



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**SOLUBILIZAÇÃO DO FOSFATO DE ROCHA POR**

*Aspergillus niger*

**GLAICON FLORISBELO ALVES**

**UBERLÂNDIA-MG**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**SOLUBILIZAÇÃO DO FOSFATO DE ROCHA POR**

*Aspergillus niger*

**Glaicon Florisbelo Alves**

**Orientadores: Dra. Vicelma Luiz Cardoso**

**Dr. Fernando Cezar Juliatti**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Engenharia Bioquímica.**

**Uberlândia – MG**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

---

A474s    Alves, Glaicon Florisbello, 1980-  
2012      Solubilização do fosfato de rocha por *Aspergillus niger*  
            / Glaicon Florisbello Alves. - 2012.  
            132 f. : il.

Orientadores: Vicelma Luiz Cardoso e Fernando Cezar Juliatti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.


1. Engenharia química - Teses. 2. Fosfatos - Solubilidade - Teses.  
3. *Aspergillus niger* - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Juliatti,  
Fernando César, 1957- III. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-  
grama de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

---

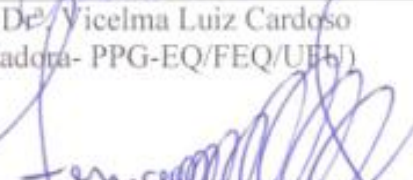
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 01 /10./2012.

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Vicolma Luiz Cardoso  
(Orientadora- PPG-EQ/FEQ/UFU)




---

Prof. Dr. Fernando Cezar Justini  
(Orientador- ICIAG/UFU)




---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Francisca Pessoa de França  
(Escola de Química/UFRJ)



---

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho  
(PPG-EQ/FEQ/UFU)



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Fabiana Regina Xavier Batista  
(PPG-EQ/FEQ/UFU)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela saúde.

À Prof<sup>ª</sup>. Vicelma Luiz Cardoso pela orientação, pela oportunidade concedida e pela confiança.

Ao Prof. Fernando Cezar Juliatti e sua equipe pela orientação e apoio.

Aos meus pais, Aniceto Alves de Sousa e Abadia Aparecida Belo Alves, e minha mulher, Kátia Fabiana da Silva, pelo apoio e ajuda em todos os aspectos.

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Fósforo.....	1
1.2 - Reservas de rochas fosfáticas.....	2
1.3 - Beneficiamento, perdas e impactos ambiental da exploração das rochas fosfáticas...	2
1.4 - Micro-organismos solubilizadores de fosfato insolúvel.....	4
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
2.1 - Fungos .....	7
2.1.1 - Fatores químicos e físicos para desenvolvimento dos fungos.....	8
2.2 - <i>Aspergillus niger</i> .....	9
2.2.1 - Produção de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i> .....	11
2.2.2 - Solubilização de fontes insolúveis de fosfatos por <i>Aspergillus niger</i> .....	14
2.2.2.1 - Mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos.....	14
2.2.2.2 - Estudos em ordem temporal da aplicação de <i>Aspergillus niger</i> e outros fungos na solubilização de rocha e outras fontes de fosfato insolúvel.....	15
2.3 - Minério fosfático.....	20
2.3.1 - Geologia.....	20
2.3.2 - O complexo de mineração de Tapira e o processo de concentração do minério fosfático.....	21
2.3.3 - Solubilização da fluorapatita.....	23
2.3.4 - Fertilizantes fosfatados.....	24
2.4 - Tratamentos estatísticas e planejamento experimental.....	25

2.4.1 – Anova.....	25
2.4.2 - Teste de Tukey.....	27
2.4.3 - Teste de Scott - Knott.....	28
2.4.4 – Planejamento Experimental.....	31
2.4.4.1 – Delineamento composto central rotacional.....	31
2.4.4.2 – Padrão da Análise Estatística de Respostas do DCCR.....	33
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 - Rocha fosfática.....	36
3.2 - Fungo de trabalho.....	36
3.2.1 - Isolamento e repicagem.....	36
3.3 - Avaliação qualitativa.....	39
3.4 - Contagem de esporos.....	40
3.5 - Classificação quantitativa.....	41
3.6 - Planejamento Experimental.....	43
3.7 - Avaliação da concentração inicial de esporos.....	47
3.8 - Tempo de fermentação.....	48
3.9 - Balanço de massa no sistema rocha, meio líquido e micélio fúngico.....	48
3.10 - Proposta de biorreator.....	49
3.11 - Metodologia analítica.....	51
3.11.1 - Determinação de fósforo total e fósforo solúvel.....	51
3.11.2 - Determinação da Acidez.....	53
3.11.3 - Determinação de pH.....	54
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
4.1 - Avaliação qualitativa.....	55
4.2 - Classificação quantitativa.....	55

4.2.1 - Avaliação do tratamento com agitação e sem agitação (repouso).....	61
4.2.2 - Avaliação da solubilização do fosfato de rocha em água e no meio de cultura..	62
4.2.3 - Seleção dos <i>A. niger</i> com melhor desempenho de solubilização.....	63
4.2.3.1 - Tratamento sem agitação (repouso).....	63
4.2.3.2 - Tratamento com agitação.....	65
4.3 - Planejamentos experimentais.....	66
4.3.1 – Primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR).....	66
4.3.2 - Avaliação preliminar da temperatura.....	69
4.3.3 - Câmaras para controle de temperatura.....	70
4.3.4 - Segundo delineamento composto central rotacional (DCCR).....	71
4.3.4.1 - Planejamento experimental para o Isolado 7.....	71
4.3.4.2 - Planejamento experimental para o Isolado 9.....	80
4.3.4.3 - Avaliação da solubilização do segundo DCCR para o Isolado 7.....	89
4.4 - Determinação da concentração inicial de esporo.....	90
4.5 – Tempo de fermentação.....	92
4.6 - Balanço de massa no sistema rocha, meio líquido e micélio fúngico.....	95
4.7 - Proposta de Biorreator.....	96
<b>5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....</b>	<b>98</b>
5.1 – Conclusões.....	98
5.2 – Sugestões para Próximos Trabalhos.....	99
ANEXO 1.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
APÊNDICE.....	114



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema do ciclo de vida geral dos fungos (MOLINARO, 2010).....	7
Figura 2.2 - Morfologia representativa de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> (ROSA et al., 2002).....	10
Figura 2.3 - Glicólise.....	12
Figura 2.4 - Esquema geral do acúmulo de ácido cítrico no ciclo de Krebs.....	13
Figura 2.5 – Fluxograma da usina de beneficiamento de rocha fosfática da usina de Araxá da Serrana Fertilizante S.A, atual Vale Fertilizantes (CETEM, 2002).....	23
Figura 2.6 - Algoritmo para classificação pelo método de Tukey representando o teste média a média (CANTERI, 2001).....	28
Figura 2.7 - Algoritmo para classificação pelo método de Scott-Knott (CANTERI, 2001).....	31
Figura 2.8 - Acréscimo de pontos no planejamento fatorial $2^k$ .....	32
Figura 2.9 – Esquema do DCCR.....	33
Figura 2.10 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário...	35
Figura 3.1 – Característica morfológica do <i>A. niger</i> .....	37
Figura 3.2 – Cultivo do <i>Aspergillus niger</i> em meio BDA.....	38
Figura 3.3 – Cultivo do <i>Aspergillus niger</i> em meio BDA inclinado.....	38
Figura 3.4 A - Repicagem do disco.....	40
Figura 3.4 B - Inoculação do disco.....	40
Figura 3.5 - Esquema de uma Câmara de Neubauer: Compartimentos (A, B e C) e subcompartimentos (a, b e c) da lâmina.....	41
Figura 3.6 - Ensaio para o tratamento sem agitação.....	42
Figura 3.7 - Ensaio para o tratamento com agitação.....	43
Figura 3.8 - Esquema do biorreator para processo fermentativo.....	50
Figura 3.9 - Biorreator constituído de rocha, micélio e meio líquido.....	51
Figura 4.1 - Expansão do fungo do disco para o meio seletivo.....	55
Figura 4.2 - Halo transparente em torno da colônia fúngica.....	55

Figura 4.3 - Avaliação qualitativa da faixa de temperatura para o <i>A. niger</i> (Isolado 7).....	69
Figura 4.4 - Câmaras para controle de temperatura.....	70
Figura 4.5 - Valores observados vs valores preditos.....	74
Figura 4.6- Valores preditos vs resíduos.....	74
Figura 4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e substrato com R constante no ponto central.....	76
Figura 4.8 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e concentração de rocha com S constante no ponto central.....	77
Figura 4.9 - Superfície de resposta e curva de contorno para substrato e concentração de rocha com T constante no ponto central.....	78
Figura 4.10 - Valores observados vs valores preditos.....	83
Figura 4.11 - Valores preditos vs resíduos.....	83
Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e substrato com R constante no ponto central.....	85
Figura 4.13 - Superfície de resposta e curva de contorno para substrato e concentração de rocha com T constante no ponto central.....	86
Figura 4.14 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e concentração de rocha com S constante no ponto central.....	87
Figura 4.15 - Cinética de solubilização do fósforo referente ao Isolado 7.....	93
Figura 4.16 – Taxa de solubilização do fósforo referente ao Isolado 7.....	93
Figura 4.17 - Cinética de solubilização do fósforo referente ao Isolado 9.....	94
Figura 4.18 – Taxa de solubilização do fósforo referente ao Isolado 9.....	94
Figura 4.19 - Biorreator em processo fermentativo.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micro-organismos solubilizadores de fosfato.....	5
Tabela 2.1 - Classificação e principais características do <i>Aspergillus niger</i> .....	11
Tabela 2.2 - Ácidos orgânicos produzidos por <i>Aspergillus niger</i> .....	13
Tabela 2.3 - Ação solubilizadora de fungos isolados de solos canteiros de mudas.....	16
Tabela 2.4 - Resultados das análises, Schneider et al (2010).....	19
Tabela 2.5 - Composições mineralógicas médias (%) dos diferentes tipos de minério da mina de Araxá, MG.....	21
Tabela 2.6 - Quadro de análise de variância.....	26
Tabela 3.1 - Meio Semi-sintético batata-dextrose-ágar (BDA) sólido.....	37
Tabela 3.2 - Meio sintético-seletivo sólido, (PIKOVSKAYA, 1948).....	39
Tabela 3.3 - Meio seletivo modificado.....	42
Tabela 3.4 - Variáveis estudadas no planejamento e os valores de seus respectivos níveis.....	45
Tabela 3.5 - Matriz do planejamento experimental.....	46
Tabela 4.1 - Resultados da solubilização do fósforo da rocha para o tratamento com agitação.....	56
Tabela 4.2 - Resultados da solubilização do fósforo da rocha para o tratamento sem agitação.....	58
Tabela 4.3 - Estatística descritiva para o tratamento com agitação e sem agitação.....	62
Tabela 4.4 - Teste de diferença entre duas médias (Distribuição normal).....	62
Tabela 4.5 - Avaliação da solubilização do fósforo sem a presença da espécie fúngica.....	63
Tabela 4.6 - Análise de variância dos resultados da Tabela 4.2.....	64
Tabela 4.7 - Testes de Tukey e Scott - Knott dos resultados da Tabela 4.2.....	64
Tabela 4.8 - Análise de variância dos resultados da Tabela 4.1.....	65
Tabela 4.9 - Testes de Tukey e Scott - Knott dos resultados da Tabela 4.1.....	66
Tabela 4.10 – Matriz dos resultados do planejamento experimental para o Isolado 7.....	67

Tabela 4.11 – Matriz dos resultados do planejamento experimental para o Isolado 9.....	68
Tabela 4.12 - Intervalo experimental com as variáveis normais e as variáveis codificadas para os Isolados 7 e 9.....	71
Tabela 4.13 - Resultados da matriz do planejamento experimental para Isolado 7.....	72
Tabela 4.14 - Coeficientes da regressão do modelo dos dados da Tabela 4.13.....	73
Tabela 4.15 - Coeficientes da regressão dos efeitos significativos.....	75
Tabela 4.16 - Variação da concentração de rocha com $T = 37\text{ °C}$ e $S = 41\text{ g/L}$ .....	80
Tabela 4.17 - Validação do modelo.....	80
Tabela 4.18 - Resultados da matriz do planejamento experimental para Isolado 9.....	81
Tabela 4.19 - Coeficientes da regressão do modelo dos dados da Tabela 4.18.....	82
Tabela 4.20 - Coeficientes da regressão dos efeitos significativos.....	84
Tabela 4.21 - Região ótima para Isolado 9, resultados da equação canônica apêndice 4..	88
Tabela 4.22 - Variação da temperatura a baixo de limite inferior.....	89
Tabela 4.23- Validação.....	89
Tabela 4.24 - Avaliação da solubilização do segundo DCCR para o Isolado 7.....	90
Tabela 4.25 - Variação inicial da concentração de esporo para os Isolados 7 e 9.....	91
Tabela 4.26 – Testes estatísticos para o Isolado 9.....	91
Tabela 4.27 – Testes estatísticos para o Isolado 7.....	92
Tabela 4.28 - Determinação do fósforo no líquido (meio de cultura).....	95
Tabela 4.29 - Determinação do fósforo nas rochas tratadas e na rocha fresca.....	95
Tabela 4.30 - Determinação do fósforo no micélio.....	96
Tabela 4.31 - Resultado do ensaio com biorreator e condições operacionais.....	97

## RESUMO

O fósforo (P) é um macroelemento essencial para manutenção da vida de animais e plantas. É encontrado na natureza na forma de numerosos minerais, tal como a apatita. A indústria de mineração realiza a extração e o beneficiamento das reservas fosfáticas. No processo industrial ocorrem perdas consideráveis deste elemento por meio de rejeitos industriais ou por lixiviação pela chuva. O fósforo arrastado pela chuva pode ocasionar a redução do oxigênio dos corpos d' água (eutrofização), necessário para manutenção da vida. Outro aspecto industrial diz respeito à produção de fertilizantes que tradicionalmente utilizam ácidos inorgânicos fortes (ácido sulfúrico) para obtenção de formas mais solúveis de fosfato, gerando subprodutos impactantes ao meio ambiente. Dentro deste contexto o presente trabalho propôs uma possível alternativa para o tratamento de rejeitos e ao processamento químico tradicional, rota sulfúrica, pela utilização de fungos *Aspergillus niger*, excretadores de ácidos orgânicos (menos impactantes) que por mecanismos de quelação e reações de troca iônica, aumentam acentuadamente a concentração de fósforo em solução. Inicialmente os fungos *A. niger* foram obtidos a partir de sementes de soja retiradas do campo. Foram obtidos 12 isolados fúngicos nomeados numericamente de 1 a 12 respectivamente, os quais foram submetidos à classificação quantitativa. Nesta etapa foram selecionados os 2 isolados fúngicos com maior potência de solubilização em meio líquido, sendo eles, o Isolado 7 (440 mg/L) e o Isolado 9 (460 mg/L), utilizando os métodos estatísticos Anova, Tukey e Scott-Knott na classificação quantitativa. Estes valores de solubilização corresponderam a  $\pm 12\%$  de solubilização do  $P_2O_5$  da rocha fosfática. A etapa seguinte foi a realização de um planejamento experimental, mais especificamente, um delineamento composto central rotacional (DCCR). As variáveis independentes avaliadas foram a temperatura ( $^{\circ}C$ ), o substrato (glicose) (g/L) e rocha fosfática (g/L). Como resultados foram obtidos, para os 2 isolados fúngicos selecionados, as equações dos modelos preditivos e os gráficos que representam as superfícies de resposta entre as variáveis. O Isolado 7 apresentou pontos ótimos bem definidos que foram confirmados na validação do modelo, sendo eles,  $37^{\circ}C$  para temperatura, 41 g/L para o substrato e 36 g/L para rocha fosfática. O Isolado 9 não apresentou pontos ótimos, mais sim uma região ótima, sendo, 25 a  $31^{\circ}C$  para temperatura, 28 a 37 g/L para o substrato e indiferente para rocha fosfática, pois esta última não demonstrou ser significativa na faixa experimental. Ainda nesta etapa, foi verificado o percentual de solubilização, variando de 8 a 62 % do  $P_2O_5$  da rocha. Após o planejamento foi avaliada a variação da concentração inicial de esporos nos ensaios para concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  esporos por mL, e não se constatou nem uma significância estatística nos resultados ao final dos experimentos para os dois fungos. Também foi realizada a cinética de solubilização do fósforo, sendo que para o Isolado 7, o tempo de estabilização ocorreu a  $\pm 36$  dias (5 semanas) após o início dos ensaios, alcançando valor de 632 mg/L de P em solução. A taxa de solubilização foi crescente nos 11 primeiros dias. O tempo de estabilização para o Isolado 9 ocorreu em  $\pm 45$  dias (6 semanas), alcançando valor de P em solução de 436 mg/L. A taxa de solubilização foi crescente nos 7 primeiros dias. Por fim foi proposto um biorreator descontínuo de 6 L com aeração e reciclo, no qual operou dentro das condições ótimas definidas anteriormente. Obteve-se ao final do ensaio valor de 123 mg/L de fósforo solúvel.

## ABSTRACT

Phosphorus (P) is an essential macro element for maintenance of life of animals and plants. It is found in nature in the form of numerous minerals, such as apatite. The mining industry performs the extraction and processing of phosphate reserves. In the industrial process of this element considerable losses occur through industrial waste or through leaching by rain. The phosphorus dragged by rain can cause the reduction of oxygen of water bodies (eutrophication), necessary for maintaining life. Another industrial aspect concerns the production of fertilizers which traditionally utilize strong inorganic acids (sulfuric acid) for the obtaining of more soluble forms of phosphate, generating impactful byproducts to the environment. Within this context, this work proposed a possible alternative for the treatment of waste and for the traditional chemical processing, sulfuric route, by the use of *Aspergillus niger*, which excretes organic acid (less impactful) that by chelation mechanisms and ion exchange reactions, markedly increase the concentration of phosphorus in solution. Initially the fungus *A. niger* was found from soybean seeds removed from the field. 12 isolated fungi were obtained and designated numerically from 1 to 12 respectively, which were submitted to quantitative classification. In this step the two isolated fungi with the highest power of solubilization in a liquid form were selected, which are Isolated 7 (440 mg/L) and Isolated 9 (460mg/L), using the statistical methods Anova, Tukey and Scott-Knott in the quantitative classification. These solubilization values corresponded to  $\pm 12\%$  of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> solubilization of phosphate rock. The next step was the experimental planning, more specifically, a Central Compound Rotational Delineation (CCRD). The relevant variables evaluated were the temperature in °C, substrate (glucose) in g/L and phosphate rock in g/L. As results were obtained for the two isolated fungi selected, the equations of the static models and graphics which represent the response surfaces between the variables. The Isolated 7 showed well-defined optimal points that were confirmed in the validation of the model, namely, 37°C for temperature, 41 g/L for the substrate and 36 g/L for the phosphate rock. The Isolated 9 didn't show optimal points, but it showed an optimal region, namely, and 25 to 31 ° C for temperature, 28 to 37 g/L for the substrate and indifferent to phosphate rock, since this last is not shown to be significant in the experimental range. Even at this stage, it was verified the percentage of solubilization, ranging from 8 to 62% of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> of the rock. After the planning it was measured the variation in the initial concentration of spores in the trials at concentrations of 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> spores per mL, and there was no statistical significance in the results at the end of the experiment for both fungi. It was also performed kinetic solubilization of the phosphorus, namely, to Isolated 7, the settling time has occurred within  $\pm 36$  days (5 weeks) after the start of the tests, reaching the value of 632 mg/L of P in solution. The solubilization rate was increased in the first 11 days. The settling time for the Isolated 9 occurred in  $\pm 45$  days (6 weeks), attaining the value of P in solution of 436 mg/L. The solubilization rate was increasing in the first 7 days. Finally, it was proposed a 6 L discontinuous bioreactor with aeration and recycle, which operated within optimum conditions defined above. It was obtained at the final test the value of 123 mg/L of soluble Phosphorus.

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

#### **1.1 - Fósforo**

O fósforo elemento químico de símbolo P, número atômico 15 (15 prótons e 15 elétrons) e massa atômica igual a 31 é vital para todos os seres vivos. No corpo humano é o segundo nutriente mineral mais abundante. Nos humanos, 80% do P é sequestrado para ossos e dentes e este nutriente é responsável por 20% dos minerais do corpo. O restante está amplamente distribuído em gorduras, proteínas, açúcares, enzimas e sais associados com todas as células de nossos corpos (YAMADA; ABDALLA, 2004).

Para a bioquímica, o fósforo é um componente indispensável para a formação dos ácidos nucleicos e faz parte dos fosfolipídios que integram e dão flexibilidade às membranas celulares. Também é considerado elemento básico, já que faz parte da composição do ATP, trifosfato de adenosina, e do ADP, difosfato de adenosina, nucleotídeos presentes nos tecidos, que desempenham função essencial tanto no metabolismo molecular como na regulação entre absorção e liberação energética (MCDOWELL, 1992).

O fósforo é um elemento essencial por participar das moléculas de DNA e RNA responsáveis pela transmissão das características genéticas, sendo indispensável à multiplicação celular, além de serem os compostos de fósforo um dos principais responsáveis na manipulação da energia nas células vivas (YAMADA; ABDALLA, 2004). Desempenha papel de co-fator de múltiplos sistemas enzimáticos no metabolismo de gorduras, carboidratos, lipídios e proteínas. Regula o equilíbrio ácido-básico do plasma, mantém a integridade do sistema nervoso central e dos rins. Possui um papel muito importante no desenvolvimento e manutenção das estruturas ósseas, síntese de colágeno e homeostase do cálcio. Regulador da excreção renal e auxilia o corpo na utilização de vitaminas. Tanto o excesso, quanto a deficiência interferem na absorção de cálcio e no metabolismo (BORGES et al., 2004).

Nas plantas, o fósforo é necessário para a fotossíntese, respiração, função celular, transferência de genes e reprodução.

Deste modo, a partir do momento que há consciência da ligação crítica entre o fósforo e a vida propriamente dita, torna-se óbvio que sem fósforo não há células, nem

plantas, nem grãos e sem a quantidade adequada de fósforo haverá falta de alimento no mundo (YAMADA; ABDALLA, 2004).

## **1.2 - Reservas de rochas fosfáticas**

O fósforo não é encontrado livre na natureza, sendo extraído de diferentes minerais e utilizado como fertilizante na agricultura. Em termos mundiais, mais de 99% dos fertilizantes fosfatados são produzidos a partir de reservas de rochas fosfáticas e apenas uma quantidade muito pequena é fornecida na forma de escórias básicas, um subproduto da indústria do aço.

Os minerais que compõem as rochas fosfáticas são, basicamente, formados por dois grupos: as apatitas, que são fosfatos de cálcio contendo  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{Cl}^-$  e as fosforitas, que são fosfatos de cálcio com substituição parcial do  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ .

Quanto à origem, as apatitas ocorrem por ação vulcânica que são os casos típicos do Brasil Central, Canadá, Rússia e África do Sul. Já as fosforitas originaram-se de depósitos sedimentares o que caracteriza os depósitos de rochas fosfáticas do norte da África, China, Oriente Médio e Estados Unidos. Atualmente, cerca de 85% da produção mundial de P vem de depósitos sedimentares de minas de superfícies e 15 % de depósitos magmáticos (YAMADA; ABDALLA, 2004).

As reservas mundiais de rocha fosfática atingem a cifra de 47 bilhões de toneladas, correspondendo a 281 anos do consumo atual (KULAIIF, 2009). Em estudo similar, segundo a United States Geological Survey - USGS (2009), a vida total das reservas no mundo estão estimadas em 90 anos e a vida das bases de reservas de 281 anos. Sendo as reservas a parte da base de reserva que pode ser economicamente extraída ou produzida no momento da avaliação, enquanto as bases de reservas são aqueles recursos que são atualmente econômicos (reservas), marginalmente econômicos e alguns dos quais são atualmente subeconômicos.

As reservas estão muito concentradas, em apenas três países, Marrocos, China e Estados Unidos detendo quase 75% das mesmas. Segundo números oficiais, o Brasil deteve, em 2007, 319 milhões de toneladas de contido em  $\text{P}_2\text{O}_5$  nas reservas medidas, sendo as principais fontes de fosfatos localizadas em Minas Gerais (67%), Goiás (14%) e São Paulo (6%). A principal jazida se encontra em Tapira (MG), seguida das reservas de Patos de Minas (MG), Araxá (MG), Catalão (GO) e Cajati (SP). As pesquisas em curso poderão ampliar as reservas para 350 milhões de toneladas, (KULAIIF, 2009).

## **1.3 - Beneficiamento, perdas e impactos ambiental da exploração das rochas fosfáticas**



A indústria de fertilizantes, mais precisamente a indústria de mineração, explora as reservas fosfáticas, sendo que o setor de fertilizantes no Brasil iniciou-se voltado para a venda de adubos mistos importados. Com o aumento da demanda, o setor passou a produzir internamente as misturas NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), não mais importando fórmulas e sim elementos simples. Isso permitiu que a oferta de formulações NPK passasse a ser mais bem adaptada as condições dos solos brasileiros.

O teor de  $P_2O_5$  nos depósitos atuais pode variar de mais de 40% até menos de 5%. As rochas fosfáticas são, em geral, beneficiadas para remoção de impurezas e obtenção dos chamados concentrados fosfáticos para atingir concentrações que podem variar de 1,5 a 9 vezes mais em  $P_2O_5$ , de 26% a 34%, em média a até 42% (YAMADA; ABDALLA, 2004).

No processo industrial de concentração do fósforo da rocha ocorrem perdas consideráveis deste elemento por meio de rejeitos industriais ou por lixiviação pela chuva. No aspecto econômico é necessário a recuperação deste mineral. No aspecto ambiental o fósforo proveniente de rejeitos ou por lixiviação é arrastado aos corpos d'água acumulando-se nos leitos de rios e lagos. A quantidade excessiva deste mineral induz a multiplicação de micro-organismos (algas microscópicas) que habitam a superfície da água, formando uma camada densa, impedindo a penetração da luminosidade. Esse fato implica na redução da taxa fotossintética nas camadas inferiores, ocasionando o déficit de oxigênio suficiente para atender a demanda respiratória dos organismos aeróbios (os peixes e mamíferos aquáticos), que em virtude das condições de baixo suprimento, não conseguem sobreviver, aumentando ainda mais o teor de matéria orgânica no meio, fenômeno conhecido como eutrofização, causando prejuízos ao meio ambiente.

A resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabeleceu a quantidade entre 0,02 mg a 0,1 mg de fósforo por litro de água, para água doce classe 1, como limite máximo permitido para não prejudicar a vida aquática e a saúde humana.

