

**ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

IVAN STAMBOROWSKI
LUCAS FELIPINI BORDONCO
PEDRO HENRIQUE TEZOTTO DELQUIARO

**REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CROMO TOTAL EM ÁGUA DE
POÇO A PARTIR DE BIOSSORÇÃO POR BIOFILME BACTERIANO**

São Paulo

2020

Ivan Stamborowski
Lucas Felipini Bordonco
Pedro Henrique Tezotto Delquiaro

**REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CROMO TOTAL EM ÁGUA DE POÇO A
PARTIR DE BIOSSORÇÃO POR BIOFILME BACTERIANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
curso de Engenharia Química da Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo como requisito parcial
à obtenção do título de Engenheiro Químico.

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider.

São Paulo

2020

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. René Peter Schneider pela oportunidade, orientação, dedicação e auxílio durante o processo de realização do trabalho.

Ao Dr. Paulo Firmino Moreira Junior pelo auxílio e orientação dada nas fases laboratoriais do experimento.

Ao LAREX - USP - Laboratório de Reciclagem, Tratamento de Resíduos e Extração pelo fornecimento do espectrofotômetro e espaço laboratorial e, em especial, ao doutorando Amilton Barbosa Botelho Junior pelo tempo dedicado e auxílio no manuseio do espectrofotômetro.

À Escola Politécnica da Universidade de São Paulo e todos seus membros, pelos ensinamentos passados, e pelo espaço, infraestrutura e ambiente de aprendizado disponibilizados.

Aos nossos pais, familiares e amigos, pelo apoio incondicional e suporte ao longo dos 5 anos de graduação.

RESUMO

STAMBOROWSKI, I., BORDONCO, L. F., DELQUIARO, P. H. T. **Redução da concentração de cromo total em água de poço a partir de bioissorção por biofilme bacteriano.** 2020. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, construir e testar um mecanismo que realize a descontaminação de cromo das águas dos poços do Aquífero Bauru através do uso de bioissorção por meio de biofilme aderido a um suporte. Além disso, este trabalho teve como objetivo de estudar a efetividade e viabilidade do método de bioissorção para realização de tal tarefa e compreender sua possível aplicação em escala real. Utilizou-se bactérias planctônicas provenientes da água de lago, localizado no campus Cidade Universitária da USP, como inóculo gerador de biofilme aderido à um suporte de espuma de PVC no interior de uma coluna de PVC. A coluna foi utilizada para descontaminação de réplica de água de poço feita em laboratório com concentrações de cromo total acima do limite de potabilidade estabelecido pelo Ministério da Saúde e, ao mesmo tempo, concentrações próximas às encontradas em casos extremos de contaminação de poços pertencentes ao Aquífero Bauru – SP. A solução proposta leva em consideração as limitações de localização, qualificação da mão-de-obra disponível, armazenamento de substrato, verba e área disponível para a operação em escala real. Dessa forma, o sistema consistiu na passagem da réplica da água de poço, em vazões baixas, pela coluna de recheio com biofilme aderido e aberta à atmosfera. Além disso, o substrato utilizado para o crescimento das bactérias foi o etanol como fonte de carbono e fosfato de amônio dibásico como fonte de fósforo e nitrogênio. Foram retiradas amostras de 137 mL do fundo da coluna, de 5 em 5 minutos, durante 50 minutos e mediu-se a concentração de cromo em solução, antes e depois da passagem na coluna, através da espectrofotometria de absorção atômica por chama. Por fim, concluiu-se que a coluna foi capaz de reduzir, em média, em 66% a concentração inicial de 0,1629 mg/L de cromo, e capaz de atingir o limite de potabilidade em de 30 a 60% das amostras, mostrando a eficácia e o potencial do método. Recomenda-se estudos mais avançados em certos aspectos para possível dimensionamento em escala real do processo.

Palavras-chave: bioissorção; biofilme; cromo; água de poço; descontaminação de água.

ABSTRACT

STAMBOROWSKI, I., BORDONCO, L. F., DELQUIARO, P. H. T. **Redução da concentração de cromo total em água de poço a partir de biossorção por biofilme bacteriano.** 2020. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The aim of the present work was to develop, build and test a mechanism that performs the decontamination of chromium in the waters of the Bauru Aquifer wells using biosorption through biofilm attached to a support. In addition, this work aimed to study the effectiveness and feasibility of the biosorption method to perform such a task and understand its possible application on a real scale. Planktonic bacteria from lake water, located on the campus Cidade Universitária - USP, were used as a biofilm generator inoculum adhered to a PVC foam support inside a PVC tube column. The column was used for decontamination of laboratory made well water replica with concentrations of total chromium above the potability limit established by the Brazilian Ministry of Health and, also, concentrations close to those found in extreme cases of contamination of the Bauru Aquifer's wells. The proposed solution considers the limitations of location, qualification of available labor, storage of substrate, funds and area available for full-scale operation. Therefore, a low flow rate of the well water replica went through the PVC column, filled by biofilm, and open to the atmosphere. Furthermore, the substrate used for the growth of bacteria was ethanol as a carbon source and dibasic ammonium phosphate as a source of phosphorus and nitrogen. Samples of 137 mL were taken from the bottom of the column, every 5 minutes, for 50 minutes, and the concentration of chromium in solution was measured, before and after the process, through flame atomic absorption spectrophotometry. Finally, it was concluded that the column was able to reduce, on average, by 66% the initial concentration of 0.1629 mg/L of chromium, and capable of reaching the potability limit in 30 to 60% of the samples, showing the effectiveness and potential of the method. More advanced studies in certain aspects are recommended for possible full-scale scaling of the process.

Keywords: biosorption; biofilm; chromium; well water; water decontamination.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Grupos funcionais participantes da biossorção de cromo	23
Tabela 2 - Concentrações de nutrientes utilizadas no cultivo do inóculo	29
Tabela 3 - Concentração das soluções da curva de calibração para a utilização da espectrofotometria de absorção atômica por chama.....	36
Tabela 4 - Massa da coluna antes e após o experimento	38
Tabela 5 - Massas coletadas e cálculo do fator de concentração.....	40
Tabela 6 - Fator, concentração medida e cálculo da concentração real por amostra.	40
Tabela 7 - Valores das grandezas da equação (3).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstração geográfica do Aquífero Bauru e os poços da região (fonte: CETESB)	11
Figura 2 – Permeabilidade do Cr(III) e Cr(IV) à mebrana celular.	13
Figura 3 - 5 estágios do desenvolvimento do biofilme (Monroe, 2007). 1 – Adesão aleatória de bactérias livres à superfície; 2 – Secreção de substâncias que facilitam a adesão e a tornam irreversível; 3 – Formação de Micro-colônias; 4 – Formação da aquitetura do biofilme complexo; 5 – Descolamento do biofilme.....	17
Figura 4 - diferença entre as bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B) (Aryal, 2019)	19
Figura 5 – Mecanismos de biossorção bacteriana de metais pesados	21
Figura 6 - Esquema da metodologia experimental para remover cromo de água de poços	27
Figura 7 - Inóculo após 2 dias em crescimento apresenta turbidez	30
Figura 8 - Aparelhagem adaptada à circulação de solução de inóculo para crescimento de biofilme.....	32
Figura 9 - Espectrofotômetro de Absorção Atômica AA-7000: SHIMADZU	35
Figura 10 - Inóculo ao início do cultivo (à esquerda) e ao fim do cultivo (direita).	37
Figura 11 - Visão do topo da coluna após formação do biofilme.	37
Figura 12 - Curva de calibração realizada pelo espectrofotômetro AA-7000: SHIMADZU...39	39
Figura 13 - Comparação entre as amostras após passagem pela coluna de biossorção, antes da passagem e o limite de potabilidade.....	41
Figura 14 - Porcentagem de redução da concentração de cromo após passagem na coluna.42	42
Figura 15 - Concentração de cromo acumulada na fase sólida.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
EPS	Exopolissacarídeos
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVC	Poli Vinil Cloreto
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
VMP	Valores Máximos Permitidos
UV	Ultra Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

C_i	concentração inicial de cromo na fase líquida	mg.L ⁻¹
C_f	concentração final de cromo na fase líquida	mg.L ⁻¹
C_{medida}	concentração medida pelo equipamento	mg.L ⁻¹
C_{real}	concentração real de solução	mg.L ⁻¹
C_s	concentração de cromo na fase sólida	mg.g bioassorvente ⁻¹
f	fator de concentração	
M_{ads}	massa de cromo adsorvida	mg
M_{bio}	massa de bioassorvente	g
$M_{ce,a}$	massa coluna encharcada antes do cresc. de biofilme	g
$M_{ce,d}$	massa coluna encharcada após cresc. de biofilme	g
$M_{cs,a}$	massa da coluna seca antes do cresc. de biofilme	g
M_f	massa final de solução	g
M_i	massa inicial de solução	g
t	intervalo de tempo entre recolhimento de amostra	min
V	volume de amostra	L
v	vazão de cromo na coluna	mL.min ⁻¹

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Objetivos	14
1.2 Justificativas.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Crescimento de biofilmes bacterianos	15
2.2 Biossorção de metais pesados por biofilme bacteriano	18
2.3 Efetividade e seletividade da biossorção de metais pesados	21
2.3.1 Grupos funcionais do biossorvente	21
2.3.2 Temperatura	23
2.3.3 pH	24
2.3.4 Quantidade de biossorvente	25
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Introdução e justificativa da metodologia experimental.....	26
3.2 Crescimento do Inóculo.....	28
3.3 Crescimento do Biofilme.....	30
3.4 Procedimento de biossorção do cromo	32
3.5 Metodologia Analítica	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 Crescimento do inóculo e formação do biofilme.....	37
4.2 Biossorção de cromo	38
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O estado de São Paulo é hoje o estado com maior consumo de água proveniente de poços profundos no Brasil. Segundo a SABESP (2019), utiliza-se hoje mais de mil poços para o abastecimento de mais de três milhões de pessoas. Entre outros motivos, esse número se dá pela grande utilização desse método de captura de água no interior do estado.

No entanto, a região Noroeste de São Paulo sofre de um problema em alguns de seus poços: a contaminação dos aquíferos com cromo. A partir da década de 90, estudos focados sobretudo no Aquífero Bauru (figura 1), que abrange 104.000 km² (Xavier et al., 2005), onde a contaminação é maior, buscaram entender as origens do metal nas águas subterrâneas e o porquê de suas concentrações elevadas. Estudos realizados na região identificaram que a ocorrência de cromo no aquífero Bauru se dá por causas naturais, dado a presença do cromo no solo basáltico da região (Nikolaev e Plakunov, 2007). Também se passou a entender que devido à tal causa natural, as concentrações do metal variam de forma não previsível de um poço para o outro, e mesmo em um local, tal concentração pode variar dependendo da profundidade em que se retira a água.

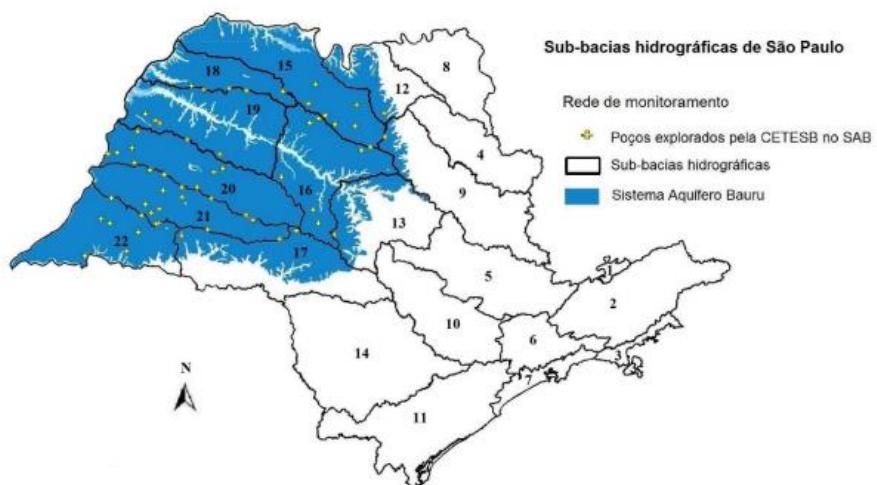


Figura 1 - Demonstração geográfica do Aquífero Bauru e os poços da região (fonte: CETESB)

Posteriormente, outros estudos concluíram mais especificamente a origem da maior parte do cromo do solo na região do Aquífero Bauru. Analisando o solo da cidade de Urânia, concluiu-se que o diopsídio do solo apresentava alta concentração de óxido de cromo (III), de até 12600 ppm, e que devido à facilidade de dissolução dos grãos desse minério na água, esta seria a fonte da contaminação (Chavant et al., 2007). Além disso, devido ao alto pH

do solo e as altas concentrações de óxidos de ferro e manganês, um processo de oxirredução permite a mobilização do cromo em sua forma hexavalente para a água.

