seguinte, deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência (o efeito) das diferentes variáveis no resultado, podendo ser Planejamento Fatorial Completo ou Planejamento Fatorial Fracionário e, dessa forma, efetuar a otimização da análise.

Para conduzir um experimento com o nível de erro aceitável, adota-se a realização de triplicatas para cada condição analisada, no qual a média da triplicata estima o teor do analito na amostra, enquanto o desvio padrão estima o erro experimental em uma determinação (PASSARI, 2011). No entanto, para a condução de um experimento que envolva a manipulação de um lote grande de variáveis, torna-se difícil e trabalhoso estimar o erro uma vez que exige um número grande de experimentos, refletindo em custo, tempo e logística. Para contornar este infortúnio e obter uma boa estimativa dos erros, é normalmente incluído um ponto central no planejamento, em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado e as replicatas são aplicadas apenas para este ponto. Deste modo, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto em planejamentos de triagem, como em metodologias de superfície de resposta (TEÓFILO et al., 2006).

Após a realização dos experimentos de triagem, faz-se uma seleção dos fatores significativos e uma metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser aplicada para otimização do experimento. Neste sentido, o significado de otimização é definido por encontrar valores das variáveis que levarão a uma melhor

resposta desejada, ou melhor, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. Após essa etapa, é possível deslocar-se sobre a superfície de resposta ajustada, a fim de localizar regiões que satisfaçam condições de interesse (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; NETO, 2010).

A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (SARAMAGO, 2008).

O mercado oferece diversos tipos de *softwares* que realizam cálculos de planejamentos experimentais, tais como *Statistica*, *Unscrambler*, *Statgraphics*, *Design Expert*, *Modde*, *Minitab* dentre outros. Porém, a maioria destes programas não são gratuitos e muitas vezes processam resultados complicados de serem entendidos por um pesquisador com pouca experiência no assunto (TEÓFILO E FERREIRA, 2006). Por isso, os autores Teófilo e Ferreira (2006) disponibilizam diversas planilhas em Excel® para tratamento de dados de planejamento fatorial e que foram utilizadas neste trabalho.

O planejamento fatorial é comumente utilizado em estudos da área de química analítica (NETO, 2010), sendo ainda pouco empregado na otimização de processos relacionados às tecnologias ambientais. Dessa forma, uma extensiva busca na literatura não encontrou trabalhos que utilizassem esta ferramenta para otimização de processos de remoção biológica do cianeto.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Otimizar o crescimento de culturas de *Aspergillus niger*, através da produção de biomassa, em presença de cianeto a fim de avaliar o potencial do micro-organismo na remoção deste contaminante em efluentes líquidos industriais.

3.2 *Objetivos específicos:*

- i. Estudar a cinética de crescimento em meios de cultura tendo como variável controlada o pH;
- ii. Estudar a cinética de crescimento em meios de cultura em diferentes concentrações de cianeto;
- iii. Otimizar a produção de biomassa através do planejamento fatorial do tipo 2^2 com 4 repetições no ponto central;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Micro-organismo e meio de cultivo*

Para realização dos experimentos utilizaram-se inóculos de uma cultura de *Aspergillus niger* já cultivada anteriormente no Laboratório Biotecnológico da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Alto Paraopeba. O meio de cultura adotado para o crescimento do fungo foi o *Czapeck Dox*, sendo referenciado no trabalho de Das e Santra (2011) como um meio adequado para o cultivo de *Aspergillus niger*. Foi utilizado meio *Czapeck Dox* da marca Sigma-Aldrich®.

4.2 *Adaptação de A. niger e preparo de pré-inóculo*

De acordo com as recomendações do fabricante, preparou-se o meio de cultura com concentração de 35 g L⁻¹, para um volume final de 100 mL em cada *erlenmeyer*. O meio foi inoculado com suspensão de esporos produzida em solução salina (NaCl 0,85%). As cepas foram, então, previamente adaptadas em condições de pH e concentração de cianeto crescentes, onde o pH foi de 7,0 a 10,5 e a concentração de CN foi de 5 a 40 mg L⁻¹. Esta cultura adaptada foi utilizada para continuidade dos experimentos. Para ajuste do pH do meio utilizou-se solução de NaOH a 0,5 mol L⁻¹.

Os pré-inóculos, produzidos para todos os ensaios do planejamento fatorial, foram feitos adicionando-se 4 mL das culturas adaptadas em 100 mL de meio *Czapeck Dox*, sendo posteriormente incubados, em agitador orbital termostatzado, a 28°C e 180 min⁻¹, durante 7 dias.

As soluções contendo cianeto foram manipuladas sempre em pH acima de 9,5 para garantir a não formação do gás cianídrico (HCN) e consequentemente a sua volatilização. Além disso, em todos os ensaios cujo cianeto foi utilizado, tomou-se o cuidado de descontaminar o local de trabalho e todas as vidrarias com solução de hipoclorito 10% em pH 11,0. Todos os meios de cultura contaminados com fungo foram descartados de acordo com as normas de biossegurança.

4.3 Determinação da biomassa microbiana

Determinou-se a concentração de biomassa através da técnica de gravimetria. Secaram-se os papéis de filtro em uma estufa a 80°C, durante 48 horas, e após esse período, os mesmos foram pesados em balança analítica (Shimadzu modelo AY220). Lavou-se e filtrou-se a massa micelial em papel de filtro quantitativo (Unifil, 7-12µM de retenção de partículas) e posteriormente transferiu-se para a estufa a 80°C para o processo secagem. Após o período de 48 horas, coletou-se o peso da membrana acrescido de biomassa. Determinou-se o peso da massa seca pela diferença entre a massa do papel de filtro antes e após a filtração do meio. Para transformar o valor da massa seca (g) em concentração (mg L⁻¹) utilizou-se a equação 4.1.

$$\text{Concentração da biomassa (mg L}^{-1}\text{)} = (\text{massa seca (g)} * 1 \times 10^4) \quad (4.1)$$

4.4 Cinética de crescimento

Avaliou-se a cinética de crescimento do *A. niger* em meio *Czapeck Dox* em diferentes pH 7,0; 8,5 e 10,0. Todos os experimentos foram executados em triplicata. Em tubos Falcon de 50 mL, adicionaram-se 9 mL de meio e 1 mL da suspensão de *A. niger*. Os tubos foram incubados em agitador orbital termostatizado a 28°C e 180 min⁻¹. Durante oito dias retiraram-se, diariamente, três tubos falcon para cada valor de pH e o meio foi filtrado para obtenção da massa microbiana conforme descrito no item 4.3.