No aspecto da produção de fertilizantes, a rota sulfúrica é o principal, se não o único, processo industrial para produção de ácido fosfórico no Brasil. É de conhecimento que a rota de produção de ácido fosfórico que utiliza o ácido sulfúrico no ataque do concentrado fosfático pode provocar grande impacto ambiental causado pela geração de 5 a 6 toneladas de fosfogesso para cada tonelada de ácido fosfórico produzida, (LAPIDO-LOUREIRO, 2000). Isso por que, embora a composição do fosfogesso seja basicamente de cálcio dihidratado, o material pode conter níveis elevados de impurezas que provêm das rochas fosfáticas. Entre essas impurezas pode ocorrer um acréscimo de radioatividade natural, devido à presença de

produtos de decaimento do urânio e tório, particularmente Ra-226 e Th-223, que inviabiliza seu uso como material de construção ou para outros propósitos. Outro problema está relacionado à estocagem deste material a céu aberto, podendo provocar drenagem ácida e posterior contaminação de lençóis freáticos.

Um fato temporal importante está relacionado à vida útil das reservas nacionais, de acordo com a USGS (2009), a vida total das reservas brasileiras com valor econômico de extração está estimada em 43 anos enquanto o total de reservas em 62 anos.

Portanto, rotas e metodologias alternativas vêm sendo estudadas visando melhor aproveitamento do minério, dos rejeitos e recuperação de subprodutos a fim de promover vantagens técnicas, econômicas e ambientais no contexto brasileiro, vislumbrando a criação de novos polos industriais de fertilizantes fosfatados.

#### **1.4 - Micro-organismos solubilizadores de fosfato insolúvel**

Em complementação ao processamento químico tradicional, uma alternativa para recuperação de rejeitos e minimização de perdas, e uma provável forma de beneficiamento de reservas de baixo teor (bases de reservas) é o emprego de micro-organismos como agentes solubilizadores de fosfato insolúvel.

Os micro-organismos do solo, especialmente os heterotróficos, são capazes de metabolizar e solubilizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos. Esta capacidade já era conhecida desde o início do século XX, em 1908, quando Sackett e seus colaboradores (GOLDSTEIN, 1986) chamaram a atenção para a importância dos micro-organismos para o ciclo do P e sua disponibilidade para os seres vivos, atividades até então completamente ignoradas.

Como consequência dos avanços dos estudos sobre o entendimento da solubilização surgiram na década de 60 os inoculantes bacterianos contendo solubilizadores de fosfatos chamados Fosfobacterinas, cuja aplicação tornou-se popular em alguns países, como Índia e União Soviética, mas com resultados duvidosos sobre sua eficácia como insumo agrícola biológico. Os micro-organismos solubilizantes de fosfatos acham-se distribuídos por todos os grupos de micro-organismos do solo, destacando-se os gêneros de bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium* e de fungos *Aspergillus* e *Penicillium*. A capacidade solubilizadora existe até mesmo em endomicorrízicos. Esta característica varia enormemente entre e dentro das espécies microbianas e das fontes de fosfato utilizadas. A maioria solubiliza

fosfatos de cálcio, mas poucos são capazes de solubilizar fosfatos de alumínio e ferro. A Tabela 1 apresenta alguns micro-organismos solubilizadores de fosfatos encontrados no solo.

É fato que a maioria das bactérias do solo tem capacidade de dissolver fosfato de rocha adicionado quando mantidas em meios de cultura (IVANOVA et al, 2006). Estes autores estudaram a solubilização do fosfato de rocha em meio líquido por bactérias *Erwinia sp* e *Azotobacter sp* isoladas do solo, e também avaliaram o tempo de incubação e o tamanho de partícula do minério.

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados como produtores de ácidos orgânicos (MATTY, 1992), e em especial o *Aspergillus niger* e algumas espécies de *Penicillium*. Estas espécies foram testadas quanto à solubilização de fosfatos insolúveis (ASEA et al., 1988). Entre os fungos filamentosos o *Aspergillus niger* tem sido bastante estudado devido à produção de ácido cítrico em escala industrial (PAPAGIANNI; MATTEY, 2004) e por apresentar grande potencial na solubilização de rocha fosfática. As principais vantagens no uso do *A. niger* estão relacionadas à facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de ácido cítrico (YOKOYA, 1992). O ácido cítrico por sua vez é menos impactante ao meio ambiente que o ácido sulfúrico de uso tradicional na indústria de fertilizantes. O processo fermentativo ainda apresenta como vantagens: operação simples, baixa consumo de energia e não requer um controle de sistema muito sofisticado, (RODRIGUES, 2006 apud TIMEIS, 2000).

Tabela 1 – Micro-organismos solubilizadores de fosfato.

Micro-organismos	Fosfato	Referência
<i>Glomus fasciculantum</i>	Fosfato de ferro	Bolan et al., 1987
<i>Penicillium bilaji</i> <i>Penicillium fuscum</i>	Fosfato de rocha Idaho	Asea et al., 1988
<i>Pseudomonas striata</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Aspergillus niger</i>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Gaind e Gaur, 1990
<i>Bacillus firmus</i>	Fosfato de rocha	Datta et al., 1992
<i>Enterobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i>	Fosfato de rocha	Chabot et al, 1993
continua		

Continuação da Tabela 1

Micro-organismos	Fosfato	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	Fosfato tricálcico	Zayed, 1997
<i>Enterobacter</i> sp. e <i>Glomus deserticola</i>	Fluorapatita	Vassileva et al., 1999
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Fosfato tricálcico	Peix et al., 2001
<i>Glomus deserticola</i> e <i>Yarrowia lipolytica</i>	Fluorapatita	Vassilev et al., 2001
<i>B. megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i>	Fosfato de rocha	Sundara et al., 2002
<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Narloch et al., 2002
<i>Acidithiobacillus</i>	Fosfato de rocha Gafsa	Stamford et al., 2003
<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus mucilaginosus</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Glomus mossae</i>	Fosfato de rocha	Wu et al., 2005

Neste contexto, o objetivo geral desta dissertação foi estudar a solubilização do fósforo proveniente de rocha fosfática por fungos *Aspergillus niger* através de processo fermentativo submerso.

Os objetivos específicos foram:

1 - Selecionar dentre os isolados fúngicos avaliados aqueles com maior potencial de solubilização do fosfato de rocha, utilizando como ferramenta de cálculo métodos de estatística experimental;

2 - Avaliar e otimizar as variáveis, temperatura, concentração de substrato e concentração de rocha fosfática por meio de um planejamento experimental;

3 - Aferir a cinética de solubilização e estimar a distribuição do fósforo no sistema rocha, meio líquido e micélio do fungo;

4 - Avaliar a solubilização da rocha fosfática em biorreator descontínuo com aeração e reciclo.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 - Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e  $\alpha$ -glucano, com ausência de plastos ou pigmentos fotossintéticos. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada). Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade. O resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos. Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada micélio, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos. Os filamentos simples ou ramificados que formam o micélio são denominados hifas.

Com a formação dos esporos ou conídios é necessário que estes tenham acesso livre ao ar, para assegurar sua disseminação. Realiza-se, então, uma diferenciação das hifas vegetativas, geralmente levantadas verticalmente sobre o plano do micélio, conhecido como esporóforo ou conidióforo, e sobre estes se originam os esporos ou conídios (MOLINARO et al., 2010). O ciclo de vida dos fungos está representado na Figura 2.1.

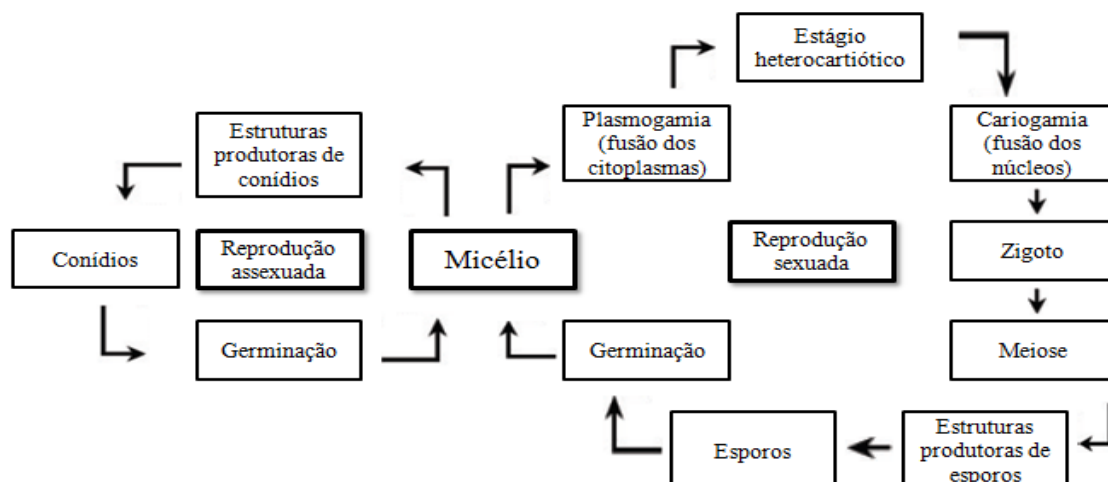


Figura 2.1 - Esquema do ciclo de vida geral dos fungos (MOLINARO et al., 2010).

Os fungos são considerados seres heterotróficos, necessitando de fontes de carbono, que servem como fonte de energia e como constituintes celulares.

Devido à ausência de clorofila nos fungos, torna-se necessário que o meio forneça as substâncias indispensáveis à alimentação, obrigando os fungos a viverem em estado de saprofitismo, parasitismo, simbiose (liquens, por exemplo) ou mutualismo. (MOLINARO et al., 2010).

Os fungos são considerados seres cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta. Sendo amplamente distribuídos pela natureza, encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e industriais (MOLINARO et al., 2010).

Os fungos se diversificaram ao longo do processo evolutivo em aproveitar uma ampla variedade de substratos e de habitat. Por isso, diferentes espécies requerem diferentes condições para um crescimento ótimo (CARLILE; WATKINSON, 1997; GRIMM et al., 2005). Assim, é necessário determinar as condições ambientais mais adequadas, sejam físicas, como a atividade da água e da temperatura, sejam químicas, como o pH, fonte de carbono e fonte de nitrogênio.

### **2.1.1 - Fatores químicos e físicos para desenvolvimento dos fungos**

A fonte de carbono é necessária para síntese de numerosos compostos orgânicos no interior das células. A principal fonte de carbono utilizada pela maioria dos fungos é a glicose, mais muitos outros açúcares ou carboidratos podem servir como fonte de carbono (CARLILE; WATKINSON, 1997).

A fonte de nitrogênio é muito importante para biossíntese de componentes celulares, principalmente as proteínas. A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio sob a forma inorgânica (nitrato) ou orgânica (amônia).

Os macronutrientes são fornecidos aos fungos na forma de sais. Enquanto que o fósforo sob a forma de fosfatos solúveis, importante no metabolismo energético. Já o enxofre está presente nos aminoácidos e participa da síntese de vitaminas. O Potássio e o magnésio estão relacionados na ativação de enzimas. O ferro para a síntese de citocromos e de certos pigmentos.

Alguns fungos requerem fatores de crescimento, principalmente vitaminas e micronutrientes como ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio, que são requeridos em quantidades mínimas.

A água não é um nutriente, mas é indispensável para o crescimento dos microrganismos. Os fungos são nutridos pela passagem de substâncias em solução através da membrana citoplasmática. A água é o solvente universal e exerce também a função de regulação da pressão osmótica e regulação térmica.

Todos os micro-organismos têm uma temperatura mínima, uma máxima e uma temperatura ótima. Para outras atividades microbianas existem temperaturas ótimas (diferentes do ótimo de crescimento), podendo existir micro-organismos termófilos (em torno de 60 °C), psicrófilos (em torno de 10 °C) e os mesófilos (entre 20 e 40 °C). A maioria dos fungos se enquadra neste última faixa (CARLILE; WATKINSON, 1997).

Na literatura há deficiência de informações sobre o efeito do pH sobre os parâmetros de crescimento dos fungos, apesar de haver considerável informação em relação ao efeito do pH inicial do cultivo. O metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos (comum para fungos filamentosos) ou amônia. A concentração do íon hidrogênio num meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela sua ação nas superfícies celulares (CARLILE; WATKINSON, 1997).

A aeração é muito importante para o metabolismo oxidativo (respiratório) ou fermentativo. Os fungos filamentosos, na sua quase totalidade, utilizam oxigênio como receptor final de elétrons para completar o processo respiratório. (CARLILE; WATKINSON, 1997).

Por fim, a agitação mecânica é um fator importante de desenvolvimento mais não primordial, e tem como objetivo promover uma melhor aeração do meio favorecendo o crescimento de micro-organismos aeróbios e facultativos bem como promover a homogeneização dos nutrientes no meio de cultura, favorecendo o crescimento dos micro-organismos.

## 2.2 - *Aspergillus niger*

Os *Aspergillus* tratam-se de um gênero dos fungos filamentosos bastante estudados. As espécies que compõem este gênero têm ampla distribuição mundial estando presentes na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de

estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas. A taxonomia atual reconhece 150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e atualmente facilmente distinguíveis (ROSA et al., 2002).

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio com farta produção de conídeos (SANTOS, 2007).

As estruturas morfológicas são características importantes para a sua classificação. As espécies pertencentes a este grupo produzem tipicamente o “aspergillum” ou “cabeça aspergillar”, que consiste de uma haste (estipede) asseptado que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem às células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídeos com diferentes pigmentações e ornamentações. Uma cabeça aspergillar simples (uniseriada) é formada por uma vesícula, total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídeos. Quando se diz que a cabeça aspergillar é bisseriada, é porque, antes da camada de fiálides, esta apresenta uma camada de células que as geraram, chamadas de métulas. A anatomia da cabeça aspergillar, forma da estrutura anamórfica que caracteriza o gênero esta apresentada na Figura 2.2. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste (ou estipede) e a célula pé, é chamada de conidióforo (SANTOS, 2007).

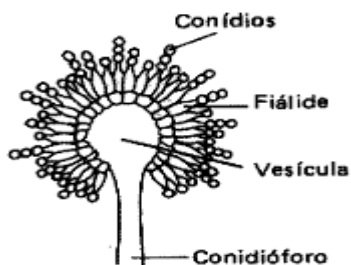


Figura 2.2 - Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus* (ROSA et al., 2002).

A classificação e principais características do *Aspergillus niger* são apresentadas na Tabela 2.1 a seguir.



Tabela 2.1 - Classificação e principais características do *Aspergillus niger*.

Classificação		Principais características
Reino	Fungi	
Divisão	Eumycota	Tipicamente micelial, algumas vezes unicelular
Subdivisão	Deuteromycotina	Talo micelial e septado ou unicelular; reprodução sexual ausente, mas a parasexual pode ocorrer.
Classe	Hyphomycetes	Formas miceliais estéreis ou produzindo conídios em hifas separadas ou agregadas na ausência de conidiomata
Ordem	Moniliales	Micélio hialino, contendo conidióforos livres, que se projetam do micélio de forma irregular.
Família	Moniliaceae	Os conidióforos são solitários livres, que se projetam do micélio de forma irregular.
Gênero	<i>Asperillus</i>	Micélio septado. Conidióforo erecto com terminais globosos dos quais emergem fiálides com conídios arredondados unicelulares e de coloração negra, esverdeada ou amarela.
Espécie	<i>níger</i>	Conídios globulosos de aspecto rugoso, com equinulações verdadeiras, coloração negra.

Fonte: (COURI, 1993).

### 2.2.1 - Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*

A principal aplicação industrial do *A. niger* esta relacionada à produção de ácido cítrico (AC). A produção de AC através de processos fermentativos já é conhecida há mais de cem anos, quando Wehmer em 1893 descobriu que linhagens de fungos *Citromyces* (hoje identificado como *Penicillium* sp.) e *Mucor* possuíam a capacidade de acumular quantidades consideráveis do ácido durante o seu cultivo (ROHR *et al.*, 1983). Mas a sua transferência para a escala industrial não obteve sucesso principalmente por causa da contaminação já que o tempo de fermentação era muito longo (várias semanas) e o pH de operação era próximo da neutralidade. Somente em 1917 foi construída a primeira planta de produção desse ácido na Bélgica, graças a estudos de Currie que estabeleceu algumas condições de produção.

A fábrica utilizava o *A. niger*, cujo desenvolvimento se dava em pH 2,5 a 3,5. A produção do ácido ocorria a pH's inferiores a 2,0. Isso possibilitou o controle mais simples da contaminação com um tempo de fermentação de 1 a 2 semanas. O trabalho pioneiro de Currie mostrou algumas bases para adequação do processo fermentativo tais como: necessidade de

concentração elevada de açúcar e a constatação de que as condições de melhor produção do ácido coincidem com a restrição do crescimento micelial. Logo após a fábrica da Bélgica surgiram outras fábricas, nos Estados Unidos, Inglaterra, Checoslováquia, União Soviética e Alemanha, que começaram a produzir ácido cítrico por fermentação (YOKOYA, 1992).

Com a descoberta da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na década de 50, foi possível elucidar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose. A base bioquímica do processo envolve três etapas:

- (a) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA através da glicólise, Figura 2.3;
- (b) Combinação da acetil-CoA e do oxaloacetato presente na matriz mitocondrial, Figura 2.4;
- (c) acúmulo do AC no ciclo de Krebs, Figura 2.4 (KUBICEK; ROHR, 1986; PANDEY et al., 2001).

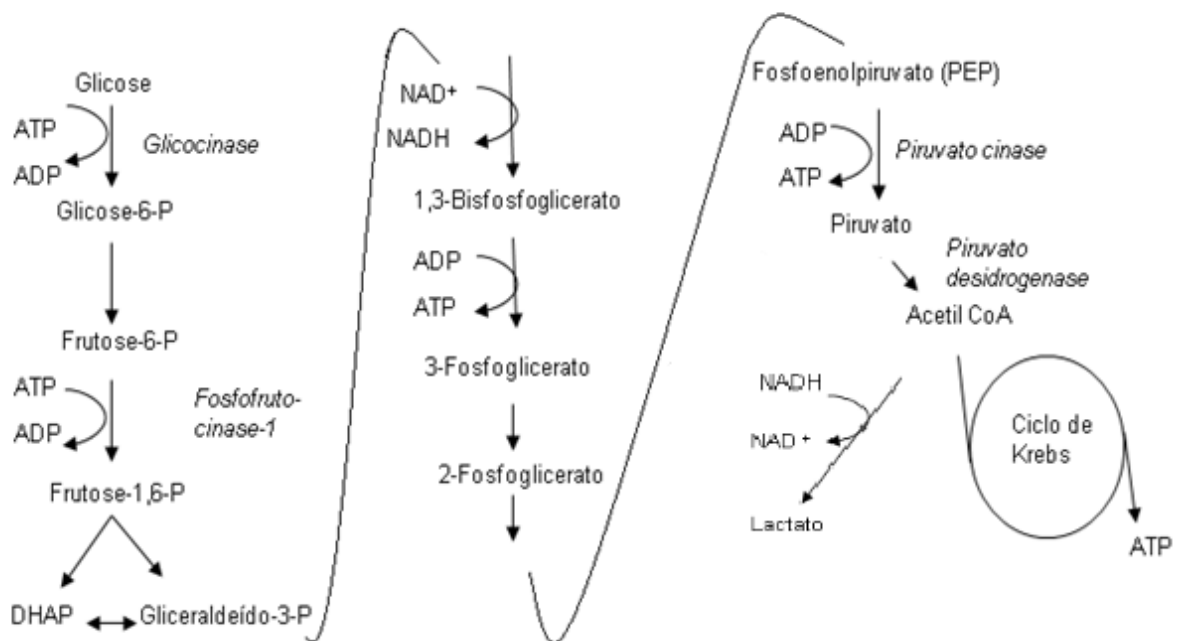


Figura 2.3 - Glicólise

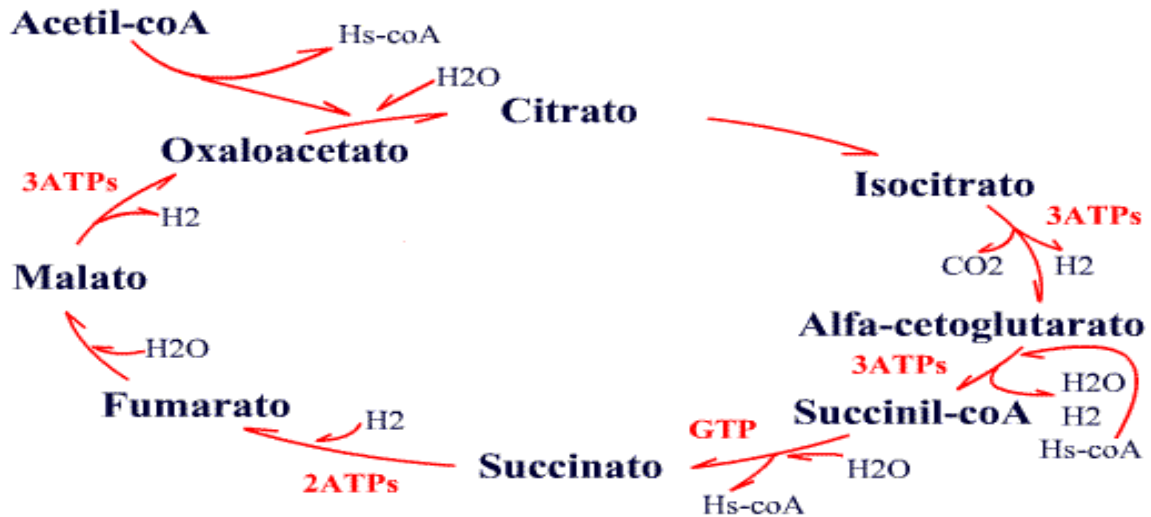


Figura 2.4 - Esquema geral do acúmulo de ácido cítrico no ciclo de Krebs

A glicólise é um processo que ocorre no citoplasma de uma célula e o ciclo de Krebs ocorre dentro das mitocôndrias encontradas no citoplasma. A Tabela 2.2 apresenta estudos dos vários ácidos orgânicos do ciclo de Krebs produzidos por *Aspergillus niger*.

Tabela 2.2 - Ácidos orgânicos produzidos por *Aspergillus niger*.

Ácidos	Referências
Cítrico	Sperber,1958
Cítrico	Tsay e To, 1987
Succínico, citrato e oxálico	Salih et al., 1989
Glucônico, láctico e citrato	Illmer e Schinner, 1992
Cítrico	Ruijter et al., 1997
Glucônico	Kara e Bozdemir, 1998
Cítrico	Sankpal et al., 2001
Oxálico	Mandal e Banerjee, 2005
Cítrico	Demirel et al., 2005

A glicose utilizada na síntese do ácido cítrico é quebrada através de duas vias: 80% pelas reações de Embden Meyerhof Parnas (EMP), também chamada via glicolítica, e 20% pelas reações da via monofosfato de hexose (HMP). Durante a fase de crescimento do fungo, a relação entre estas duas vias é de 2:1, e durante a produção de ácido cítrico esta proporção aumenta para 4:1 (YOKOYA, 1992; PANDEY et al., 2001). A via glicolítica tem duplo

papel, a degradação da glicose para geração de ATP e o fornecimento de elementos para biossínteses celulares. A velocidade da glicólise é regulada para atender a essas duas necessidades.

Desde 1920, a fermentação é o processo mais econômico e mais utilizado na produção industrial de ácido cítrico, representando mais de 90% da produção mundial. Este processo apresenta como vantagens: operações simples, baixo consumo de energia e não requer um controle do sistema muito sofisticado.

Industrialmente, há três formas de conduzir a fermentação cítrica, o processo submerso, processo de superfície e processo em estado sólido (ou processo “Koji”). Os processos “Koji” e de superfície são os mais antigos e adequados para conduzir a fermentação em pequena e média escala (até 10 t/dia). Já o processo submerso é destinado à produção em grande escala (YOKOYA, 1992).

Poucas espécies de micro-organismos demonstraram ser capazes de secretar ou excretar quantidades apreciáveis de ácido cítrico, o que é esperado, pois este é um composto intermediário do metabolismo normal, e a sua excreção seria condicionada à situação peculiar de desequilíbrio metabólico (KUBICEK; ROHR, 1986). Destas, apenas *A. niger* e *Saccharomycopsis* (Candida) são consideradas atualmente como importantes produtoras de ácido cítrico.

Atualmente, a fermentação industrial para produção do ácido cítrico é conduzida utilizando unicamente o *A. niger*, devido a sua maior produção de ácido cítrico por unidade de tempo, quando comparado a outros micro-organismos (YOKOYA, 1992; PAZOUKI et al., 2000; CROLLA; KENNEDY, 2001).

## **2.2.2 - Solubilização de fontes insolúveis de fosfatos por *Aspergillus niger***

### **2.2.2.1 - Mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos**

A solubilização, como já mencionado, decorre da secreção de metabólitos como ácidos orgânicos e inorgânicos, acompanhada da diminuição do pH do meio (NAHAS, 1996; NAUTIYAL, 1999). A produção de ácidos orgânicos tem sido considerada um dos principais mecanismos, contudo não somente a quantidade como a natureza do ácido produzido influencia a solubilização de fosfatos inorgânicos (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992). Os ácidos orgânicos secretados pelos micro-organismos podem diminuir o pH ou atuar como agentes quelantes dos metais dos fosfatos inorgânicos liberando fosfato solúvel (SALIH et al.,

1989; NAHAS, 1991) para o solo (WHITELAW, 2000). De acordo com Illmer e Schinner (1995) pode ocorrer solubilização ainda sem a produção de ácidos, pela liberação de prótons resultantes da assimilação de  $\text{NH}_4^+$ .

Asea et al. (1988) demonstraram a necessidade da presença do  $\text{NH}_4^+$  no meio de cultura para aumentar a solubilização de P por *Penicillium bilaji*. Por seus resultados as plantas podem favorecer a solubilização de fosfatos insolúveis (HOFFLAND et al., 1989), por um mecanismo que envolve o balanço entre cátions e ânions absorvidos, de modo que, quando há absorção de  $\text{NH}_4^+$  pela planta como fonte de N, a mesma mantém sua eletroneutralidade secretando  $\text{H}^+$ , diminuindo o pH da rizosfera, e, quando o  $\text{NO}_3^-$  é absorvido, há secreção de  $\text{OH}^-$  com elevação do pH (SWART; DIEST, 1987).

O efeito do valor do pH na dissolução de fosfato de rocha pode ser constatado em condições onde a atividade foi restringida. O resultado obtido mostrou que há uma dependência do tempo de reação e uma relação linear entre a quantidade de fosfato solubilizado e a diminuição dos valores do pH do solo (KANABO; GILKES, 1987).

