



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0702638-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0702638-2

(22) Data do Depósito: 03/04/2007

(43) Data da Publicação do Pedido: 17/03/2009

(51) Classificação Internacional: C02F 1/62; C02F 101/10

(54) Título: PROCESSO PARA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS DE LÍQUIDOS CONTAMINADOS.

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, Diretor(a), CGC/CPF: 88648761000103.  
Endereço: Rua Francisco G. Vargas, 1130, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil (BR/RS), CEP: 95020972.

(72) Inventor: ALDO JOSÉ PINHEIRO DILLON; JOHNNY FERRAZ DIAS; MARIA LÚCIA YONEAMA; STELA MARIS DA SILVA; LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/04/2007, observadas as condições legais.

Expedida em: 2 de Junho de 2015.

Assinado digitalmente por:

**Júlio César Castelo Branco Reis Moreira**  
Diretor de Patentes



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

PROCESSO DE ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS PRESENTES EM LÍQUIDOS ATRAVÉS  
DA UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *PLEUROTUS*.

### 5 **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção é relacionada a processos de cultivo de fungos e a processos de remediação ambiental. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um processo para remoção de metais pesados, como cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, de líquidos e/ou de águas  
10 contaminadas.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

#### 1. O fungo

Acredita-se hoje que existam cerca de 200.000 espécies diferentes de  
15 fungos, distribuídos na natureza. A grande importância dos fungos na natureza é o papel de decompositor. Eles crescem sobre a matéria orgânica, restos de vegetais e animais, assimilando-os e, transformando-os em substâncias mais simples para serem absorvidos pelos vegetais, permitindo assim, a reciclagem dos elementos da natureza. É um trabalho que nos passa despercebido, mas  
20 sem ele a recirculação dos elementos da natureza estaria prejudicada, dificultando todas as outras formas de vida. Os fungos são classificados em vários grupos de acordo com uma série de características e o nosso cogumelo faz parte dos basidiomicetos, que é um grupo onde se enquadra a maioria dos cogumelos comestíveis. Os ascomicetos também possuem exemplares que  
25 são cultivados e consumidos como alimento, em outros países. Mas no Brasil são cultivados apenas os basidiomicetos. Um bom exemplo de basidiomiceto é o champignon (*Agaricus bisporus*).

No gênero *Pleurotus* são encontradas várias espécies comestíveis, entre elas o *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmo-narius*, *Pleurotus sarjor-caju*,  
30 *Pleurotus eous* e *Pleurotus cornucopiae*. A cor do píleo ou chapéu difere para cada uma dessas espécies, assim como a temperatura de frutificação, necessidades nutricionais, tempo de incubação, etc. A maioria das espécies e linhagens utilizadas para o cultivo no Brasil foi introduzida da Europa e da Ásia.

O cultivo do *Pleurotus* é basicamente o mesmo para todas as linhagens, com exceção das temperaturas de frutificação.

## 2. Efluentes e formas de tratamento dos mesmos

5 Anos atrás os poucos efluentes produzidos eram simplesmente jogados nos cursos d'água onde se processava a depuração por vias naturais: um grande volume de água limpa e oxigenada diluía a pouca carga de esgotos e resíduos industriais e os microrganismos existentes no curso de água, se encarregavam da degradação oxidativa deste alimento inesperado, retirando pouco oxigênio da água (O<sub>2</sub>), sem interferir com a vida aquática. Com o aumento da população e da atividade industrial, maiores volumes de efluentes e esgotos foram gerados, obrigando a coletividade e as indústrias a construir plantas de tratamento da água poluída para evitar mortandade de peixes, mau cheiro, epidemias e outros problemas. Na natureza, os compostos orgânicos tóxicos podem ser degradados a CO<sub>2</sub>, água e sais por meios biológicos e 10 químicos. No entanto, metais são permanentes e o meio de diminuir sua toxicidade é pela mudança de seus estados químicos ou físicos por meio de reações de oxidação/redução, solubilização, precipitação, entre outros.

Uma das técnicas promissoras para remoção de metais é a que utiliza organismos vivos ou não-vivos e seus derivados. Uma ampla variedade de 20 microrganismos é capaz de seqüestrar mesmo até altas concentrações íons metálicos de soluções aquosas. Certos tipos de biomassa podem reter quantidades relativamente altas de metais por meio de processos passivos como biosorção, os quais são dependentes da afinidade entre as espécies metálicas ou suas formas iônicas e os sítios de ligação da estrutura molecular das paredes das células. O processo é relativamente rápido e o fato de que é 25 um fenômeno de superfície facilita a remoção do metal e o subseqüente uso do material como biosorbente, podendo a operação ser realizada mesmo quando a célula se encontra metabolicamente inativa ou morta. Em anos recentes, pesquisas sobre a acumulação de metal por microrganismos têm recebido 30 atenção especial, principalmente por sua aplicação potencial na detoxificação e recuperação de resíduos industriais. A bioabsorção de metais pesados como Cu, Zn, Cd, Pb, Fe, Ag, Ni, Th, Ra e U, por biomassa microbiana tem sido observada em várias espécies de microrganismos, incluindo fungos

filamentosos como *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, algas como *Chlorella vulgaris* e bactérias como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em alguns estudos, foi empregada biomassa com e sem pré-tratamento químico com NaOH e