O mesmo procedimento foi usado para avaliar a cinética de crescimento de *A. niger*, em meio suplementado com 5 mg L⁻¹; 10 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ de cianeto. Neste caso, o meio de cultivo foi mantido em pH 10,0.

4.5 Dosagem de cianeto livre

Para dosagem de cianeto livre utilizou-se o *Kit Hach* pelo método *Hach 8027 Pyridine-Pyrazalone* para faixa de detecção de 0,001 a 0,240 mg L⁻¹ de CN⁻. Os reagentes encontram-se padronizados e pré-dosados para uso em amostras de 10 mL e a reação foi executada conforme as recomendações do fabricante.

Após adição dos reagentes do *kit* à amostra, quando na presença de cianeto, o meio adquire cor rosa nos primeiros minutos e em seguida uma coloração azul. Foi feita varredura, em espectrofotômetro, de uma amostra padrão entre os comprimentos de onda de 100 a 900 nm e detectou-se absorvância máxima em 612 nm, confirmando as recomendações do fabricante do *kit*. Para amostra com concentração superior a faixa de detecção, tornou-se necessário realizar diluição.

Para quantificação da concentração de cianeto elaborou-se uma curva de calibração correlacionando a absorvância com as respectivas concentrações de cianeto, a saber, 0,05 mg L⁻¹; 0,12 mg L⁻¹; 0,24 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹.

4.6 Relação do volume do inóculo com a massa

Para assegurar que todos meios fossem submetidos à mesma carga microbiana, realizaram-se ensaios para padronizar o volume de inóculo com a quantidade de massa microbiana. O ensaio foi baseado na técnica de filtração gravimétrica. Pipetou-se 4 mL de inóculo e submeteu-se ao processo de filtração. As membranas utilizadas no processo de filtração foram secas durante 12 horas em estufa a 80°C. A secagem das membranas foi realizada antes e após a etapa da filtração. A diferença obtida entre o peso da membrana antes e após a filtração foi relacionada ao valor da biomassa correspondente aos 4 mL de inóculo.

4.7 Otimização da remoção de cianeto através do planejamento fatorial 2²

Após a adaptação do *A. niger* realizaram-se ensaios para avaliar a influência do pH e da concentração inicial de cianeto sobre a formação de biomassa e a remoção do íon. Conduziu-se o delineamento experimental por meio de 4 ensaios, seguindo um planejamento experimental fatorial 2² com 4 repetições no ponto central. As faixas de pH e concentração de cianeto e seus respectivos níveis estão detalhados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1: Matriz do planejamento fatorial para avaliar a influência do pH e da concentração inicial de cianeto sobre a concentração de biomassa e a remoção de cianeto.

Nível	-1	0	+1
pH	9,5	10	10,5
[CN ⁻]	2,5	7,5	12,5

Realizaram-se os experimentos em frascos *erlenmeyer* de 250 mL para um volume de 100 mL de meio de cultivo e 4 mL de inóculo sob agitação de 180 min⁻¹, a uma temperatura de 28°C, durante 192h (8 dias). Ao término dos ensaios, determinou-se a biomassa através da técnica de filtração gravimétrica, como descrito no item 4.3. Coletaram-se 10 mL do filtrado para a leitura da concentração de cianeto e o restante para leitura do pH.

É importante ressaltar que foi executado paralelamente um experimento abiótico, ou seja, nas mesmas condições descritas, mas sem inóculo microbiano, a fim de comparar os percentuais de remoção de cianeto. Para garantir a não contaminação deste meio, utilizou-se solução de metilparabeno/propilparabeno como conservantes.

Foram preparados meios de cultivo em meio tamponado, para evitar erro na interpretação do método de remoção do cianeto pelo *A. niger*. O tampão escolhido foi bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 0,025 mol L⁻¹ para a faixa de pH de 9 a 11, segundo Harris e Angal (1993).

Utilizaram-se as planilhas em Excel® disponibilizadas por Teófilo e Ferreira (2006) para análise dos dados e geração dos gráficos e a significância dos resultados foram testadas ($p \leq 0,1$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Adaptação de *A. niger* e preparo de pré-inóculo

A primeira etapa realizada experimentalmente foi a adaptação do fungo em meio sintético *Czapeck Dox* em pH e concentração de cianeto crescentes. Esse meio de cultivo foi citado por Das e Santra (2011) como meio adequado para o desenvolvimento de *Aspergillus niger* por ser este organismo capaz de crescer em meio contendo apenas nitrato como fonte de nitrogênio.

De acordo com Barbosa (2010) a escolha da composição do meio de cultivo requer alguns cuidados, tais como a indispensável presença de alguns macronutrientes e micronutrientes essenciais. No meio de cultura utilizado neste trabalho a fonte de carbono foi a sacarose e o nitrato de sódio a fonte de nitrogênio, estes nutrientes estavam na proporção de (10:1).

Notou-se que o fungo não se desenvolveu na forma de hifas, como esperado, mas em forma de *pellets*, que são pequenas esferas formadas pelo conjunto de micélios. Rodrigues (2011) justifica essa adoção de morfologia pelos fungos devido aos diferentes fatores como meio de cultivo, pH, temperatura, agitação, oxigênio dissolvido e concentração de inóculos. E que essa formação de *pellets* pelo gênero *Aspergillus* ocorre devido a agregação de esporos no início da germinação.