De acordo com Nahas, (1996), aumentando a acidez titulável ocorre diminuição nos valores de pH final, e um aumento da acidez titulável ou uma diminuição nos valores de pH final correspondem a um aumento do teor de fosfato solúvel. No estudo realizado por Seshadri et al. (2000) envolvendo o crescimento de três linhagens de *Azospirillum halopraeferans* (LMG7107, LMG 7108 e LMG 7109) em dois meios de cultura líquidos, a solubilização do fosfato variou de 47,19 a 122,54  $\mu\text{g P/ mL}$ , foi atribuída à diminuição do pH em decorrência da dissociação dos cátions. Segundo Sayer et al. (1997), o fungo *A. niger* foi capaz de solubilizar quatro compostos insolúveis de metal,  $\text{CuO}_2$ ,  $\text{Pbs}$ ,  $\text{Mn}(\text{CO}_3)_x$  e  $\text{CaCO}_3$  em meio de cultura sólido pela produção de ácidos orgânicos. A produção de ácidos orgânicos e metabólitos variam com as condições do meio, estado fisiológico e o tipo de microrganismo (SILVA FILHO, 1998).

Entre os ácidos orgânicos, como mencionado no ciclo de Krebs, encontram-se o ácido maléico, cítrico, láctico, oxálico, tartárico, sucínico e glucônico (ILLMER; SCHINNER, 1992; HAQ et al., 2002). A capacidade de *Penicillium rugulosum* em solubilizar fosfatos foi proporcionada pela produção dos ácidos cítrico e glucônico (REYES et al., 2001).

#### **2.2.2.2 - Estudos em ordem temporal da aplicação de *Aspergillus niger* e outros fungos na solubilização de rocha e outras fontes de fosfato insolúvel.**

Agnihotri (1970) avaliou a capacidade solubilizadora de 18 espécies fúngicas do solo e observou que a porcentagem de P solubilizada variou de 0 a mais de 80% para fosfato tricálcio e fluorapatita e de 0 a 58% para hidroxiapatita e poucos fungos foram capazes de solubilizar esta última fonte, Tabela 2.3. Este estudo revelou também que vários fungos não apresentaram ação solubilizadora ou apenas solubilizaram pequenas quantidades de P.

Tabela 2.3 - Ação solubilizadora de fungos isolados de solos canteiros de mudas

Fonte de P	Solubilizadores (total de 18)	Principais solubilizadores (% P solubilizado)
Fosfato tricálcio	78%	<i>Aspergillus niger</i> (88%), <i>Fusarium</i> (80%), <i>Mortierella</i> (78%), <i>Sclerotium</i> (70%)
Fluorapatita	61%	<i>Aspergillus niger</i> (80%), <i>Cylindrocladium</i> (77%), <i>Sclerotium</i> (77%), <i>Penicillium</i> (65%), <i>Verticillium</i> (65%), <i>Trichoderma</i> (20%)
Hidroxiapatita	61%	<i>Aspergillus niger</i> (59%), <i>Sclerotium</i> (50%), <i>Cylindrocladium</i> (21%), <i>Mortierella</i> (25%)

Fonte: Modificada de AGNIHOTRI (1970).

Vazquez et al. (2000) propuseram que a produção de ácidos orgânicos por microrganismos da rizosfera de manguezais decorreu em decorrência de possíveis mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato de cálcio insolúvel. Para isto trabalharam com 6 espécies de bactérias, sendo elas, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus licheniformis*, *Vibrio proteolyticus*, *Paenibacillus macerans*, *Xanthobacter agilis* e uma espécie de fungo, *Aspergillus niger*. Os autores verificaram que todas as espécies de bactérias foram capazes de solubilizar fosfato insolúvel, embora em graus diferentes, sendo *V. proteolyticus* a espécie mais ativa na solubilização seguida da *X. agilis*. Em média, a solubilização em meio marinho do fungo *A. niger* foi superior a qualquer espécie de bactéria. Obtiveram ainda, por meio de cromatografia gasosa, a identificação dos ácidos orgânicos produzidos. Para as bactérias os ácidos mais comuns produzidos foram láctico, succínico, isobutírico, isovalérico e ácido acético. Para o fungo, segundo Vazquez, apenas foi detectado a produção de ácido succínico.

Em outros estudos envolvendo bactérias, os ácidos orgânicos identificados foram: o ácido maléico, cítrico, láctico, xálico, tartárico, sucínico e glucônico (ILLMER; SCHINNER, 1992; HAQ et al., 2002).

Sudhakara Reddy et al. (2002) testaram a solubilização de rocha fosfática pela utilização de isolados de *Aspergillus tubingensis* e *Aspergillus niger* a partir da rizosfera do solo de plantações de eucalipto em Punjab - Índia. Os autores avaliaram a capacidade de solubilização em meio Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948) na presença de 2% de rocha fosfática. A redução do pH foi observada para todos os isolados, no entanto, nem uma relação significativa poderia ser estabelecida entre a quantidade de fosfato solubilizado e a queda do pH. Relatórios anteriores também mostraram os mesmos resultados (AHMAD; JHA, 1968; NARSIAN; PATEL, 2000). Como resultado obtiveram até 98% de solubilização em mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para *Aspergillus tubingensis* e aproximadamente 75% de solubilização para *Aspergillus niger*.

Sampaio et al. (2003) estudaram o processo de solubilização do fosfato de rocha fosfática do tipo "Tapira" por fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* através de fermentação submersa. Avaliaram a influência das variáveis experimentais temperatura (°C), concentração de rocha (g/L), substrato (g/L) e granulometria (Mesh) realizando um planejamento composto central (PCC). Avaliaram também duas fontes de substrato (sacarose e melão). Constataram que a produção de P solúvel utilizando sacarose como substrato foi superior ao melão, mesmo assim o melão demonstrou ser uma boa opção econômica como fonte de carbono. Dentre as espécies fúngicas os *A. niger* obtiveram as maiores taxas de solubilização, 1647 µg/mL PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Os valores ótimos das variáveis experimentais foram: substrato = 26,1 g/L, granulometria = 287 Mesh, temperatura = 34,0 °C e rocha = 7,86 g/L.

Barroso e Nahas (2005) selecionaram 33 isolados fúngicos de um Nitossolo Vermelho, sendo que 12 se sobressaíram por sua maior capacidade de solubilização, mas apenas 1 isolado fúngico solubilizou todos os fosfatos inorgânicos (Ca, Fe e Al) em quantidade acima de 1000 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> mL<sup>-1</sup> em meio de cultura líquido.

Chuang et al. (2007) isolaram dentre 187 fungos dois da espécie *A. niger* com potencial de solubilização. Foi estudada a capacidade de solubilização utilizando como fonte de P nas formas de cálcio (Ca-P), ferro (Fe-P), e alumínio (Al-P) em meio líquido contendo sacarose com substrato. No meio com Ca-P a solubilização alcançou aproximadamente valores de 322 µg mL<sup>-1</sup> e redução de pH de 4,2 para 2,3 em 72 horas, enquanto que pequenas quantidades de P foram liberados de Fe-P e Al-P. Com Ca-P, ácido glucônico foi predominantemente produzido pelos fungos, enquanto que o ácido oxálico predominou com Fe-P e Al-P.

Bojinova et al. (2008) trabalhando com 5 isolados de *Aspergillus niger* na solubilização de rocha fosfática em meio líquido com 0,75 % de rocha como única fonte de fosfato (meio B), em ensaios com período de 10 dias avaliaram o tempo de bioconversão do fósforo (medido em  $P_2O_5$ ), a produção de ácido cítrico (g/L), o consumo do substrato (glicose g/L) e o pH do meio. Obtiveram em seus resultados teores máximos de solubilização de 84,7% e 87,8% de  $P_2O_5$ , sendo os valores em solução de 1,91 e 1,98 g/L de  $P_2O_5$ . O substrato sofreu redução de 120 g/L (valor inicial) para valores entre 20 a 40 g/L ao final dos ensaios. Neste estudo uma correlação entre o fosfato solubilizado e a produção de ácido cítrico durante a bioconversão foi observada. No entanto, o aumento da solubilidade não está relacionado com o aumento da concentração do ácido cítrico. A produção de ácidos orgânicos, medidos em ácido cítrico, alcançaram valores ao final dos experimentos entre 4 a 16 g/L. Valores de pH variaram em valores de 2,80 a 3,23.

Saber et al. (2009) avaliaram *A. niger* e *Penicillium* sp. como inoculantes em *Vigna radiata* (L.) R. Plantas Wilczek e encontraram um aumento de P solúvel com fosfato tricálcico ( $211 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), fosfato de alumínio ( $104 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), rocha fosfática ( $99 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e de fosfato de ferro ( $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Ogbo (2010) utilizando 2 fungos, caracterizados como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, isolados a partir da casca de mandioca em decomposição, trabalhou na conversão de resíduos da mandioca por meio da técnica de fermentação semi-sólida para produção de biofertilizantes fosfatados. Os isolados solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$  em meio Pikovskaya líquido, um processo que foi acompanhado pela produção de ácido orgânico. O meio para a fermentação foi composto de 1% de mandioca crua como amido, excrementos de aves 3% como nutrientes do solo e 96% (0,5-1,5 mm) de casca seca de mandioca. O processo fermentativo foi por período de 14 dias e como resultado o *A. fumigatus* obteve 41 mg/L, 10 mg/L e 4 mg/L enquanto o *A. niger* liberou 47 mg/L, 10 mg/L e 6 mg/L de fosfato solúvel, respectivamente a partir de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$ . A ordem de solubilização dos fosfatos foi de  $\text{Ca} > \text{Al} > \text{Fe}$ . Em outro trabalho (GUPTA et al., 2010), avaliaram a capacidade do fungo *Aspergillus* sp em solubilizar rocha fosfato (Índia), e obtiveram valores variando de 45,2 a 54,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  P solúvel.

Rinu e Pandey (2010) avaliaram a solubilização de fosfato tricálcico em temperaturas diferentes, utilizando dez espécies de *Aspergillus* isolados a partir de amostras de solo coletadas em diferentes locais da região do Himalaia no Índico. As culturas foram testadas em caldo Pikovskaya contendo fosfato tricálcico para determinação quantitativa da solubilização. Como resultados obtiveram solubilização de fosfato por várias espécies de *Aspergillus*



variando entre 374 µg/mL (*A. candidus*) para 1394 µg/mL (*A. niger*) a 28 °C, 33 µg/mL (*A. fumigatus*) para 2354 µg/mL (*A. niger*) a 21 °C, 93 µg/mL (*A. fumigatus*) para 1452 µg/mL (*A. niger*) em 14 °C e 21 µg/mL (*A. wentii*) para 83 µg/mL (*A. niger*) a 9 °C. Aos 21 e 28 °C, a solubilização de fosfato mostrou-se diminuir dentro de 4 semanas de incubação, ao passo que a 9 °C e 14 °C, continuou ainda até 6 semanas de incubação. Em geral, solubilização de fosfato pelas diferentes espécies de *Aspergillus* foi gravada com um máximo de 28 °C ou 21 °C, onde a produção de biomassa foi favorecida a 21 °C e 14 °C.

Schneider et al. (2010) relataram a utilização de ácido orgânico produzidos por micro-organismos, nomeadamente *Aspergillus niger*, no qual, apresentaram como uma alternativa sustentável ao uso de ácidos inorgânicos fortes. Mediram a eficiência de mobilização de fósforo em tratamentos biológicos com *A. niger* cultivados em presença de rocha fosfática (RP). Os resultados mostraram que a adição de diferentes RP para cultivo conduziram a diferenças significativas no perfil de ácidos orgânicos produzidos por *A. niger*. Adições de rochas ígneas, especialmente com elevadas quantidades de ferro e manganês, contribuíram para a redução da concentração do ácido cítrico. Apesar desta diferença, a mobilização do fósforo foi semelhante entre os tratamentos. Além do ácido cítrico, foi sugerido que o ácido oxálico contribui para a solubilização de RP em cultivo direto com *A. niger*. O estudo foi realizado usando RP de diferentes composição e origem, rocha fosfática de origem sedimentar (Carolina do Norte, EUA) foi comparada com rochas fosfáticas de origem ígnea (Catalão, Brasil) e Kapuskasing, Ontário, Canadá. A Tabela 2.4 apresenta os resultados do trabalho, sendo, fosfato de cálcio tribásico (T) padrão e três fosfatos de diferente fontes, Carolina do Norte (NC), Kapuskasing (K) e Catalão (C) foram testadas por período de 8 dias de incubação em meio líquido.

Tabela 2.4 - Resultados das análises, Schneider et al (2010)

Ensaio	pH final	AC (g/L)	AG (g/L)	AO (g/L)	Biomassa (g)	Fósforo mg/L
T	3,27	3,3	35	< 0,05	0,64	2111
NC	3,28	2,0	15,9	< 0,05	0,46	382
K	2,57	0,4	1,7	< 0,05	0,55	306
C	2,62	1,2	2,7	< 0,05	0,40	281

Legenda: Acido cítrico (AC); Acido glutâmico (AG); Acido oxálico (AO).

Shrivastava et al. (2011) trabalhando com *Aspergillus niger* e *Penicillium oxalicum* (isolados da rizosfera de manguezais e plantas de arroz), mantidos em meio Pikovskaya,

avaliaram a produção de fosfato de estrume enriquecido utilizando fosfato de rocha de baixo teor, de origem sedimentar. O estudo de laboratório revelou que um mês de incubação foi o tempo suficiente para a produção de fertilizantes fosfatados de boa qualidade. Também verificaram quanto maior a população de microrganismos solubilizadores de fosfato maior foi à atividade da fosfatase. Observaram a redução do pH do meio devido a produção de ácidos orgânicos no processo de biossolubilização. Os resultados deste estudo revelaram que o P enriquecido melhorou as propriedades biológicas do solo em termos de atividade da fosfatase e conseqüentemente maior absorção pelas plantas de P do solo.

Vassilev et al. (2012) realizando um curto resumo das tendências atuais e futuras em isolamento, desenvolvimento e aplicação de P de microrganismos solubilizadores de fosfato relataram estudos recentes realizados por (SINGH et al., 2011), no qual estes autores, trabalhando na região do Ártico, encontraram entre 21 fungos isolados duas cepas de *Aspergillus niger* eficientes que demonstraram atividade de solubilização excelente a 20 °C, na presença de fosfato de tricálcico. Foi à primeira investigação de fungos solubilizadores de fosfato em solos do Ártico. As cepas de *A. niger* obtiveram quantidades de 285  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 265  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfato solúvel a partir de 0,5% de fosfato tricálcico em 7 dias.

Coutinho et al. (2012) trabalhando com *Aspergillus* e *Penicillium* spp avaliaram a capacidade potencial de 10 isolados fúngicos na solubilização dos fertilizantes superfosfato simples (SSP) e mono-amônio fosfato (MAP), em quatro períodos (1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação). Verificaram que 90% dos isolados apresentaram potencial de solubilização do SSP e MAP no sétimo dia de avaliação. Esta redução pode ser atribuída ao aumento na biomassa fúngica, o que resultou em uma maior captação de fosfato solúvel para o crescimento. Um isolado destacou-se dos demais por apresentar valores de P solúvel (56 e 84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), demonstrando que estes fungos podem contribuir para solubilização de fontes de fosfato, contribuindo para uma melhor utilização dos fertilizantes SSP e MAP e reduzindo os custos dos insumos agrícolas e o impacto causado por excesso de fósforo.

## 2.3 - Minério fosfático

### 2.3.1 - Geologia

Grande parte dos minerais-minérios fosfáticos pertence ao grupo das apatitas, segundo forma geral  $\text{Ca}_5\text{X}(\text{PO}_4)_3$ , podendo o X representar  $\text{F}^-$  (fluorapatita),  $\text{OH}^-$  (hidroxiapatita) e  $\text{Cl}^-$  (cloroapatita).

O minério utilizado no trabalho foi a fluorapatita fornecido pelo Complexo de mineração de Tapira, Vale Fertilizantes S/A. A Vale por concessão explora parte das jazidas do Complexo Carbonatítico do Barreiro, situado em Araxá - MG, distante 340 km a oeste de Belo Horizonte.

O Complexo Carbonatítico do Barreiro tem forma aproximadamente circular com 4,5 km de diâmetro. O perfil geológico das jazidas, resultante da ação do intemperismo, consiste de três zonas portadoras de apatita dividida em três tipos de minérios, Tabela 2.5.

(i) Minério oxidado - contendo elevado teor de apatita e óxidos de ferro, e baixo teor de carbonatos, pode ainda ser classificado em dois subtipos, argiloso e cimentado. O minério mais argiloso é friável e possui teores de  $P_2O_5$  apatítico em torno de 10%, o minério cimentado é mais coeso, possui teores de  $P_2O_5$  apatítico acima de 15% e é frequentemente recortado por veios de barita.

(ii) Minério micáceo e carbonático – contém elevada percentagem de minerais do grupo da mica (vermiculita, hidrobiotita e clorita).

(iii) Minério carbonático – contém tanto calcita quanto dolomita.

Tabela 2.5 – Composições mineralógicas médias (%) dos diferentes tipos de minério da mina de Araxá, MG.

Minerais	Minério Oxidado	Minério Micáceo	Minério Carbonático
Apatita	32,5	24,3	26,6
Barita	7,1	0,2	2,3
Carbonatos	2,9	3,0	18,7
Óxidos de Ferro	27,4	21,5	15,6
Micas	10,0	37,3	26,2
Outros	20,1	13,7	10,6

Centro de Tecnologia Mineral (, 2002).

### 2.3.2 - O complexo de mineração de Tapira e o processo de concentração do minério fosfático

O complexo de mineração de Tapira, em Minas Gerais, da Vale/Fosfertil, é o maior produtor de rocha fosfática do Brasil, com linha de produção de concentrado fosfático, com capacidade anual de produção de 2.030.000 toneladas de concentrado fosfático e com perspectiva de aumento 200.000 toneladas até 2013 (KULAIIF, 2009). Sua mina apresenta uma capacidade de produção de 16,5 milhões de toneladas anuais de rocha bruta (ROM), o que a posiciona em 11º lugar entre as 200 maiores minas brasileiras. Segundo a comissão de valores mobiliários CVM/IAN Fosfertil (2008), a vida útil da reserva desta mina está

estimada em 65 anos. A usina que integra este complexo apresenta operações de moagem, deslamagem e flotação. Os produtos da usina se dividem entre o concentrado fosfático convencional, com teor de 35,8% de  $P_2O_5$ , constituindo 95% do total, e o concentrado ultrafino, com teor de 35,2% de  $P_2O_5$ . Estes produtos são enviados ao complexo industrial de Uberaba, a 120 km, o primeiro transportado por mineroduto e o segundo por rodovia, para serem utilizados na produção de ácido fosfórico e fertilizantes (KULAIF, 2009).

O processo de concentração do minério bruto (ROM), proveniente da mina, realizado pelo complexo de mineração de Tapira, segue de modo simplificado pelas seguintes etapas:

- 1° etapa - Britagem primária, britagem secundária, peneiramento e homogeneização.
- 2° etapa - Moagem primária, moagem secundária, separação magnética e classificação.
- 3° etapa - Flotação de Barita, flotação da apatita grossa, flotação de apatita remoída, flotação da apatita fina.
- 4° etapa - Espessamento, filtragem e secagem.

Ao final do processo obtém-se o concentrado apatítico grosso (GCA) e o concentrado apatítico fino (FCA). A Figura 2.5 representa o fluxograma do processo de concentração do minério fosfático.

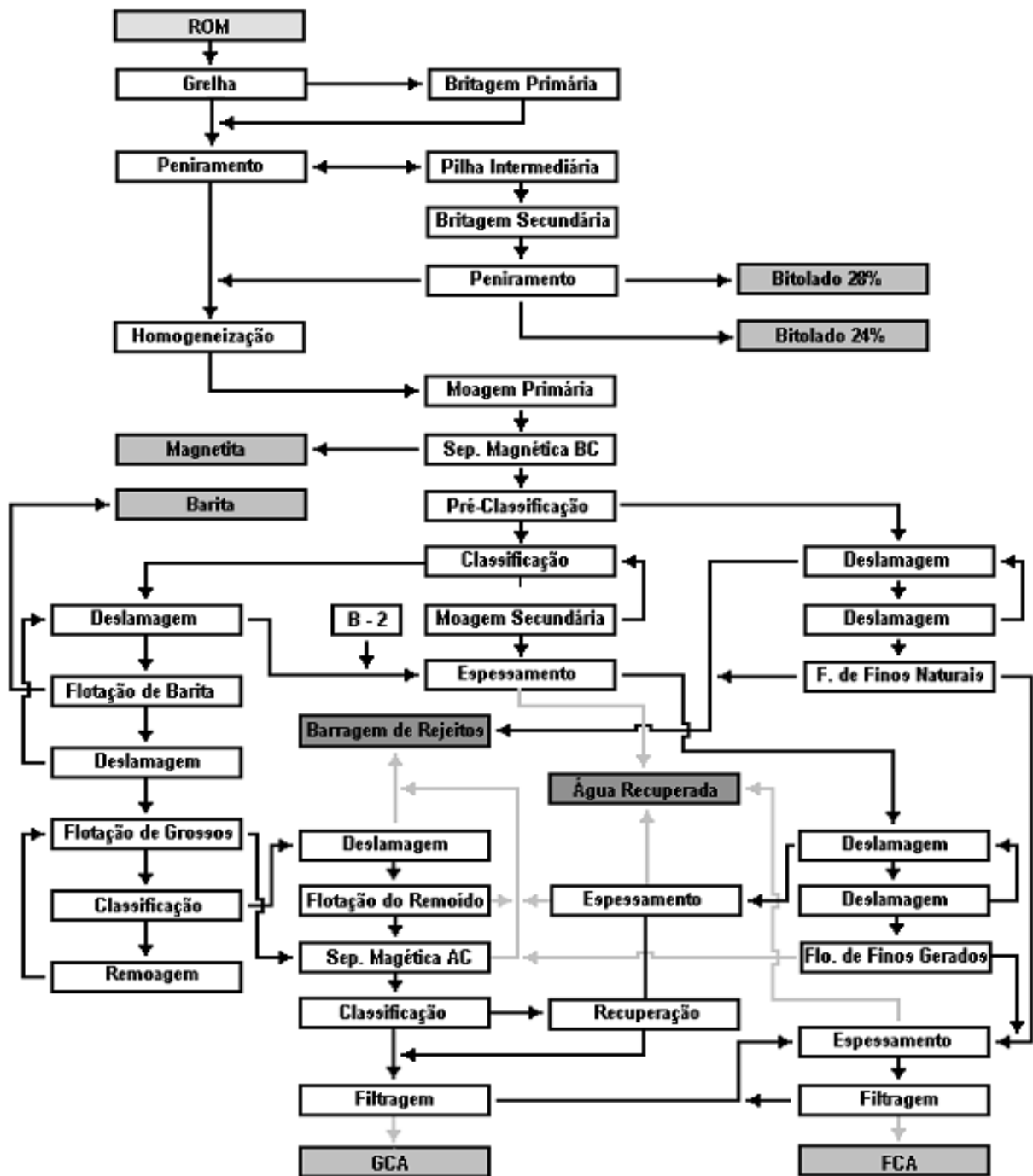
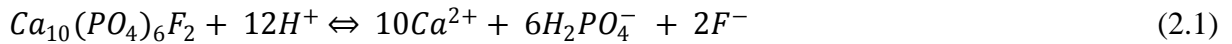


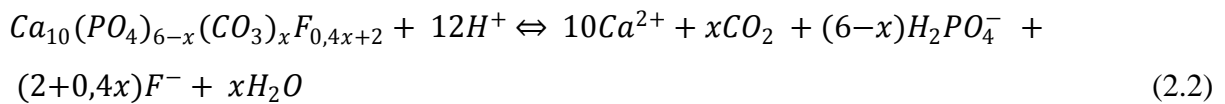
Figura 2.5 – Fluxograma da usina de beneficiamento de rocha fosfática da usina de Araxá da Serrana Fertilizante S.A, atual Vale Fertilizantes (CETEM, 2002).

### 2.3.3 - Solubilização da fluorapatita

A reação de dissolução da fluorapatita em meio ácido é representada simplificada pela Equação 2.1, com a formação do anion fosfato  $H_2PO_4^-$ . Maiores detalhes do equilíbrio eletrolítico do fósforo em meio líquido consultar APÊNDICE 1.



A reatividade e a cristalinidade das rochas estão relacionadas com o grau de substituições isomórficas, principalmente de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  mais F. Estas substituições ocorrem no momento da formação da rocha. Deste modo, a equação química anterior pode ser descrita de uma forma mais geral como apresentada na Equação 2.2:



Sendo:

x = números de  $\text{CO}_3^{2-}$  que substituem isomorficamente  $\text{PO}_4^{3-}$

#### 2.3.4 - Fertilizantes fosfatados

As plantas absorvem o Fósforo da solução do solo nas formas dos íons  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Após absorvido pela planta, o P permanece na forma de fosfato, não modificando seu estado de oxidação. Contudo, os solos brasileiros geralmente são deficientes em fósforo e têm capacidade de reter este nutriente em formas não disponíveis para as plantas. Assim, há necessidade de adubações fosfatadas frequentes para que os rendimentos das culturas sejam economicamente viáveis.

A matéria prima dos adubos fosfatados é a apatita. Esta para se transformar em adubos solúveis deve ser acidulada, ou moída para aplicação direta, como fosfato natural. A seguir são apresentadas as várias reações para obtenção dos diferentes fertilizantes, Equações 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9 respectivamente.

(a) Mono - amônio fosfato (MAP)



A indústria de formação do ácido fosfórico é a maior produtora de gesso (sulfato de cálcio), que é um resíduo do processo.

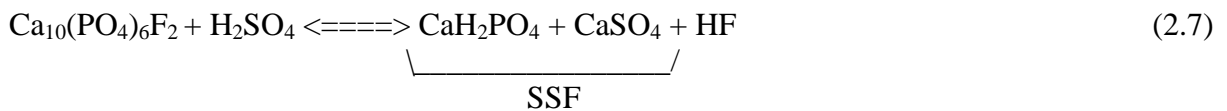


(b) Di – amônio Fosfato (DAP)



(c) Super Fosfato Simples (SSF)

Numa rota química diferente a apatita ao ser acidulada com ácido sulfúrico, dá origem ao SSF, constituído de um fosfatomonocalcil mais gesso.