5 constatou-se que o pré-tratamento físico ou químico da biomassa tem efeitos positivos na capacidade de biosorção de metais. Este efeito pode ser devido a uma troca de permeabilidade na parede celular, no caso de bioacumulação. Isto pode ocorrer devido ao aumento da disponibilidade de sítios de ligação ou a remoção de polissacarídeos que bloqueiam o acesso a estes sítios de

10 ligação. Como o processo de biosorção ocorre rapidamente, pode se dizer que este é um fenômeno de superfície.

A geração de resíduos sólidos e líquidos ricos em vários metais com alto valor econômico agregado, mas ainda potencialmente poluentes, é comum a um grande número de indústrias, como as de mineração, produção de papel e

15 refino de petróleo, entre outras. Desenvolvimento de processos ambientalmente adequados para o tratamento e disposição dos resíduos provenientes de várias indústrias e minimização de sua geração fazem parte dos esforços mundiais que visam o tratamento de resíduos industriais. Os metais pesados como chumbo, cobre, cádmio, zinco e níquel estão entre os

20 poluentes mais comuns encontrados em efluentes industriais e podem ser tóxicos, carcinogênicos ou mutagênicos, mesmo em baixas concentrações. Espécies metálicas mobilizadas e liberadas no ambiente por atividades tecnológicas tendem a persistir indefinidamente, circulando e eventualmente acumulando através da cadeia alimentar, causando sérios problemas para o

25 ambiente, animais e humanos. Deste modo, um metal somente é "removido" de uma solução quando está apropriadamente imobilizado. Além dos lentos processos naturais de mineralização, a remoção é efetivamente obtida somente quando o metal se torna concentrado de tal modo que possa ser reprocessado, reutilizado. Em casos específicos, como no caso da presença de

30 cromo em resíduos líquidos, os diversos processos físicos e químicos existentes e que estão disponíveis para remoção de cromo não são efetivos para presença de  $\text{Cr}^{+6}$  em concentrações menores do que 100mg/L e apresentam um custo proibitivo.

Fungos apresentam a habilidade de acumular metais mesmo quando estes se encontram externamente em baixas concentrações. A capacidade de bioabsorção de íons de metais pela biomassa fúngica está diretamente relacionada ao número de grupos presentes na parede fúngica (carbonil, amina, hidroxil, fosfato) capazes de ligar-se aos íons metálicos e a densidade da biomassa. A eficiência da translocação de metais para o corpo de frutificação do fungo depende da espécie de fungo envolvida, solubilidade do metal, e condições ambientais como pH, temperatura, aeração e inibidores metabólicos. Os fungos filamentosos parecem ser os mais adequados para estes propósitos do que os demais microrganismos, pela sua alta tolerância a metais, capacidade de união à parede celular e absorção intracelular do metal. Fungos podem acumular metal por mecanismos físico-químicos e biológicos, incluindo ligação extracelular por metabólitos e polímeros. A bioacumulação pelos fungos é bastante efetiva quando comparada com a observada em resinas comerciais de trocas iônicas, carbono ativado e óxidos de metais.

O desenvolvimento de estudos envolvendo o crescimento do fungo *P. sajor-caju* e sua capacidade de absorção de metais é de grande relevância, na medida em que este encontram-se presentes em distintos resíduos industriais e têm efeitos inibitórios no crescimento de muitos organismos utilizados em tratamentos de descontaminação. Além disso, *P. sajor-caju* apresenta a característica de acumular íons de metais, mesmo em baixas concentrações externas e sem apresentar toxicidade para o microrganismo. Existem várias pesquisas documentando a habilidade dos fungos da podridão branca como os do gênero *Pleurotus* spp, de remediar solos contaminados e de degradarem corantes presentes em efluentes industriais. (Lamida, Hélio *et al.* 2005). No entanto, não foram encontrados relatos da aplicação de fungos para fins de absorção de metais presentes em efluentes.

Na literatura patentária pode-se citar a patente US 6,350,605, que relata o uso de microbiota simbiótica (bactérias e algas) da água com capacidade de capturar metais pesados, particularmente o manganês sólido, além da competência de oxidar o manganês dissolvido, precipitando-o. Desta maneira, poder-se-ia remover este metal pesado da água para sua reciclagem e seu uso em esmaltes, células secas, ferro e óculos. A presente invenção difere da

referida patente porque a presente invenção mostra um processo para remoção de cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo de efluentes líquidos ou de águas contaminadas a partir da biomassa do fungo *Pleurotus sajor-caju*, e não a partir de bactérias e algas.