Sabendo da presença do cromo nas águas do Aquífero Bauru, é importante estudar também as legislações que regem a presença desse metal em água potável. Segundo a definição da Portaria MS nº 2.914/2011, para que uma água possa ser considerada potável, deve-se atender ao padrão de potabilidade, que envolve padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde para parâmetros físicos, químicos, microbiológicos, organolépticos, cianobactérias/cianotoxinas e radioatividade.

É de competência do Ministério da Saúde, pelo decreto nº 79.367 de 09/03/1977, o estabelecimento de normas de potabilidade da água e é de responsabilidade do Sistema Único de Saúde, pelo artigo 200 da constituição federal, a fiscalização e inspeção de bebidas e águas para o consumo humano. A Portaria MS nº 2.914/2011, parte integrante da Portaria de Consolidação de 28/09/2017, determina os VMP – Valores Máximos Permitidos – para diversos compostos em água, sendo o do cromo 0,05 mg/L. Vale ressaltar que tal valor é referente ao cromo total, ou seja, inclui os íons trivalentes e hexavalentes do metal.

Quando a legislação brasileira é comparada com outras, nota-se que a mesma segue os padrões mundiais, dado que a legislação vigente americana para a potabilidade de águas que contenham cromo, determinada pela US Environmental Protection Agency, determina a concentração máxima de 0,1 mg/L para cromo total (Walker et al., 1995) e a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de concentrações máximas de 0,05 mg/L (Oliveira et al., 2010).

Torna-se relevante, portanto, entender o motivo de se estabelecer limites tão baixos de potabilidade do metal. O cromo é um metal que apresenta-se em diversos estados de oxidação, desde Cr(0) (cromo metálico) ao Cr(VI) (cromo hexavalente). O estado mais abundante e estável é o Cr(III), seguido pelo Cr(VI) (Annu. Rev. Microbiol, 2002). A principal diferença entre os dois estados é em relação à toxicidade ao corpo humano. Enquanto o Cr(III) serve como suplemento nutricional quando ingerido nas quantidades corretas, o Cr(VI) é conhecido por seu alto potencial cancerígeno quando inalado, causando dano ao DNA, aberrações cromossômicas e alterações no epigenoma do sistema respiratório (Costa e Klein, 2006; Zhitkowich, 2011 apud. Sun et al., 2015).

Até o momento, houve poucos estudos sobre os efeitos da exposição oral ao cromo em humanos, mas estudos com ratos expostos a cromo via oral já demonstraram formação de câncer de estômago, na cavidade bucal e câncer no intestino delgado (O'Toole e Kolter, 1998). A exposição via oral é possível de duas maneiras: quando este metal está presente em solução e quando está presente em alimentos. Seus malefícios ainda não são totalmente entendidos, mas o mecanismo de intoxicação é bastante famoso.

Após a ingestão, o cromo atinge o sistema gastrointestinal onde, dependendo de seu estado de oxidação, irá permanecer na região extracelular ou atravessar a membrana plasmática das células da parede desse sistema. Caso a espécie presente na cavidade gastrointestinal seja o Cr(III), devido à sua baixa permeabilidade à membrana, permanecerá fora das células, oferecendo baixa ou nenhuma toxicidade e atividade carcinogênica. Entretanto, se a espécie presente for o Cr(VI), ocorrerá passagem via membrana para o meio intracelular, onde a redução de Cr(VI) para Cr(III) irá gerar acúmulo da espécie mais reduzida neste meio, o que apresenta potencial carcinogênico e toxicidade. Vale ressaltar que a redução do Cr(VI) é bastante favorecida pelos fluidos do sistema gastrointestinal, principalmente pelo suco gástrico, e portanto a maior parte do Cr(VI) é reduzido no meio extracelular, constituindo um mecanismo de desintoxicação pelo corpo humano, já que o Cr(III) extracelular não apresenta potenciais perigos à saúde humana, como já foi dito (Korber et al., 1995). A seguir apresenta-se um esquema que explicita a relação entre espécie química e permeabilidade à membrana celular.

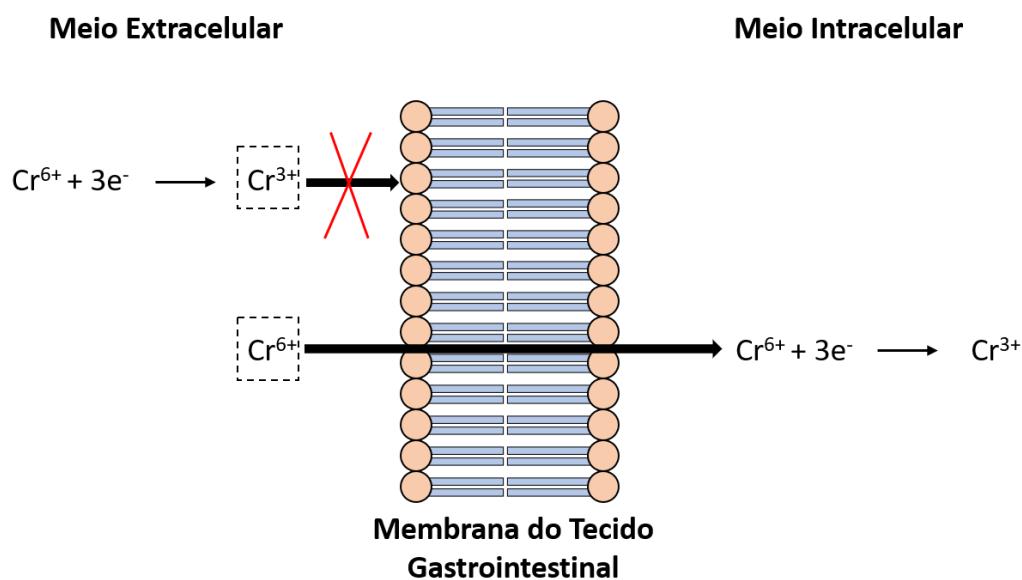


Figura 2 – Permeabilidade do Cr(III) e Cr(IV) à membrana celular.

Desta forma, mesmo sendo o cromo hexavalente a espécie capaz de penetrar no meio intracelular, faz sentido controlar a potabilidade da água a partir do cromo total, dado que o percurso da água que sai da fonte até entrar no organismo nem sempre é certo, e pode favorecer processos de oxirredução que transformem o cromo trivalente em hexavalente. Afinal, como dito anteriormente, presença de óxidos de ferro e manganês favorecem tal processo.

Como forma de tentativa de solucionar a questão da contaminação das águas por Cromo em determinados pontos do Aquífero Bauru, a bioassorção, propriedade que algumas biomoléculas e alguns tipos de biomassa têm de se conectar com íons ou moléculas específicas presentes em soluções aquosas, pode ser explorada como um potencial fenômeno para a redução da concentração do metal. Tal processo, diferentemente do fenômeno de bio-acúmulo, ocorre passivamente, sem gasto de energia das células. Desta maneira, o processo de bioassorção ocorre tanto em células vivas quanto em células mortas, pois depende apenas da afinidade entre o bioassorvente e a partícula que é adsorvida (Volesky, 2007).

A maior parte dos estudos realizados à respeito de bioassorção são voltados para a adsorção de metais, onde o uso de biomassa se mostrou mais promissor. Além disso, o foco no uso de bactérias também se mostra promissor, dado que suas paredes celulares possuem grupos ativos na remoção de íons em solução, principalmente o peptidoglicano e o ácido teicólico.

Uma outra característica que também leva a crer que bactérias têm grande potencial de serem utilizadas em tal problema é a capacidade de formar biofilmes bacterianos: comunidades de bactérias envoltas por substâncias, principalmente açúcares, produzidas pelas próprias bactérias, que conferem à comunidade proteção contra diversos tipos de agressões que ela pode vir a sofrer como, por exemplo, a falta de nutrientes, o uso de um antibiótico ou algum agente químico utilizado para combater bactérias (Korber et al., 1995).

Dessa forma, o uso de biofilmes garante às comunidades bacterianas maior resistência. Ao mesmo tempo, a superfície de contato entre os grupos funcionais que possuem afinidade com o alvo da bioassorção e o metal alvo aumenta com o uso de biofilme, mostrando-se como uma excelente alternativa para solucionar concentrações excedentes de cromo em água de poço.

1.1 Objetivos

Tendo em vista o problema introduzido, este trabalho tem como objetivo desenvolver, construir e testar um mecanismo que realize a descontaminação de cromo das águas dos poços do Aquífero Bauru através do uso de bioassorção por meio de biofilme aderido a um suporte.

Além disso, este trabalho tem o objetivo de estudar a efetividade e viabilidade do método de bioassorção para realização de tal tarefa e compreender sua possível aplicação em escala real.

1.2 Justificativas

Como apresentado nessa introdução e como será aprofundado no tópico 2, existem hoje poucos estudos sobre a efetividade de bioassorção de metais em baixas concentrações como as encontradas nas águas do Aquífero Bauru, mesmo assim, tal descontaminação de cromo se faz necessária devido aos baixíssimos limites de potabilidade. Além disso, também existem poucas evidências do método de bioassorção de cromo em águas onde também há a presença de outros elementos e de outros metais, havendo também a necessidade de se testar esse fato.

Em suma, este trabalho busca, portanto realizar um “*proof of concept*” (prova de conceito), a fim de dar direcionamento para pontos relevantes no ramo de bioassorção de metais e, ao mesmo tempo, fazer isso através de um problema real.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Crescimento de biofilmes bacterianos

Os biofilmes, definidos como comunidades de microrganismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana, representam a parte majoritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade (Xavier et al., 2005). Em ambientes naturais, 95% a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento (Nikolael e Plakunov, 2007).

Microrganismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização. Dentre os fatores que possibilitam a alta resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos pode-se encontrar a matriz de polímeros extracelulares, que age como um adsorvente ou inativante, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células bacterianas do seu interior (Oliveira, 2010). Ao mesmo tempo, a resistência dos biofilmes está ligada à sua propriedade viscoelástica que o permite se adaptar a altos cisalhamentos por tornarem-se mais densos e resistentes (Annu. Rev. Microbiol., 2002).

Além disso, biofilmes são mais resistentes pois podem ser formados por diferentes espécies, as quais protegem umas às outras durante a aplicação de agentes químicos. Esse fato é causado pela diferente resistência de uma respectiva espécie microbiana contra os agentes utilizados (Vidal et al., 2000). Por fim, demonstram também resistência acrescida à radiação UV (Elasri e Miller 1999), à desidratação (a matriz de polímeros extracelulares é altamente hidratada) e a predadores como protozoários (Xavier et al., 2005). Tal modo dos microrganismos organizarem-se é uma maneira de proteger o seu desenvolvimento, gerando uma relação de simbiose, além de poder viver em ambientes hostis (Kasnowski et al., 2010).

Apesar de demonstrarem riscos à saúde e serem potenciais causadores de prejuízos na indústria quando seu crescimento é indesejado, os biofilmes têm importância em várias atividades humanas. Estações de tratamento de águas ou de efluentes removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água ou efluente através de interação com biofilmes. A produção de vinagre, produção de ácido cítrico, aplicações farmacêuticas através da produção de metabolitos secundários e processos biológicos para a extração de metais a partir de minério também dependem da ação de biofilmes em seus processos (Xavier et al., 2005).

A formação do biofilme tem início quando algumas poucas células pioneiras aderem a uma superfície. Estas pioneiras contribuem para tornar a superfície mais atrativa às células subsequentes, que eventualmente evoluem a filme complexo e estruturado (Monroe, 2007). As etapas de crescimento e maturação de um biofilme é esquematizada na figura a seguir.

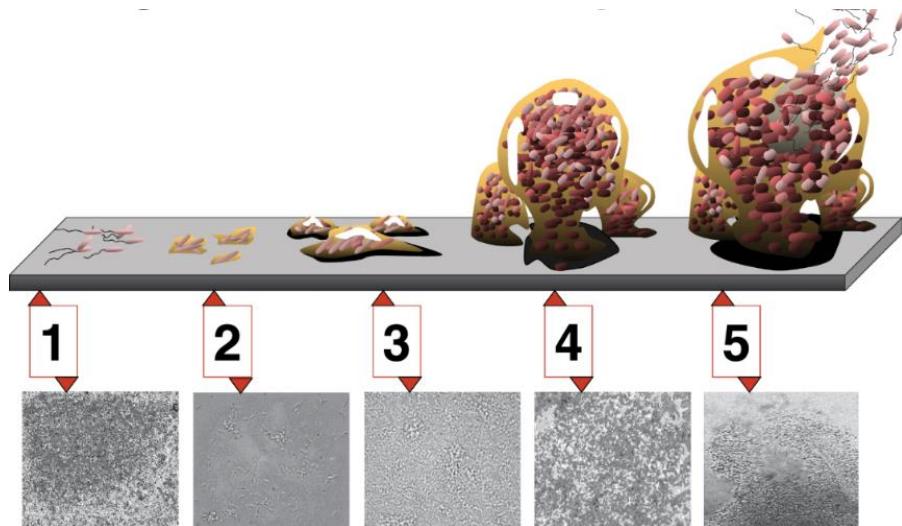


Figura 3 - 5 estágios do desenvolvimento do biofilme (Monroe, 2007). 1 – Adesão aleatória de bactérias livres à superfície; 2 – Secreção de substâncias que facilitam a adesão e a tornam irreversível; 3 – Formação de Micro-colônias; 4 – Formação da arquitetura do biofilme complexo; 5 – Descolamento do biofilme.