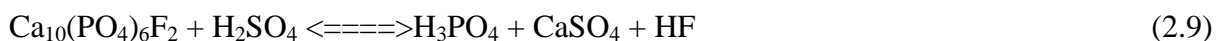


(d) Super Fosfato Triplo (STF)

A apatita é acidulada com ácido fosfórico:



(e) Ácido Fosfórico



## 2.4 - Tratamentos estatísticas e planeamento experimental

### 2.4.1 – Anova

A análise de variância (Anova) é um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre médias oriundas de grupos diferentes, também chamados de tratamentos. Para montagem do quadro de Anova, Tabela 2.6, seguem as equações 2.10, 2.11, 2.12 e 2.13 respectivamente.

$$\text{Soma dos quadrados total} = SQTOT = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^b (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (2.10)$$

$$\text{Soma dos quadrados dos tratamentos (i)} = SQT = b \sum_{i=1}^t (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \quad (2.11)$$

$$\text{Soma dos quadrados dos blocos (j)} = SQB = t \sum_{j=1}^b (\bar{y}_j - \bar{y})^2 \quad (2.12)$$

$$\text{Soma dos quadrados do resíduo ou do erro} = SQR = SQTOT - SQT - SQB \quad (2.13)$$

Notação:

$\bar{y}_j$  = Média de bloco;

$\bar{y}_i$  = Média de tratamento;

$y_{ij}$  = Experimento (observação de um ponto);

$\bar{y}$  = Média geral;

$b$  = Número de blocos;

$t$  = Número de tratamentos.

Tabela 2.6 - Quadro de análise de variância

Causas de variação	gl	SQ	QM	$F_t$
Tratamentos	$(t - 1)$	SQT	$QMT = SQT / (t - 1)$	$QMT / QMR$
Blocos	$(b - 1)$	SQB	-	
Resíduo	$(t - 1)(b - 1)$	SQR	$QMR = SQR / (t - 1)(b - 1)$	
Total	$tb - 1$	SQTOT		

Legenda: gl - graus de liberdade; SQ - soma dos quadrados; QM - soma dos quadrados médios;  $F_t$  - Razão.

Os resultados de  $F_t$  serão comparados com valores tabelados da distribuição  $F$  para 5% ou 1% de significância. Para  $F_t > F$  tabelado concluíam-se que existe diferença entre tratamentos, caso contrário os tratamentos serão estatisticamente iguais.

Quando é feita a análise de variância (Anova) de um experimento com apenas dois tratamentos, podemos visualizar apenas pela média qual o melhor tratamento. Porém, quando há mais de dois tratamentos, fazendo apenas o teste de “ $F$ ” (teste que mostra se existe



diferença entre as médias dos tratamentos) não podemos indicar qual o melhor tratamento caso exista diferença entre eles ao nível de significância estipulado. Neste caso, é necessário aplicar testes de comparação entre médias de tratamentos.

#### 2.4.2 - Teste de Tukey

Existem diversos métodos de comparação entre médias. Como exemplo, podemos citar os métodos de Scheffé, Tukey, Dunnett, Duncan e Scott-Knott (Chew, 1977). Dentre todos os métodos de separação de médias, pode-se observar uma predominância no uso do método de Tukey em experimentos citados na literatura.

O método de Tukey tem a característica principal comparar as diferenças absolutas (em módulo) entre as várias médias dos tratamentos tomadas duas a duas a um valor delta ( $\Delta$ ), previamente calculado, podendo haver sobreposição entre os grupos de médias encontrados, ou seja, um mesmo tratamento pode pertencer a dois grupos de tratamentos (CANTERI et al., 2001).

Sendo o  $\Delta$  calculado pela Equação 2.14 (PIMENTEL GOMES, 1987; BANZATTO; KRONKA, 1995; SILVA; SILVA, 1999).

$$\Delta = q \sqrt{\frac{QMR}{n}} \quad (2.14)$$

Sendo:

q = amplitude total studentizada, valor obtido em uma tabela de dupla entrada com o grau de liberdade do resíduo e o número de tratamentos.

QMR = quadrado médio do resíduo, Tabela 2.6;

n = número de observações por tratamento (repetições).

Serão consideradas significativas ao nível de significância pré-determinado ( $\alpha$ ) aquelas diferenças entre as médias cujo valor absoluto for maior que o  $\Delta$  calculado.

A Figura 2.6 representa um exemplo hipotético com 8 médias colocadas em ordem crescente (1,2,3,4,5,6,7,8). Aplicando o teste de Tukey inicialmente comparando a média 1 com as demais médias, verifica-se que não existe diferença significativa entre as médias 1 e 2, enquanto a média 1 com as demais médias foram significativamente diferentes. Obtendo-se

assim o primeiro grupamento (1a, 2a). Em seguida é feita a comparação entre a média 2 com as demais médias e observa-se que não existe diferença entre elas. Obtendo-se o segundo grupamento (2b,3b,4b,5b,6b,7b,8b) encerrando o teste. Caso a análise tivesse dado diferença em algum ponto o teste seria novamente realizado entre a média 3 com as demais médias, e assim por diante. Pode-se observar pelo exemplo a ambiguidade da média 2 que faz parte dos dois grupamentos.

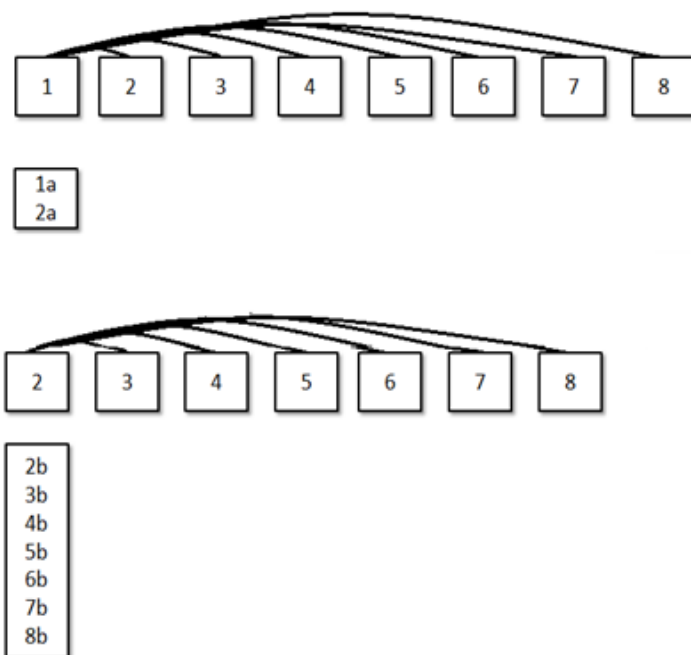


Figura 2.6 - Algoritmo para classificação pelo método de Tukey representando o teste média a média (CANTERI et al., 2001).

### 2.4.3 - Teste de Scott - Knott

Os procedimentos de comparações múltiplas, como o teste de Tukey, são apresentados detalhadamente e com grande diversidade nos diversos textos de estatística experimental, o que facilita suas utilizações pelos pesquisadores de diferentes áreas, tendo em vista, em grande parte, as suas disponibilidades na maioria dos *softwares* estatísticos. Entretanto, muitas vezes o usuário tem dificuldade na interpretação dos resultados, principalmente se o número de tratamentos for grande e também existir ambiguidade entre os tratamentos.

Com o objetivo de eliminar a ambigüidade e garantir uma separação real de grupos de médias, foram propostos na literatura métodos aglomerativos, e dentre eles destaca-se o apresentado por Scott - Knott (1974). O teste de Scott - Knott foi comparado por Silva (1998)

com o teste de Tukey, t, Scheffé, Newman Keuls modificado e tbayesiano. Com relação à precisão, número de tratamentos, número de repetições e nível de significância, através de estudo de simulação, sendo avaliado quanto ao poder e taxas de erro do tipo I (rejeitar a hipótese de nulidade quando a mesma é verdadeira, também chamado de falso positivo). De acordo com os resultados obtidos, o aumento do número de tratamentos do experimento afetou o desempenho dos testes, destacando-se o teste de Scott - Knott, por ser o mais poderoso e por controlar adequadamente as taxas de erro do tipo I, apesar de a taxa de erro por experimento aparentemente apresentar valores um pouco acima do nível de significância nominal do teste.

Verifica-se que o teste de Scott - Knott por apresentar uma real separação dos grupos de média (eliminando ambiguidade), o que sem dúvida facilita a comparação entre os níveis dos tratamentos, auxilia o pesquisador na discussão de seus resultados e na tomada de decisões.

A principal desvantagem é que esse método possui cálculos mais complexos do que os outros métodos. Mas com os computadores houve mais agilidade no processo de análise, deste modo, o método de Scott-Knott tornou-se uma alternativa viável aos pesquisadores que na maioria das vezes preferem resultados mais diretos e mais fáceis de serem interpretados.

Para aplicação do método ordenam-se as médias dos tratamentos em ordem crescente realizando em seguida testes estatísticos para encontrar conjuntos ou grupos de médias de tratamentos, por meio das Equações 2.15 e 2.16 sugeridas pelos desenvolvedores do método (SCOTT; KNOTT, 1974).

$$\lambda = \frac{\pi B_0}{2\sigma_0^2(\pi - 2)} \quad (2.15)$$

Sendo:

$B_0$  = valor máximo da soma dos quadrados entre os grupos de todas as possíveis partições dos tratamentos.

$$\sigma_0^2 = \frac{\sum_1^t (y_i - \bar{y})^2 + \mathcal{V}_{S_x}^2}{(t + \mathcal{V})} \quad (2.16)$$

Sendo:

$y_i$  = média do i-ésimo tratamento;

t = número de médias de tratamentos sendo separados;

$s_x^2$  = variância de uma média de tratamento (quadrado médio do erro/r);

$\mathcal{V}$  = graus de liberdade do quadrado médio do erro;

r = número de observações em cada média.

Calcula-se  $B_0$  para todas as possíveis partições entre as médias. Considera-se, dentre todas as possíveis partições, aquela que apresentar o maior valor de  $B_0$ , obtendo-se dois grupos distintos de médias. Calcula-se para essa partição o valor de  $\lambda$  em seguida é feita uma comparação do valor deste com o valor tabelado de qui-quadrado ( $X^2$ ).

Se  $\lambda$  for menor que o valor de  $X^2$ , as médias dos dois grupos são consideradas homogêneas e nenhum teste é mais necessário. Ao contrário, se  $\lambda$  for maior que o valor de  $X^2$  os grupos de médias são considerados diferentes. Neste caso, repetem-se todos os cálculos para cada um desses dois grupos de médias até que se encontrem grupos onde as médias possam ser consideradas homogêneas (CANTERI, et al.2001).

Todas as ramificações dos grupos de médias que vão se formando, têm que ser analisadas. A Figura 2.7 demonstra um experimento hipotético com 8 médias colocadas em ordem crescente (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Após os cálculos iniciais, as fórmulas acusaram uma diferença entre o grupo das cinco primeiras médias (1, 2, 3, 4, 5) com o grupo das três últimas (6, 7, 8). Inicialmente o algoritmo separa as médias em dois grupos e prossegue as análises dentro de cada grupo, lembrando que as médias num mesmo grupo são consideradas homogêneas. Executando os cálculos para o grupo com as médias 1, 2, 3, 4, 5 o resultado indicou que havia diferença entre o grupo das médias 1, 2, 3 com o grupo com as médias 4, 5. Prosseguiram-se os cálculos dentro do grupo 1, 2, 3 e obteve uma diferença entre os grupos das médias 1, 2 com o grupo da média 3. Após os testes, o grupo das médias 1 e 2 foi considerado homogêneo e encerrou-se o particionamento nesta ramificação. Todas as outras ramificações restantes foram analisadas até que não houvesse diferenças entre as médias ou que restasse apenas uma média no grupo. O passo seguinte foi o teste do grupo que continha a média 3. Verificado que esta média era única no grupo, passou-se para o grupo que continha as médias 4 e 5 e assim sucessivamente para os outros grupos. Na Figura 2.7 estão representados todos os caminhos que foram percorridos para que o algoritmo fizesse a classificação das médias em 5 grupos. Os grupos estão representados por meio de letras, uma para cada grupo de média.

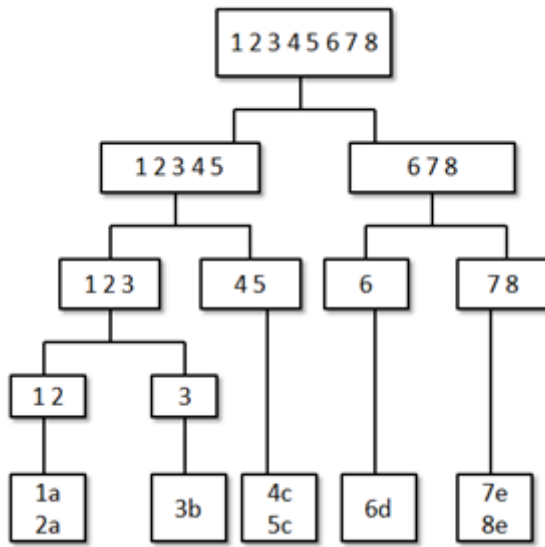


Figura 2.7 - Algoritmo para classificação pelo método de Scott-Knott (CANTERI et al., 2001).

#### 2.4.4 – Planejamento Experimental

O planejamento experimental é, por definição, a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas. Constitui uma ferramenta estatística que pode ser utilizada para otimizar as grandezas de interesse, determinar as variáveis influentes sobre essas grandezas, eventualmente das suas interações no desempenho de um processo. Este planejamento permite ao experimentador diminuir o número de ensaios, estudar um número considerável de fatores, detectar as interações entre as variáveis estudadas, detectar os valores ótimos destas variáveis, melhorar a precisão dos resultados e otimizar os resultados (MONTGOMERY, 1999).

##### 2.4.4.1 – Delineamento composto central rotacional

Delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) são planejamentos fatoriais de 1ª ordem aumentada por pontos adicionais para permitir a estimação dos parâmetros de uma superfície de 2ª ordem, (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Este planejamento é composto de um planejamento fatorial  $2^k$  ou fatorial fracionário (níveis codificados -1 e +1) aumentado pelos pontos da Figura 2.8.

	X1	X2	X3	X <sub>k</sub>
	0	0	0	.....0
	- α	0	0	.....0
	+α	0	0	.....0
	0	- α	0	.....0
	0	+α	0	.....0
	0	0	- α	.....0
	0	0	+α	.....0
	0	0	0	.....-α
	0	0	0	.....+α

Figura 2.8 - Acréscimo de pontos no planejamento fatorial  $2^k$ .

A representação matemática é dada pela Equação 2.17.

$$2^k + n_2 + 2 \cdot k \quad (2.17)$$

Sendo:

k- número de variáveis de estudo;

$n_2$ - número de réplicas no ponto central.

Para o caso da aplicação do DCCR com 3 variáveis de estudo, a Equação anterior dará  $2^3 + 2 + 2 \cdot 3 = 16$ , 16 experimentos a serem realizados ao adotar duas réplicas no ponto central.

Para a realização destes experimentos é constituída a matriz do planejamento, de acordo com a Figura 2.9, ao ser definido os níveis -1, +1, 0, +α e -α das variáveis estudadas.

- 1	- 1	- 1	} Planejamento Fatorial 2 <sup>k</sup>
- 1	- 1	+ 1	
- 1	+ 1	- 1	
- 1	+ 1	+ 1	
+ 1	- 1	- 1	
+ 1	- 1	+ 1	
+ 1	+ 1	- 1	
+ 1	+ 1	+ 1	
- α	0	0	} Pontos Axiais 2.K
+ α	0	0	
0	- α	0	
0	+ α	0	
0	0	- α	
0	0	+ α	} Pontos Centrais
0	0	0	
0	0	0	

Figura 2.9 – Esquema do DCCR.

#### 2.4.4.2 – Padrão da Análise Estatística de Respostas do DCCR

A análise estatística dos dados é efetuada através de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das variáveis estudadas. A equação empírica de 2ª ordem proposta para representar cada uma das respostas segue a forma da Equação 2.18, para um exemplo com 3 variáveis independentes.

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1^2 + iX_2^2 + jX_3^2 \quad (2.18)$$

Sendo:

Y = resposta estudada;

$\beta_0$  = valor médio da resposta;

a,b,c,...j = constantes ou parâmetros da equação;

$X_1$  = variável estudada 1;

$X_2$  = variável estudada 2;

$X_3$  = variável estudada 3.

A esta Equação são aplicados os resultados obtidos e feita uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros através dos valores de t de Student para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância (p) superior a 1%, 5% ou 10%, dependendo do rigor necessário na análise efetuada. Deste modo, as variáveis relacionadas a estes são

consideradas não relevantes quando  $p$  superior ao percentual estipulado. Os parâmetros não significativos são eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa apenas os efeitos das variáveis significativas, ou seja, que mais afetam a resposta. O valor do  $R^2$  e a comparação entre  $F$  calculado e  $F$  tabelado são utilizados para constatação da significância ou não do modelo (FELIPE, 1999).

Com o objetivo de verificar o comportamento da resposta estudada, isto é, se ela apresenta ponto de máximo, de mínimo ou não apresenta nem ponto de máximo e nem de mínimo (ponto de sela) é necessário descobrir o ponto estacionário.

Os pontos estacionários são obtidos através da derivada da equação da resposta  $Y$  pela variável  $X_k$ , Equação 2.19.

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (2.19)$$

Aplicando a derivada em  $Y = b_0 + x'b + x'Bx$  obtem-se a Equação 2.20.

$$\frac{\partial Y}{\partial X} = \frac{\partial}{\partial X} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (2.20)$$

Sendo;

$b_0$  o termo independente;

$x'b$  são os termos de 1ª ordem na função de resposta;

$x'Bx$  é a contribuição quadrática.

Desta maneira, o ponto estacionário será dado por:  $X_0 = - (1/2) B^{-1}b$ , em que  $B$  é a matriz ( $k \times k$ ) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex:  $a_{12}$  e  $a_{21}$  correspondem ao coeficiente da interação  $X_1X_2$ ). A matriz  $b$  é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares).

O ponto estacionário ( $X_0$ ) pode ser:

- \* Um ponto onde a superfície atinge um máximo;
- \* Um ponto onde a superfície atinge um mínimo, ou
- \* Um ponto nem de máximo, nem de mínimo  $\Rightarrow$  Ponto de sela (*saddle point*).

Porém, podem existir problemas relacionados a estes pontos estacionários:

- \* Pode existir uma região de máximo e não um ponto de máximo;



\* Pode ser que o ponto estacionário esteja fora da região experimental.

Para determinar a natureza desse ponto estacionário é necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem  $(X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, \dots, 0)$  para o ponto estacionário  $X_0$ , Figura 2.10. Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis,  $w_1, w_2, \dots, w_k$ .

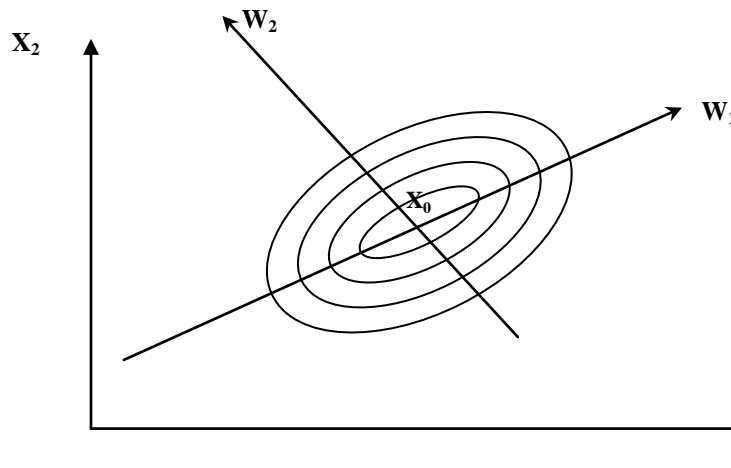


Figura 2.10 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis, Equação 2.21.

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2, \quad (2.21)$$

Sendo:

$y_0$ : é a resposta estimada no ponto estacionário e,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  são constantes.

Os sinais dos  $\lambda$ 's e a grandeza dos  $\lambda$ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os  $w$ 's e os  $x$ 's também são importantes, pois indicam ao pesquisador regiões úteis para exploração.

Quando  $\lambda_i < 0$ , sendo  $i = 1, 2, \dots, k$ , movimentados em qualquer direção a partir do ponto estacionário, proporcionaria um decréscimo de  $Y$ , isto é, o ponto estacionário  $x_0$  é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se  $\lambda_i > 0$ , o ponto estacionário  $x_0$  é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os  $\lambda$ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário  $x_0$  não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Rocha fosfática

A rocha fosfática utilizada no trabalho foi o concentrado fosfático ultrafino (fluorapatita), com teor de 35,7% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, fornecido pelo Complexo de Mineração de Tapira (Vale/Fosfértil), localizado na região do Alto Paranaíba, Estado de Minas Gerais.

A rocha foi acondicionada em potes de polipropileno com rosca e mantidos a  $\pm 4$  °C em refrigerador.

#### 3.2 - Fungo de trabalho

O fungo *Aspergillus niger* foi o micro-organismo escolhido para o trabalho. O mesmo foi fornecido pelo laboratório de Micologia e Proteção de Plantas do Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. O *A. niger* foi encontrado em sementes de soja coletadas em fazendas do município de Uberlândia MG em tempo e locais variados.

##### 3.2.1 - Isolamento e cultivo

O fungo foi isolado das sementes de soja para obtenção das culturas puras. Os cultivos foram realizados por meio de repicagens para manutenção e manipulação dos isolados fúngicos.

Estes procedimentos foram executados em ambiente apropriado, em câmara de fluxo laminar ou próximo a chama do bico de bunsen em ambiente desinfectado com álcool 70 %.

Para o isolamento e o cultivo foram necessários os seguintes materiais: microscópio estereoscópico (lupa), pinça, bico de bunsen, gás, placas de Petri com meio BDA (batata, dextrose e agar), descrito na Tabela 3.1, tubos de ensaio com meio BDA inclinado, alça de repicagem, câmara de fluxo laminar e álcool 70%. O meio semi-sintético BDA foi escolhido pois é considerado meio universal por suportar o crescimento da maioria dos fungos.

Tabela 3.1 - Meio Semi-sintético batata-dextrose-ágar (BDA) sólido<sup>1,2</sup>.

Componente	Quantidade
Extrato de batata (200g/500mL)	500 mL
Dextrose (= D-glicose)	20 g
Ágar	17 - 20 g
Água destilada	1.000 mL

<sup>1</sup> pH = 6,06.

<sup>2</sup> Esterilização via vapor saturado em autoclave pelo tempo de 30 min, 120 °C e pressão de 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>.

Inicialmente as sementes infectadas foram inoculadas em placas contendo meio BDA. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara úmida a  $\pm 25$  °C por período de 1 a 3 dias com a finalidade de se estimular a esporulação.

Após a esporulação foi efetuada a identificação do fungo visualmente com auxílio de lupa. A identificação foi realizada através das características morfológicas do *A. niger*, colônias negras de conídios (esporos), Figura 3.1. Constatou-se a sua presença em 12 placas.



Figura 3.1 – Característica morfológica do *A. niger*.

Finalizada a etapa do isolamento procedeu-se o cultivo de colônias para placas com meio BDA. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 5 a 7 dias a 25 °C. Este cultivo foi realizado com a finalidade de se desenvolver o fungo e observar possíveis contaminações provenientes da semente, Figura 3.2.



Figura 3.2 – Cultivo do *Aspergillus niger* em meio BDA.

Com os isolados fúngicos desenvolvidos foram realizados novos cultivos. Colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Para evitar contaminações nos tubos foram utilizados como rolhas tampões de algodão hidrófobos cobertos por gaze. Em seguida, os tubos foram incubados a 25 °C até que os fungos ocupassem toda a superfície do meio, Figura 3.3.



Figura 3.3 – Cultivo do *Aspergillus niger* em meio BDA inclinado.

Concluídas estas etapas foram obtidos 12 isolados puros, identificados aleatoriamente com números de 1 a 12. Deste modo, o isolado identificado com o número 1 foi denominado de Isolado 1, e assim por diante.

### 3.2.2 - Armazenamento e preservação

Os tubos de ensaio contendo os isolados foram armazenados em refrigerador a  $\pm 4$  °C. Para garantir a viabilidade das culturas foram realizados cultivos periódicos por meio de repicagens de 6 a 6 meses.

Além do armazenamento, foi utilizado óleo mineral 40% (glicerol) previamente esterilizado para cobrir totalmente as colônias contidas nos tubos. Este procedimento tem como objetivo minimizar ou estagnar a multiplicação do fungo sob o óleo, por reduzir a disponibilidade de oxigênio. Esta técnica, segundo vários estudos, faz com que muitas espécies de fungos permaneçam viáveis por meses ou até mesmo anos de armazenamento.

Para reativar o micro-organismo armazenado a 4 °C sob óleo mineral, foi necessário repicar o mesmo para placas com meio BDA e esperar a reativação de crescimento da cultura.

### 3.3 - Avaliação qualitativa

Concluídas as etapas de armazenamento e preservação iniciou-se as etapas de seleção dos isolados fúngicos, segundo a capacidade de solubilização do fosfato insolúvel. Inicialmente os 12 isolados de *A. niger* foram submetidos a avaliação qualitativa de solubilização, com o propósito de identificar quais linhagens possuíam tal capacidade. Para isto foi empregado o meio sintético-seletivo para crescimentos de micro-organismos com capacidade de solubilização de fosfato insolúvel, no caso fosfato tricálcico, Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Meio sintético-seletivo sólido, (PIKOVSKAYA, 1948)<sup>1,2</sup>.

Componente	Quantidade (g/L)
Dextrose (= D-glicose)	10,00
Ágar	15,00
Extrato de Levedura	0,50
Fosfato tricálcico	5,00
Sulfato de Magnésio	0,10
Sulfato de amônio	0,50
Sulfato ferroso	0,0001
Sulfato de manganês	0,0001
Cloreto de potássio	0,20

<sup>1</sup> pH = 4,74.

<sup>2</sup> Esterilização via vapor saturado em autoclave pelo tempo de 30 min, 120 °C e pressão de 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>.

Primeiramente os isolados foram repicados em placas contendo meio BDA a 25 °C por 5 dias para crescimento. Em seguida, foi retirado um disco do meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro contendo filamentos (hifas) do fungo, por meio de um furador cilíndrico

esterilizado previamente por flambagem, Figura 3.4 A. Discos dos 12 isolados foram inoculados em placas contendo meio seletivo, Figura 3.4 B. Em seguida as placas foram incubadas a 25 °C por 48 h. Após este período foi realizada a leitura para observação dos testes positivos, caracterizado pela presença de uma zona translúcida (halo) em torno da colônia fúngica.