5 A patente US 5,789,204 relata um método para extrair poliaminosacarídeos da biomassa microbial de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* ou *Micrococcus* originados de fermentações industriais e plantas tratadas biologicamente. Os poliaminosacarídeos são utilizados como matéria-  
prima para a bioabsorção de metais pesados. Íons fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) de  
10 poliaminosacarídeos da biomassa microbiana são convertidos em fosfato de sódio, após a reação com NaOH ou  $\text{NaHCO}_3$ . Esta conversão em fosfato de sódio contribui pra a bioabsorção de metais pesados na combinação de radicais amina em polímeros para formar os sítios de ligação para os metais pesados. O mecanismo de bioabsorção envolve adsorção, troca iônica, co-  
15 ordenação e ligação covalente. Certos ingredientes na parede celular de microrganismos estão envolvidos na bioabsorção, como a quitina e o complexo glucana da biomassa microbiana. A presente invenção difere da referida patente porque diz respeito a um processo para remoção de metais pesados de efluentes líquidos ou de águas contaminadas a partir da biomassa do fungo  
20 *Pleurotus sajor-caju*, e não de polissacarídeos extraídos do mesmo.

A patente US 6,204,049 descreve a despoluição do meio-ambiente mediada pelo fungo *Marasmiellus troyanus* que degrada compostos orgânicos. O *Marasmiellus troyanus* apresenta a capacidade de degradar e mineralizar os poluentes químicos, como o benzopireno. Diferentemente da referida patente, a  
25 presente invenção relata um processo para remoção não de compostos orgânicos, mas sim de metais pesados como o cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, de efluentes líquidos ou de águas contaminadas a partir da biomassa do fungo *Pleurotus sajor-caju*.

A patente US 5,876,484 relata um processo de remover íons metais de  
30 soluções aquosas através de raízes da plantas terrestres. Estas plantas terrestres crescem em receptáculos que dispõem uma relação de ar e solução contendo metal e nutrientes, permitindo que a raiz da planta terrestre penetre na solução e remova os metais. A finalidade da referida patente, como a da

presente invenção, é o tratamento de água para remover metais tóxicos, contribuindo para a despoluição do meio-ambiente. Porém a presente invenção mostra a remoção de metais pesados de efluentes líquidos ou de águas contaminadas a partir da biomassa do fungo *Pleurotus sajor-caju*, que não é  
5 uma planta terrestre, mas sim um fungo.

A patente EP 00614691 reivindica o tratamento de efluentes industriais ou domiciliares através da neutralização de gases ácidos pelo contato de metais alcalinos nos reatores; da condensação e absorção de metais pesados através de gasodutos; da separação por filtração de partículas sólidas. A  
10 presente invenção relata um método orgânico e não químico para remover metais pesados de efluentes líquidos ou de águas contaminadas através do uso de biomassa do fungo *Pleurotus sajor-caju*.

A patente US 4,021,368 descreve que a biomassa do micélio de microrganismo, particularmente de fungos filamentosos como *Penicillium* ou  
15 *Aspergillus*, é usada para a retenção de íons metálicos de soluções, como o urânio e o rádio, através do enrijecimento pela adição de componentes polimerizáveis e formando um produto granulado e insolúvel em água. Este é empregado na absorção/adsorção cíclica e repetitiva, processando íons de metais pesados, como chumbo, urânio e rádio através do contato. Embora a  
20 presente invenção utilize também micélios de fungos para a remoção de metais pesados, a presente invenção difere do referido documento do estado da técnica por: a) remover um espectro diferente de metais pesados, incluindo zinco, alumínio, cromo, ferro e cobre; b) utilizar uma biomassa viva e solúvel em água do fungo *Pleurotus sajor-caju*; e c) não utilizar nenhum agente para  
25 promover a polimerização.

A patente US 5,047,332 relata um processo de produção de alimentos e combustível a partir de biomassa de fungos. Frações de carboidrato da biomassa são convertidas em alimentos ricos em proteínas ou em combustível líquido como o etanol. Ainda, as frações de lignina podem ser convertidas em  
30 adesivos, todos os processos são econômicos e não-poluentes. Entre os microrganismos da biomassa, há o *Pleurotus sajor-caju*. Este junto ao *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. é usado na conversão de lignocelulose da biomassa em alimentos ricos em proteínas para animais e humanos. Apesar de

a presente invenção empregar biomassa do fungo *Pleurotus sajor-caju*, a finalidade do uso é diferente da patente relatada.