Na primeira etapa da formação do biofilme, células livres aderentes são envoltas apenas por pequenas quantidades de material exopolimérico e muitas são capazes de movimentos independentes (O'Toole et al., 1998). Estas células ainda não fazem parte de nenhuma estrutura e muitas, inclusive, soltam-se da superfície e continuam a vida planctônica. Durante este estágio de adesão reversível o conjunto de bactérias exibe diversas características diferentes, específicas de cada uma das espécies (Korber, 1995).

Num segundo estágio estas células secretam exopolissacarídeos (EPS) a ponto de tornarem sua adesão irreversível (Wingender, 2000), caracterizando o início da formação do biofilme. Conforme amadurece, o biofilme desenvolve micro colônias e a arquitetura dos canais de água, configurando as terceira e quarta etapas do crescimento, respectivamente. Neste momento muitas células alteram seus processos fisiológicos como resposta às alterações no nicho onde estão (Annu. Rev. Microbiol., 2002).

A maturidade do biofilme é caracterizada pela alta densidade populacional e, também, pela pronunciada produção de polímeros extracelulares, aumentando a espessura do biofilme (Cheng et al., 2007). Com o aumento da população microbiana, o ambiente torna-se anaeróbio no interior do biofilme, provocando aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis, que enfraquecem a estrutura, causando o desprendimento de células únicas ou de fragmentos (Trachoo, 2003). No momento em que o biofilme atinge massa denominada crítica, o equilíbrio

dinâmico é alcançado e a camada microbiana mais externa de sua estrutura inicia a produção de células bacterianas planctônicas (Prosser, 1987). O desprendimento também pode ser reflexo do cisalhamento causado pelo fluxo que passa pelo local.

Para o crescimento bacteriano as fontes de carbono mais comuns são açúcares e glicídios (pentoses, hexoses, polissacarídeos). Outras fontes de carbono menos comuns abrangem uma ampla faixa de compostos, indo desde os mais simples como metano, metanol e etanol às mais complexas como celulose e hemicelulose. No presente trabalho optou-se por utilizar o etanol como substrato para o crescimento do biofilme, uma vez que se pretende estocar o substrato e este não deve ser contaminado antes de entrar no sistema, que será descrito adiante. Existem algumas referências na literatura (Kunkee, 1967; Lafon - Lafourcade et al., 1983; Peynaud e Domerco, 1968; Pilone 1975; Ribereau-Gayon et al., 1975; 1977) sobre a inibição do etanol no crescimento de certas espécies de bactérias, o que torna a contaminação do substrato mais difícil quando estocado em altas concentrações. O Etanol pode ter efeito repressivo dependendo de sua concentração e do pH do meio de cultura (Fernandes, 1989).

São essenciais também outros elementos como o Nitrogênio para a síntese proteica e o Fósforo, em forma de fosfato, para a síntese de material genético. É importante garantir concentrações suficientes destes elementos na solução em que o biofilme está imerso, uma vez que a manutenção e crescimento bacteriano são críticos para o sucesso desta metodologia estudada.

2.2 Biossorção de metais pesados por biofilme bacteriano

Como descrito de maneira breve anteriormente, biossorção é uma propriedade que biomoléculas ou biomassas têm de se conectar com certas espécies químicas em solução aquosa. Mais especificamente, tal conexão se dá sem depender de adição de energia no sistema, pois as espécies em solução se aderem a sítios ativos dos biossorventes (Aryal, 2019). É interessante, aqui, comentar sobre a diferença da biossorção para o acúmulo biológico das espécies em solução, que seria mais semelhante a uma absorção. Enquanto a biossorção ocorre na porção externa da célula, o acúmulo ocorre quando a espécie química passa para o meio intracelular. Ou seja, o processo que buscamos estudar através desse trabalho assemelha-se mais ao uso de resinas, produtos sintéticos muito usados em processos de adsorção.

A partir disso, já podemos partir para o porquê do uso de biossorção para a remoção de cromo no experimento, ao invés de outro método. Primeiramente, o uso de bactérias torna o processo mais barato e menos poluente (Volesky, 1990) que o convencional uso de adsorventes

como resinas ou carvão ativado e, buscando reduzir os custos ainda mais, este trabalho não se baseia no uso de bactérias selecionadas e um meio estéril, mas sim de um conjunto não necessariamente identificado de espécies de bactérias, que através do crescimento inicial do inóculo, alimentado pelo substrato selecionado, irá favorecer o crescimento das espécies mais adaptadas àquele meio. Dessa forma, não se faz necessário adquirir nada além do substrato para a manutenção do biofilme que realizará a adsorção. Além disso, o processo de biossorção é mais vantajoso que o de acúmulo biológico (Aryal et al., 2015), sobretudo devido ao fato de que o primeiro não é danoso às células e é espontâneo, ocorrendo tanto em células vivas quanto mortas, enquanto o segundo causa danos irrecuperáveis à estrutura celular e depende da atividade da membrana e parede celular para permitir a entrada e saída das espécies químicas.

Apesar de não ser necessário entender as espécies de bactérias utilizadas no experimento, é necessário compreender o porquê da estrutura de tais células ser capaz de realizar o processo de biossorção para definir uma melhor estrutura de processo. Primeiramente, as bactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos: as Gram-positivas e as Gram-negativas, sendo tal divisão feita principalmente pela diferença entre as paredes e membranas dos dois tipos, como vemos na figura 4. Dentre os dois tipos, as bactérias Gram-positivas são as que têm maior capacidade de adsorver metais, devido principalmente à presença dos ácidos teicoico e lipoteicoico, com grupos carbônicos carregados negativamente, bem como à grande quantidade de proteínas ligadas ao peptidioglicano, o que torna a porção externa da célula mais resistente a forças de cisalhamento (McLean e Beveridge, 1990).

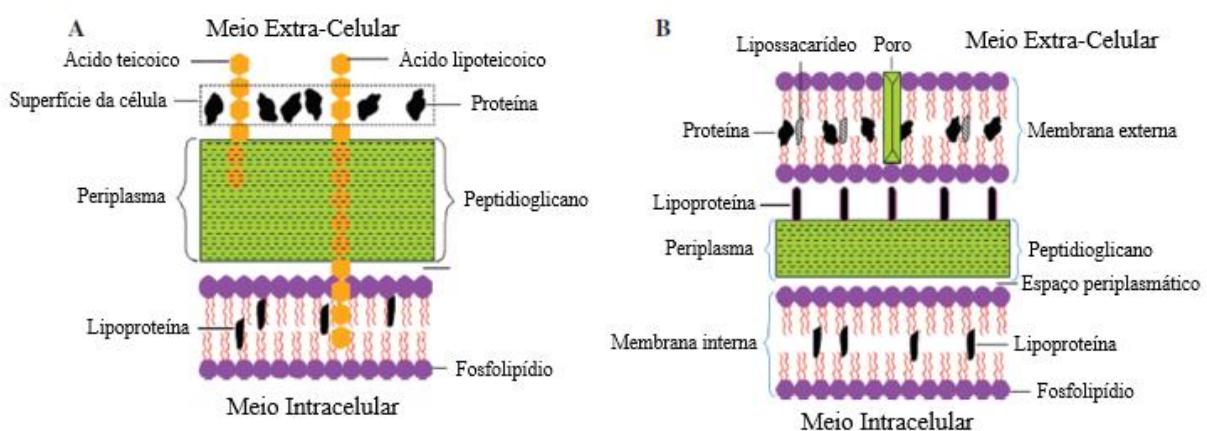


Figura 4 - diferença entre as bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B) (Aryal, 2019)

Conhecendo, portanto, o que é a biossorção, suas vantagens em quais tipos de bactérias está mais presente, devemos entender também o mecanismo pelo qual tal fenômeno ocorre, sobretudo o mecanismo focado em metais pesados e, mais especificamente, em cromo. O fato

é que tal fenômeno não ocorre de maneira exclusiva por um único mecanismo, mas sim por diversos. Alguns deles são complexação, coordenação, quelação, troca iônica, precipitação metálica e adsorção física (Baltazar et al., 2018), ou seja, são mecanismos físicos e químicos, com um grande leque de possibilidades, demonstrando novamente a vantagem do uso da bioassorção. A figura 5 demonstra esquematicamente como ocorrem alguns mecanismos de bioassorção entre a célula bacteriana e o meio externo. Posteriormente, entenderemos também como o pH de meio interfere nas cargas elétricas das superfícies da célula e como tal fator influencia na adsorção de metais pesados.

Dentre os mecanismos mais presentes, é válido descrever mais afundo alguns deles. A adsorção física, por exemplo, é resultado de dois tipos de interação: forças de Van der Waals e ligações eletroestáticas, sendo o primeiro caso mais fraco que o segundo e, consequentemente, mais fácil de ser desfeito (Volesky, 1990). A complexação e a quelação, por outro lado, vão um passo além. A partir da presença do metal na superfície da célula, pode haver uma interação química entre os ácidos orgânicos produzidos pela bactéria e o metal, como a quelação e a desprotonação, dando origem a compostos orgânicos complexos com presença de metais pesados, nomeados moléculas organometálicas (Yee e Fein, 2001).

Outros métodos também se baseiam em interações químicas. A precipitação metálica, por exemplo, ocorre através da formação de sais entre sulfatos, sulfetos e fosfatos com o metal pesado, de maneira que esses sais ficam contidos dentro da célula (McLean e Beveridge, 1990). Já a troca iônica ocorre em compostos onde já há a presença de um cátion, normalmente de metais não considerados metais pesados, como Na^+ , Mg^{2+} , K^+ e Ca^{2+} . Nesse caso, os cátions de metais pesados passam a ocupar os sítios que outros metais ocupavam nos polissacarídeos da parede celular das bactérias (Aryal, 2019).

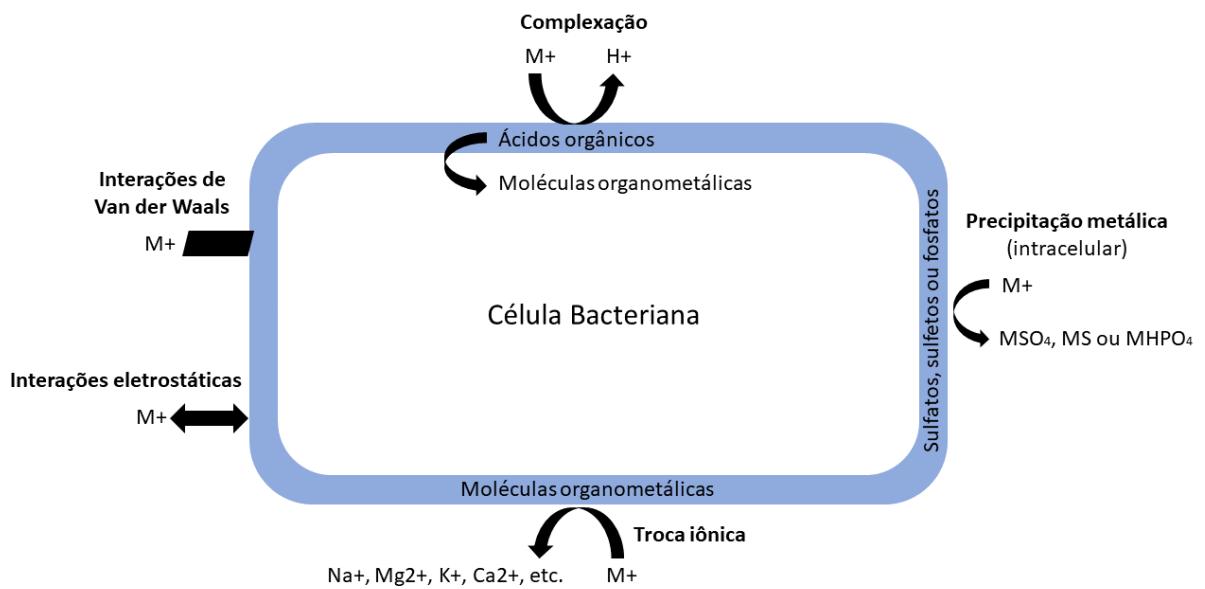


Figura 5 – Mecanismos de bioassorção bacteriana de metais pesados

2.3 Efetividade e seletividade da bioassorção de metais pesados

Fatores de efetividade e seletividade na bioassorção incluem grupos funcionais presentes no bioassorvente, temperatura, pH e quantidade de bioassorvente (Beni e Esmaeli, 2020). Isso ocorre pois, dado que o bioassorvente consiste em uma biomassa viva, existem condições físico-químicas ótimas de trabalho que possibilitam o melhor resultado de bioassorção para cada material a ser adsorvido.