Ao final da fermentação observou-se também um decréscimo no pH do meio. Segundo Rodrigues (2011) essa acidificação é proveniente da formação e acúmulo de alguns ácidos orgânicos, produto do metabolismo fúngico. E que a espécie *Aspergillus niger* é conhecida pela sua capacidade de produzir ácido cítrico, podendo levar o pH até valores próximos a 2.

5.2 Cinética de crescimento *A. niger*

O perfil de atividade proliferativa do *Aspergillus niger* sob condições diferentes de pH apresentou o comportamento próximo ao padrão sigmoide, como mostrado na figura 5.1. Como o inóculo utilizado neste experimento foi procedente de uma cultura

pré-adaptada em meio *Czapeck-Dox*, não se observou fase de adaptação (fase lag) do crescimento celular no perfil de crescimento do fungo.

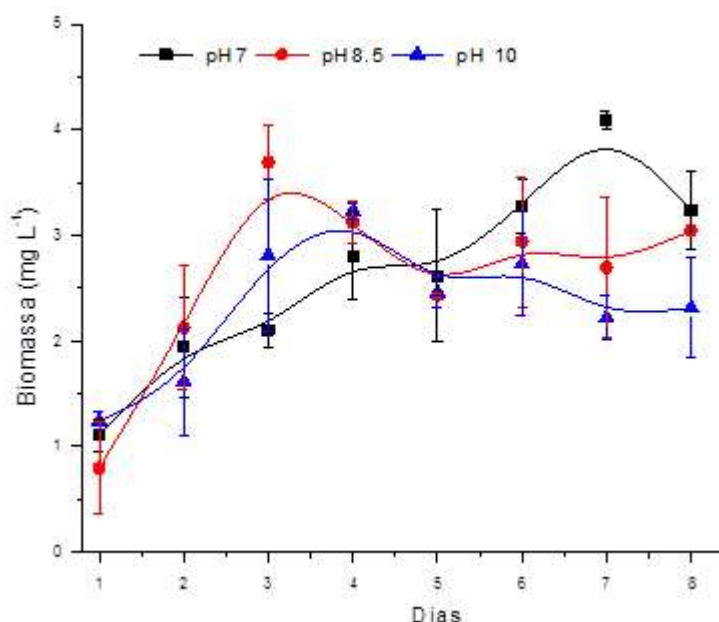


FIGURA 5.1: Cinética de crescimento de *Aspergillus niger*, variação da concentração de biomassa (mg L^{-1}) em relação ao tempo (dias). Meio *Czapeck-Dox* em pH 7,0; 8,5 e 10,0. 28°C e 180 min^{-1} .

Macedo (2009) relata que espécies do gênero *Aspergillus* crescem em pH que varia entre 2 a 11, mas a velocidade de crescimento sofre retardo à medida que o pH se afasta do ótimo, próximo a 5,0. Essa afirmação pode ser comprovada quando se analisa os perfis de crescimento fúngico obtidos (Figura 5.1). Observa-se, na figura 5.1, que a fase log estendeu-se até o sétimo dia na cultura em pH 7,0, na qual o valor da biomassa foi superior a todos os outros pontos ao final do experimento. Já na cultura em que o pH ajustado foi-se de 8,5, nota-se que o crescimento linear se alongou até o segundo dia. Essa contração no período de proliferação ativa do fungo pode ser justificada pelo afastamento da faixa ótima de pH. Esse comportamento também foi visto no perfil de crescimento da cultura em pH 10.

Por outro lado, quando se observa os valores das taxas máximas de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) apresentados na tabela 5.1, obtidas através da

equação de Monod, nota-se que a maior taxa de crescimento para *A. niger* (0,981 dia⁻¹) ocorreu em pH 8,5.

TABELA 5.1: Taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) de *A. niger* cultivado em meio Czapeck-Dox em pH 7; 8,5 e 10, sem cianeto. 28°C e 180 min⁻¹ por 7 dias.

pH	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)
7	0,258
8,5	0,981
10	0,409

A figura 5.2 representa o crescimento da cultura de *A. niger* utilizando meio suplementado com cianeto nas respectivas concentrações 5, 10 e 20 mg L⁻¹. Admite-se que o perfil de crescimento fúngico foi satisfatório, no entanto, o comportamento foi distinto daquele apresentado na figura 5.1 no qual a variável controlada era o pH. Nesse sistema, foi possível observar fase lag de crescimento celular até o segundo dia para as concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹ e até o terceiro dia para a concentração de 5 mg L⁻¹. Barbosa (2010) salienta que essa fase de adaptação é necessária para as células acionarem as vias metabólicas, antes reprimidas, possibilitando a síntese de enzimas que metabolizem algum composto presente no meio.

A tabela 5.2 mostra os valores das taxas máximas de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) para os cultivos descritos acima. Observa-se que *A. niger* apresentou melhor taxa de crescimento (0,698 dia⁻¹) para o meio suplementado com 10 mg L⁻¹ de CN⁻. Além disso, esta taxa é ainda maior que aquela obtida na mesma condição de pH (pH 10), mostrada na tabela 5.1, mas sem suplementação com cianeto (0,409 dia⁻¹). Esses valores sugerem que a presença de cianeto favoreceu o crescimento celular, podendo este íon estar sendo utilizado como fonte de nutriente para as células de *A. niger*.