O pedido de patente WO 9615659 revela um processo para a produção de inóculo de cogumelos baseado em fermentação submersa para o crescimento de micélio do fungo. Este documento se restringe a relatar a produção de níveis elevados de biomassa de micélios em meio líquido, tal processo sendo apropriado para a produção semi-contínua ou contínua. Além disso, é também descrito o uso de microcápsulas para realçar o processo de fermentação e o equipamento conduzir tal processo.

A patente US 6,372,964 descreve variedades hortícolas novas e distintas de cogumelos *Basidiomycetes* mais elevados crescidos em cultura submersa. Especificamente, as variedades novas das espécies do gênero *Pleurotus* oferecem rendimentos superiores a células de biomassa de cogumelos e altas concentrações de proteína rica em aminoácidos essenciais, ácidos graxos, vitaminas e em minerais.

A patente US 4,852,297 descreve métodos e sistemas para a produção de cogumelos, usando recipientes que abrigam os micélios e os substratos nutritivos reidratados e cercados por tecido absorvente. O método consiste em encher o recipiente com substrato, adicionando um volume apropriado de água através de um furo no recipiente, e cobrindo o furo com uma membrana adesiva, esterilizando depois o conteúdo e o recipiente. Depois disso, refrigera o sistema e o fungo é inoculado ao sistema e incubado em temperatura adequada durante um período de tempo.

A patente US 4,977,702 descreve um método para produção de cogumelos cosmestíveis, particularmente *Pleurotus* ou *Volvaria*, onde o inóculo ou micélio estão na suspensão líquida e o substrato é embalado antes da pasteurização. O substrato é contido em um saco plástico especialmente adaptado para ser seguro durante as etapas de pasteurização e inoculação. A inoculação pode ser feita, pela injeção do inóculo na suspensão através do saco plástico.

Até o momento não foram encontrados relatos sobre a utilização de fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus* na remoção de metais pesados como Cu, Fe, Al, Zn e Cr de águas contaminadas. Os processos de cultivo submerso



de fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus* conhecidos na técnica são distintos do revelado na presente invenção, pois não ocorrem na presença de metais pesados.

## 5 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

É um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo de remoção de metais pesados de líquidos contaminados através da bioadsorção. Preferencialmente, os metais pesados removidos são escolhidos do grupo que compreende Cu, Fe, Al, Zn, Cr e combinações dos mesmos.

10 É um adicional objeto da presente invenção proporcionar um processo de remoção de metais pesados compreendendo as etapas de:

a) adicionar, a um reator aerado e sob agitação, uma quantidade de fungo do gênero *Pleurotus* e uma quantidade de líquido contaminado, onde a proporção fungo:líquido contaminado varia de 0,5:1 a 1,5:1.

15 b) deixar o fungo em contato com o líquido o tempo necessário para que ocorra a bioadsorção; e

c) separar a massa fúngica do líquido contaminado, preferencialmente por filtração.

20 É um adicional objeto da presente invenção proporcionar um processo de remoção de metais pesados compreendendo adicionalmente uma etapa onde há:

d) adição do líquido filtrado oriundo da etapa c) a um sistema de todo ativado.

25 É adicionalmente um objeto da presente invenção proporcionar um processo para remoção de metais pesados de líquidos e/ou águas contaminadas a partir da bioadsorção dos mesmos na biomassa de fungos do gênero *Pleurotus*, preferencialmente o fungo *Pleurotus sajor-caju*.

30 É um adicional objeto da presente invenção proporcionar um processo de remoção de metais pesados onde a quantidade de fungo adicionada na etapa a) contém uma proporção de fungos oriundos de ciclos anteriores, proporcionando assim uma reciclagem do fungo e melhor aproveitamento. Preferencialmente, a proporção de fungo reciclado varia entre 0% a 100% p/p de massa de fungo total.

Estes e outros objetos da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção e de seus exemplos, que têm como objetivo apenas ilustrar um dos inúmeros meios de se realizar a invenção, não limitando portanto seu escopo.

5

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 mostra um gráfico expressando a massa micelial de *Pleurotus sajor-caju*, em cultivo líquido, com meios contendo sais metálicos, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. Os tratamentos com a mesma letra no dia de crescimento não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

A Figura 2 mostra um gráfico expressando a absorção de zinco pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, com 14 e 21 dias de desenvolvimento.

A Figura 3 mostra um gráfico expressando absorção de ferro pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, com 14 e 21 dias de desenvolvimento.

A Figura 4 mostra um gráfico expressando a absorção de alumínio pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, com 14 e 21 dias de desenvolvimento.

20

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A aplicação de fungos para fins de absorção de metais presentes em líquidos, efluentes e/ou águas contaminadas envolve a inoculação, no local contaminado, de uma suspensão contendo uma linhagem selecionada, seguida pela adição de nutrientes (se necessário) e aeração para fornecer condições ótimas de crescimento fúngico. A mistura poderá ser realizada 'in situ' pela colocação do inóculo no local contaminado. Como resultado da atividade fúngica, os componentes tóxicos são absorvidos/adsorvidos e se tornarão biologicamente inativos, não apresentando problemas de toxicidade.