2.3.1 Grupos funcionais do bioassorvente

Tendo em vista os diferentes mecanismos envolvidos na bioassorção de metais pesados que foram discutidos na seção 2.2, deve-se analisar a seletividade de tais mecanismos para diferentes metais pesados.

É importante ressaltar que a seletividade a diferentes metais pesados apresentada pela presença de diferentes grupos funcionais em células de bioassorventes é diretamente relacionada com a afinidade eletrônica entre metal pesado e superfície da bactéria. Ou seja, quanto maior a afinidade entre um metal pesado específico e o exterior da bactéria, maior a probabilidade de que a espécie metálica será adsorvida pela célula.

Grupos funcionais presentes na superfície de bactérias estão diretamente ligados aos mecanismos de bioassorção de afinidade eletrônica como os mecanismos de complexação, interações eletrostáticas e de troca iônica, sem dependência metabólica, entre a superfície da bactéria e o meio de troca. Outros mecanismos já citados como transporte metabólico para

dentro da célula e acúmulo de metais pesados no biofilme não dependem de afinidade eletrônica com a superfície da célula e, portanto, não dependem dos grupos funcionais da superfície das bactérias.

Analisando especificamente as espécies Cr (III) e Cr (VI) pode-se destacar alguns grupos funcionais importantes na bioassorção destes metais através dos mecanismos já mencionados de complexação, interações eletrostáticas e de troca iônica. Entretanto, de acordo com Hlihor et al. (2016), íons de Cr (III) são adsorvidos predominantemente por mecanismo de troca iônica com a superfície da célula bacteriana e, portanto, representam o mecanismo mais significante de adsorção para Cr (III).

A seguir apresenta-se uma tabela que relaciona os diferentes grupos funcionais que participam da bioassorção de Cr (III) e Cr (VI) presentes em diferentes bioassorvente bacterianos.

Tabela 1 -Grupos funcionais participantes da biossorção de cromo

Espécie Metálica	Bactéria	Grupo funcional	Referências
Cr(III)	<i>B. subtilis</i>	Carboxila	Aravindhan et al. 2012
Cr(III)	<i>Mycobacterium sp.</i>	Amina e Carboxila	Aryal e Liakopoulou-Kyriakides 2013a
Cr(III)	<i>P. aeruginosa</i>	Amina e Carboxila	Kang et al. 2007
Cr(III)	<i>S. rimosus</i>	Carboxila	Sahmoune et al. 2009
Cr(VI)	<i>Bacillus sp. FM1</i>	Amina, carboxila, hidroxila, e fosfato	Masood and Malik 2011
Cr(VI)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amina, carboxila, hidroxila, e carbonila	Oves et al. 2013
Cr(VI)	<i>Cronobacter mutjisi</i>	Amina e fosfodiéster	Quinton et al. 2018
Cr(VI)	<i>Mycobacterium sp.</i>	Amina, carboxila e fosfato	Aryal e Liakopoulou-Kyriakides 2013a
Cr(VI)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Amina e fosfodiéster	Quinton et al. 2018

A partir da tabela 1, pode-se concluir que bactérias são microorganismos promissores para a biossorção de cromo pois possuem grupos ativos na remoção de íons em solução, principalmente na composição de sua parede celular. Isso se dá pois na superfície celular bacteriana há a presença de peptidoglicanos e ácido teicóico, que por sua vez são compostos pela maioria dos grupos funcionais ativos indicados na tabela 1.

2.3.2 Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros de toda reação química. A temperatura afeta a solubilidade e estabilidade de espécies de íons metálicos, ligantes e ligantes complexos (Zhang et al., 2010). O efeito da temperatura na cinética da reação, ou seja, qualidade da biossorção, ou tem um efeito positivo ou negativo sobre a natureza do biossorvente. No entanto, alguns pesquisadores sugerirem que o efeito da temperatura é menor do que aqueles dos parâmetros de impacto, como quantidade de biossorvente e pH (Gomez-Gonzalez et al., 2016).

Existem amplos estudos buscando temperaturas ótimas de bioassorção para diferentes bioassorventes. Entretanto, vale destacar que no caso de bioassorventes vivos, a temperatura apresenta maior importância na fase de crescimento da biomassa que será utilizado no processo do que durante a fase de bioassorção em si (Beni e Esmaeili, 2020).

Para bioassorção de Cr (VI) em *Cellulosimicrobium funkei*, uma bactéria Gram-positiva, 35°C foi a melhor temperatura para o crescimento de biomassa e bioassorção (Karthik et al., 2016). Já para os biopolímeros extracelulares bacterianos (biofilmes bacterianos), não existem estudos que avaliam temperaturas ótimas para a bioassorção de cromo, entretanto Bulgariu e Gavrilescu (2015) mostraram que a temperatura ótima para a bioassorção de Cd (III) e Zn (II) por biopolímeros extracelulares é de 37°C.

Vale ressaltar que a eficiência de remoção de metais pesados como Pb (II), Cu (II), Zn (II), Mn (II) e Cr (VI) demonstrou aumentar levemente aumentando a temperatura. Isso indica que a bioassorção é de natureza endotérmica, com exceção para Ni (II) (Daneshfazoun et al., 2017). Acredita-se que o aumento da quantidade de bioassorção com o aumento da temperatura pode ser devido ao aumento do tamanho dos poros no bioassorvente, à maior mobilidade dos íons de metais pesados e às colisões efetivas (Verma et al., 2016, 2017).

Por fim, vale ressaltar que processos de bioassorção são raramente realizados a altas temperaturas devido ao aumento dos custos operacionais (Nongmaithem et al., 2016). Além disso, existem alguns estudos que mostram resultados diferentes, pois indicam que a temperatura não afeta o processo de bioassorção (Farnane et al., 2017). Dessa forma, os pesquisadores optam por realizar o processo em temperatura ambiente (Masoumi et al., 2016).

2.3.3 pH

O pH desempenha um papel importante no processo de bioassorção, no crescimento microbiano e em sua atividade enzimática. O pH da solução em que se encontra o bioassorvente determina a carga superficial do mesmo e seu grau de ionização (Dhanarani et al., 2016; Yu et al., 2016). Entretanto, em biofilmes aderidos a um suporte não imerso em solução, o pH que deve ser considerado é o pH da solução que contém a substância que será adsorvida, pois está será a solução que entrará em contato com o biofilme e determinará seu pH.

Em pH baixo, regiões com densidade de carga positiva surgem no bioassorvente, geralmente em regiões com grupos carboxila, fosfato e amino. Essa densidade de carga positiva cria centros que repelem cátions metálicos eletrofílicos, dificultando a bioassorção (Ramteke e

Gogate, 2016). Além disso, a solubilidade dos íons metálicos em pH alto é reduzida e, portanto, tais íons estão mais suscetíveis a serem atraídos por grupos funcionais do bioassorvente. Tais estudos concluem que ocorre um aumento da eficiência da bioassorção com o aumento do pH do meio em que se encontra o bioassorvente.

Entretanto, a eficiência de bioassorção de ânions metálicos aumenta com a diminuição dos valores de pH devido ao aumento em grupos funcionais com carga positiva, (Ziagova et al. 2007, Aryal e Liakopoulou-Kyriakides 2013), contrariando a maior efetividade em pH alto. Dessa forma, cientistas buscam trabalhar com meios neutros para não contrariar, de maneira não intencional, os grupos funcionais presentes na biomassa do experimento.

2.3.4 Quantidade de bioassorvente

De acordo com estudos sobre a relação do bioassorvente com a capacidade de bioassorção, pode-se concluir que a capacidade de bioassorção muitas vezes tem uma relação direta com a quantidade de bioassorvente. A eficiência da bioassorção aumenta com o aumento de bioassorvente porque mais sítios ativos ficam disponíveis para íons metálicos.

Em uma curva de eficiência da bioassorção em função da quantidade de bioassorvente, a inclinação é muito íngreme no início do processo, isso é devido à disponibilidade de sítios ativos na superfície do bioassorvente para íons de metais pesados. Entretanto, se não houver renovação de sítios ativos, a inclinação da curva diminui gradualmente até a saturação do bioassorvente (Nadeem et al., 2016).

Entretanto, Fadel et al. (2017) relataram que, quando a concentração de biomassa de bioassorção é baixa, os íons metálicos são bioassorvidos na superfície da biomassa, e alguns deles são introduzidos na célula interna devido ao gradiente de íons metálicos, aumentando a bioassorção por volume de bioassorvente.

Sendo assim, experimentos para otimizar a quantidade de bioassorvente e sua eficiência de remoção são realizados de modo que valores ótimos são encontrados para equilibrar a bioassorção tradicional e a incorporação de íons metálicos por gradiente de íons.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Introdução e justificativa da metodologia experimental

A metodologia experimental deste trabalho foi inteiramente baseada no objetivo de provar a possibilidade de eliminar concentrações de cromo, em água de poços profundos de regiões do interior do estado de São Paulo, acima do limite de potabilidade estabelecido pelo ministério da saúde. Ao mesmo tempo, para que esta metodologia fosse vista como possível solução para tais poços, foi necessário considerar aspectos de localização, existência ou não de mão-de-obra especializada, verba e tamanho da operação.

Dessa forma, a metodologia aplicada vislumbrou o pior dos cenários para todos os aspectos mencionados: dificuldade de acesso causado pela localidade interiorana, inexistência de mão-de-obra especializada para operar maquinários sofisticados, baixa verba para realização do processo proposto e área reduzida para construção da operação.

Sendo assim, um esquema simplificado da metodologia proposta, em escala laboratorial, como tentativa de provar a possibilidade de remover o cromo de água de poços profundos até limites aceitáveis, considerando todos os aspectos mencionados, é mostrado a seguir na figura 6. É importante mencionar que, em escala real, não haveria a utilização de um tanque de armazenamento para a água de poço, visto que essa seria bombeada diretamente da sua fonte.

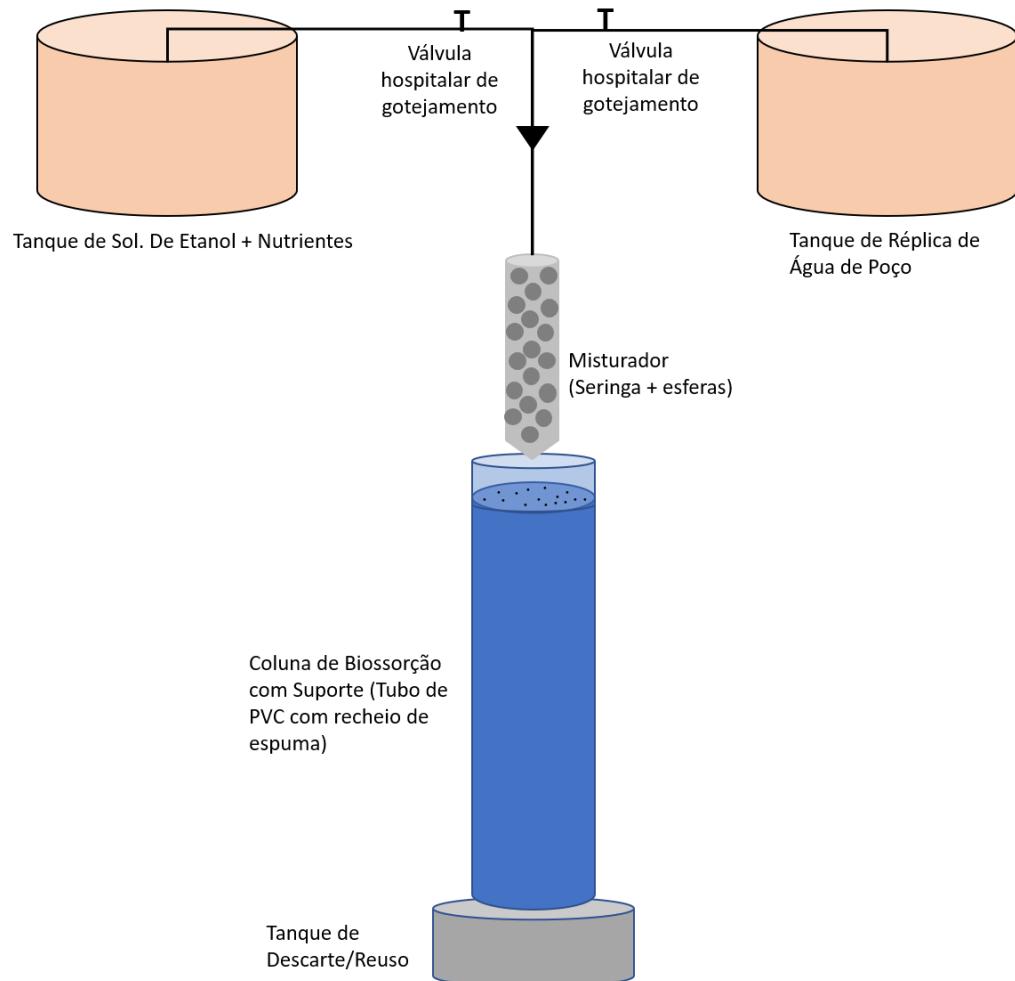


Figura 6 - Esquema da metodologia experimental para remover cromo de água de poços

Os materiais utilizados foram:

- 3 bêqueres de 2L;
- 4 tubos de silicone;
- 2 válvulas hospitalares de gotejamento;
- 1 seringa com esferas de vidro;
- 1 cano de PVC com recheio de espuma;
- Solução de Etanol e nutrientes;
- Solução de cromato de potássio.