Figura 3.4 A - Repicagem do disco.



Figura 3.4 B - Inoculação do disco.

### 3.4 - Contagem de esporos

Todos os ensaios das etapas seguintes foram conduzidos em meio líquido. O agente solubilizador do fosfato de rocha como descrito foi o *A. niger*, inoculado diretamente nos meios líquidos de trabalho.

A inoculação foi realizada através de suspensão de esporos em solução salina 0,85%. Para obtenção da suspensão inicialmente os isolados fúngicos foram inoculados em placas contendo meio BDA. As placas foram mantidas em incubação a 25 °C até que os esporos se formassem em toda superfície do meio. Em seguida, foi utilizado alça de drigalski para raspagem e transferência dos esporos para solução salina.

Para garantir a repetibilidade dos experimentos e padronização de procedimentos foi necessária a quantificação da suspensão de esporos. A quantidade de esporos por unidade de volumétrica, nas suspensões dos inóculos, pode ser estimada mediante o uso de uma lâmina especial denominada de Hemacitômetro ou Câmara de Neubauer, Figura 3.5.

Para quantificar uma suspensão de inóculo, procedeu-se à contagem de esporos, obedecendo aos cuidados descritos em Alfenas e Mafia 2007.

Como as suspensões de esporos obtidas sempre foram muito concentradas utilizou-se o compartimento "C". Efetuando contagens individuais nos quatro subcompartimentos "c" dos cantos e no do centro. Calculou-se a média das cinco contagens e aplicou-se a fórmula: Média do número de esporos em "c" x  $2,5 \times 10^5$  = células/mL.

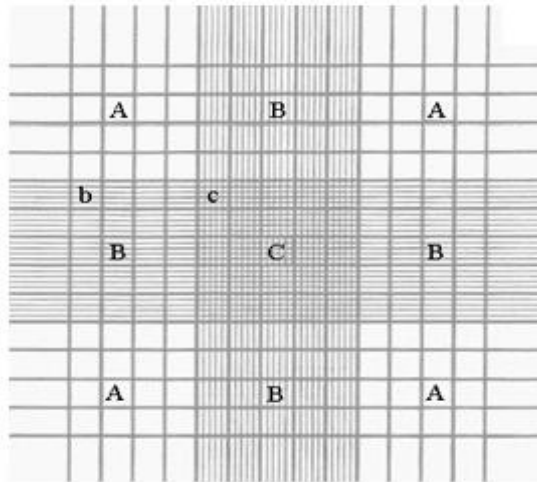


Figura 3.5 - Esquema de uma Câmara de Neubauer: Compartimentos (A, B e C) e subcompartimentos (a, b e c) da lâmina.

### 3.5 - Classificação quantitativa

Os isolados fúngicos marcados pelos testes positivos na avaliação qualitativa foram submetidos à classificação quantitativa, com a finalidade de se identificar entre os isolados aqueles com maior capacidade de solubilização do fosfato de rocha em meio líquido.

Para realização deste ensaio foi preparado o meio seletivo modificado líquido em que o fosfato tricálcico foi substituído pelo concentrado fosfático ultrafino (fluorapatita) a  $\pm 2$  % (SUDHAKARA REDDY et al., 2002), descrito na Tabela 3.3.

Porções de 70 mL do meio modificado foram distribuídas em Erlenmeyers de 125 mL. Os recipientes foram tampados com rolhas de algodão e em seguida esterilizados. Após esfriamento a temperatura ambiente, foram inoculadas aos Erlenmeyers 1 mL da suspensão aquosa contendo inicialmente  $10^6$  esporos dos isolados fúngicos selecionados (SAMPAIO et al., 2003).

Tabela 3.3 - Meio seletivo modificado<sup>1,2</sup>.

Componente	Quantidade (g/L)
Dextrose (= D-glicose)	10,00
Extrato de Levedura	0,50
Rocha fosfática	24,00
Sulfato de Magnésio	0,10
Sulfato de amônio	0,50
Sulfato ferroso	0,0001
Sulfato de manganês	0,0001
Cloreto de potássio	0,20

<sup>1</sup> pH = 7,78.

<sup>2</sup> Esterilização via vapor saturado em autoclave pelo tempo de 30 min, 120 °C e pressão de 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>.

Em seguida foi avaliada a solubilização da rocha fosfática para o tratamento sem agitação, ou seja, o ensaio realizado em completo repouso a 30 °C por 12 dias. Foram realizadas triplicatas para cada isolado, Figura 3.6.



Figura 3.6 - Ensaio para o tratamento sem agitação.

Juntamente com o ensaio anterior foi avaliada a solubilização da rocha fosfática para o tratamento com agitação. Para isto foi utilizado mesa agitadora orbital de agitação horizontal e constante a 120 rpm a 30 °C por 12 dias. Foram realizadas triplicatas para cada isolado, Figura 3.7.





Figura 3.7 - Ensaio para o tratamento com agitação.

Juntamente com os ensaios anteriores foi avaliada a solubilização da rocha fosfática em água. Para isto, foram adicionados 70 mL de água destilada mais a rocha fosfática na concentração de 24 g/L em Erlenmeyer de 125 mL. O recipiente foi tampado com rolha de algodão e em seguida esterilizado. Experimento realizado em triplicata para os tratamentos com e sem agitação por 12 dias a 30°C.

Paralelamente foi avaliada a solubilização da rocha em meio seletivo modificado sem a presença da espécie fúngica. Para isto, foram adicionados 70 mL de meio mais a rocha na concentração de 24 g/L em Erlenmeyer de 125 mL. Experimento realizado em triplicata para os tratamentos com e sem agitação por 12 dias a 30°C.

Concluídos todos os ensaios foram realizadas as análises para determinação do fósforo solúvel, acidez e pH para todas as amostras, Seção 3.11.

Com os resultados das análises de fósforo foram efetuados os tratamentos estatísticos para comparação entre os tratamentos com agitação e sem agitação pelo teste de diferença entre médias. O software Statistica 7.0 foi utilizado na realização dos cálculos.

Para seleção dos isolados fúngicos, os resultados analíticos foram tratados pelo método estatístico de análise de variância (Anova), pelo método de comparação múltipla (teste de Tukey) e o método aglomerativo (teste de Scott - Knott). O software Sisvar foi utilizado para realização dos cálculos.

### 3.6 - Planejamento Experimental

Os 2 isolados fúngicos com melhores desempenhos na classificação quantitativa foram submetidos a um planejamento experimental utilizando se como ferramentas de cálculo os softwares Statistica 7.0 e Maxima.

Visando à otimização das condições operacionais foi realizado um planejamento experimental denominado de delineamento composto central rotacional (DCCR), cujo objetivo foi definir a melhor relação entre as variáveis significativas do sistema, sendo elas, temperatura, concentração de substrato (glicose) e concentração de rocha.

Este tipo de planejamento foi escolhido, pois as outras alternativas de planejamento, tais como, planejamento completo para 3 variáveis,  $2^3$ , teria apenas 8 ensaios e o planejamento fracionado,  $2^{3-1}$ , teria apenas 4 ensaios. Seriam poucas informações para o que se deseja obter, aumentando desta forma o risco (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

De modo geral, num DCCR com 2 níveis originais temos  $2^k$  pontos fatoriais + 2 k pontos axiais (nos extremos) + um número arbitrário de pontos centrais. As variáveis independentes deste processo foram:

T – Temperatura em °C;

S – Concentração de substrato em g/L;

R – Concentração de rocha em g/L.

No planejamento foi adotado como resposta (variável dependente) os resultados de fósforo solúvel em mg/L. Além disto, foram realizadas as análises de pH e acidez do meio.

Os níveis das variáveis estudadas foram codificadas (adimensionalizadas), utilizando a seguinte equação de codificação, Equação 3.1:

$$X_n = \frac{X - X_0}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.1)$$

Sendo:

$X_n$  é o valor da variável na forma codificada;

$X$  é o valor real da variável a ser calculado;

$X_0$  é o valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  é o valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  é o valor da variável no nível inferior.

Foi definido um  $\alpha$  de rotabilidade de 1,68, para que o DCCR fosse "rodável", deste modo, o valor da distância axial dos pontos extremos do planejamento,  $\alpha$ , foi estabelecido aplicando a Equação 3.2:

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad (3.2)$$

Sendo  $k = 3$  (variáveis independentes).

Na Tabela 3.4, estão relacionadas às variáveis de processo e seus respectivos valores, de acordo com os níveis inferiores, centrais e superiores adotados.

Tabela 3.4 - Variáveis estudadas no planejamento e os valores de seus respectivos níveis.

Níveis experimentais	Substrato (g/L)	Temperatura (°C)	Concentração de rocha (g/L)
-1,68	6	25,5	2,6
-1	18	28	5
0	35,5	31,5	8,5
1	53	35	12
1,68	65	37,4	14,4

Para determinação dos valores da Tabela 3.4 foi necessário estimar o ponto central e os pontos dos níveis -1 e 1, simétricos entre si pelo ponto central. Os cálculos dos valores dos extremos foram realizados utilizando-se das Equações 3.1 e 3.2. Os valores estimados foram estabelecidos com auxílio de estudos similares realizados para o mesmo fim, (SAMPAIO et al., 2003).

A Tabela 3.5 apresenta a matriz do planejamento com os valores codificados e reais das variáveis estudadas, considerando 3 pontos no centro.

Tabela 3.5 – Matriz do planejamento experimental.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	T	S	R	T (°C)	S (g/L)	R (g/L)
1	-1	-1	-1	28	18	5
2	-1	-1	1	28	18	12
3	-1	1	-1	28	53	5
4	-1	1	1	28	53	12
5	1	-1	-1	35	18	5
6	1	-1	1	35	18	12
7	1	1	-1	35	53	5
8	1	1	1	35	53	12
9	-1,68	0	0	25,5	35,5	8,5
10	1,68	0	0	37,4	35,5	8,5
11	0	-1,68	0	31,5	6	8,5
12	0	1,68	0	31,5	65	8,5
13	0	0	-1,68	31,5	35,5	2,6
14	0	0	1,68	31,5	35,5	14,4
15	0	0	0	31,5	35,5	8,5
16	0	0	0	31,5	35,5	8,5
17	0	0	0	31,5	35,5	8,5
18	0	0	0	31,5	35,5	8,5
19	0	0	0	31,5	35,5	8,5

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Concentração de rocha (R).

A Tabela 3.5 foi usada como roteiro para montagem dos experimentos. Foi utilizado o meio líquido modificado com a mesma formulação descrita na Seção 3.5, com exceções, para o substrato (glicose) e a rocha fosfática que tiveram concentrações variáveis (de acordo

com os 5 níveis experimentais da Tabela 3.4).

Foram realizados 2 delineamentos compostos centrais rotacionais, um para cada isolado fúngico selecionado na classificação quantitativa. Para cada DCCR foram adicionadas porções de 70 mL dos meios preparados em Erlenmeyers de 125 mL. Os recipientes foram tampados com rolhas de algodão e em seguida esterilizados. Após esfriamento a temperatura ambiente, foram inoculadas aos Erlenmeyers suspensões aquosas de  $10^6$  esporos por mL do isolado selecionado. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada ponto do planejamento em sistema sem agitação por 12 dias nos 5 níveis de temperatura estabelecidos na Tabela 3.4.

Desta forma, o número total de experimentos foi:

$$2^k + 2k + 5 \text{ (pontos no centro)}$$

$$2^3 + 2 \times 3 + 5 = 19$$

$$19 \times 2 \text{ (duplicata)} = 38$$

$$38 \times 2 \text{ (dois isolados)} = 76 \text{ experimentos.}$$

### 3.7 - Avaliação da concentração inicial de esporos

Além das variáveis otimizadas nos planejamentos foram avaliadas posteriormente mais duas variáveis, sendo elas, a concentração inicial de esporos no sistema (dosagem) e o tempo de fermentação.

Para uma percepção significativa da influência da concentração inicial de esporos no sistema foi necessário uma variação da ordem de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  esporos por mL. Estas variações não se encaixam nos níveis estipulados pela Equação 3.1 por não possuírem espaçamentos simétricos em relação ao ponto central, por este fato, esta variável não foi considerada no planejamento.

Foi empregado o meio líquido modificado com a mesma formulação descrita na Seção 3.5, com exceções, para o substrato (glicose) e rocha fosfática que utilizaram as concentrações ótimas identificadas nos planejamentos para cada isolado. Foram introduzidas porções de 70 mL dos meios em Erlenmeyers de 125 mL. Os recipientes foram tampados com rolhas de algodão e em seguida esterilizados.

Após esfriamento a temperatura ambiente, foram inoculadas aos Erlenmeyers as diferentes concentrações de esporos, conforme procedimento descrito na Seção 3.4, considerando as diluições se necessário. Estes ensaios foram realizados em triplicatas em

sistema sem agitação por 12 dias nas temperaturas ótimas de cada isolado fúngico.

Concluídos os ensaios foram realizadas as análises para determinação do fósforo solúvel, acidez e pH de todas as amostras, Seção 3.11.

Para avaliar a variação da concentração inicial de esporos, os resultados analíticos foram tratados pelo método estatístico de análise de variância (Anova), pelo método de comparação múltipla (teste de Tukey) e o método aglomerativo (teste de Scott - Knott). O software Sisvar foi utilizado na realização dos cálculos.

### **3.8 - Tempo de fermentação**

Para a avaliação do tempo de fermentação foi empregado o meio líquido modificado com a mesma formulação descrita na Seção 3.5, com exceções, para o substrato (glicose) e rocha fosfática que utilizaram as concentrações ótimas identificadas nos planejamentos para cada isolado. Neste caso, foram adicionadas porções de 140 mL dos meios em Erlenmeyers de 250 mL. O volume maior teve como propósito a manutenção das características das amostras, frente uma série de coletas de alíquotas sobre um tempo ainda indeterminado. Em seguida os recipientes foram tampados com rolhas de algodão e esterilizados.

Após esfriamento foram inoculadas aos Erlenmeyers suspensões aquosas de  $10^6$  esporos por mL do isolado fúngico selecionado. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, em sistema sem agitação, nas temperaturas ótimas de cada isolado e por período indeterminado.

Inicialmente foram retiradas alíquotas diárias das amostras, à medida que os valores de solubilização do fósforo foram se estabilizando, passou-se para período de 48 horas. Como as concentrações de P solúvel foram sempre bem elevadas, conseqüentemente as alíquotas sempre foram bem reduzidas, não alterando significativamente o volume inicial do meio.

Para coleta das alíquotas foi utilizada micropipeta volumétrica automática de 10 a 1000 microlitros com ponteiros devidamente esterilizados. Após cada coleta foi quantificado o valor do fósforo em solução.

### **3.9 - Balanço de massa no sistema rocha, meio líquido e micélio fúngico.**

O balanço de massa foi um ensaio a parte com o propósito de avaliar como o fósforo está distribuído no sistema rocha, meio líquido e micélio do fungo. Este ensaio foi realizado para os dois *A. niger* selecionados e em paralelo ao segundo planejamento.

O meio líquido modificado foi preparado conforme descrito na Seção 3.5, com exceções, para substrato e rocha fosfática que tiveram as concentrações de 39 e 14 g/L respectivamente, conforme ponto zero do segundo planejamento. Foram adicionadas porções de 140 mL dos meios em Erlenmeyers de 250 mL. Após esterilização seguida de esfriamento foram inoculadas aos Erlenmeyers suspensões aquosas de  $10^6$  esporos por mL do fungo selecionado. Os experimentos foram realizados em sistema sem agitação por 20 dias em temperatura de 36 °C, também referente ao ponto zero do segundo planejamento.

O volume de 140 mL e o tempo de 20 dias foram estipulados para maior e melhor formação da massa micelial, pois esta foi objeto de quantificação.

Ao final dos experimentos, a massa micelial, sobrenadante no líquido, foi retirada com auxílio de espátula, lavada em água corrente e seca a 70 °C por 2 dias. A rocha fosfática foi separada do meio líquido por filtração, com auxílio de papel de filtro para filtragem rápida, e seca a 120 °C por duas horas. Em seguida foi quantificado o fósforo solúvel para o meio líquido e o fósforo total para o micélio e a rocha fosfática, conforme Seção 3.11.

A quantificação do fósforo foi realizada após diluições das amostras. As diluições, por sua vez, sempre trazem erros referentes a procedimentos de medida e materiais utilizados, conhecidos como incertezas. Para melhor interpretação dos resultados do balanço de massa foi pertinente à utilização de cálculos para determinação da incerteza da diluição, através das equações a seguir, retiradas do APÊNDICE 2.

$$Sr = \sqrt{S_A^2 + S_b^2} \qquad \frac{Sr}{R} = \sqrt{\left(\frac{S_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{S_B}{B}\right)^2}$$

Sendo:

A e B são variáveis de entrada (concentração, volume e etc);

$S_A$  e  $S_B$  são as tolerâncias (incertezas) independentes entre si dos materiais utilizados;

Sr a incerteza absoluta;

Sr/R a incerteza relativa.

### 3.10 - Proposta de biorreator

Foi proposto um biorreator descontínuo com capacidade para 6 litros, reciclo contínuo entre suas partes e oxigenação constante, conforme Figura 3.8.



Figura 3.8 - Esquema do biorreator para processo fermentativo.

Observa-se pela Figura 3.8 que o biorreator foi constituído de dois recipientes de vidro (10 x 10 x 30 cm) ligados entre si por uma conexão na base por onde transitou o líquido. No recipiente do lado esquerdo ficaram os "pratos" sobrepostos para acondicionamento e distribuição da rocha fosfática. O recipiente do lado direito foi constituído por grades de arame para acondicionamento do micélio. A vazão de oxigênio foi realizada através de uma bomba de deslocamento positivo alternativa com capacidade de 1,6 L por minuto, ligada por intermédio de uma mangueira de silicone, ao recipiente do lado direito, juntamente com um termômetro para aferição da temperatura. Com auxílio de uma bomba peristáltica, com vazão de 60 litros por hora, localizada na parte superior da estrutura, o líquido foi transferido do recipiente da rocha para o recipiente do fungo, este por sua vez, através da pressão da coluna de líquido, transferiu pela base a mesma quantidade de líquido para o outro recipiente, a fim de se igualar a pressão. Este processo foi realizado continuamente. O reator foi colocado no interior de uma câmara de placa de fibra de madeira (MDF) constituída de lâmpadas incandescente para aquecimento e um cooler para homogeneização do ar quente (temperatura). A Figura 3.9 retrata o biorreator em condições de operação.





Figura 3.9 - Biorreator constituído de rocha, micélio e meio líquido.

No ensaio foi empregado o meio líquido modificado com a mesma formulação descrita na Seção 3.5, com exceções, para o substrato (glicose) e a rocha fosfática que utilizaram as concentrações ótimas identificadas no planejamento, sendo a rocha distribuída nos pratos. O Experimento foi realizado por período de tempo em que a taxa de solubilização do fósforo se manteve em crescimento, conforme resultado da Seção 3.8 para o tempo de fermentação. Por fim foi utilizada a temperatura ótima de trabalho determinada no planejamento.

Dentre os 2 isolados fúngicos, foi escolhido aquele com melhor desempenho nos ensaios anteriores. Ao biorreator foi inoculado micélio fixado pelas grades de arame e distribuído da base do recipiente até o nível mais alto (superfície do líquido).

### 3.11 - Metodologia analítica

#### 3.11.1 - Determinação de fósforo total e fósforo solúvel

A determinação do fósforo total e fósforo solúvel em solução foi realizado de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-P Phosphorus.

### Fósforo Total

O fósforo total foi quantificado na rocha fresca (rocha não tratada), rocha tratada e micélio do fungo. Foi necessário o procedimento de digestão para completa oxidação da amostra, convertendo todas as formas de fósforo em ortofosfato, sendo esta, a forma solúvel liberada em solução que foi posteriormente analisada por colorimetria.

A solução digestora consistiu no preparo da mistura ácido nítrico/ácido sulfúrico concentrado na proporção 5/1, tal procedimento foi realizado em capela de exaustão. Esta solução foi mantida e conservada em vidro ambar em local apropriado.

A quantidade de amostra para digestão se deu pela quantidade estimada de fósforo na mesma. Transferiu-se a massa para tubo de ensaio contendo 20 mL da solução digestora. Em seguida os tubos foram acondicionados em bloco digestor a 150 °C, no interior de capela de exaustão, por duas horas ou pela constatação de completa oxidação da amostra. Filtrou-se a amostra com auxílio de funil e papel de filtro de filtragem rápida para balão de 100 mL. Efetuaram-se as diluições antes das leituras.

### Fósforo Solúvel

O fósforo solúvel foi quantificado nos extratos líquidos (meio líquido) após os ensaios. Neste caso não foi necessário à digestão da amostra, sendo o fósforo determinado diretamente após filtração da amostra com auxílio de papel de filtro para filtragem rápida.

### Método colorimétrico

Após um dos 2 procedimentos descritos anteriormente, o ortofosfato liberado foi determinado pelo método colorimétrico do fosfato vanadomolibdato.

O método segue o seguinte conceito: Uma solução de ortofosfato reage com o molibdato de amônio e com vanádio para formação do ácido vanadomolibdatofosfórico, de coloração amarela. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração do fósforo. A faixa de trabalho do método é de 1 a 10 mg/L (ppm) de fósforo em comprimento de onda de 420 nm.

Para coloração foi utilizado a solução de vanadomolibdato de amônio preparada através da mistura de duas soluções. A primeira consistiu na dissolução de 40g de molibdato de amônio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 400 mL de água destilada. A segunda foi realizada

dissolvendo 1 g de metavanadato de amônio  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  em uma mistura de 300 mL de água destilada e 200 mL de ácido nítrico concentrado. A segunda solução foi adicionada a primeira, em seguida completou esta mistura a 1000 mL com água destilada.

Para leitura do resultado de fósforo foi transferido 50 mL do extrato líquido da amostra, ou o mesmo diluído, para frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida foi adicionado 25 mL da solução de vanadomolibdato de amônio seguido de agitação vigorosa. Após 2 minutos para desenvolvimento da cor, foi determinada a absorvância das amostras em espectrofotômetro a 420 nm. 50 mL de água destilada foi utilizada como branco, seguindo o mesmo procedimento dos extratos.

A curva de calibração foi constituída pelos pontos de 1,0 mg/L, 3,0 mg/L, 5,0 mg/L, 7,5 mg/L e 10,0 mg/L de P, seguindo o mesmo procedimento dos extratos líquidos das amostras.

### **3.11.2 - Determinação da Acidez**

A determinação da Acidez Total foi de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1998. – part 2000 Physical & Aggregate properties, 2310 Acidity.

A acidez de uma amostra líquida em geral é a sua capacidade quantitativa de reagir com uma base forte para um designado pH. O valor medido pode variar significativamente com a escolha do pH do ponto final usado na determinação ou do indicador escolhido.

No caso dos extratos líquidos obtidos nos ensaios, o ácido cítrico foi possivelmente o componente ácido existente, sendo este, titulado com uma base forte (hidróxido de sódio 0,02N) para pH de 8,3, correspondente a mudança do indicador fenolftaleína, sendo este valor aceito para titulações de ácidos fracos.

O volume da amostra correspondeu ao necessário para o consumo de 20 mL ou mais do titulante, medido em bureta de 50 mL.

O preparo da solução indicadora consistiu em dissolver 0,5 g de fenolftaleína em uma mistura de 50 mL de álcool etílico e 50 mL de água destilada.

A solução de correção de normalidade consistiu na pesagem de 10 g de ftalato de potássio,  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ , seco a 120 °C por 2 horas. A massa foi dissolvida em água destilada e em seguida completou a solução para 1 litro em balão volumétrico.

Para o preparo da solução titulante de hidróxido de sódio 0,02 N foi pesado 4,0

gramas de NaOH. A massa foi dissolvida em água destilada isenta de CO<sub>2</sub>, água recém-fervida e esfriada, em seguida completou a solução para 1 litro em balão volumétrico. 200 mL desta solução foi diluída para 1000 mL com água destilada isenta de CO<sub>2</sub>. Esta última foi padronizada, conforme Equação 3.3, utilizando 15 mL da solução de correção de normalidade com 5 gotas da solução de fenolftaleína como indicador.

$$\text{Normalidade} = \frac{A \times B}{204,2 \times C} \quad (3.3)$$

Sendo:

A = gramas de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> pesadas para 1 litro de solução;

B = mL da solução de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> tomada para a titulação;

C = mL da solução de NaOH utilizada.

Para titulação dos extratos líquidos obtidos nos ensaios, foi selecionado o volume necessário (10 mL), em seguida foi adicionado 0,2 mL (5 gotas) da solução indicadora. A titulação foi realizada sobre superfície branca até a mudança de cor persistente, de incolor para rósea.

A seguir foi utilizada a Equação 3.4, para o cálculo da acidez, assumindo que o ácido cítrico foi o agente acidificante presente na amostra:

$$\text{Acidez, em mg } H_3C_6H_5O_7/L = \frac{A \times B}{ml \text{ da amostra}} \times 64040 \quad (3.4)$$

Sendo:

A = mL de NaOH titulante consumido na titulação;

B = Normalidade do NaOH.

### 3.11.3 - Determinação de pH

A determinação do pH foi de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-H pH value.

A leitura do pH das amostras foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando phmetro, introduzindo o eletrodo diretamente nos extratos líquidos ao final dos ensaios.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 - Avaliação qualitativa

Na avaliação qualitativa os 12 isolados de *Aspergillus niger* apresentaram capacidade de solubilização de fosfato insolúvel, verificado pela presença de um halo translúcido ao redor da colônia fúngica, conforme Figuras 4.1 e 4.2. Deste modo, todos os isolados fúngicos foram selecionados para a próxima etapa.



Figura 4.1 - Expansão do fungo do disco para o meio seletivo.



Figura 4.2 - Halo transparente em torno da colônia fúngica

#### 4.2 - Classificação quantitativa

Na classificação quantitativa foi avaliada a capacidade de solubilização de fósforo da rocha pelos isolados fúngicos em meio líquido modificado, para 2 tipos de tratamentos. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os resultados da classificação quantitativa para os tratamentos com agitação e sem agitação (repouso) para os 12 isolados em triplicatas.

Tabela 4.1 - Resultados da solubilização do fósforo da rocha para o tratamento com agitação.