30 Exemplo 1: Processo de produção e cultivo do fungo

Para o desenvolvimento do processo de produção descrito nesta concretização preferencial da invenção, foi utilizado o fungo da Linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju*. O referido fungo parece ser originário da Índia e

foi introduzido no Brasil há algumas décadas, sendo atualmente conhecido e amplamente disponível em diversas coleções de cultura no mundo. Não houve, portanto, acesso a material biológico ou recursos genéticos, nos termos do disposto no art. 31 da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, originária da Medida Provisória nº 2.052, de 29 de junho de 2000, e, ainda, o disposto na Resolução No. 23, de 10 de novembro de 2006, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN. Além disso, qualquer outra linhagem de fungos do gênero *Pleurotus*, em especial a espécie *Pleurotus sajor-caju* pode ser utilizada, como aquelas disponíveis em diversas coleções de cultura no mundo. O meio de manutenção da linhagem fúngica foi formulado com 2% (p/v) de serragem de *Pinus* spp e 2% (p/v) de farelo de trigo moídos e intumescidos em água destilada, 0,2% (p/v) de carbonato de cálcio e 2% (p/v) de ágar-ágar. Posteriormente o meio foi autoclavado a 120°C e 1 atm, por 30 minutos. Os cultivos das linhagens foram desenvolvidos em tubos inclinados contendo o meio de manutenção, a 25°C, durante 14 dias, e para armazenamento da linhagem foram guardados a 4°C e transferidos a cada 6 meses.

Exemplo 2: Produção de micélio em cultivo líquido

O processo de cultivo de micélio em meio líquido preferencialmente compreende as etapas de:

a) cultivar uma pequena quantidade dos fungos em uma placa de Petri contendo meio de cultura adequado. O meio de manutenção é indicado visto a sua economicidade, pois contém: 2% (p/v) de serragem de *Pinus* spp e 2% (p/v) de farelo de trigo moídos e intumescidos em água destilada, 0,2% (p/v) de carbonato de cálcio e 2% (p/v) de ágar-ágar;

b) deixar o fungo crescer até que ocorra a ocupação completa da placa (7- 8 dias). Antes da aplicação do fungo em meio líquido, devem ser feitos inóculos do mesmo com a utilização de colônias de oito dias desenvolvidas em placas de Petri contendo o meio de manutenção, iniciadas a partir de um disco de ágar colonizado de 8 mm de diâmetro e disposto no centro da placa;

c) inocular uma pequena quantidade do fungo obtido na etapa b) em um meio líquido contendo meio de cultura adequado e manter sob agitação;

Para a produção de micélio em cultivo líquido foi utilizado o meio MCL, baseado em Mandels & Reese (1957), contendo 1% de glicose. A solução 10 vezes concentrada consistiu da seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14; uréia, 3; MgSO<sub>4</sub>, 3; CaCl<sub>2</sub>, 4; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05; MnSO<sub>4</sub>, 5 0,0156; ZnSO<sub>4</sub>, 0,014; CoCl<sub>2</sub>, 0,02.

O meio utilizado para o cultivo líquido após autoclavagem foi inoculado pela disposição de um disco de 1,5 cm de diâmetro, retirado com um cilindro de vidro, a partir da extremidade de placas preparadas para inóculo.

Para o cultivo líquido na presença de metais foram utilizados frascos 10 Erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL do meio MCL.

Como inóculo, foi usada uma suspensão de 1-5mL de massa do fungo (micélio crescido na superfície de uma placa de Petri da etapa b) contendo o meio de manutenção. Este foi desprendido da superfície da placa por raspagem com alça de platina e ressuspenso em 5mL de água destilada e 15 esterilizada. Os frascos foram mantidos a 28°C em agitação orbital (180rpm).

#### Exemplo 3: Realização de estudos de absorção de metais

Para estudos da absorção dos metais pelo micélio fúngico crescido em meio líquido foram realizadas análises da massa micelial seca, obtida dos frascos no 7º, 14º e 21º dias de desenvolvimento, sendo utilizados um total de 20 6 frascos para cada tempo de desenvolvimento. As soluções concentradas de metais utilizadas para as adições nos frascos contendo 100 mL de meio de cultivo líquido, foram constituídas de sulfato cúprico, sulfato de zinco, sulfato ferroso e sulfato de alumínio. A concentração final foi de 30mg/100ml e cada uma delas correspondeu a um tratamento que foi adicionado ao meio de 25 cultivo líquido, imediatamente após a realização do inóculo.