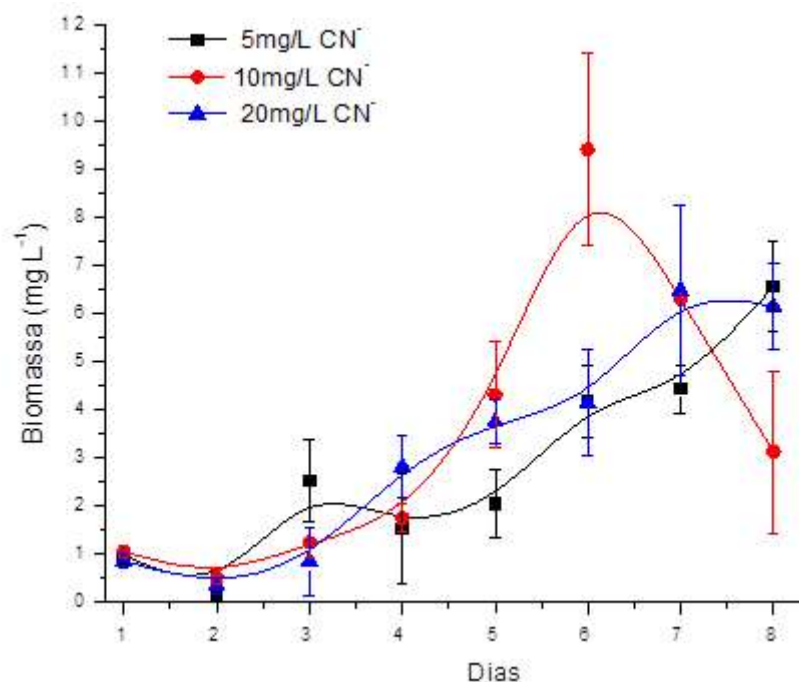


FIGURA 5.2: Cinética de crescimento do *Aspergillus niger*, variação da concentração de biomassa (mg L^{-1}) em relação ao tempo (dias). Meio *Czapeck-Dox* suplementado com 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1} de cianeto. pH 10, 28°C e 180 min^{-1} .

TABELA 5.2: Taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) de *A. niger* cultivado em meio *Czapeck-Dox* em meio suplementado com 5; 10 e 20 mg L^{-1} de CN^- . pH 10; 28°C e 180 min^{-1} por 7 dias.

[CN ⁻] (mg L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)
5	0,185
10	0,698
20	0,260

Outra observação pertinente é a maior formação de biomassa observada para o experimento acrescido de solução de cianeto (Figura 5.2), chegando a $6 - 8 \text{ mg L}^{-1}$ de biomassa, quando comparado ao experimento em que a variável manipulada foi o pH (Figura 5.1), que atingiu valores entre $2 - 4 \text{ mg L}^{-1}$ e no qual nenhum cianeto foi adicionado ao meio. Costa (2011) orienta que o fungo quando na presença de algum composto tóxico, neste caso o cianeto, desenvolve mecanismos para acumular

componentes intracelulares (polissacarídeos e lipídeos) que favorecem o aumento da biomassa e evitar, dessa forma, o efeito tóxico do poluente. Assim, a presença de compostos tóxicos favorece o aumento de massa fúngica e a ramificação do micélio.

Esses ensaios cinéticos foram necessários pois permitiu-se analisar o comportamento do crescimento fúngico na presença e ausência de cianeto. Contudo, também foram úteis para estimar o tempo necessário para condução do planejamento fatorial, uma vez que a fase de crescimento exponencial é que exerce maior domínio sobre a otimização de um processo.

5.3 Curva padrão para dosagem de CN⁻ livre

Para a quantificar a concentração de cianeto, traçou-se uma curva padrão relacionando o valor da absorbância encontrado, após reação recomendada pelo *kit Hach*, com a concentração de CN⁻ conhecida 0,05; 0,12; 0,24 e 0,5 mg L⁻¹ (Figura 5.3). Esta curva padrão mostrou-se satisfatória, uma vez que o coeficiente de determinação se foi próximo de 1 ($R^2 = 0,9992$).

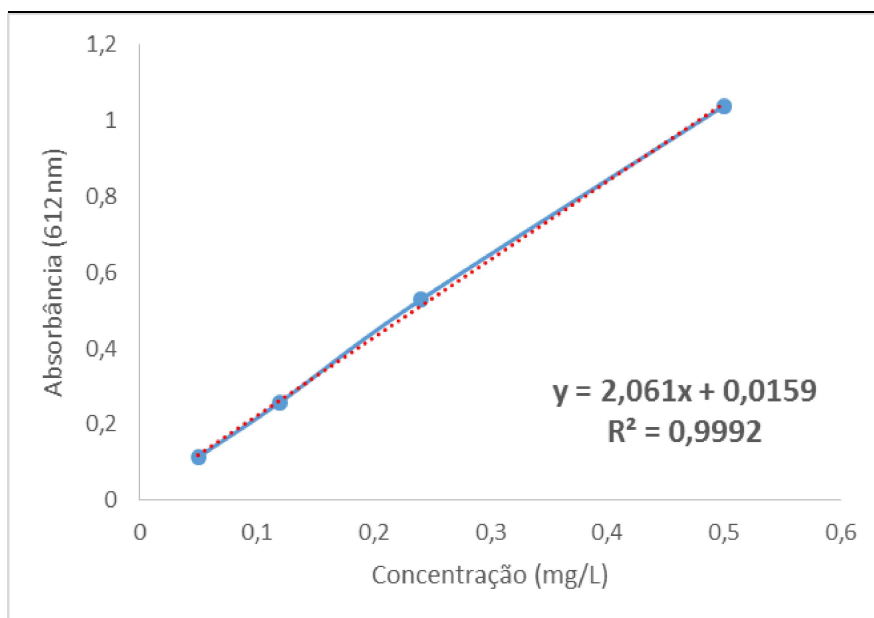


FIGURA 5.3: Curva padrão para quantificar a concentração de cianeto do meio correlacionando com o valor da absorbância com a concentração de CN⁻ (0,05; 0,12; 0,24 e 0,5 mg L⁻¹).

5.4 Relação do volume do inóculo com a massa

O ensaio realizado para relacionar o volume de inóculo (4 mL) com a massa microbiana apresentou resultados semelhantes, variando entre um mínimo de 0,0044g a um máximo de 0,0057g conforme mostra a tabela 5.3. Com esses resultados permite-se inferir que nenhum cultivo foi beneficiado por receber uma maior massa fúngica ou comprometido por receber menor massa de inóculo. Deste modo, pode-se afirmar que o inóculo foi de (“ Média 0,0048” $\pm$ “Erro 0,00013”).