Isolados	Sistema agitado		
	P (mg/L)	pH	Acidez g/L
1	381,2	3,01	1,72
1	398,9	2,98	1,96
1	403,4	2,97	1,98
2	298,3	3,31	1,01
2	311,7	3,22	1,13
2	338,9	3,19	1,22
3	400,2	3,32	1,11
3	410,2	3,26	1,17
3	417,3	2,23	1,24
4	321,0	3,17	1,08
4	322,0	3,14	1,13
4	338,4	3,11	1,18
5	365,3	3,19	1,46
5	379,2	3,15	1,55
5	386,2	3,12	1,66
6	397,1	2,99	1,45
6	408,7	2,96	1,50
6	410,5	2,95	1,56
7	435,8	2,89	1,67
7	439,1	2,86	1,69

Continua

Continuação da Tabela 4.1

Isolados	Sistema agitado		
	P (mg/L)	pH	Acidez g/L
7	446,4	2,83	1,72
8	333,3	3,33	1,22
8	345,3	3,03	1,27
8	346,5	2,99	1,32
9	458,7	3,07	1,58
9	459,0	3,07	1,58
9	463,3	3,04	1,64
10	383,6	3,04	1,55
10	384,0	3,04	1,57
10	396,2	3,02	1,59
11	384,1	3,04	1,41
11	387,9	3,01	1,45
11	391,7	2,98	1,5
12	397,5	3,06	1,47
12	402,0	2,95	1,55
12	405,1	2,93	1,65
Média geral	387,4	3,07	1,46
Desvio padrão	42,2	0,13	0,24

P - Fósforo; Acidez em g/L de ácido cítrico; Rocha fosfática 24 g/L; pH inicial = 7,78; acidez inicial = 0.

Tabela 4.2 - Resultados da solubilização do fósforo da rocha para o tratamento sem agitação.

Isolados	Sistema sem agitação		
	P (mg/L)	pH	Acidez g/L
1	380,0	3,06	1,36
1	389,3	3,05	1,38
1	392,6	3,02	1,42
2	372,7	2,94	1,45
2	381,7	2,91	1,52
2	396,2	2,88	1,60
3	243,4	3,46	0,86
3	255,4	3,43	0,88
3	261,2	3,41	0,89
4	314,6	3,59	0,97
4	324,3	3,56	0,99
4	328,0	3,53	0,99
5	346,9	3,31	1,19
5	382,8	3,24	1,25
5	388,7	3,20	1,32
6	381,0	3,09	1,31
6	388,4	3,05	1,36
6	392,8	3,03	1,42
7	377,1	3,40	1,22
7	387,8	3,32	1,25

Continua



Continuação da Tabela 4.2

Isolados	Sistema sem agitação		
	P (mg/L)	pH	Acidez g/L
7	395,6	3,21	1,28
8	335,6	3,49	1,12
8	338,4	3,36	1,18
8	356,2	3,13	1,29
9	342,4	3,29	1,13
9	351,1	3,18	1,20
9	356,8	3,07	1,27
10	362,4	3,01	1,47
10	368,2	2,98	1,51
10	376,4	2,95	1,56
11	345,6	3,23	1,10
11	364,8	3,19	1,16
11	370,2	3,15	1,23
12	364,2	3,32	1,18
12	366,3	3,29	1,22
12	386,1	3,12	1,32
Média geral	357,4	3,21	1,24
Desvio padrão	38,4	0,20	0,19

P - Fósforo; Acidez em g/L de ácido cítrico; Rocha fosfática 24 g/L; pH inicial = 7,78; acidez inicial = 0.

A seguir, serão apresentados os resultados dos tratamentos estatísticos para avaliação dos sistemas com agitação e sem agitação, juntamente com a determinação dos isolados fúngicos com melhores desempenhos de solubilização de fosfato de rocha. Contudo, foi necessário a avaliação dos resultados das Tabelas 4.1 e 4.2 sobre algumas aspectos.

Observando os resultados de fósforo solúvel em mg/L não se tem uma idéia clara do significado físico dos seus valores. Para melhor compreensão foi tratado isoladamente o resultado médio de maior valor de solubilização, 460,3mg/L, relativo ao Isolado 9 da Tabela 4.1. Este resultado equivale a uma redução de 12,4 % do P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> da rocha fosfática, sendo que esta possui em média teor de 35,2 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Provavelmente, se os experimentos fossem realizados com rocha de outros pontos do processo (alimentação, deslamagem ou rejeito) ou mesmo com a rocha bruta da mina (ROM), que apresentam teores de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bem inferiores, à porcentagem de solubilização seria possivelmente bem maior. De qualquer forma, foi necessário um planejamento experimental, a fim de avaliar a possibilidade de maximização da solubilização de P insolúvel dentro de um custo benefício aceitável.

As concentrações de P solúvel obtidas nos ensaios biológicos foram comparáveis aos resultados de outros trabalhos. Embora os resultados variem dependendo do tipo de rocha, micro-organismo e condições de cultivo. Em estudos com *A. niger* e rocha fosfática normalmente se tem alcançado concentrações de P solúveis, que variaram 13-31 mg/L (WAHID; MEHANA, 2000 e ABD-ALLA; OMAR, 2001) para 300-400 mg/L (VASSILEV et al. 1995 e VASSILEVA et al. 1998) e de 219-382 mg/L (SCHNEIDER et al., 2010). Através de métodos mais sofisticados que podem não ser tão facilmente aplicáveis, alguns estudos têm relatado concentrações mais elevadas. Por exemplo, Bojinova et al. (1997) obtiveram P solúvel em concentrações de 747 mg/L usando ácido cítrico industrial produzidos por *A. niger*. Cereti et al. (2004) alcançaram concentrações de P solúvel de 750 mg/L de rocha fosfática de origem sedimentar, utilizando um biorreator descontínuo onde as amostras eram renovadas em períodos de 48 h durante cultivo de 8 dias.

Ainda em relação as Tabelas 4.1 e 4.2, não foi verificado nem uma tendência, direta ou indireta, na comparação dos resultados de P, acidez e pH entre as linhagens de *A. niger*. Esperava-se, conforme relatos na literatura, que num menor pH e maior acidez, refletisse em um aumento de P solúvel no meio. Mais isto não foi verificado de forma clara, por exemplo, comparando os resultados do Isolado 9 e do Isolado 1 da Tabela 4.1, o primeiro apresentou maior valor de solubilização em relação ao segundo, no entanto, o Isolado 9 apresentou pH menos ácido e valor de acidez inferior ao Isolado 1. Este acontecimento também se verifica na

Tabela 4.2. Uma provável explicação para este fato esta relacionada ao ácido orgânico produzido, que não foi possível ser determinado pela metodologia utilizada.

Diferente do que foi descrito no parágrafo anterior, para uma mesma espécie de *A. niger* verifica-se uma tendência nos resultados de P, acidez e pH para os resultados das duas tabelas. Observou-se, para qualquer fungo, que em um menor pH e maior acidez, maior foi o valor de solubilização. Esta observação também foi verificada quando se compara as médias gerais dos resultados de P, acidez e pH para as duas tabelas, ou seja, quando se compara os tratamentos com agitação (P = 387,4 mg/L, pH = 3,07 e acidez = 1,46 g/L) e sem agitação (P = 357,4 mg/L, pH = 3,21 e acidez = 1,24 g/L).

Como foi mencionado, os valores de pH e acidez tiveram estas disposições, mais avaliando os resultados de forma geral, verifica-se que numa variação considerável da resposta de solubilização de P (DP = 42,1 mg/L) os valores de acidez (DP = 0,24 g/L) e pH (DP = 0,13) foram muito próximos para se ter uma afirmação deste comportamento, contudo a acidez teve melhor sensibilidade que o pH do meio. Todavia, valores de pH e Acidez não refletem para uma previsão quantitativa do fósforo solúvel em solução, apenas indicam um bom ou mau resultado.

Schneider et al. (2010) trabalhando com rochas fosfáticas variadas e o fungo *Aspergillus niger* obtiveram resultados de fósforo, pH e acidez titulável em g/L de ácido cítrico, sendo a rocha fosfática de Catalão Brasil com valores de P = 281 mg/L, pH = 2,62 e acidez = 3,1 g/L, a rocha de Kapuskasing Canadá obtiveram P = 306 mg/L, pH = 2,57 e acidez = 2,0 g/L e Carolina do Norte USA valores de P = 382 mg/L, pH = 3,28 e acidez = 5,1 g/L. Os autores observaram que os diferentes tipos de rocha contribuíram para o pH e a acidez do meio e que estes parâmetros influenciaram na solubilização do P.

#### **4.2.1 - Avaliação do tratamento com agitação e sem agitação (repouso)**

Nesta seção os resultados apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2 foram assumidos como dois tratamentos com 36 experimentos cada. A Tabela 4.3 apresenta os resultados estatísticos básicos para os tratamentos com e sem agitação.

Tabela 4.3 - Estatística descritiva para o tratamento com agitação e sem agitação.

Tratamento	Experimentos	Média	Variância	Desvio Padrão
Sem agitação	36	357,4	1478	38,4
Com agitação	36	387,4	1782	42,2

Com os resultados da Tabela 4.3, pode-se aplicar o teste de diferença entre médias, Tabela 4.4, com a seguinte condição de hipótese.

Teste de Hipótese:

H1: Tratamento com agitação melhor que o Tratamento sem agitação

H0: Tratamento com agitação igual ou menos eficiente que o Tratamento sem agitação

IC: 95%

Sendo:

H0 a hipótese de nulidade;

H1 a hipótese alternativa;

IC é o intervalo de confiança.

Tabela 4.4 - Teste de diferença entre duas médias.

Tratamento	Média	Desvio padrão	Experimentos	p	
Sem agitado	357,4	38,4	36	0,0012	Unicaudal
Com agitação	387,4	42,2	36		

Como p (0,0012) da Tabela 4.4 é menor que  $\alpha$  (0,05), pode-se rejeitar a hipótese H0 com confiança de 95%. Deste modo, o tratamento com agitação é melhor que o tratamento sem agitação.

#### 4.2.2 - Avaliação da solubilização do fosfato de rocha em água e no meio de cultura

Foi analisada a solubilização do fósforo no sistema rocha mais água e no sistema rocha mais meio de cultura, sem a presença da espécie fúngica, a fim de avaliar a influência tanto da água quanto do meio no processo de dissolução, conforme Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Avaliação da solubilização do fósforo sem a presença da espécie fúngica

Análises	Tratamento	Rocha + água	Meio de cultura + rocha	Tempo (Dias)
P - (mg/L)		< 1,0*	3,78	
pH	Com agitação	7,9	4,26	12
Acidez (g/L)		0	0,82	
P - (mg/L)		< 1,0*	2,43	
pH	Sem agitação	7,85	4,74	12
Acidez (g/L)		0	0,64	

\* Limite de detecção do método 1,0 mg/L

Pela tabela 4.5, verifica-se que o meio de cultura e muito menos a água não possuem por si só boa capacidade de solubilização de fosfato de rocha. Evidenciando, deste modo, que a solubilização do fósforo insolúvel foi devido à presença da espécie fúngica.

#### 4.2.3 - Seleção dos *A. niger* com melhor desempenho de solubilização

Nesta seção, foram realizados os cálculos estatísticos para seleção dos isolados fúngicos com melhores desempenhos de solubilização, tanto no tratamento com agitação, Tabela 4.1, quanto no tratamento sem agitação, Tabela 4.2.

##### 4.2.3.1 - Tratamento sem agitação (repouso)

Para o tratamento sem agitação foi proposto à análise de variância (Anova), Tabela 4.6, sobre o seguinte teste de hipótese.

Teste de hipótese:

H1: Os isolados fúngicos são estatisticamente diferentes

H0: Os isolados fúngicos são estatisticamente iguais.

Tabela 4.6 - Análise de variância dos resultados da Tabela 4.2

FV	GL	SQ	QM	Fc	p
Tratamento	11	48756,1	4432,4	35,7	0,0000
Erro	24	2975,8	124		
Total corrigido	35	51731,9			
CV (%)	3,12				
Média geral	357,4			Número de observações	36

Legenda: FV (fonte de variação); GL (graus de liberdade); SQ (soma dos quadrados); QM (quadrado médio); Fc (valor na distribuição F); p (significância); CV (coeficiente de variação).

Como p (0,0000) da Tabela 4.6 é menor que  $\alpha$  (0,05), logo se pode rejeitar a hipótese  $H_0$ . Deste modo, os isolados fúngicos são estatisticamente diferentes. Com este resultado é necessário continuar com a avaliação estatística, a fim de determinar os isolados com melhores desempenhos de solubilização. A Tabela 4.7 apresenta o teste de comparação múltipla entre médias (Teste de Tukey) e o teste aglomerativo (Teste de Scott - Knott).

Tabela 4.7 - Testes de Tukey e Scott - Knott dos resultados da Tabela 4.2.

Isolados	Médias	Teste Tukey		Teste de Scott - Knott
3	253,3	a1		a1
4	322,3	a2		a2
8	343,4	a2	a3	a3
9	350,1	a2	a3	a3
11	360,2		a3 a4	a4
10	369,0		a3 a4	a4
12	372,2		a3 a4	a4
5	372,8		a3 a4	a4
2	383,5		a4	a5
7	386,8		a4	a5
1	387,3		a4	a5
6	387,4		a4	a5

Grau de significância  $\alpha$  (0,05).

O teste de Tukey compara as médias tomadas duas a duas através da combinação entre os tratamentos (Isolados), podendo coexistir, agrupamentos de tratamentos iguais, agrupamentos distintos e também intersecções entre agrupamentos.

A Tabela 4.7 apresentou para o teste de Tukey 4 grupos de isolados estatisticamente diferentes e intersecções entre os grupos a2 e a3 e os grupos a3 e a4. Os isolados do grupo a4 apresentaram melhores resultados. Embora os membros deste grupo sejam estatisticamente iguais, os Isolados 6, 1 e 7 demonstraram, nesta ordem, as melhores médias.

O teste aglomerativo de Scott - Knott compara e separa as médias dos tratamentos em grupos distintos, desta forma, o teste não apresenta ambiguidade, caracterizada pela intersecção entre grupos.

A Tabela 4.7 apresentou para o teste de Scott - Knott 5 grupos de isolados estatisticamente diferentes. Os isolados do grupo a5 apresentaram melhores resultados. Embora os membros deste grupo sejam estatisticamente iguais, os fungos 6, 1 e 7 demonstraram, nesta ordem, as melhores médias, tal qual no teste de Tukey.

#### 4.2.3.2 - Tratamento com agitação.

Para o tratamento com agitação também foi proposto à análise de variância (Anova), Tabela 4.8, sobre o seguinte teste de hipótese.

Teste de hipótese:

H1: Os isolados fúngicos são estatisticamente diferentes

H0: Os isolados fúngicos são estatisticamente iguais

Tabela 4.8 - Análise de variância dos resultados da Tabela 4.1

FV	GL	SQ	QM	Fc	p
Tratamento	11	60223,2	5474,8	61,4	0,0000
Erro	24	2140,3	89,2		
Total corrigido	35	62363,5			
CV (%)	2,44				
Média geral	387,4			Número de observações	36

Legenda: FV (fonte de variação); GL (graus de liberdade); SQ (soma dos quadrados); QM (quadrado médio); Fc (valor na distribuição F); p (significância); CV (coeficiente de variação).

Como p (0,0000) da Tabela 4.8 é menor que  $\alpha$  (0,05), logo se pode rejeita a hipótese H0. Deste modo, os isolados são estatisticamente diferentes. Com este resultado é necessário continuar com avaliação estatística, a fim de determinar os fungos com melhores

desempenhos de solubilização. A Tabela 4.9 apresenta o teste de comparação múltipla entre médias (Teste de Tukey) e o teste aglomerativo (Teste de Scott - Knott).

Tabela 4.9 - Testes de Tukey e Scott - Knott dos resultados da Tabela 4.1.

Isolados (tratamentos)	Médias	Teste de Tukey		Teste de Scott - Knott
2	316,3	a1		a1
4	327,1	a1		a1
8	341,7	a1		a2
5	376,9		a2	a3
10	387,9		a2 a3	a3
11	387,9		a2 a3	a3
1	394,5		a2 a3	a3
12	401,5		a2 a3	a4
6	405,4		a3	a4
3	409,2		a3	a4
7	440,4			a5
9	460,3			a6

Grau de significância  $\alpha$  (0,05).

A Tabela 4.9 apresentou para o teste de Tukey 4 grupos de isolados estatisticamente diferentes e uma intersecção entre os grupos a2 e a3. Os isolados do grupo a4 apresentaram melhores resultados, sendo eles, os Isolados 7 e 9.

A Tabela 4.9 apresentou para o teste de Scott - Knott 6 grupos de isolados estatisticamente diferentes. O isolado do grupo a6, Isolado 9, foi isoladamente o que apresentou melhor desempenho, seguido isoladamente pelo Isolado 7 do grupo a5.

Por questões operacionais, foram selecionados para as próximas etapas apenas 2 isolados fúngicos. Como o Isolado 7 apresentou bom desempenho em ambos os tratamentos, com e sem agitação, foi selecionado para as próximas etapas. Como o Isolado 9 foi isoladamente o melhor fungo no tratamento com agitação, também foi selecionado.

### 4.3 - Planejamentos experimentais

#### 4.3.1 – Primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR)

Com os Isolados 7 e 9 foram realizados os planejamentos experimentais. Os níveis experimentais e demais condições foram definidas na Seção 3.6 do Capítulo 3. Assim, nas



Tabelas 4.10 e 4.11 são apresentados os resultados dos DCCR para os Isolados 7 e 9, respectivamente.

Tabela 4.10 – Matriz dos resultados do planejamento experimental para o Isolado 7.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis forma real			Resultados
	T	S	R	T (°C)	S (g/L)	R (g/L)	P (mg/L)
1	-1	-1	-1	28	18	5	139,9
2	-1	-1	1	28	18	12	207,6
3	-1	1	-1	28	53	5	128,8
4	-1	1	1	28	53	12	192,8
5	1	-1	-1	35	18	5	126,1
6	1	-1	1	35	18	12	117,0
7	1	1	-1	35	53	5	108,5
8	1	1	1	35	53	12	266,3
9	-1,68	0	0	25,5	35	8,5	91,8
10	1,68	0	0	37,4	35	8,5	94,7
11	0	-1,68	0	31,5	6	8,5	21,2
12	0	1,68	0	31,5	65	8,5	149,6
13	0	0	-1,68	31,5	35	2,6	72,0
14	0	0	1,68	31,5	35	14,4	156,2
15	0	0	0	31,5	35	8,5	119,4
16	0	0	0	31,5	35	8,5	100,8
17	0	0	0	31,5	35	8,5	108,4
18	0	0	0	31,5	35	8,5	99,4
19	0	0	0	31,5	35	8,5	99,4

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Concentração de rocha (R); Fósforo (P).

Tabela 4.11 – Matriz dos resultados do planejamento experimental para o Isolados 9.

Experimentos	Variáveis codificadas			Variáveis forma real			Resultados
	T	S	R	T (°C)	S (g/L)	R (g/L)	P (mg/L)
1	-1	-1	-1	28	18	5	116,8
2	-1	-1	1	28	18	12	176,1
3	-1	1	-1	28	53	5	90,15
4	-1	1	1	28	53	12	141,7
5	1	-1	-1	35	18	5	95,5
6	1	-1	1	35	18	12	207,6
7	1	1	-1	35	53	5	87,15
8	1	1	1	35	53	12	194,6
9	-1,68	0	0	25,5	35	8,5	141,8
10	1,68	0	0	37,4	35	8,5	92,9
11	0	-1,68	0	31,5	6	8,5	178,6
12	0	1,68	0	31,5	65	8,5	80,0
13	0	0	-1,68	31,5	35	2,6	47,2
14	0	0	1,68	31,5	35	14,4	118,3
15	0	0	0	31,5	35	8,5	85,0
16	0	0	0	31,5	35	8,5	100,4
17	0	0	0	31,5	35	8,5	86,6
18	0	0	0	31,5	35	8,5	98,2
19	0	0	0	31,5	35	8,5	104,8

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Concentração de rocha (R); Fósforo (P).

Com os resultados dos planejamentos experimentais apresentados nas Tabelas 4.10 e 4.11 foram obtidos os coeficientes de correlação, 62% para o Isolado 7 e 80% para o Isolado 9. A região ótima de temperatura demonstrou ficar acima do limite superior da faixa experimental para os 2 Isolados. A região ótima de substrato demonstrou estar acima do limite superior da faixa experimental para o Isolado 7 e apresentou comportamento de sela para o Isolado 9. A região ótima de concentração de rocha evidenciou ficar também acima do limite superior da faixa experimental para os 2 isolados.

Pelo que foi descrito, a faixa experimental dos planejamentos, fundamentada em valores da literatura, não correspondeu à realidade deste trabalho.

Os coeficientes de correlação também apresentaram valores um pouco abaixo do aceitável, demonstrando, que os modelos estatísticos não representaram bem os resultados experimentais. Uma provável causa para esta ocorrência foi à realização dos planejamentos em duas etapas, devido a falta de incubadoras disponíveis para atender as 5 faixas de temperatura.

Após estas observações, verificou-se a necessidade de realização de um novo planejamento. De qualquer forma, os resultados obtidos foram válidos, pois demonstraram a necessidade de ampliação da faixa experimental e que os experimentos deveriam ser conduzidos em uma única etapa.

Portanto, maiores discussões foram deixadas para o próximo planejamento.

#### 4.3.2 - Avaliação preliminar da temperatura

Antes da realização do segundo planejamento foi efetuado um teste preliminar para a temperatura, com o objetivo de avaliar qualitativamente o crescimento do *A. niger* frente à variação da mesma, Figura 4.3.



Figura 4.3 - Avaliação qualitativa da faixa de temperatura para o *Aspergillus niger*.

Este ensaio foi realizado com intuito de se estimar o limite superior de temperatura, sem comprometer o crescimento do fungo, ou até contribuir para sua morte. Deste modo, verifica-se um bom crescimento do *A. niger* nas temperaturas de 30 e 35 °C, apresentando para os 2 ensaios diâmetro de colônia fúngica de aproximadamente 2,8 cm, quando comparadas com a temperatura de 40 °C que apresentou diâmetro de colônia de aproximadamente 1,7 cm. Para as temperaturas de 45 e 50 °C o fungo não se desenvolveu. A

placa Petri com isolado a 50 °C apresentou em seu meio de cultura rachaduras devido ao calor.

Após esta avaliação, o fungo, inoculado nas placas submetidas a 45 e 50 °C, foi colocado a temperatura ambiente por 3 dias, mas não se constatou crescimento do mesmo, ficando evidente que o limite de temperatura aceitável para este isolado foi por volta de 40 °C.

#### **4.3.3 - Câmaras para controle de temperatura**

Para realização do segundo planejamento em apenas uma única etapa foi necessário a construção de câmaras apropriadas para atender as 5 faixas de temperatura, conforme Figura 4.4.



Figura 4.4 - Câmaras para controle de temperatura.

As câmaras foram construídas em placa de fibra de madeira (MDF). A variação da temperatura foi realizada através de lâmpadas incandescentes. Um cooler também foi fixado no interior de cada câmara para homogeneização do ar quente. Em Erlenmeyer com água foi colocado um termômetro de vidro para aferição da temperatura.

#### 4.3.4 - Segundo delineamento composto central rotacional (DCCR)

Após o teste preliminar para temperatura e as tendências indicadas no primeiro planejamento foi proposto um novo intervalo experimental para as variáveis em estudo, Tabela 4.12.

Tabela 4.12 - Intervalo experimental com as variáveis normais e as variáveis codificadas para os Isolados 7 e 9

---

Variáveis codificadas	Rocha (g/L)	Substrato (g/L)	T (°C)
-1,68	2,2	4	31
-1	7	18	33
0	14	39	36
1	21	60	39
1,68	25,8	74,5	41

---

A seguir são apresentados os resultados para os Isolados 7 e 9.

##### 4.3.4.1 - Planejamento experimental para o Isolado 7

A Tabela 4.13 apresenta os resultados do planejamento experimental para o Isolado 7. Com estes resultados foi possível realizar algumas considerações iniciais:

- Comparando os experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8 e 9 e 10, observa-se que o aumento da temperatura, mantendo as demais variáveis constantes, acarretou em uma diminuição no resultado de solubilização do fósforo;
- Comparando os experimentos 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8 e 11 e 12, observa-se que o aumento da concentração de substrato, mantendo as demais variáveis constantes, causou um aumento no resultado de solubilização;
- Comparando os experimentos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8 e 13 e 14, observa-se que o aumento da concentração de rocha fosfática, mantendo as demais variáveis constantes, ocasionou em um aumento no resultado de solubilização.

Com a equação proposta pelo modelo estatístico e os gráficos de superfície de resposta, apresentados logo a seguir, será possível não só avaliar melhor os comportamentos mencionados, mais também aferir sua sensibilidade.

Tabela 4.13 - Resultados da matriz do planejamento experimental para Isolado 7.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			
	T	S	R	T (°C)	S (g/L)	R (g/L)	P (mg/L)
1	-1	-1	-1	33	18	7	199
2	-1	-1	1	33	18	21	256
3	-1	1	-1	33	60	7	211,8
4	-1	1	1	33	60	21	240
5	1	-1	-1	39	18	7	160
6	1	-1	1	39	18	21	245
7	1	1	-1	39	60	7	199,8
8	1	1	1	39	60	21	276
9	-1,68	0	0	31	39	14	210
10	1,68	0	0	41	39	14	185
11	0	-1,68	0	36	4	14	125
12	0	1,68	0	36	74,5	14	233,4
13	0	0	-1,68	36	39	2,2	211
14	0	0	1,68	36	39	25,8	326
15	0	0	0	36	39	14	294,8
16	0	0	0	36	39	14	292,8
17	0	0	0	36	39	14	291,6
18	0	0	0	36	39	14	292,8
19	0	0	0	36	39	14	290

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Concentração de rocha (R); Fósforo (P).

A seguir a Tabela 4.14 apresenta os coeficientes da regressão do modelo estatístico, estimados a partir dos efeitos das variáveis envolvidas no planejamento experimental. O modelo apresenta coeficiente de correlação  $R^2 = 0,949$ , ou seja, variabilidade de 94,9 % para ajuste aos resultados experimentais.

Tabela 4.14 - Coeficientes da regressão do modelo dos dados da Tabela 4.13

Var. Dependente Fósforo (mg/L); R-sqr = 0,94967; 3 Variáveis; 1 Bloco; 19 Experimentos.

Variáveis	Coeficientes	p	-95% Limite inferior	95% Limite superior
Média	291,89	0,000000	274,79	308,99
(1) T (L)	-4,98	0,304877	-15,34	5,37
T (Q)	-30,76	0,000087	-41,12	-20,40
(2) S (L)	18,29	0,003130	7,93	28,65
S (Q)	-37,23	0,000019	-47,59	-26,87
(3) R (L)	32,20	0,000061	21,84	42,56
R (Q)	-5,66	0,247708	-16,02	4,70
1(L) x 2(L)	9,25	0,156523	-4,28	22,78
1(L) x 3(L)	9,50	0,146813	-4,03	23,03
2(L) x 3(L)	-4,70	0,452342	-18,23	8,83

Legenda: Temperatura (T); Conc. de substrato (S); Conc. de rocha (R); Linear (L); Quadrado (Q).