A funcionalidade do processo será explicada nas seções 3.3 e 3.4, mas vale ressaltar que a biossorção de cromo ocorre no interior da coluna, onde há biofilme aderido ao suporte.

A questão de dificuldade de acesso causado pela localidade foi compensada na escolha de materiais de fácil obtenção. Pode-se destacar o etanol como substrato utilizado para metabolismo do inóculo e as bactérias do inóculo provenientes da água de um lago.

A inexistência de mão-de-obra especializada pode ser compensada com a necessidade apenas da preparação de uma solução simples de etanol e nutrientes, a não especificação de um tipo de bactéria (que elimina a necessidade de controles rígidos de esterilização), e a facilidade de manuseio da bomba.

A baixa verba para o projeto pode ser amenizada com os baixos custos de matérias primas, pois a bactéria é o único tipo de matéria prima que pode ser regenerada, baixos custos de maquinário e gastos de energia, dada que a bomba seria o único maquinário custoso do projeto. Além disso, a coluna de biossorção é aberta para o ambiente, e não é afogada, não havendo necessidade de gastos com aparelhagem de vedação e de controle interno da coluna.

A área reduzida para realização da operação é compensada pela verticalidade do arranjo. Uma coluna ocupa espaço vertical e não horizontal, reduzindo a área de utilização.

Por fim, vale ressaltar que para que o processo de remoção de cromo por biossorção como descrito na figura 6 fosse possível, esta foi precedida de duas etapas anteriores e, portanto, a metodologia foi constituída cronologicamente por 3 etapas que se complementam:

- I. Crescimento, sem formação de biofilme, do inóculo utilizado;
- II. Geração de biofilme aderido à coluna de biossorção a partir do inóculo;
- III. Biossorção de cromo na coluna com biofilme aderido.

3.2 Crescimento do Inóculo

Para o cultivo do inóculo utilizado como biomassa no sistema de biossorção foram utilizadas bactérias que viviam em água de lago localizado no campus Cidade Universitária da USP. Tais bactérias foram cultivadas em solução de água de torneira de volume 1L, com etanol como fonte de carbono e fosfato de amônio dibásico como fonte de fósforo e nitrogênio.

A escolha da água de torneira deu-se justamente para simular as condições encontradas no sistema real, com concentração de íons metálicos de forma a selecionar bactérias que sobrevivam em tal meio, e não num meio sem dureza alguma como, por exemplo, em água Milli-Q. É de grande importância replicar as características principais do meio onde o problema deve ser atacado, pois a interação entre os íons presentes no meio de cultura com os microrganismos em crescimento e, principalmente, com o processo de biossorção exercem grande influência nos resultados obtidos.

Tabela 2 - Concentrações de nutrientes utilizadas no cultivo do inóculo

Substância	Concentração em solução de 1L
Etanol	2 g/L
Fosfato de Amônio Dibásico	4 g/L

A escolha do etanol como substrato para o crescimento bacteriano, e consecutiva seleção das bactérias, deu-se pela necessidade de estocar o substrato. Em baixas concentrações, o etanol é fonte de carbono para determinadas bactérias, porém em concentrações mais altas ele tem ação bactericida, o que evita a contaminação da solução estoque, tornando-o uma opção em potencial para determinado cenário.

A solução de inóculo foi colocada em agitador magnético e mantida em temperatura e pressão constantes, com reposição de substrato a cada dois dias. A agitação garante a difusão de oxigênio na solução, decisão tomada para favorecer a seleção de bactérias aeróbicas no inóculo, uma vez que a coluna operará aberta e com gotejamento, com livre circulação de oxigênio por meio de seu recheio. As condições de temperatura e pressão também se assemelham às encontradas na operação.

O inóculo que, ao início do cultivo era incolor, apresentou turbidez perceptível a olho nu, comprovando o crescimento bacteriano no meio de cultivo. Vale ressaltar que a divisão celular é um processo que ocorre a todo momento na operação e, apesar do cultivo do inóculo separadamente num momento inicial, o crescimento contínuo e incessante é essencial para o sucesso do experimento. Por isso as condições encontradas na atual etapa descrita devem ser fiéis às condições de operação da coluna recheada, evitando assim a destruição da população cultivada e renovando sítios de biossorção.

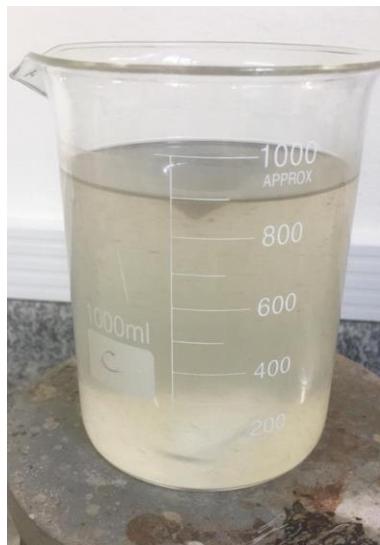


Figura 7 - Inóculo após 2 dias em crescimento apresenta turbidez

3.3 Crescimento do Biofilme

Para o crescimento do biofilme no sistema montado circulou-se a solução de inóculo de modo contínuo na coluna de biossorção por duas semanas.

O sistema utilizado e demonstrado na figura 8 consistiu em dois tanques, um com solução de substrato e nutrientes de mesmas concentrações empregadas no crescimento bacteriano e outro com o inóculo. Seus conteúdos foram levados a um misturador que garantiu a homogeneização da mistura. Posteriormente a solução foi levada a um gotejador com diversos pontos de gotejamento, funcionando como um chuveiro. Este último garante a distribuição da solução em todos os pontos da coluna, evitando assim que haja caminhos preferenciais e proporcionando o crescimento uniforme de biofilme na estrutura.

A coluna é feita de tubo de PVC, com recheio de espuma de PVC (similar à usada em capachos) e altura de cerca de 60cm. Diferentemente do que se obteria com esponjas, os poros do recheio são grandes o suficiente para garantir circulação de oxigênio por toda a coluna e diminuir a retenção de água e cromo.

A solução com inóculo e substrato chega à coluna e escoa por gravidade, entrando em contato com o recheio. Todo o conteúdo que sai pelo fundo da coluna é devolvido ao tanque de inóculo por meio de uma bomba peristáltica, voltando ao sistema. O arranjo horizontal proporciona facilidade no escoamento dos fluidos envolvidos no processo, que é feito por diferença altura de colunas de água.

A vazão do tanque de substrato foi ajustada com vazão média de 3 gotas/min, enquanto a vazão do tanque com bactérias tinha vazão média de 15 gotas/min. Tais valores foram escolhidos para que o escoamento fosse lento, de modo a aumentar o tempo de residência da solução na coluna e garantir uma maior adesão das bactérias planctônicas ao recheio, facilitando a formação de biofilme.

O gotejamento de solução de etanol simultaneamente à circulação do inóculo tem função de fornecer nutrientes continuamente para que o biofilme possa crescer e se espalhar pela coluna. Tal fato garante o aumento da densidade populacional, formação da arquitetura de canais e evita o desprendimento de células ou conjuntos de células por conta de falta de nutrientes.

Além disso, a alimentação de substrato tem papel essencial no processo de regeneração da biomassa, uma vez que num cenário de saturação dos sítios de biossorção, a divisão e crescimento celular seriam a solução para devolver ao sistema a capacidade de remoção de cromo em solução.

O crescimento do biofilme foi medido pela diferença entre a massa da coluna inicialmente encharcada de água e a massa da coluna encharcada após decorrido um determinado intervalo de tempo. Sabe-se que biofilmes podem reter grande quantidade de água, então a variação de massa não pode ser atribuída unicamente à massa das células bacterianas, mas é diretamente proporcional à quantidade destas.

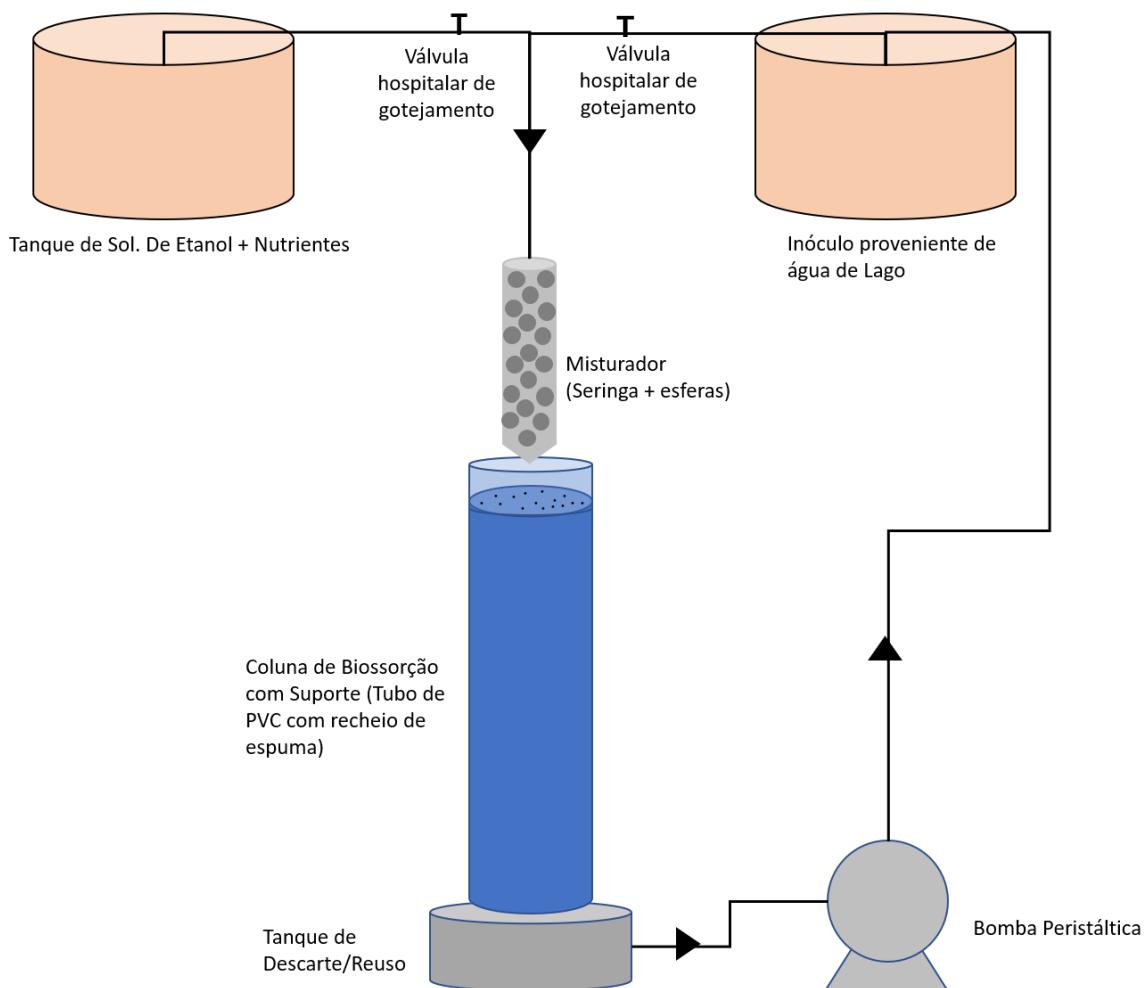


Figura 8 - Aparelhagem adaptada à circulação de solução de inóculo para crescimento de biofilme

3.4 Procedimento de biossorção do cromo

A fim de realizar um experimento que nos permitisse o acompanhamento próximo e contínuo do processo pensado, buscamos uma metodologia que nos permitisse retirar dados contínuos de concentração de cromo na saída, que posteriormente seriam utilizados para a comprovação ou não da funcionalidade do método. Para tal, a disposição dos equipamentos foi bem similar à usada para a formação do biofilme na coluna, no entanto foi simplificada.