Para a determinação da massa seca em cultivos líquidos, a massa micelial dos frascos foi separada por filtração e lavada com água destilada. Após lavagem, foi secada em estufa a 70°C, até o peso manter-se constante. Posteriormente para a quantificação de metais presentes no micélio obtido dos 30 cultivos líquidos nos quais houve adição dos distintos metais, as amostras secas coletadas foram submetidas à análise por PIXE (Particle-Induced X-Ray Emission).

#### Exemplo 4: Realização da análise por PIXE

Para a realização da análise por PIXE, as massas miceliais secas coletadas das sextuplicatas, obtidas nos 7º, 14º e 21º dias de desenvolvimento, foram misturadas de acordo com os respectivos tratamentos. Posteriormente, foram maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e encaminhadas à análise por PIXE. A técnica PIXE foi utilizada para a determinação das concentrações elementares e é baseada na emissão de raios-X característicos dos elementos presentes em uma amostra quando esta é irradiada por feixes de íons carregados (prótons, partículas alfa), sendo eficiente para análises que envolvam determinação de elementos-traço (Yoneama & Dias, 2002). A técnica requer que íons acelerados penetrem no material a ser estudado. Na presente invenção as amostras foram analisadas em um acelerador Tandetron.

Para realização da análise, é necessário que as amostras estejam preparadas de maneira adequada, isto é, devem ser preferencialmente sólidas, homogêneas e sem rugosidades. As amostras devidamente secas e homogeneizadas na maceração com hidrogênio líquido preferencialmente contêm 1g do material a ser analisado. O produto resultante da maceração é prensado e transformado em finas pastilhas que são levadas ao acelerador Tandetron para a análise. A análise quantitativa dos espectros de raios-X característicos das amostras foi realizada pelo programa GUPIX (Maxwell, 1995 apud Yoneama & Dias, 2002), desenvolvido na Universidade de Guelph, Canadá, e permite a inclusão de elementos invisíveis e complexos que podem ser independentes ou estar estequiometricamente relacionados com elementos cujos raios-X são visíveis no espectro. O programa GUPIX leva em conta um amplo banco de dados que inclui todas as quantidades físicas relevantes, assim como os processos e efeitos envolvidos nessa técnica, sendo as concentrações obtidas, expressas em partes por milhão (ppm).

Para a realização dos gráficos relativos ao conteúdo de metais absorvido, empregou-se o programa GraphPadPrism versão 3.00 da GraphPad Software Incorporation. Conforme os dados apresentados na Figura 1, pode-se constatar que em uma etapa inicial de desenvolvimento correspondente aos 7 dias de cultivo, os sais sulfato cúprico e sulfato de alumínio promoveram um acentuado desenvolvimento micelial, em

comparação ao controle e aos meios onde os demais metais foram adicionados.

Posteriormente, foram realizados ensaios com sulfato de cromo, sulfato de níquel, todos os sais associados em concentrações de 30mg/100ml de meio, denominada "Todos" e uma concentração duas vezes maior do que a testada inicialmente, utilizando todos os sais associados, totalizando 60mg/100ml de meio, denominada SC2. Os resultados dos ensaios realizados em meios de cultivo líquido, aos quais foram adicionados zinco na forma de sulfato de zinco na quantidade de 30mg/100mL de meio, estão representados na Figura 2. Os testes empregando PIXE determinaram que o micélio sem a adição de zinco (controle) apresenta uma pequena quantidade deste elemento correspondendo a 0,0981mg/g, sendo que o fungo apresentou capacidade de assimilar valores de até 29,141mg/g, que correspondem a um aumento na quantidade de zinco presente - 297 vezes superior às quantidades normalmente encontradas no micélio. Os meios de cultivo que tiveram 21 dias de desenvolvimento apresentaram uma capacidade de absorção de zinco de 5,734 mg/g, o que representa uma significativa diminuição na capacidade de absorção deste metal quando comparadas com os de 14 dias de desenvolvimento. Este fato pode indicar uma possível lise celular em etapas mais tardias de desenvolvimento fúngico (após 14º dia de cultivo), com uma consequente liberação do metal previamente assimilado no meio de cultivo.

A figura 3 mostra a assimilação de ferro pela massa micelial de *P. sajor-caju* em cultivo líquido. Os dados obtidos indicam que o ferro apresentou maior toxicidade e/ou menor afinidade química entre a membrana fúngica e o íon metálico, indicada pela menor capacidade de absorção do mesmo quando comparada aos valores obtidos nos meios onde foi adicionado zinco (Figura 2) e alumínio (Figura 4). O ferro já existente no fungo em condições normais corresponde a 0,127mg/g, sendo que nos 14 dias iniciais de desenvolvimento o fungo conseguiu assimilar 2,275mg/g, valor este que corresponde a um aumento de 17 vezes a quantidade normal deste metal presente no fungo. Após 21 dias de desenvolvimento houve um aumento na capacidade de absorção do ferro pelo fungo, chegando este a um patamar de 2,773 mg/g de assimilação, o que indica um aumento superior a 21 vezes na quantidade de

ferro presente no micélio, quando comparada àquelas encontradas no fungo em condições normais de crescimento.