TABELA 5.3: Relação do volume do inóculo (mL) com a massa seca fúngica (g), realizada por meio de filtração gravimétrica.

Ensaio	Peso da membrana seca (g)	Membrana seca com fungo (g)	Massa seca fúngica (g)
1	0,2526	0,2583	0,0057
2	0,2412	0,2456	0,0044
3	0,2466	0,2511	0,0045
4	0,2513	0,2561	0,0048
5	0,2491	0,2537	0,0046
6	0,2480	0,2530	0,0050
7	0,2503	0,2549	0,0046

5.5 Planejamento fatorial

Após os ensaios cinéticos onde avaliou-se a taxa de crescimento fúngico manipulando as variáveis pH e concentração de cianeto, procurou-se investigar a influência dessas mesmas variáveis, sobre a formação de biomassa e a remoção do íon CN^- e as respectivas interações entre elas por meio do planejamento fatorial 2^2 , descrito no item 4.7.

No oitavo dia, antes da coleta dos dados, observa-se com clareza a presença de uma grande quantidade de biomassa nos biorreatores inoculados (Figura 5.4). Enquanto o meio abiótico (indicado pela seta vermelha) acrescido de conservante, não apresentou nenhum crescimento.



FIGURA 5.4: Resultado do crescimento microbiano para as condições do planejamento fatorial (Tabela 4.1) e para a condição de meio abiótico (seta vermelha). 28°C, 180 min⁻¹ e 8 dias de incubação.

Os resultados obtidos na realização deste planejamento fatorial são apresentados na tabela 5.4, juntamente com as condições para cada um dos experimentos e o valor de pH do meio determinado ao final do experimento.

TABELA 5.4: Resultados dos ensaios avaliando a influência de pH e a concentração inicial de cianeto sobre a concentração de biomassa (mg L^{-1}) e sobre a remoção do cianeto. Os níveis avaliados encontram codificados entre parênteses.

Ensaio	pH	[CN ⁻] (mg L^{-1})	Massa seca (g)*	Concentração de Biomassa (mg L^{-1})	pH final	Remoção de Cianeto (%)
1	9,5 (-1)	2,5 (-1)	0,4811	4.811	3,15	99,6
2	10,5 (+1)	2,5 (-1)	2,3247	23.247	3,35	99,6
3	9,5 (-1)	12,5 (+1)	1,8581	18.581	2,85	100
4	10,5 (+1)	12,5 (+1)	2,9873	29.873	2,85	99,9
5	10,0 (0)	7,5 (0)	1,3767	13.767	2,75	100
6	10,0 (0)	7,5 (0)	2,2113	22.113	2,78	99,9
7	10,0 (0)	7,5 (0)	1,5704	15.704	2,92	100
8	10,0 (0)	7,5 (0)	2,1250	21.250	2,82	99,7
9**	10,0 (0)	7,5 (0)	0,0197	0,197	7,12	99,6

* Para volume de 100mL.

**Condição abiótica.

Por meio dos resultados experimentais torna-se sugestivo afirmar que os valores encontrados para a remoção de cianeto foram inconclusivos, uma vez que mesmo em meio abiótico (ensaio 9) o percentual de remoção do íon foi de 99,6%. Estes valores podem não ser confiáveis, pois não foi avaliada a possibilidade de interferência na dosagem de cianeto pelos componentes do meio de cultivo, principalmente cloretos. Sendo assim, o método de dosagem de CN⁻ livre utilizado não foi validado. Além disso, segundo Neto (2010) mesmo que o procedimento experimental seja rigorosamente obedecido e todas as operações sejam feitas com todo cuidado, sempre existirão flutuações imprevistas, ainda mais quando se trabalha com grandezas na ordem de ppm. Como não foi possível controlar essas variações, os dados da remoção não serão mais discutidos nesse trabalho, tornando-se apenas uma proposta interessante para estudos futuros.

Em contrapartida, a formação de biomassa teve efeito positivo, servindo como base para uma discussão mais concisa e fins preditivos da possibilidade de *A. niger* atuar na biodegradação de cianeto em efluentes industriais. Através da análise estatística, permite-se verificar a influência das variáveis de entrada sobre os valores da variável resposta. Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a resposta biomassa, num intervalo de confiança de 90% ($P < 0,1$), estão descritos na tabela 5.5.

TABELA 5.5: Análise de variância (ANOVA) para ajuste do modelo de dados do planejamento fatorial.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	P
pH	2,209385	1	2,209385	16,96646	0,014624
[CN ⁻]	1,039992	1	1,039992	7,98638	0,047537
pH e [CN ⁻]	0,127592	1	0,127592	0,97981	0,378279
Erro Total	0,520883	4	0,130221	-	-

Com os resultados da análise de variância (ANOVA) confirmou-se que a variável com maior efeito sobre a concentração de biomassa foi o pH para um $p=0,014624$, seguida pela concentração de cianeto com $p=0,047537$, enquanto a interação entre estes fatores não apresentou nenhuma significância, uma vez que apresentou um valor de $p>0,1$.

Já o teste F estabelece a relação funcional entre as variáveis independentes sobre a variável dependente, nota-se que a variável pH e concentração de cianeto exercem influência sobre a variável dependente (concentração de biomassa) ao nível de 16,96% e 7,98% respectivamente.

Esta mesma análise pode ser visualizada no gráfico de Pareto (Figura 5.5), no qual pode-se comprovar a interferência do pH e da concentração de cianeto para a formação de biomassa. As barras horizontais representam as variáveis controladas e a linha vertical é utilizada para analisar quais efeitos foram estatisticamente

expressivos (ROSSI, 2012). Portanto, qualquer barra que ultrapasse a linha vertical, é considerada como significativa. Sendo assim, segundo os resultados obtidos, o pH e a concentração de cianeto tiveram uma influência significativa e positiva para a formação de biomassa, enquanto a interação entre estas variáveis não apresentou significância, corroborando com os dados apresentados na análise de variância (Tabela 5.5).