Estava no planejamento a possibilidade de desprendimento de parcelas do biofilme ao longo das passagens e, como a aparelhagem não possuía um filtro no final da coluna, optou-se por não haver reciclo do fundo da coluna para o tanque de armazenamento da água de poço preparada. Dessa forma, a montagem do sistema dependeu apenas do tanque de armazenamento da água de poço, do gotejador, da coluna, e de um béquer colocado no fundo da coluna, que foi sendo trocado para cada amostra recolhida, como mostrado na figura 6.

A água de poço utilizada foi produzida no próprio laboratório, preparada com água da torneira em que fora adicionado cromato de potássio até se obter a concentração de 0,11 mg/L. Essa concentração foi a medida no poço BA0219P, no município de General Salgado, nas regiões do aquífero Bauru, em abril de 2016 através de um acompanhamento periódico da CETESB. Optou-se pela escolha desse poço pois foi um dos que apresentou a concentração de cromo total bem acima da permitida pela legislação (mais que o dobro), e bem acima da média dos poços contaminados (que ficou em 0,064 mg/L), o que significaria realizar o teste de biossorção sob condições máximas e visando a utilização de um aparelho em escala real onde há a maior necessidade.

Durante a realização do experimento, optou-se por adicionar os substratos, em concentrações menores que no crescimento do biofilme, diretamente na água de poço fabricada. Tal montagem se deu pois, originalmente, pensava-se em ter uma corrente separada de substrato puro, que se juntaria à corrente da água de poço em uma vazão bem menor, garantindo a concentração ideal de substrato, e que não alteraria significativamente o volume total de água de poço que passaria pela coluna e, consequentemente, não alteraria a concentração de cromo da água de poço antes mesmo que passasse pela coluna. No entanto, essa montagem não foi possível devido à pequena escala em que o experimento foi realizado, de forma que não se conseguiu manipular as vazões para garantir uma vazão de substrato contínua e, ao mesmo tempo, insignificante perto da vazão total, o que seria possível em escalas maiores. A escolha de diluir os substratos na própria água de poço preparada permitiu uma concentração de cromo fiel à realidade em todo o momento até sua entrada na coluna.

A utilização do gotejador em formato de “chuveiro” foi planejada para garantir a melhor distribuição da água de poço ao longo da coluna, assim como realizado no crescimento de biofilme, buscando-se assim evitar caminhos preferenciais. Tal configuração garante uma biossorção mais uniforme e uma utilização maior dos sítios de adsorção disponíveis em todo o preenchimento da coluna. Somado a isso, o acompanhamento próximo dos integrantes do grupo também foi crucial para garantir tal distribuição das gotas de água, pois quando o equipamento apresentava alguma falha como gotejar em apenas um lugar, algum integrante podia agir rapidamente de duas maneiras possíveis: ajustando o gotejador para garantir mais gotas ou girando a coluna para garantir a passagem da água por outro caminho.

A realização do experimento em si baseou-se na passagem de aproximadamente 1500mL da água de poço preparada, utilizando uma vazão de 27,4 mL/min por 50 minutos.

Foram recolhidas amostras a cada 5 minutos de passagem, ou seja, com cada amostra contendo aproximadamente 137mL, que forneceram os dados de concentração no fundo da coluna ao longo do tempo. Também foram recolhidas amostras da água de poço preparada, que forneceu a concentração inicial real, e da água de torneira, para garantir que a água usada na preparação da água de poço não tinha contaminação prévia a ser considerada. As amostras foram filtradas, para a remoção das bactérias desprendidas da coluna, e armazenadas separadamente, para posteriormente serem analisadas.

3.5 Metodologia Analítica

Tendo em vista, novamente, que este trabalho consistiu em tentar provar a possibilidade de eliminar concentrações de cromo, em água de poços profundos de regiões do interior do estado de São Paulo, acima do limite de potabilidade estabelecido pelo ministério da saúde, fez-se necessário determinar a quantidade de cromo total em solução nas amostras antes e depois da passagem pela coluna de biossorção.

Para validar o experimento, saber se a concentração de cromo em solução diminuiu é essencial. Além disso, saber se a quantidade de cromo removido de uma mesma amostra inicial ao longo do tempo muda é essencial para determinar variações de eficiência da coluna. Sendo assim utilizou-se a técnica de espectrofotometria de emissão atômica em chama para medir as concentrações de cromo.

A espectrofotometria de chama é a mais simples das técnicas analíticas baseadas em espectroscopia atômica. Nesse caso, a amostra contendo cátions metálicos é inserida em uma chama e analisada pela quantidade de radiação emitida pelas espécies atômicas ou iônicas excitadas. Os elementos, ao receberem energia de uma chama, geram espécies excitadas que, ao retornarem para o estado fundamental, liberam parte da energia recebida na forma de radiação, em comprimentos de onda característicos para cada elemento químico.

Para a realização do experimento, foi utilizado o Espectrofotômetro de Absorção Atômica AA-7000: SHIMADZU disponível no prédio do Semi – Industrial do departamento de engenharia química da USP e apresentado na figura 9.



Figura 9 - Espectrofotômetro de Absorção Atômica AA-7000: SHIMADZU

Além disso, para utilização do aparato, foi necessária a construção de uma curva de calibração utilizando soluções de cromato de potássio. As concentrações das soluções devem abranger um intervalo que englobe a concentração inicial de 0,11 mg/L da réplica de água de poço e as concentrações esperadas das amostras pós passagem na coluna de biossorção, em torno de 0,05 mg/L, correspondente ao limite de potabilidade estabelecido na legislação. Vale ressaltar que para as soluções da curva de calibração utiliza-se água Milli-Q e balões volumétricos, pois os valores devem ser os mais precisos possíveis.

Sendo assim, a ideia inicial era criar uma curva de calibração com 7 pontos, além do branco (água Milli-Q pura), de concentração iniciando em 0,05 mg/L e terminando em 1,00 mg/L. Entretanto, medições iniciais de concentrações de cromo em solução utilizando o espectrofotômetro de absorção atômica AA-7000: SHIMADZU mostraram que o equipamento era capaz de captar adequadamente apenas concentrações acima de 0,20 mg/L e portanto algumas alterações na curva tiveram que ser feitas.

Tendo em vista a limitação do equipamento, foi necessário mudar o intervalo de abrangência da curva de calibração com uma mudança da concentração das soluções componentes da curva. Ao mesmo tempo, concentrar as amostras de réplicas de água de poço, pois nem mesmo a amostra inicial de réplica seria captada pelo equipamento dado que a concentração inicial era de 0,11 mg/L, bem menor que o limite inferior de captação do equipamento.

Os fatores de concentração das amostras retiradas da coluna de biossorção variaram de 6 a 10 vezes e são explicitados na seção de resultados, mas, tendo em vista tais fatores, foi construída uma curva de calibração que abrangesse concentrações até 10 vezes maiores que a concentração inicial da réplica de água de poço, ou seja, 1,10 mg/L, correspondente a 10 vezes a valor de 0,11 mg/L. A seguir é mostrada as concentrações das soluções utilizadas na curva de calibração.

Tabela 3 - Concentração das soluções da curva de calibração para a utilização da espectrofotometria de absorção atômica por chama.

Solução	Concentração (mg/L)
Branco	-
1	0,25
2	0,50
3	0,75
4	1,00
5	1,10
6	1,25
7	1,50

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Crescimento do inóculo e formação do biofilme

O crescimento do inóculo pode ser observado pelo aumento da opacidade da solução, conforme mostrado na figura 9 a seguir.



Figura 10 - Inóculo ao início do cultivo (à esquerda) e ao fim do cultivo (direita).

Após o crescimento visível de bactérias em solução, estas foram circuladas no sistema descrito na seção 3.2 montado com o objetivo de formação de biofilme. A figura 10 mostra, após dias de funcionamento do sistema, o biofilme que se prendeu ao recheio da coluna:



Figura 11 - Visão do topo da coluna após formação do biofilme.

Além de visível, o crescimento do biofilme pode ser comprovado por meio da variação de massa da coluna (entende-se por coluna o conjunto formado pelo tubo e pelo recheio, ambos de PVC) antes e depois da circulação da solução de inóculo.

Tabela 4 - Massa da coluna antes e após o experimento

Estado da Coluna	Massa total da Coluna
Coluna seca, antes do crescimento de biofilme	253,8 g
Coluna encharcada, antes do crescimento de biofilme	299,6 g
Coluna encharcada após o fim do período de crescimento	375,3 g

Pela tabela 4, é possível notar que houve variação de massa da coluna, o que foi causado pelo crescimento do biofilme. Note que a variação de massa não deve ser atribuída somente à biomassa que ali se desenvolveu, mas também à água retida em maior quantidade e outras substâncias adsorvidas por esta biomassa e que ficam no meio extracelular.

Vale ressaltar que este trabalho foi realizado concomitantemente à pandemia do novo coronavírus e o acesso aos laboratórios da universidade passou a ser restrito por medida de contenção da doença. Pretendia-se, após a finalização do experimento, abrir esta coluna para verificar internamente como foi a adesão do biofilme ao longo da coluna analisando seções transversais dela, buscando verificar se este estava uniformemente distribuído ou se possuía concentração em pontos ou caminhos específicos. No entanto, as únicas provas que puderam ser obtidas a tempo são as apresentadas nesse tópico.

4.2 Biossorção de cromo

Como descrito no tópico 3.5, a comprovação da efetividade do método de remoção de cromo foi medida através da variação da concentração de cromo ao longo do tempo no fundo da coluna, sendo essa comparada à concentração da água de poço inicial. Além disso, também se fez necessário uma adaptação no método de medições devido a uma limitação no equipamento, de maneira que as amostras tiveram de ser concentradas para atender a uma curva de calibração entre 0,25 e 1,5 mg/L. A figura 12 mostra a curva de calibração realizada pelo equipamento AA-7000: SHIMADZU.

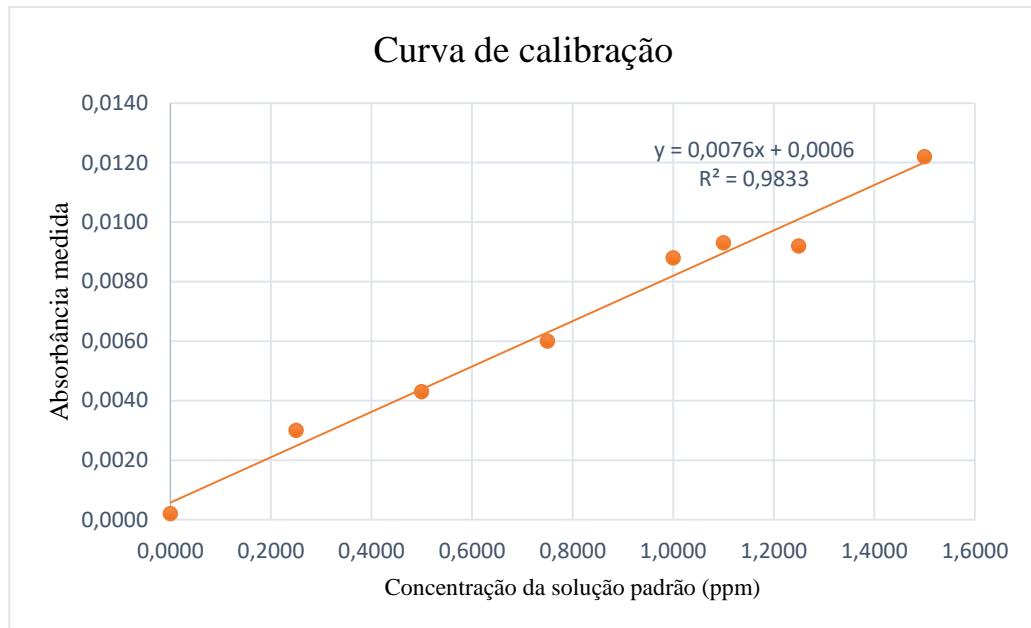


Figura 12 - Curva de calibração realizada pelo espectrofotômetro AA-7000: SHIMADZU

A curva de calibração demonstra que as soluções padrões foram feitas com consistência e o erro do equipamento é baixo, da ordem 10^{-2} mg/L, representando entre 1 e 3% dos valores medidos de concentração. Tal curva de calibração é usada pelo próprio espectrofotômetro no cálculo das concentrações das amostras desconhecidas. Além disso, o equipamento realiza 3 medições para cada amostra, devolvendo a média como resultado.