A assimilação de alumínio pela massa micelial de *P. sajor-caju* está representada na Figura 4. O alumínio presente no fungo em condições normais corresponde a 0,2011mg/g, sendo que o fungo conseguiu assimilar 7,969 mg/g do metal, em um período de 14 dias de cultivo. Estes dados indicam um aumento superior a 39 vezes na quantidade de alumínio presente no fungo, quando comparados aos valores normalmente encontrados no microrganismo. Ao atingir o 21º dia de desenvolvimento os valores de alumínio assimilados pelo fungo foram incrementados, chegando a 18,63 mg, o que corresponde a 92 vezes a quantidade de alumínio normalmente encontrada no fungo.

Em nenhuma das condições testadas, os metais e as concentrações empregadas foram letais ao fungo *P. sajor-caju*. Ao contrário, este se mostrou altamente capacitado para assimilar metais nas condições testadas, o que favorece seu uso em processos de biorremediação que envolvam remoção e recuperação de metais em efluentes contaminados por estes elementos.

#### Exemplo 5: Processo de remoção de metais pesados

O processo para remoção de metais pesados (cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo) de líquidos, efluentes e/ou águas contaminadas da presente concretização preferencial compreende as etapas de:

a) adicionar, a um reator aerado e sob agitação, uma quantidade de suspensão do fungo o do gênero *Pleurotus* e uma quantidade de líquido compreendendo metais pesados, onde a proporção fungo:líquido contaminado varia de 0,5:1 a 1,5:1.

A primeira etapa consiste na atividade microbiana em reator aerado e agitado contendo 50% de seu volume com biomassa do fungo do gênero *Pleurotus sp.*, preferencialmente o *Pleurotus sajor-caju* PS2001, e 50 % de efluentes líquidos. No reator o fungo é disposto em meio líquido (MCL) para permitir crescimento na presença de cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo.

b) deixar o fungo em contato com o líquido o tempo necessário para que ocorra a bioadsorção. Durante o tempo de residência (7, 14, 21 dias de acordo

com o metal) ocorre a retirada dos metais do líquido por absorção pela massa fúngica;

c) filtração da massa fúngica do líquido contaminado.

5 Em uma realização alternativa da invenção, a quantidade de fungo adicionada na etapa a) contém uma proporção de fungos oriundos de ciclos anteriores, proporcionando assim reutilização do fungo e melhor aproveitamento.

A massa fúngica é filtrada e reciclada, retornando ao reator de absorção que é novamente preenchido com nova carga de efluente para um novo ciclo.

10 Em cada ciclo é descartado em torno de 5-50% da massa fungica do reator de absorção de acordo com a concentração de metais no efluente.

Esse processo pode ainda compreender uma etapa adicional que consiste da:

15 d) adição do líquido filtrado oriundo da etapa c) a um sistema de lodo ativado, visando à redução da DQO.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.



### **Reivindicações**

#### PROCESSO DE ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS PRESENTES EM LÍQUIDOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *PLEUROTUS*.

- 5 1. Processo para remoção de metais pesados de líquidos contaminados caracterizado por compreender as seguintes etapas:
- a) adicionar, a um reator aerado e sob agitação, uma quantidade de fungo do gênero *Pleurotus* e uma quantidade de líquido contaminado, onde a proporção fungo: líquido contaminado varia de 0,5:1 a 1,5:1;
  - 10 b) deixar o fungo em contato com o líquido o tempo necessário para que ocorra a bioadsorção; e
  - c) separar da massa fúngica do líquido contaminado.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proporção
- 15 fungo:líquido contaminado ser 1:1.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos metais pesados serem escolhidos do grupo que compreende Cu, Fe, Al, Zn, Cr e/ou combinações dos mesmos.
- 20 4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender uma etapa adicional de adição do líquido filtrado obtido na etapa c) a um sistema de lodo ativado.
- 25 5. Processo, de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela massa fúngica filtrada ser reutilizada na quantidade de fungo do gênero *Pleurotus* da etapa a).
6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela massa fúngica filtrada corresponder até 100% p/p da quantidade de fungo do gênero
- 30 *Pleurotus* da etapa a).