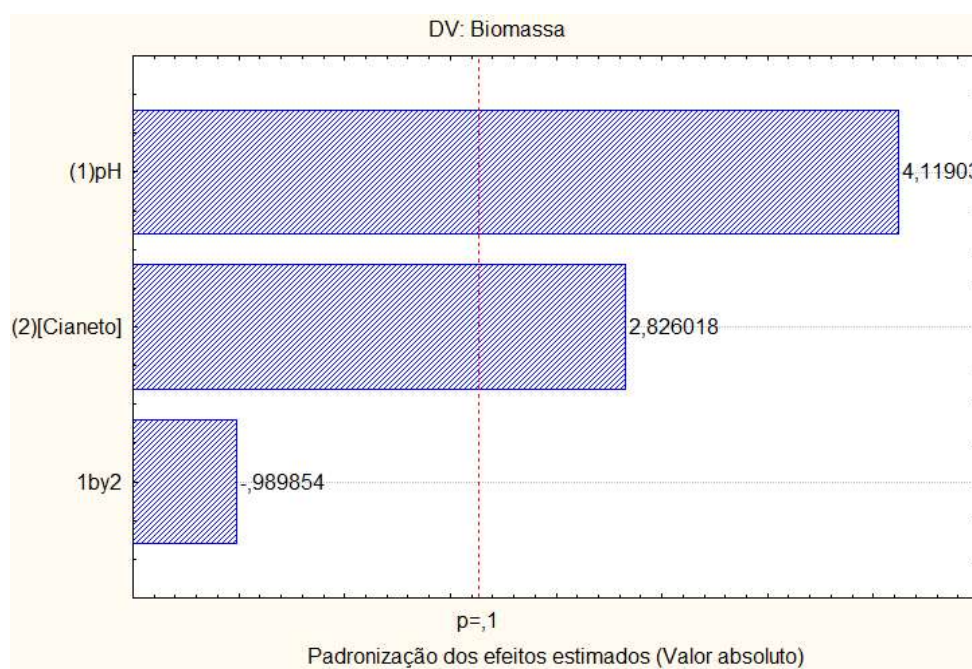
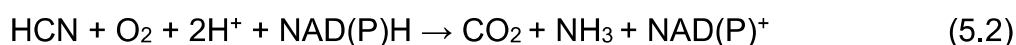


FIGURA 5.5: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável (pH e concentração de cianeto) do planejamento fatorial 2^2 . Variável dependente: concentração de biomassa.

Uma vez que a variável resposta é a concentração de biomassa, e que a concentração de cianeto foi significativa, o resultado conduz a duas possíveis hipóteses (i) o fungo apenas tolerou o cianeto, o mesmo teve um aumento de massa devido a reserva de componentes intracelulares conforme a observação feita por Costa (2011). No entanto, há diferentes respostas no estudo cinético, uma vez que não houve linearidade nas taxas de crescimento. É provável que esta hipótese não seja válida; (ii) o fungo produziu enzimas extracelulares oxidativas para degradação

do cianeto e utilizou este composto como nutriente, possivelmente como fonte de nitrogênio, para produção de biomassa celular.

A via de degradação do cianeto pelo fungo pode ser ativada pela presença das enzimas cianeto monoxigenase e cianeto dioxigenase (EBBS, 2004). A ação da enzima cianeto monoxigenase busca transformar o ácido cianídrico em ácido cianúrico (HOCN) que é um composto com baixa toxicidade, esta via é representada pela equação 5.1. Enquanto a cianeto dioxigenase transforma o HCN em amônia (NH₃⁺) e dióxido de carbono (CO₂), representada pela equação 5.2. O *A. niger* tem habilidade para utilizar amônia diretamente como fonte de nitrogênio. No entanto, caso o NH₃ tenha sido consumido, o pH do meio tende a acidificar, podendo justificar a acidificação do meio, após a fermentação. (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).



Observa-se que para ativação dessas rotas o meio deve ser ácido, de acordo com os dados apresentados na tabela 5.4, os quais mostram que o pH ao final da fermentação ficou ácido, essa condição para ativação das vias pode ser compreendida.

Considerando-se que o modelo quadrático foi validado para a variável biomassa, o mesmo foi usado para gerar a superfície de resposta com o objetivo de otimizar o processo. A superfície de resposta está representada pela figura 5.6. Pela análise gráfica pode-se estimar que para o experimento de otimização, próxima etapa após a triagem, recomenda-se trabalhar com o pH e a concentração de cianeto em níveis mais altos.