Para adaptar as amostras, inicialmente em concentrações esperadas entre 0,05mg/L e 0,11mg/L, para a curva de calibração, realizou-se um método simples de concentração por evaporação, dessa forma, foi medida a massa inicial de solução e a massa após a evaporação para se obter um fator de concentração, que posteriormente foi utilizado para dividir os dados coletados na espectrofotometria para se encontrar os valores reais de concentração das amostras. Descrevendo algebricamente o método, temos:

$$f = \frac{M_i}{M_f} \quad (1)$$

$$C_{real} = \frac{C_{medida}}{f} \quad (2)$$

Onde:

- f é o fator de concentração;
- M_i é a massa de solução antes da evaporação;

- M_f é a massa de solução depois da evaporação;
- C_{medida} é a concentração medida pelo equipamento de espectrofotometria;
- C_{real} é a concentração real da amostra coletada.

Os dados de massa e fator obtidos para cada amostra encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Massas coletadas e cálculo do fator de concentração

Amostra	Massa béquer vazio (g)	Massa total pré aquecimento (g)	Massa total pós aquecimento (g)	Massa de solução pré aquecimento (g)	Massa de solução pós aquecimento (g)	Fator de concentração
Início	32,37	84,49	39,13	52,12	6,76	7,71
5 min	60,95	98,81	64,98	37,86	4,03	9,39
10 min	71,72	111,38	76,02	39,66	4,30	9,22
15 min	63,09	99,42	68,05	36,33	4,96	7,32
20 min	48,49	88,06	54,69	39,57	6,20	6,38
25 min	47,09	83,35	52,56	36,26	5,47	6,63
30 min	48,94	84,01	53,01	35,07	4,07	8,62
35 min	55,17	91,83	59,09	36,66	3,92	9,35
40 min	57,82	96,18	62,69	38,36	4,87	7,88
45 min	55,53	92,96	61,1	37,43	5,57	6,72
50 min	63,02	102,2	67,63	39,18	4,61	8,50
Torneira	48,85	97,77	54,02	48,92	5,17	9,46

Com os fatores de concentração calculados a partir da equação (1), fazemos então o cálculo das concentrações reais das amostras a partir dos valores de concentração medidos como descrito na equação (2), os resultados estão expressos na tabela 6.

Tabela 6 - Fator, concentração medida e cálculo da concentração real por amostra.

Amostra	Fator de concentração	Concentração medida (mg/L)	Concentração real (mg/L)
Início	7,71	1,2561	0,1629
5 min	9,39	0,6147	0,0654
10 min	9,22	0,4100	0,0445
15 min	7,32	0,7512	0,1026
20 min	6,38	0,4919	0,0771
25 min	6,63	0,4510	0,0680
30 min	8,62	0,3418	0,0397
35 min	9,35	0,5192	0,0555
40 min	7,88	0,0689	0,0087
45 min	6,72	0,3418	0,0509
50 min	8,50	0,3145	0,0370
Torneira	9,46	-0,0130	-0,0014

Nota-se, de primeira instância, valores negativos de concentração medida para a água da torneira, isso se dá pelo erro apresentado pelo espectrofotômetro AA-7000: SHIMADZU em concentrações muito baixas ou nulas de cromo, como descrito anteriormente, e demonstra que não é necessário contabilizar dados de cromo provenientes da água da torneira para posteriores cálculos relacionando às amostras.

A partir dos dados reais de concentração após a passagem na coluna de bioassorção é possível construir um gráfico que compara tais valores com a concentração inicial, antes da passagem pela coluna, e com o limite de potabilidade para concentrações de cromo. Tal gráfico é mostrado na figura 13.

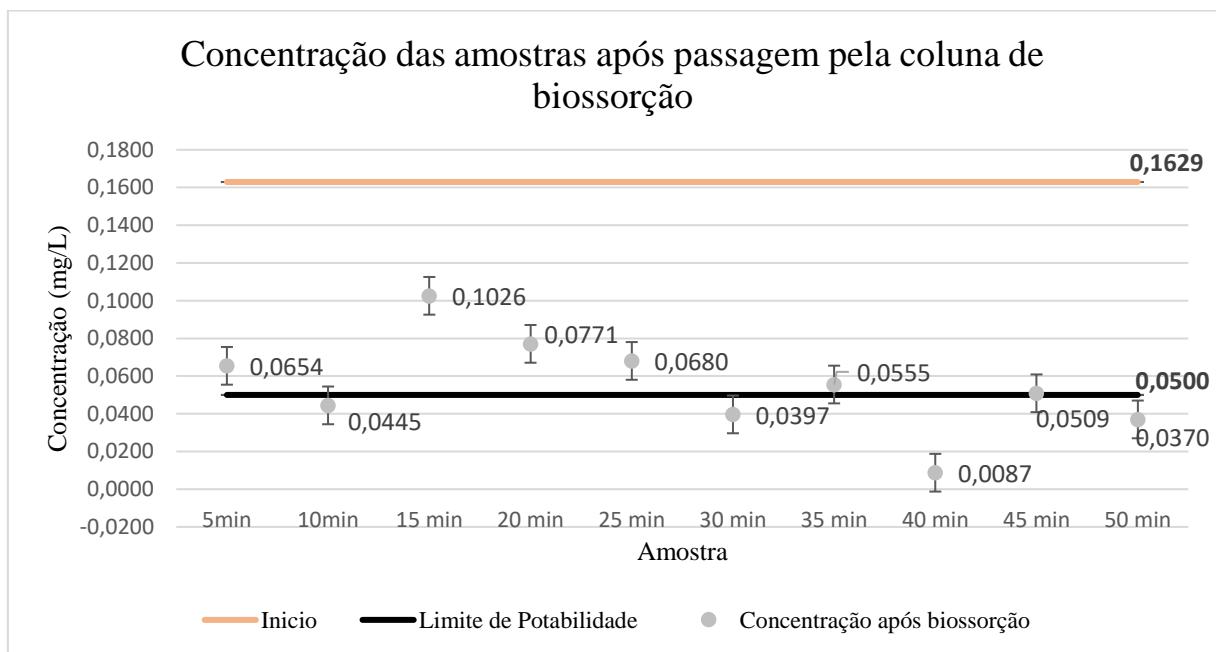


Figura 13 - Comparação entre as amostras após passagem pela coluna de bioassorção, antes da passagem e o limite de potabilidade.

Analizando o gráfico, é perceptível que houve redução da concentração de cromo em todas as amostras retiradas da coluna de bioassorção, evidenciando o funcionamento do processo. Entretanto, é preciso analisar se a coluna proposta foi capaz de reduzir a concentração de cromo em solução a ponto de respeitar o limite de potabilidade definido pelo Ministério da Saúde. Verifica-se que o limite de potabilidade foi alcançado em pelo menos 3 amostras e em até 6, considerando o erro das medidas. Ou seja, entre 30 e 60% dos testes realizados. Ao mesmo tempo, entre 40 e 70% das amostras não atingiram o limite de potabilidade e, portanto, o processo não foi totalmente efetivo para esses casos.

Entretanto, caso não fossem retiradas amostras a cada 5 minutos, mas fosse retirada apenas uma amostra ao final dos 50 minutos de processo, a concentração após a passagem na coluna de biossorção dessa única amostra seria de 0,0549 mg/L, o que é facilmente obtido através de uma média aritmética das concentrações de cada amostra realizada, visto que a vazão permaneceu constante a todo momento. Tal valor é muito próximo do limite de potabilidade de 0,0500 mg/L, de forma que ao se considerar os erros de medida, é possível evidenciar a funcionalidade do método em funcionamento contínuo, e, ao mesmo tempo, evidenciar a necessidade de mais testes para provar a consistência do método.

Além disso, é possível calcular a porcentagem de redução da concentração de cromo nas amostras após passagem pela coluna em relação à amostra inicial. O gráfico da figura 14 demonstra a porcentagem de redução da concentração de cromo em cada amostra e revela o quanto faltou para que o limite de potabilidade fosse atingido.

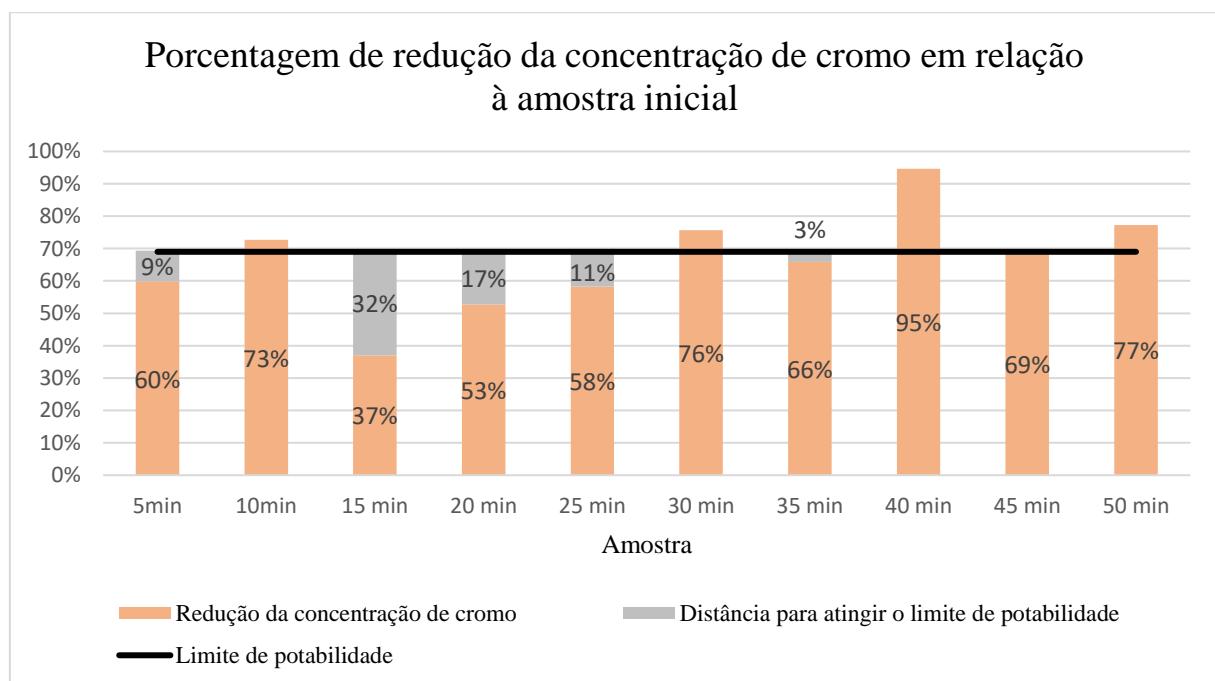


Figura 14 - Porcentagem de redução da concentração de cromo após passagem na coluna.

O gráfico da figura 14 deixa claro que a coluna se mostra eficiente na redução da concentração de cromo em solução e que nas amostras em que não foi possível atingir o limite de potabilidade chegou-se perto de atingi-lo. Além disso, através da média aritmética dos valores de redução, conclui-se que o valor da redução média da concentração de cromo em solução da coluna é de 66%. Valor muito próximo de 69%, que representa a redução necessária para atingir o limite de potabilidade, partindo do valor inicial do experimento de 0,1629 mg/L.

É importante, aqui, apontar que concentrações iniciais tão elevadas quanto as utilizadas no experimento não foram encontradas na base dos poços monitorados pela CETESB. Como descrito no tópico 3.4, a água de poço preparada teria uma concentração de 0,11 mg/L, referente a um caso extremo de contaminação entre os poços monitorados. No entanto, ao realizar as medições das amostras, foi constatado que a concentração real da amostra inicial ficou 48% maior que o esperado, devido a algum erro no preparo da solução, o que acarretou um caso de contaminação excessiva. Mesmo assim, a média das amostras ficou apenas 10% além do limite de potabilidade de 0,05 mg/L.

Outro ponto relevante a ser analisado é o desvio padrão das amostras, que ficou em 0,0255 mg/L, considerado elevado por representar mais de 50% do limite de potabilidade. O desvio padrão, no caso do experimento realizado com vazão constante, demonstra a variação causada pelos diferentes caminhos percorridos pela água de poço dentro da coluna. Como descrito no tópico 4.1, não foi possível abrir a coluna após o experimento para analisar dispersão do biofilme formado devido ao fechamento da universidade. No entanto, acredita-se que, devido à inconstância do gotejador e ao fato de não ter sido possível um acompanhamento constante do processo de crescimento de biofilme na coluna, algumas regiões do enchimento continham maior quantidade de biomassa que outras. O resultado disso foi que, dependendo do caminho percorrido pela água de poço, as gotas podiam entrar em contato com uma quantidade grande de biomassa, resultando em uma adsorção elevada, ou podiam entrar em contato com pouca biomassa, resultando em uma adsorção baixa. Nas amostras coletadas, por exemplo, pode-se dizer que a amostra dos 15 minutos percorreu, em sua média, um caminho com pouca biomassa, enquanto a amostra dos 40 minutos percorreu, em sua média, um caminho com muita biomassa.