Figura 1

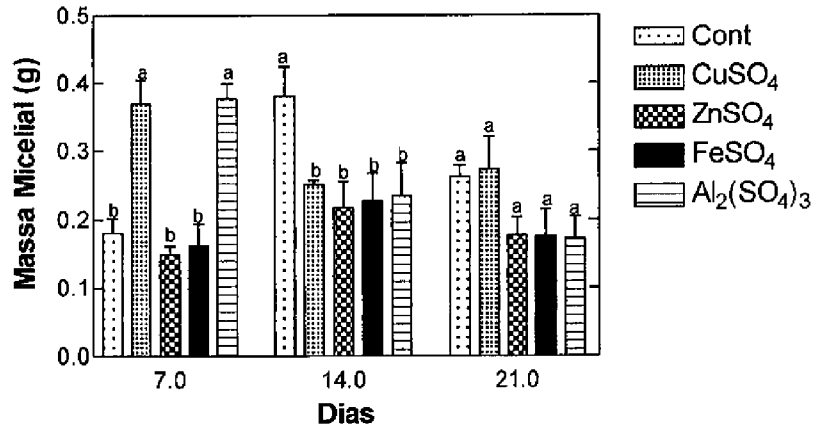


Figura 2

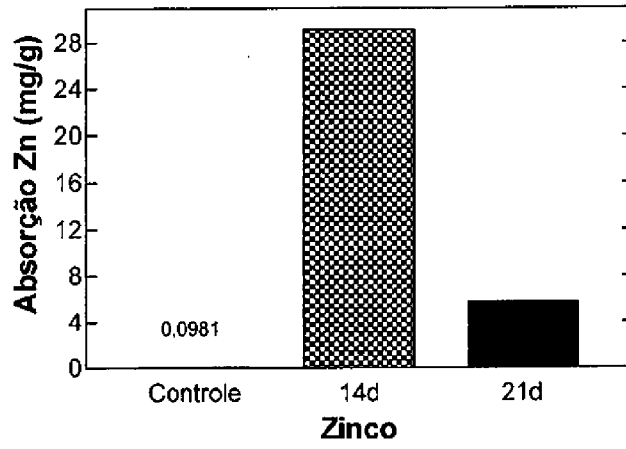


Figura 3

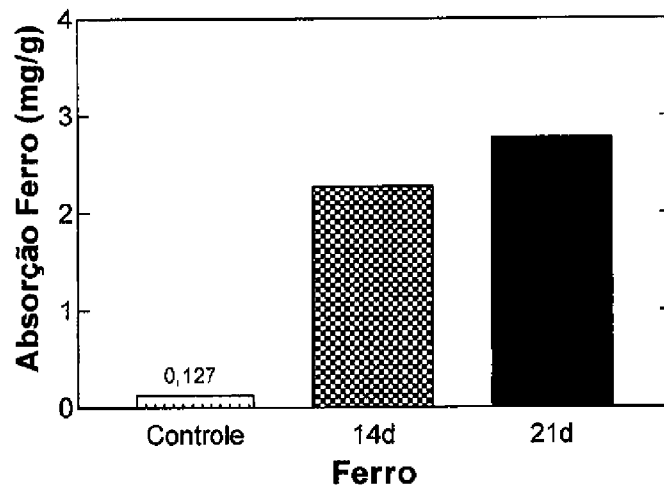
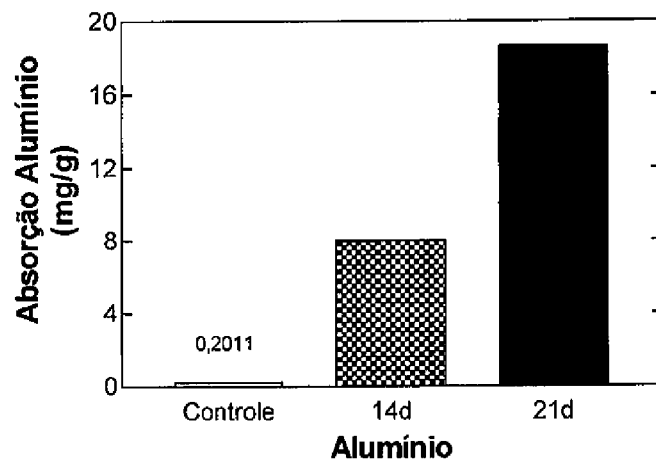


Figura 4



**Resumo****PROCESSO DE ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS PRESENTES EM LÍQUIDOS ATRAVÉS  
DA UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *PLEUROTUS*.**

5           A presente invenção proporciona um processo para remoção de metais  
pesados de líquidos e/ou de águas contaminadas, a partir da utilização de uma  
biomassa composta de fungos do gênero *Pleurotus ssp* para a remoção de  
metais como cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo pela bioadsorção dos  
mesmos. Os metais pesados, como os citados, estão entre os poluentes mais  
10 comuns encontrados em efluentes industriais e podem ser tóxicos,  
carcinogênicos ou mutagênicos, mesmo em baixas concentrações. O processo  
da presente invenção constitui-se em um tratamento biológico alternativo e  
economicamente viável tanto para recuperação do efluente como para  
recuperação de bens metálicos.