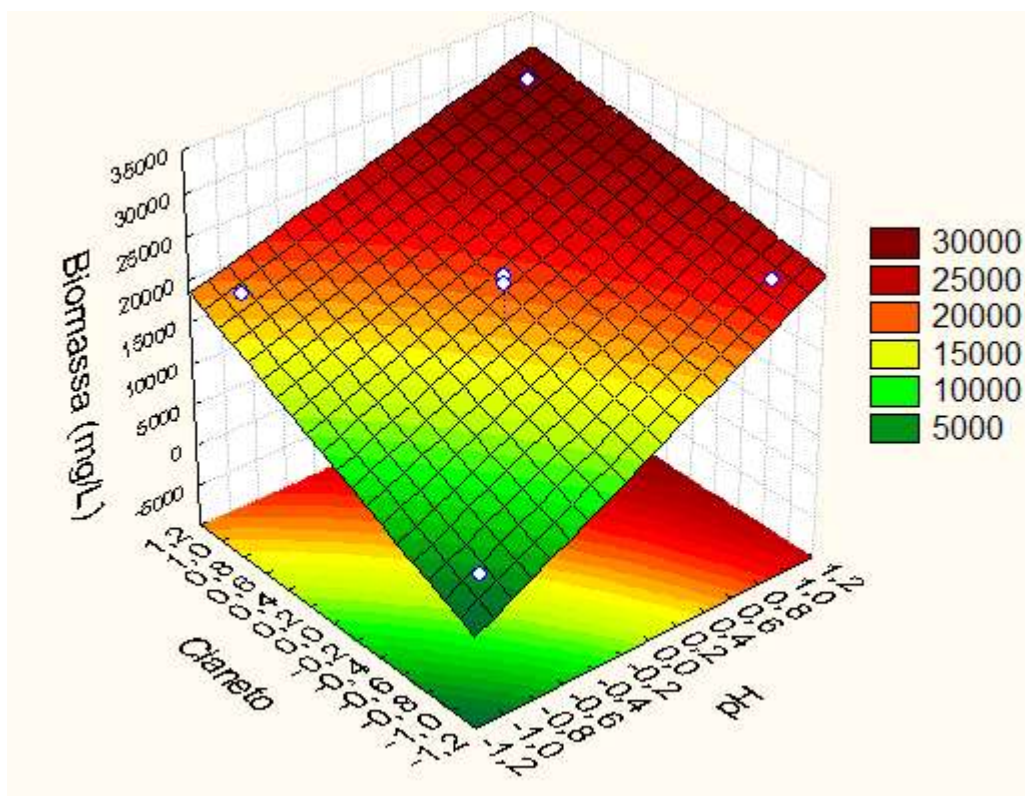


FIGURA 5.6: Superfície de resposta da concentração de biomassa em relação à concentração de cianeto e de pH.

$$\text{Biomassa} = 18,7 + 7,4 \times \text{pH} + 5,1 \times [\text{CN}^-] - 1,8 \times \text{pH} \times [\text{CN}^-]$$

Enfim, no ensaio para triagem observou-se que tanto o pH quanto a concentração de cianeto iniciais podem contribuir para a formação da biomassa, apesar da interação entre eles não ser significativa. No entanto, observou-se um decaimento no pH ao final do experimento, já que o mesmo foi conduzido sem tamponamento do meio de cultura, ocultando a hipótese de a remoção de cianeto ter sido feita por via biológica, já que o íon CN^- em pH abaixo de 9,3 leva a formação do HCN, podendo ser volatilizado.

Dessa forma, este mesmo ensaio foi repetido com o meio tamponado, utilizando tampão bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ para a faixa de pH de 9 a 11. No entanto, os resultados foram estatisticamente inconclusivos, uma vez que a produção de biomassa foi insignificante. Permitiu-se inferir que o tamponamento do meio de cultivo influenciou negativamente o crescimento do micro-organismo, bem como seu metabolismo.

A tabela 5.6 apresenta o resultado de um ensaio conduzido em meio com e sem tampão, nas condições de pH 10 sem cianeto, para avaliar se a influência do tampão no crescimento do fungo. Nota-se que o tampão utilizado foi capaz de manter o pH do meio em condição muito próxima da inicial, no entanto, não foi observado crescimento microbiano, enquanto no meio sem tampão houve crescimento microbiano, bem como redução drástica no pH do meio.

TABELA 5.6: Teste realizado para avaliar a influência do tampão bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9 a 11) no crescimento de *A. niger*.

Ensaio	Condição do Meio de Cultivo	Crescimento de <i>A. niger</i>	pH final
1	Com tampão	Negativo	pH 9,92
2	Sem tampão	Positivo	pH 3,17

Com esses resultados surgiram novos questionamentos: (i) será que o processo fermentativo do fungo leva à formação de metabólitos ácidos e intencionalmente o cianeto é volatilizado do meio? (ii) será que o fungo apresenta uma rota metabólica específica para a assimilação do cianeto que só é ativada em pH ácido? (iii) no caso da hipótese ii ser verdadeira, o fungo utiliza o cianeto como fonte de carbono ou nitrogênio? (iv) por que não foi observado crescimento quando o meio permaneceu tamponado? O próprio tampão inibe o crescimento de *A. niger*? Ou como não houve volatilização do cianeto, este foi tóxico para o fungo?

A literatura ainda não traz dados consistentes em relação à utilização de fungos filamentosos para biodegradação de cianeto. No entanto, os resultados apresentados mostram que é promissor levar estes experimentos adiante e buscar evidências que encaminhem para um melhor entendimento deste processo, buscando novas alternativas para o tratamento de efluentes líquidos industriais com altas concentrações de cianeto.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o pH no qual a cultura de *Aspergillus niger* apresentou maior taxa de crescimento foi 8,5, atingindo um $\mu_{\text{máx.}}$ de 0,981 dia⁻¹. No entanto, o mesmo apresentou uma boa adaptação em pH 10, permitindo conduzir os experimentos com um maior nível de segurança, uma vez que pode ocorrer volatilização de HCN em pH abaixo de 9,3.

A presença de cianeto no meio de cultura não inibiu o crescimento do fungo e contribuiu de forma significativa para uma maior formação de biomassa. A concentração de cianeto que teve maior impacto sobre a taxa de crescimento fúngico foi 10 mg L⁻¹, apresentando $\mu_{\text{máx.}}$ de 0,698 dia⁻¹.

Com base no planejamento experimental tanto a variável pH quanto a concentração de cianeto tiveram influência sobre a formação de biomassa. E através da superfície de resposta, recomenda-se trabalhar com o pH e concentração de cianeto em níveis mais altos. No entanto, os resultados para a remoção de cianeto foram inconclusivos, uma vez que o método de dosagem de CN⁻ livre utilizado não foi validado.

A partir dos resultados e conclusões obtidas nesse trabalho, recomenda-se dar continuidade à pesquisa na tentativa de responder a questionamentos inquietantes, tais como:

- i. Validar a metodologia para dosagem de CN⁻, avaliando as possibilidades de interferência dos componentes do meio de cultivo na metodologia de dosagem.
- ii. Avaliar a influência da utilização de meio tamponado no crescimento de *A. niger*.
- iii. Avaliar o mecanismo de remoção de cianeto por *A. niger*, se por redução do pH do meio ou por utilização do mesmo como fonte de nutriente.
- iv. Estudar a otimização do processo de remoção de cianeto em efluentes reais.
- v. Dosagem de NH₃ para avaliar produção e / ou consumo.