Indo mais a fundo, é necessário avaliar se a coluna de biossorção atingiu saturação de cromo em seus sítios de biossorção ou se ainda havia possibilidade de continuar com o processo de passagem da réplica de água de poço pela coluna. Tal conclusão apenas é possível com o cálculo da concentração de cromo na fase sólida, ou seja, cálculo da massa de cromo por grama de biossorvente. Tal concentração é dada por:

$$C_s = \frac{M_{ads}}{M_{bio}} = \frac{V \cdot (C_i - C_f)}{M_{bio}} = \frac{v \cdot t \cdot (C_i - C_f)}{M_{bio}} \quad (3)$$

Onde:

- C_s é a concentração de cromo na fase sólida em mg/g de biossorvente;

- M_{ads} é a massa de cromo adsorvida na coluna em mg;
- M_{bio} é a massa de bioissorvente presente na coluna em g;
- V é o volume que passa pela coluna em cada amostra em L;
- C_i é a concentração de cromo na fase líquida antes da passagem na coluna em (mg/L);
- C_f é a concentração de cromo na fase líquida depois da passagem na coluna em (mg/L);
- v é a vazão de solução de cromo na coluna em (mL/min);
- t é o intervalo de tempo de recolhimento de cada amostra em minutos.

Para realizar os cálculos, assumimos que a massa de biofilme permaneceu a mesma ao longo do experimento devido a perdas insignificantes causadas pelo arrasto de bactérias. Note que, com tal hipótese, o denominador na equação (3) é constante e, portanto, seu valor real não interfere na análise da curva de acúmulo de massa de cromo. Dessa forma, foi escolhido calcular a massa de bioissorvente considerando que a coluna encharcada com e sem biofilme continha a mesma quantidade de água. Assim, tendo em vista os dados de massa da coluna de bioissorção apresentados na tabela 4, a massa de bioissorvente presente na coluna é dada por:

$$M_{bio} = \left(M_{ce,d} - (M_{ce,a} - M_{cs,a}) \right) - M_{cs,a} \quad (4)$$

Onde:

- M_{bio} é a massa de bioissorvente;
- $M_{ce,d}$ é a massa da coluna encharcada depois do crescimento do biofilme;
- $M_{ce,a}$ é a massa da coluna encharcada antes do crescimento do biofilme;
- $M_{cs,a}$ é a massa da coluna seca antes do crescimento do biofilme.

Realizando o cálculo da equação (4) temos, $M_{bio} = 75,7\text{g}$. A tabela 7 apresenta os valores de cada grandeza que está presente nas equações (3).

Tabela 7 - Valores das grandezas da equação (3).

Grandeza	Valor
C_i	0,1629 mg/L
C_f	Varia para cada amostra
v	27,4 mL/min
t	5 min

Já o resultado da equação (3) é diferente para cada amostra e é interessante analisá-lo de forma cumulativa, ou seja, a concentração de cromo na fase sólida acumulada ao longo das amostras, já que o intuito é avaliar se houve ou não saturação de cromo nos sítios ativos da coluna. O gráfico a seguir apresenta os resultados da equação (3) de maneira cumulativa em cada amostra retirada da coluna.

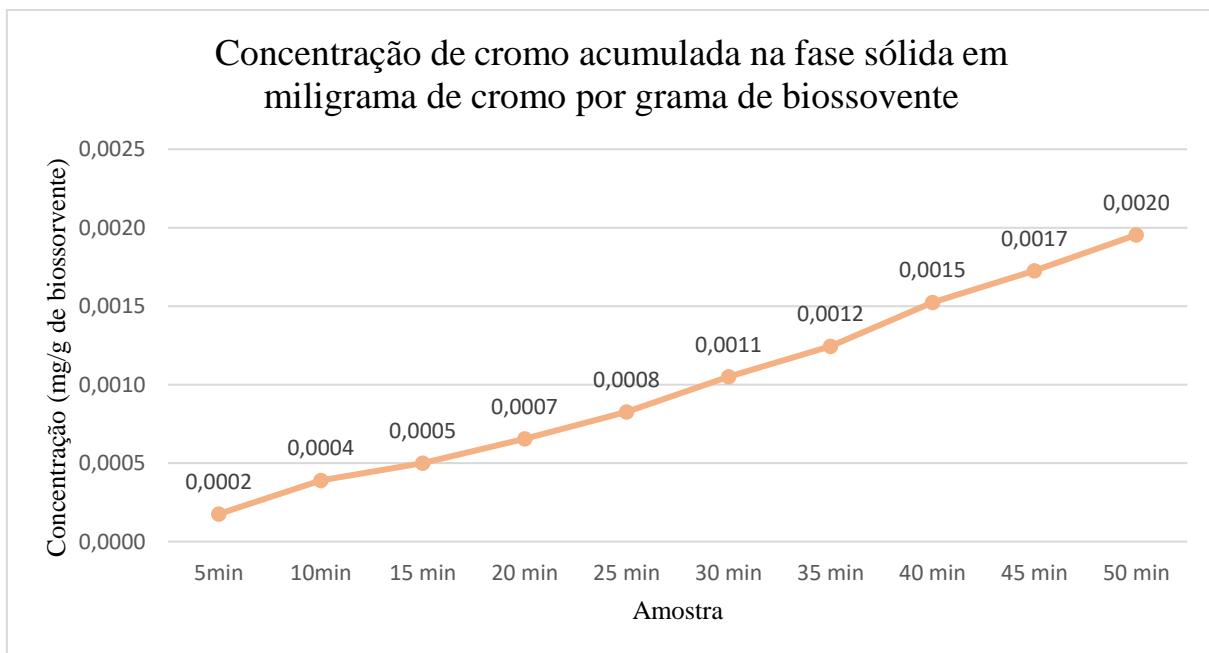


Figura 15 - Concentração de cromo acumulada na fase sólida.

A partir do gráfico da figura 15, é possível concluir que a coluna não atingiu a saturação de seus sítios ativos de adsorção de cromo, pois não há indícios de diminuição da inclinação da curva cumulativa de concentração de cromo no biossorvente. Portanto, é possível concluir que o biofilme formado apresenta concentração de saturação para cromo de no mínimo 0,002 mg/g de biossorvente. Sendo assim, seria necessário a realização de testes adicionais com maiores concentrações iniciais de cromo em solução ou com a mesma concentração inicial e com maior duração, para determinar tal concentração de saturação em fase sólida.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Analisando os resultados obtidos das medições e dos posteriores cálculos de eficiência do método, pode-se concluir que o método de remoção de água de poço através do uso de biofilme é promissor, pois obteve-se diminuições relevantes na concentração de cromo da solução inicial, de até 95%, mesmo partindo de valores 48% maiores que os casos extremos da realidade do problema estudado. Além disso, buscou-se enfrentar um problema crucial: conseguir uma remoção de cromo mesmo partindo de concentrações tão baixas. A preocupação aqui era se o biofilme da coluna conseguia entrar em contato com o metal, mesmo que houvesse uma quantidade muito reduzida dele na solução. Apesar dessa preocupação, concluiu-se que a utilização de gotejamento, que proporciona vazões baixas, é capaz de garantir um contato eficiente entre o biofilme e o cromo em solução, causando a adsorção da maior parte do metal.

É importante apontar também que a solução de substratos proposta, com utilização de etanol como fonte de carbono, conseguiu selecionar bactérias capazes de gerar biofilme e adsorver cromo, a partir de uma fonte inicial de bactérias sem especificação. No entanto, não foi possível analisar a efetividade desse substrato na renovação dos sítios de adsorção por meio do crescimento contínuo de bactérias durante o processo de biossorção da água de poço, uma vez que o experimento não atingiu saturação na fase sólida e não foi possível realizar um experimento sem a utilização de etanol para encontrar os limites de saturação da coluna sem regeneração.

No geral, o experimento realizado com métodos simples e baratos mostrou-se promissor, com uma média de remoção de 66% do cromo dissolvido na água de poço. Assim, a solução formulada e sustentada pelos embasamentos teóricos apresentados no tópico 2 mostrou-se adequada ao problema apresentado.

Entretanto, ao longo do experimento, pode-se constatar a necessidade de estudos mais aprofundados em alguns tópicos, além de melhorias de processo para o próprio arranjo realizado:

- O limite de saturação dos sítios ativos da coluna deve ser determinado a partir do acompanhamento do acúmulo de cromo na fase sólida até sua estabilização. É importante, aqui, que esse experimento seja realizado sem a renovação dos sítios de adsorção, ou seja, sem a alimentação de substrato no sistema;

- Análise da influência da alimentação contínua de substrato na renovação dos sítios de adsorção na coluna, buscando evitar atingir sua saturação, ou prorrogá-la;
- Avaliação da influência de diferentes vazões de processo sobre a adsorção do cromo, buscando encontrar um ponto ótimo, onde o metal seria adsorvido a ponto de atender os limites de potabilidade enquanto uma maior quantidade de água é descontaminada;
- Garantia de um crescimento uniforme de biofilme inicial na coluna, a fim de evitar a grande influência causada pelo caminho percorrido sobre a quantidade de cromo adsorvido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, Z., Ahmad, V.U., Zahid, M., Tareen, R.B., 1998. Benzoic acid derivatives from Stocksia brahuica. *Phytochemistry*. 48, 1271–1273. doi:10.1016/S0031-9422(98)00124-1.

Annu. Rev. Microbiol. 2002.56:187-209. Downloaded from www.annualreviews.org Access provided by 189.125.94.196 on 04/01/20

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 29, de 1º de junho de 2012. Acesso em: 07 de Novembro de 2018. Disponível em: <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatórios/e2f34-Rdc-29.pdf>.

Aryal M. A comprehensive study on the bacterial biosorption of heavy metals: materials, performances, mechanisms, and mathematical modellings (2019)

Aryal M, Liakopoulou-Kyriakides M. Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. (2015)

Baltazar MPG, Gracioso LH, Avanzib IR, Karolski B, Tenório JA, Augusto SC, Nascimento O, Perpetuo E., 2018. Copper biosorption by Rhodococcus erythropolis isolated from the Sossego Mine-PA-Brazil. 8: 475–483.

Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007; 68 (3): 605-12.

Cheng G, Zhang Z, Chen S, Bryers JD, Jiang S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials*. 2007; 28 (29): 4192-9.

Costa M, Klein C.B. 2006. Toxicity and Carcinogenicity of Chromium Compounds in Humans, *Critical Reviews in Toxicology*, 36:2, 155-163, DOI:10.1080/10408440500534032.

Fernandes M.L.M. Efeito do etanol no crescimento das bactérias lácticas. Universidade Técnica de Lisboa, IST 1989;

Kasnowski, M. C.; Mantilla, S. P. S.; Oliveira, L. A. T.; Franco, R. M. 2010. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 8, n. 15, p. 1.

Korber DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, Costerton JW. 1995. Growth of microorganisms on surfaces. In *Microbial Biofilms*, ed. HM Lappin-Scott, JW Costerton, pp. 15–45. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.

McLean RJC, Beveridge TJ., 1990. Metal binding capacity of bacterial surfaces and their ability to form mineralized aggregates. 185–222.

Monroe D. 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 5(11): e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307

Nikolaev YA, Plakunov VK. Biofilm - “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya*. 2007; 76 (2): 149-63.

Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2010; 69(3):277-84.

O’Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol*. 30:295–304

Prosser BL, Taylor D, Dix BA, Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* . 1987; 31 (10): 1502-6.

Sun H, Brocato J, Costa M. 2015. Oral Chromium Exposure and Toxicity. *Curr Envir Health Rpt* (2015) 2:295–303, DOI 10.1007/s40572-015-0054-z.

Trachoo N. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J Sci and Technol*. 2003; 25 (6): 807-15.

Vidal DR, Ragot C, Thibault F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Ann Pharm Fr*. 1997; 55 (2): 49–54.

Volesky B., 1990. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. In: Volesky B, editor. *Biosorption of heavy metals*: 7–43.

Walker, J. T., C. W. Mackerness, D. Mallon, T. Makin, T. Willierts and C. W. Keevil (1995). “Control of Legionella-Pneumophila in a Hospital Water-System by Chlorine Dioxide.” *Journal of Industrial Microbiology* 15(4): 384-390.

Wingender J, Neu TR, Flemming H-C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, ed. J Wingender, TR Neu, H-C Fleming, pp. 93–112. Berlin: Springer

Xavier J.B., Picioreanu C., Almeida J.S., Van Loosdrecht M.C.M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. Boletim de Biotecnologia, 2005.

Yee N, Fein J., 2001. Cd-adsorption onto bacterial surfaces: a universal adsorption edge? 65: 2037–2042.

Zhitkovich A, 2011. Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. 1617–1629.