Verifica-se pela Tabela 4.14, com intervalo de confiança de 95%, que as variáveis com efeitos significativos (probabilidade p menor que 0,05 ou 5% de significância), marcadas em vermelho, foram temperatura quadrática, substrato linear, substrato quadrático e rocha linear, demonstrando que as 3 variáveis exerceram influência no sistema. Constata-se também a inexistência de efeitos significativos entre interações das variáveis.

Com os coeficientes, definiu-se a equação do modelo completo codificada, Equação 4.1.

$$P \text{ (mg/L)} = 291,9 - 4,9T - 30,8T^2 + 18,3S - 37,2S^2 + 32,2R - 5,6R^2 + 9,2TS + 9,5TR - 4,7SR \quad (4.1)$$

O coeficiente de correlação não é o único parâmetro para estimativa de um modelo preditivo. Valores preditos e resíduos também são úteis para avaliações da consistência dos resultados.

A Figura 4.5 relaciona os resultados da variável dependente (valores observados) com os valores preditos pelo modelo. Observa-se pela figura boa consistência, demonstrando a qualidade do ajuste e a força da associação.

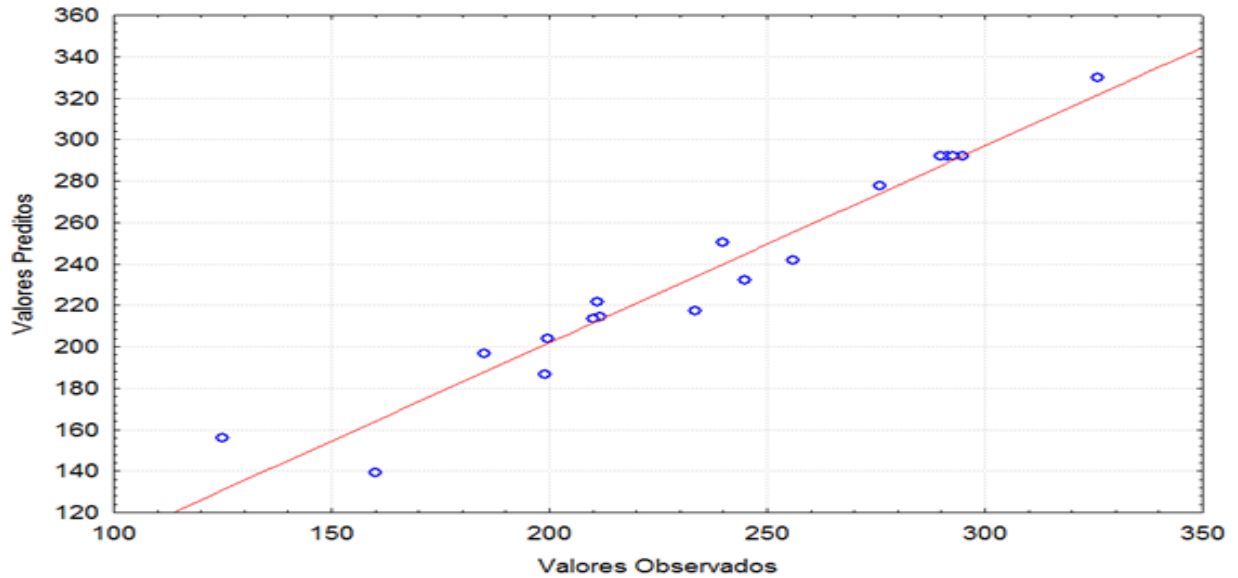


Figura 4.5 - Valores observados vs valores preditos

A Figura 4.6 relaciona os valores preditos pelo modelo com os resíduos (erro), permitindo avaliar a hipótese de resíduo independente e identicamente distribuído, ou seja, variância constante representada por uma distribuição aleatória (nuvens de pontos sem qualquer padrão sistemático). Os pontos da Figura não demonstram tendências típicas que se afastam do ideal, tais como, formação de cone à medida que os valores preditos aumentam, ou tendência parabólica dos pontos. Dois pontos, um com resíduo próximo de 20 e o outro com resíduo próximo de -30 têm características de erro experimental.

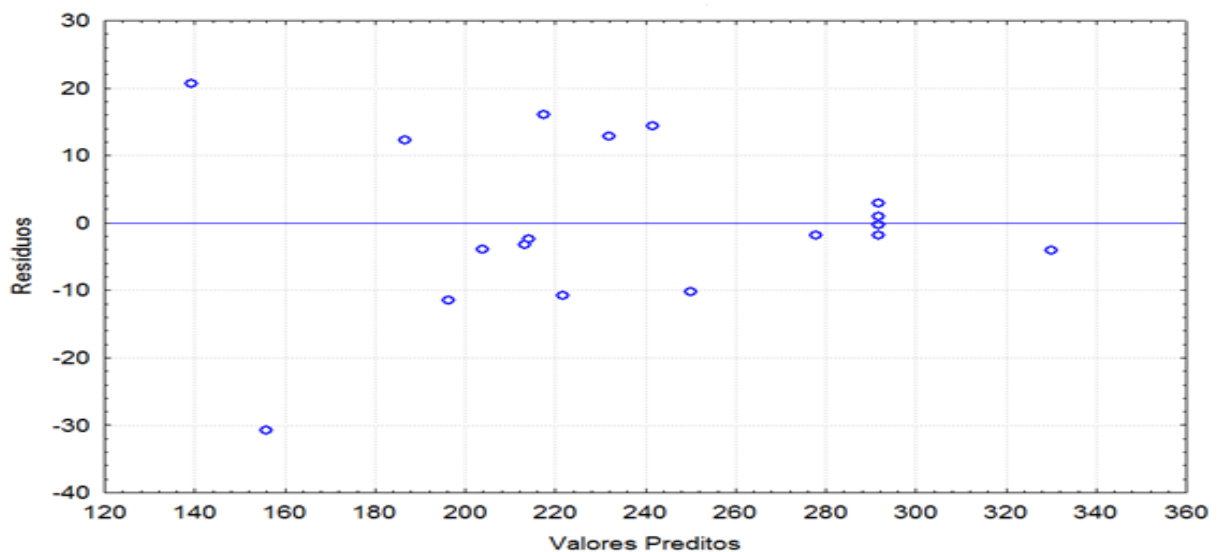


Figura 4.6- Valores preditos vs resíduos.



A seguir, a Tabela 4.15 faz uma estimativa apenas dos coeficientes dos efeitos significativos das variáveis envolvidas no planejamento experimental. O modelo reduzido apresenta coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9036$ , ou seja, variabilidade de 90 % para ajuste aos resultados experimentais.

Tabela 4.15 - Coeficientes da regressão dos efeitos significativos.

Var. Dependente Fósforo (mg/L); R-sqr = 0,9036; 3 Variáveis; 1 Bloco; 19 Experimentos;

Variáveis	Coeficientes	p	-95% Limite inferior	95% Limite superior
Média	286,63	0,000000	271,76	301,49
T (Q)	-29,93	0,000035	-40,71	-19,14
(2) S (L)	18,29	0,002893	7,39	29,19
S (Q)	-36,40	0,000004	-47,18	25,61
(3) R (L)	32,20	0,000018	21,30	43,10

Legenda: Temperatura (T); Conc. de substrato (S); Conc. Rocha (R); Linear (L); Quadrado (Q)

Observa-se pela Tabela 4.15, com intervalo de confiança de 95%, que as variáveis com efeitos significativos (probabilidade p menor que 0,05 ou 5% de significância) se mantiveram.

A partir dos coeficientes, defini-se a equação do modelo reduzida codificada, Equação 4.2.

$$P \text{ (mg/L)} = 286,6 - 29,9T^2 + 18,3S - 36,4S^2 + 32,2R \quad (4.2)$$

Com a Equação 4.2, pode-se compreender o comportamento da resposta do sistema frente às variáveis envolvidas no planejamento, deste modo:

- O coeficiente positivo da variável R e o seu valor em módulo demonstra que a concentração de rocha exerce maior influência no sistema, aumentando a solubilização do fósforo;
- O coeficiente positivo da variável S demonstra que o aumento na concentração de substrato proporciona maior solubilidade do fósforo, como já discutido anteriormente com a análise dos resultados.

#### Superfície de resposta

Com a Equação 4.2, foram estipulados os gráficos que representam as superfícies de resposta e as curvas de contorno entre as variáveis, Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 respectivamente.

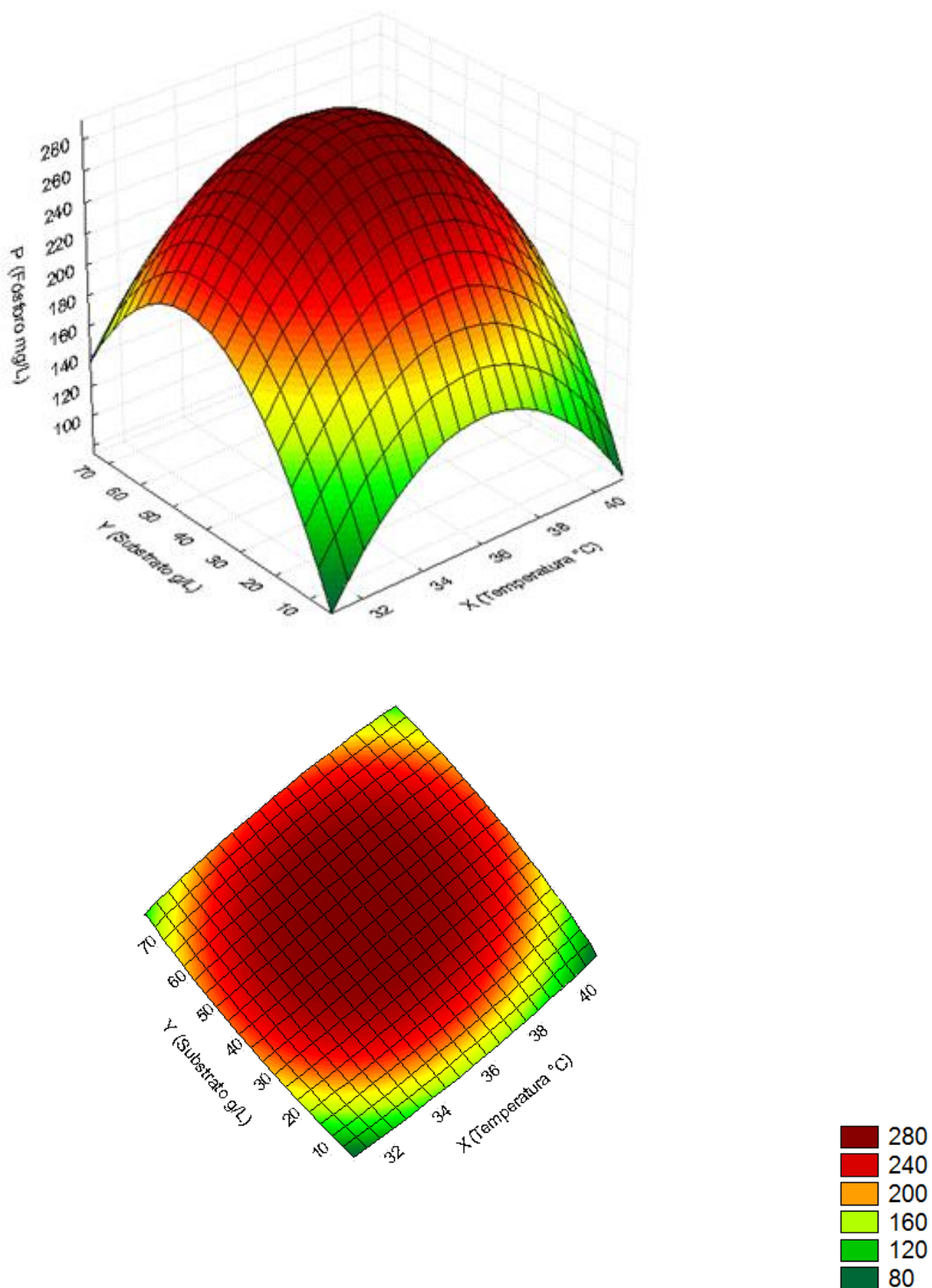


Figura 4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e substrato com R constante no ponto central.

O formato parabólico da Figura 4.7 é devido aos sinais negativos dos termos quadráticos das variáveis T e S da Equação 4.2. Observa-se na Figura que os pontos ótimos de temperatura e substrato estão dentro da região experimental. Além disto, pode-se verificar uma região ótima, de 30 a 60 g/L para o substrato e 34 a 38 °C para a temperatura. Isto é importante, caso seja desejável a realização de um estudo da relação custo benefício, ou seja, buscar não apenas a maximização do produto mais também a minimização de custo.

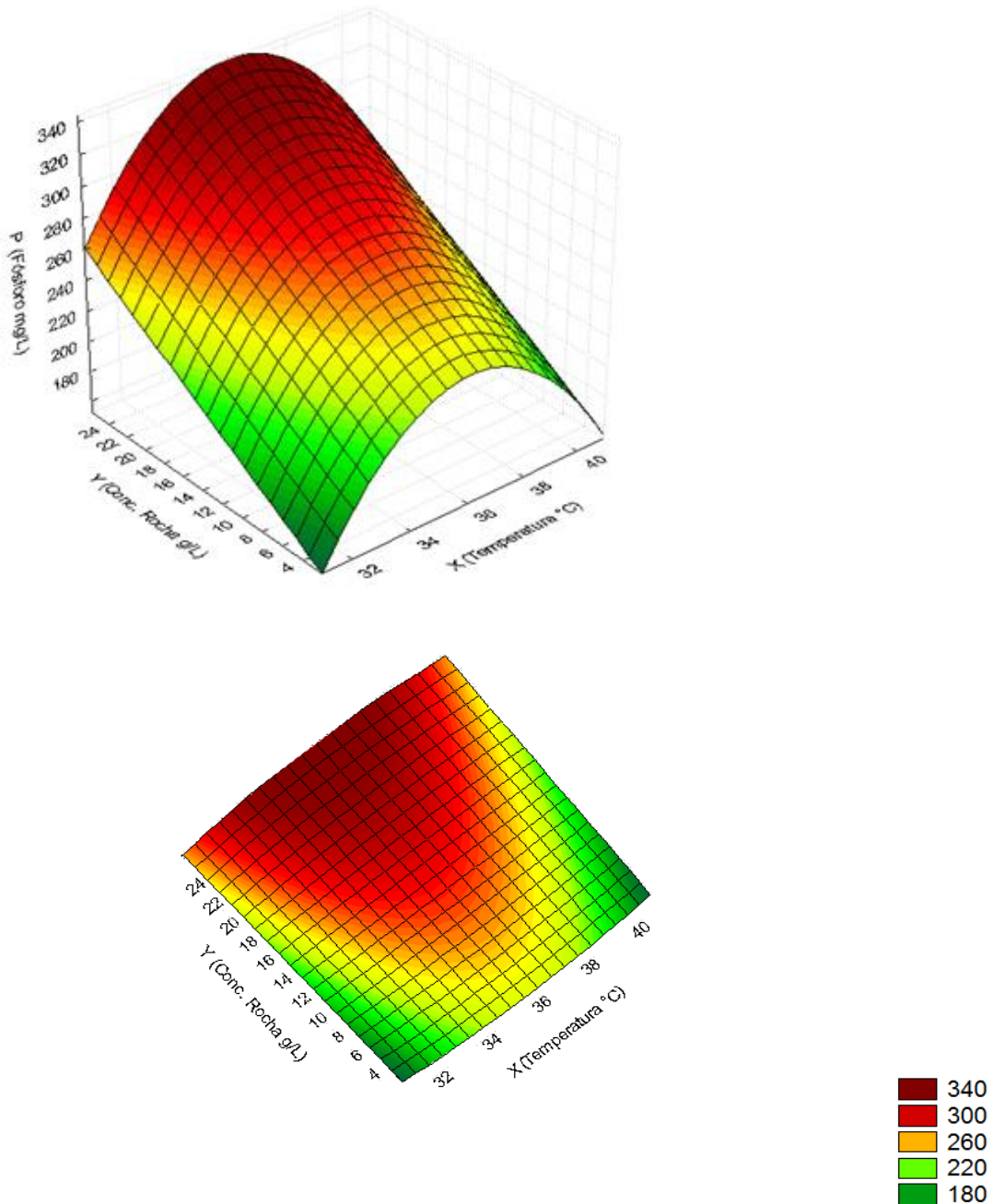


Figura 4.8 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e concentração de rocha com S constante no ponto central.

A Figura 4.8 apresenta perfil parabólico para a variável T e perfil linear para variável R, conforme Equação 4.2. Dentro da faixa das variáveis estudadas pode-se afirmar que os melhores resultados de solubilização do fósforo foram obtidos para a faixa de temperatura de 34 a 38 °C e de concentração de rocha maior do que 22 g/L. O ponto ótimo para temperatura, como descrito, esta dentro da região experimental. O ponto ótimo para concentração de rocha esta fora da região experimental, acima do nível superior.

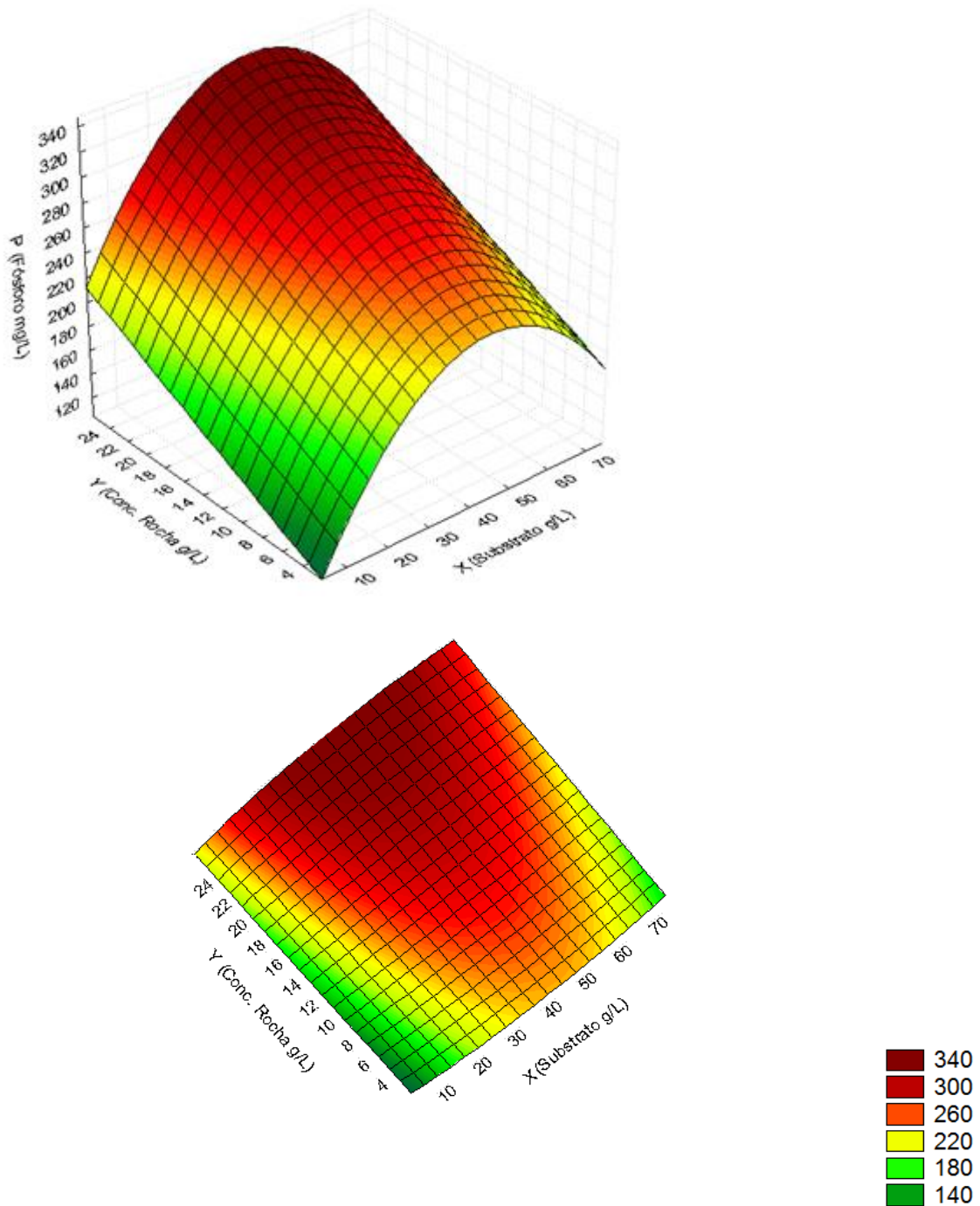


Figura 4.9 - Superfície de resposta e curva de contorno para substrato e concentração de rocha com T constante no ponto central.

A Figura 4.9 apresenta perfil parabólico para a variável S e perfil linear para variável R, segundo Equação 4.2. O ponto ótimo para o substrato, como mencionado, está dentro da região experimental de 30 a 60 g/L. Sobre a concentração de rocha, dentro da faixa estudada, está deverá ser maior que 22 g/L.

#### Determinação dos pontos ótimos

Para a determinação dos pontos ótimos de temperatura, substrato e rocha fosfática foi utilizado o software Máxima como ferramenta para o cálculo da inversa da matriz dos termos quadráticos, determinação das raízes características (autovalores) e cálculo dos pontos estacionários, conforme código descrito no APÊNDICE 3. Maiores informações conceituais estão descritas na Seção 2.3 do Capítulo 2.

Deste modo, foram determinadas as raízes características da matriz simétrica dos coeficientes quadráticos da equação do modelo completo codificada, Equação 4.1, que foram obrigatoriamente reais (- 40,15, - 28,79 e - 4,66). Logo em seguida, foram calculados os pontos estacionários ( $X_{10} = 0,43$ ,  $X_{20} = 0,09$ ,  $X_{30} = 3,19$ ) através da Equação 4.3. Os pontos estacionários maximizam a solubilização do fósforo, pois os autovalores foram negativos.

$$X_0 = -\frac{1}{2}B^{-1}b \quad (4.3)$$

Sendo:

$B^{-1}$  = matriz inversa dos coeficientes quadráticos;

b = matriz dos coeficientes lineares.

Substituindo os pontos estacionários na Equação 4.4 obtêm-se os pontos ótimos de temperatura igual a 37,3 °C, substrato igual a 41,3 g/L e rocha igual a 36,4 g/L em escalas reais.

$$X_0 = \frac{E - E_0}{\frac{E_1 - E_{-1}}{2}} \quad (4.4)$$

Sendo:

$X_0$  = Ponto estacionário codificado (adimensional);

E = Variável em escala real;

$E_0$  = Variável real no nível zero;

$E_1$  = Variável real no nível 1;

$E_{-1}$  = Variável real no nível -1.

Conforme discutido na Figura 4.8 e agora determinado pela Equação 4.4, o ponto ótimo da concentração de rocha está fora da região experimental (36,4 g/L).

Experimentos em torno do ponto ótimo para concentração de rocha foram realizados, Tabela 4.16, em seguida foi efetuada a validação do modelo, Tabela 4.17.

Tabela 4.16 - Variação da concentração de rocha com T = 37 °C e S = 41 g/L.

Concentração de rocha (g/L)	P (mg/L)
25	370,3
30	376,5
36	381,3
42	357,1

Tabela 4.17 - Validação do modelo.

	Variáveis			Resultado
	T °C	S g/L	R g/L	P mg/L
Melhor resultado da Tabela 4.20	37	41	36	381,3
Resultado segundo equação do modelo reduzido, Equação 4.2	37	41	36	385,1

Conforme resultados da Tabela 4.17, confirmou-se a validação do modelo. Em trabalho semelhante com *A. niger* e rocha fosfática (SAMPAIO et al., 2003) envolvendo planejamento e otimização dessas mesmas variáveis foram obtidos valores ótimos de 34 °C para temperatura, 26,1 g/L para substrato e 7,86 g/L de rocha fosfática obtendo ao final do ensaio valor de 537,4 mg/L (1647 µg/mL PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) de fósforo em solução.

#### 4.3.4.2 - Planejamento experimental para o Isolado 9

A Tabela 4.18 apresenta os resultados do planejamento experimental para o Isolado 9. Com estes resultados já é possível fazer algumas considerações preliminares:

- Comparando os experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8 e 9 e 10, observa-se que o aumento da temperatura, mantendo as demais variáveis constantes, conduziu em uma diminuição no resultado de solubilização de fósforo;
- Comparando os experimentos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8 e 13 e 14, observa-se que o aumento da concentração de rocha, mantendo as demais variáveis constantes, não apresentou um único comportamento e nem uma variação muito significativa na resposta;

- Comparando os experimentos 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8 e 11 e 12, observa-se que o aumento da concentração de substrato, mantendo as demais variáveis constantes, demonstrou aumento de solubilização em alguns pontos e diminuição em outros.

Com a equação proposta pelo modelo estatístico e os gráficos de superfície de resposta, apresentados logo a seguir, será possível não só avaliar melhor os comportamentos mencionados, mais também avaliar a sensibilidade dos mesmos.

Tabela 4.18 - Resultados da matriz do planejamento experimental para Isolado 9.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			Resultados
	T	S	R	T (C)	S (g/L)	R (g/L)	P (mg/L)
1	-1	-1	-1	33	18	7	152,4
2	-1	-1	1	33	18	21	145,8
3	-1	1	-1	33	60	7	128,4
4	-1	1	1	33	60	21	131,4
5	1	-1	-1	39	18	7	89,88
6	1	-1	1	39	18	21	98,4
7	1	1	-1	39	60	7	105,72
8	1	1	1	39	60	21	99
9	-1,68	0	0	31	39	14	179,01
10	1,68	0	0	41	39	14	85,2
11	0	-1,68	0	36	4	14	75
12	0	1,68	0	36	74,5	14	87
13	0	0	-1,68	36	39	2,2	109,8
14	0	0	1,68	36	39	25,8	133,8
15	0	0	0	36	39	14	137,4
16	0	0	0	36	39	14	135,8
17	0	0	0	36	39	14	132
18	0	0	0	36	39	14	133,8
19	0	0	0	36	39	14	132

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Concentração de rocha (R); Fósforo (P).