- vi. Substituir as fontes de N por CN^- para avaliar o consumo deste como fonte daquele elemento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R.C; MARTINS, A.H. Extração por solventes aplicada à recuperação de cianetos. *Revista Escola de Minas*, v.58, n. 2, p. 161-164, 2005.

BARBOSA, H. R; TORRES, B.B. **Microbiologia básica**.1ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 196 p.

BON, E.P.S; FERRARA, M.A; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Disponível em: <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/47/2013/11/cianetos.pdf> Acesso em 09 de set. 2016.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em 20 de out. 2016.

COSTA, J.M; CORBELLINI, V.A; SCROFERNEKER, M.L. Study of different nitrogens sources on glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultered in tricyclazole. *Process Biochemistry*. v.39, n.5. p. 633-636, 2004.

DAS, S.; SANTRA, S. C. Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v. 10, n. 8, p. 2670-2675, 2011.

DASH, R.R; GAUR, A; BALOMAJUMDER, C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, v.163, p. 1-11, 2009.

DUTRA, A. J. B.; SOBRAL, L. G. S.; LEMOS, F. A.; SANTOS, F. H. S. O processo eletroquímico como alternativa para o tratamento de efluentes cianídricos. *Revista Escola de Minas*, v.55, n.4, p. 267-272, 2002.

EBBS, S. Biological degradation of cyanide compounds. *Environmental Biotechnology*, v. 15, n.1, p. 231-236, 2004.

EISLER, R. Cyanide hazards to fish, wildlife, and invertebrates: asynoptic review. *Biological Report*, v. 58, n. 1/23, p. 1-58, 1991.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2.ed. Caxias do Sul: Educ, 2010. 638 p.

FERREIRA, D. F; CORAIOLA, M. Eficiência do lodo ativado em fluxo contínuo para tratamento de esgoto. *Revista Acadêmica Ciência Agrária Ambiental*, v.6, n. 2, p. 259-279, 2008.

GRANATO M.; GONÇALVES, M.M.M.; VILLAS BOAS, R.C.; SANT'ANNA JR, G.L. Avaliação de um processo de tratamento biológico para efluentes contendo cianeto, tiocianato e metais pesados. Centro de Tecnologia Mineral - Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 1995.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. Wiley-Liss, New York, 1994.

HARRIS, E.L.V; ANGAL, S. **Protein purification methods a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1993.

LINARDI, V. R.; AMANCIO, M. C.; GOMES, N. C. M. Maintenance of *Rhodotorula rubra* isolated from liquid samples of gold mine effluents. *Folia Microbiologica*, v. 40, n. 5, p. 487-489, 1995.

LU, H. *et al.* Integrated isotope-assisted metabolomics and C metabolic flux analysis reveals metabolic flux redistribution for high glucoamylase production by *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Fact*, p. 14-147, 2015.

MACEDO, L. N. *et al.* Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. In: **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 07, 2009, Rio de Janeiro. Anais.... Natal RN: Embrapa, P. 01-05, 2009.

MACHADO, C.M; ANDRADE, M.W.M; RECH, H; TEIXEIRA, E.C. Estudo do comportamento reacional de cianetos no tratamento de efluentes de coqueria sob variação de parâmetros operacionais. In: **Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 05, 2000, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/i-023.pdf>>. Acesso em: 21 de outubro de 2016.

MACHADO, M.L.P. **Siderurgia: da matéria prima ao aço laminado**. Vitória, 2006. (Apostila). Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgm30AH/apostila-siderurgia-materia-prima-ao-aco-laminado-202-paginas>> Acesso em: 15 de novembro de 2016.

MANIYAM, M. N.; SJAHRIR, F.; IBRAHIM, A. L.; CASS, A. E. G. Biodegradation of cyanide by *Rhodococcus UKMP-5M*. *Section Celular and Molecular Biology*, v. 68, n. 2, p. 177-185, 2013.

MARINHO, M. R. M. Planejamento fatorial: uma ferramenta poderosa para os pesquisadores. In: Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia, 15., 2005, Paraíba. Disponível em:

<http://www.labgest.com.br/sistema/downloads/59/ii_209.pdf>. Acesso em: 20 de outubro 2016.

NETO, B.B; SCARMINIO, B. S; BRUNS, R.E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p.1401-1406, 2006.

NETO, B.B; SCARMINIO, B. S; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 4ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

NOVAK, D.; WHITTLE, I. H. F.; PIRC, E. T.; JERMAN, V.; INSAM, H.; LOGAR, R. M.; STRES, B. Biotic and abiotic processes contribute to successful anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. *Water Research*, v. 47, n. 11, p. 3644-3653, 2013.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 189-259, 2004.

PASSARI, L. M. Z. G; SOARES, P. K; BRUNS, R. E; SCARMINIO, I. S. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 477-482, 2011.

PELETIN, A. L; YUSFIN, Y.S; TRAVYANOV, A.Y. Possibility of Cyanide Formation in Blast Furnaces. *Chernaya Metallurgiya*, v. 38, n. 1, p. 17-19, 2008.

PERUZZO, T; CANTO, E. **Química na abordagem do cotidiano**. 7ed. 2010. p. 354. Disponível em: <http://www2.unifesp.br/reitoria/residuos/curiosidades/por_que_o_cianeto_mata.pdf> . Acesso em 20/11/2016.

RITCEY, G. M. Tailings management in gold plants. *Science*, v. 15, n.1, p. 3 -20, 2005.

RODRIGUES, K. A. Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética. 2006.145f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento: Área Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

ROSSI, G. F. Análise dos processos de polpação do bagaço da cana-de-açúcar: estudo termocinético da influência da antraquinona no tratamento alcalino. 2012. 137f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

SANTOS, A.L. Inventário dos rejeitos, efluentes e subprodutos, das indústrias siderúrgicas integradas na fabricação de aço líquido. 2010.79f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia metalúrgica) – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SARAMAGO, S. P; JUNIOR, V. S; SILVA, J. D; SARAMAGO, S.F.P. Planejamento de experimentos e otimização de sistemas mistos. *FAMAT*, n. 11, p.231-246, 2008.