A seguir a Tabela 4.19 apresenta os coeficientes da regressão do modelo estatístico, estimados a partir dos efeitos das variáveis envolvidas no planejamento experimental. O modelo apresenta coeficiente de correlação  $R^2 = 0,937$ , ou seja, variabilidade de 93,7 % para ajuste aos resultados experimentais.

Tabela 4.19 - Coeficientes da regressão do modelo dos dados da Tabela 4.18  
Var. Dependente Fósforo (mg/L); R-sqr = 0,937; 3 Variáveis; 1 Bloco; 19 Experimentos.

Variáveis	Coeficientes	p	-95% Limite inferior	95% Limite superior
Média	133,86	0,000000	124,20	143,52
(1) T (L)	-23,63	0,000008	-29,48	-17,78
T (Q)	1,09	0,682173	-4,75	6,94
(2) S (L)	-0,13	0,960957	-5,98	5,72
S (Q)	-16,97	0,000104	-22,82	-11,11
(3) R (L)	2,82	0,303472	-3,02	8,67
R (Q)	-2,54	0,350489	-8,40	3,30
1(L) x 2(L)	6,85	0,073197	-0,79	14,50
1(L) x 3(L)	0,67	0,846176	-6,97	8,32
2(L) x 3(L)	-0,70	0,839446	-8,35	6,94

Legenda: Temperatura (T); Conc. de substrato (S); Conc. de rocha (R) Linear (L); Quadrado (Q)

Confere-se pela Tabela 4.19, com intervalo de confiança de 95%, que as variáveis com efeitos significativos (probabilidade p menor que 0,05 ou 5% de significância), marcadas em vermelho, foram temperatura linear e substrato quadrático. Constata-se também a inexistência de efeitos significativos da concentração de rocha e de interações entre variáveis.

Com os coeficientes, define-se a equação do modelo completo codificada, Equação 4.5.

$$P(\text{mg/L}) = 133,9 - 23,6T + 1,1T^2 - 0,1S - 16,9S^2 + 2,8R - 2,5R^2 + 6,8TS + 0,7TR - 0,7SR \quad (4.5)$$

Análises de preditos e resíduos também foram efetuadas para o Isolado 9. A Figura 4.10 relaciona os resultados da variável dependente (valores observados) com os valores preditos pelo modelo, permitindo avaliar a qualidade do ajuste e a força da associação, observando pela Figura uma associação menos regular que a observada pelo Isolado 7.



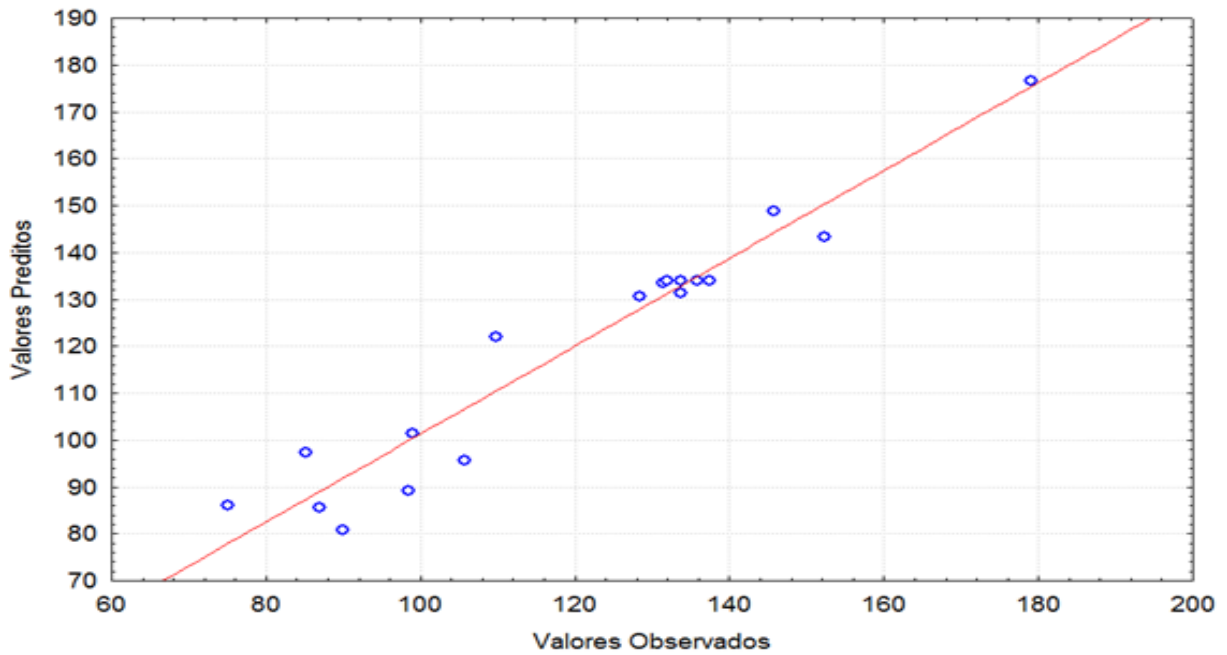


Figura 4.10 - Valores observados vs valores preditos.

A Figura 4.11 relaciona valores preditos pelo modelo com os resíduos (erro), permitindo avaliar a hipótese de resíduo independente e identicamente distribuído, ou seja, variância constante representada por uma distribuição aleatória (nuvens de pontos sem qualquer padrão sistemático). Pela Figura, verifica-se que os resíduos do Isolado 9 foram menores que os resíduos do Isolado 7. Os pontos também demonstraram uma boa aleatoriedade ao redor de zero.

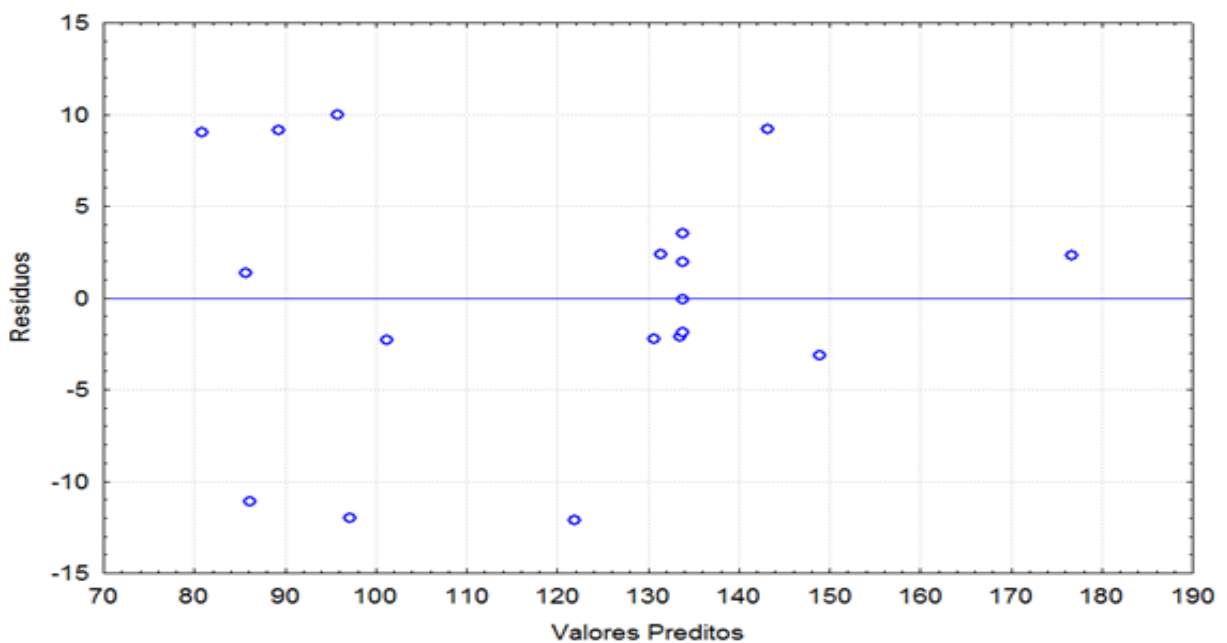


Figura 4.11 - Valores preditos vs resíduos.

A seguir, a Tabela 4.20 faz uma estimativa apenas dos coeficientes dos efeitos significativos das variáveis envolvidas no planejamento experimental. O modelo reduzido apresenta coeficiente de correlação  $R^2 = 0,919$ , ou seja, variabilidade de 91,9 % para ajuste aos resultados experimentais.

Tabela 4.20 - Coeficientes da regressão dos efeitos significativos.

Var. Dependente Fósforo (mg/L); R-sqr = 0,91896; 3 Variáveis; 1 Bloco; 19 Experimentos.

Variáveis	Coeficientes	p	-95% Limite inferior	95% Limite superior
Média	132,68	0,000000	127,34	138,03
(1)T (L)	-23,63	0,000000	-28,47	-18,78
S (Q)	-16,78	0,000002	-21,54	-12,03
1(L) x 2(L)	6,85	0,035650	0,52	13,18

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Linear (L); Quadrado (Q).

Observa-se pela Tabela 4.20, com intervalo de confiança de 95%, que as variáveis com efeitos significativos (probabilidade p menor que 0,05 ou 5% de significância) se mantiveram. Também se tornou significativa a interação entre a temperatura e o substrato.

Com os coeficientes, define-se a equação do modelo reduzido codificada, Equação 4.6.

$$P \text{ (mg/L)} = 132,6 - 23,6T - 16,8S^2 + 6,8TS \quad (4.6)$$

Com a Equação 4.6, pode-se compreender o comportamento da resposta do sistema frente às variáveis envolvidas no planejamento, deste modo, a temperatura foi a única variável isolada que apresentou significância, demonstrando que a mesma é a variável com maior influência na solubilização do fósforo em relação às demais estudadas. O sinal negativo indica que, dentro da faixa analisada e em relação à avaliação do efeito conjunto das variáveis, a diminuição da temperatura provoca um aumento na solubilização do fósforo.

### Superfície de resposta

Com a Equação 4.6, foram estipulados os gráficos que representam as superfícies de resposta e as curvas de contorno entre as variáveis, Figuras 4.12, 4.13 e 4.14 respectivamente.

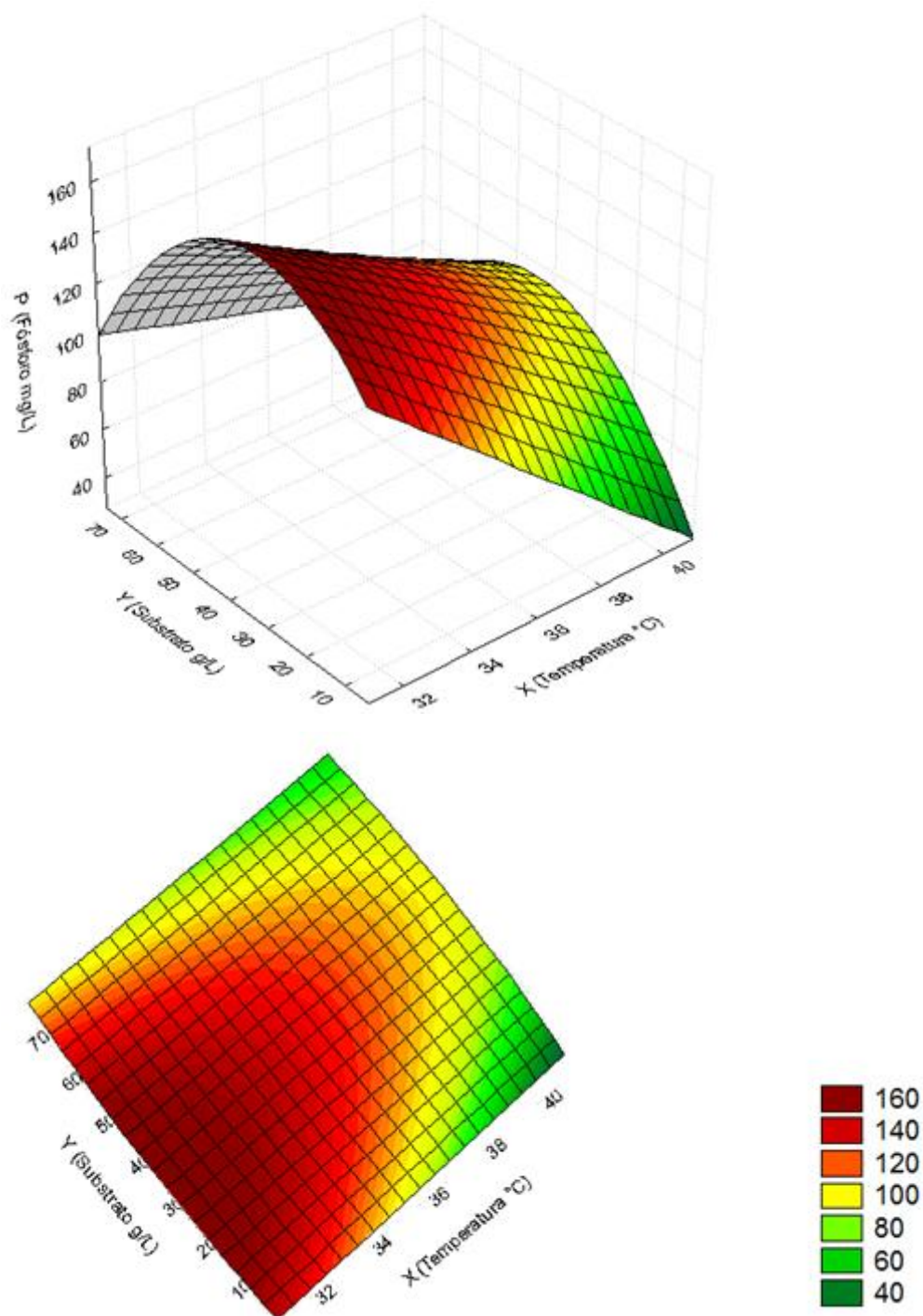


Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e substrato com  $R$  constante no ponto central.

A Figura 4.12 apresenta perfil parabólico para  $S$  e perfil linear para  $T$ , conforme Equação 4.6. Observa-se uma região ótima bem definida para o substrato, entre 20 a 50 g/L, dentro da faixa experimental. Esta região demonstra a possibilidade de se trabalhar em concentrações menores de substrato e ainda obter resultados satisfatórios.

Avaliando a temperatura constata-se que a região ótima esta abaixo do nível inferior (31 °C), indicando que o Isolado 9 possa ter bom desempenho em temperatura ambiente, sem haver a necessidade de controle de temperatura.

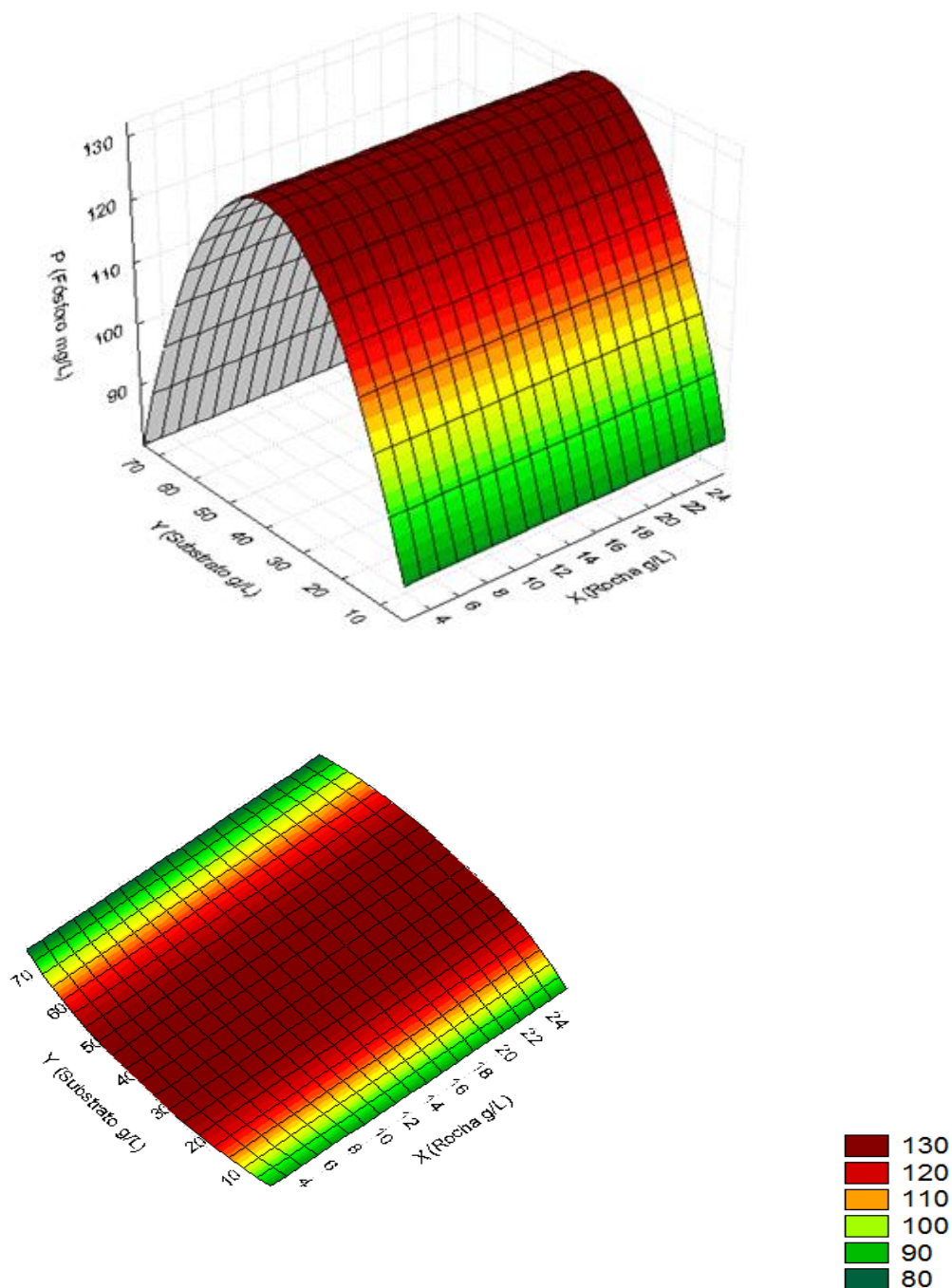


Figura 4.13 - Superfície de resposta e curva de contorno para substrato e concentração de rocha com T constante no ponto central.

A Figura 4.13 apresenta comportamento parabólico para S e comportamento constante para R. O substrato, como mencionado, tem região ótima dentro da faixa

experimental. Observa-se acentuado comportamento parabólico devido ao perfil quadrático de S.

A variação na concentração de rocha não interfere na resposta do sistema, pois dentro da faixa estudada, a rocha não apresentou efeitos significativos.

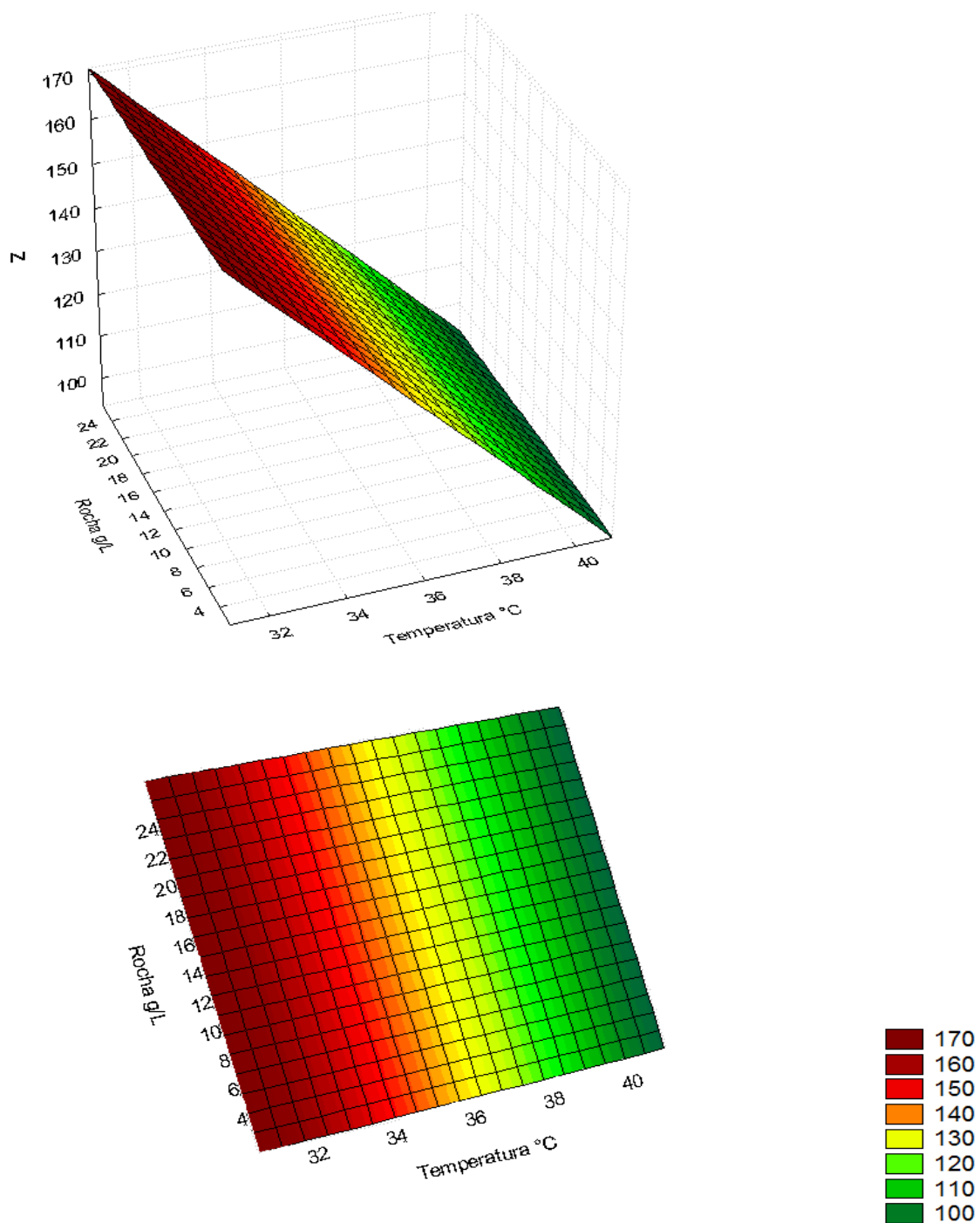


Figura 4.14 - Superfície de resposta e curva de contorno para temperatura e concentração de rocha com S constante no ponto central.

A Figura 4.14 tem comportamento de reta devido a não influência de R, conforme Equação 4.6. A temperatura, como descrito, tem região ótima fora da faixa experimental, abaixo do limite inferior da região experimental. A variação na concentração de rocha não interfere na resposta do sistema, observado pelo perfil constante de R.

#### Determinação da região ótima

Para determinação das regiões ótimas de temperatura, substrato e rocha fosfática foi utilizado o software Máxima como ferramenta para o cálculo da inversa da matriz dos termos quadráticos, determinação das raízes características (autovalores), cálculo dos pontos estacionários e análise canônica, conforme código descrito no APÊNDICE 4. Maiores informações conceituais estão descritas na Seção 2.3 do Capítulo 2.

Deste modo, foram determinadas as raízes características da matriz simétrica dos coeficientes quadráticos da equação do modelo completo codificada, Equação 4.5, que foram obrigatoriamente reais (- 17,5, - 2,5 e 1,7). Logo em seguida, foram calculados os pontos estacionários ( $X_{10} = 6,4$ ,  $X_{20} = 1,3$ ,  $X_{30} = 1,3$ ) através da Equação 4.3. Os pontos estacionários não foram nem de máximo e nem de mínimo, pois os autovalores apresentaram valores positivos e negativos, sendo deste modo, pontos de sela. Este tipo de ponto tem como característica a determinação de uma região ótima, pois não existe um ponto ótimo.

Para melhor definição da região ótima foi aplicada a análise canônica. E através de processos interativos foi possível definir a melhor região dentro da faixa experimental, Tabela 4.21.

Tabela 4.21 - Região ótima para Isolado 9 (resultados da equação canônica APÊNDICE 4)

Temperatura (°C)	Substrato (g/L)	Conc. Rocha (g/L)	Fósforo (mg/L)
31	28,9	16,2	178,7
31	28,9	19,0	178,4
31	28,9	13,4	178,1
31	37,3	16,2	177,8
31	37,3	19,0	177,4
31	28,9	21,8	177,4
31	37,3	13,4	177,3
31	28,9	10,6	176,8
31	37,3	21,8	176,2

Verifica-se pela Tabela 4.21 o que foi discutido nos gráficos de superfície de resposta. A região ótima para temperatura está abaixo de 31 °C, a região ótima para o substrato encontra-se entre 28 a 37 g/L (dentro da faixa experimental), a rocha apresentou valores aleatórios, pois não demonstrou efeitos significativos na faixa estudada.

Experimentos para temperaturas inferiores a 31 °C foram realizados, Tabela 4.22, em seguida foi efetuada a validação do modelo, Tabela 4.23.

Tabela 4.22 - Variação da temperatura a baixo de limite inferior.

Temperatura (°C)	Fósforo (mg/L)
25	226,2
28	251,9

Substrato = 33 g/L e Rocha= 19 g/L.

Tabela 4.23- Validação

	T °C	Variáveis		Resultado
		S g/L	R g/L	P mg/L
Melhor resultado da Tabela 4.26	28	33	19	251,9
Resultado da Equação 4.7 do modelo reduzido	28	33	19	199,0

Legenda: Temperatura (T); Concentração de substrato (S); Conc. rocha (R); Fósforo (P).

Pela Tabela 4.22, observa-se melhor desempenho de solubilização na temperatura de 28 °C, assim, a região ótima para a temperatura evidenciou esta acima de 25 °C e abaixo de 31 °C.

De acordo com os resultados da Tabela 4.23 a validação não se confirmou para o Isolado 9. Isto pode ter ocorrido devido a alterações na morfologia deste fungo, constatado pela diminuição de sua capacidade de esporular e diminuição de sua agressividade. Este comportamento também pode explicar o fato dos resultados de solubilização do Isolado 9 estarem bem abaixo dos valores de solubilização do Isolado 7, mesmo aquele tendo demonstrado excelente desempenho frente aos demais fungos na etapa de classificação quantitativa. De qualquer forma, o Isolado 9 foi mantido para as etapas seguintes.

#### 4.3.4.3 - Avaliação da solubilização do segundo DCCR para o Isolado 7.

Antes de finalizar as discussões referentes aos planejamentos, vale ainda mais uma observação importante. Para isto foram selecionados alguns pontos do segundo DCCR relativo ao Isolado 7, isolado fúngico de melhor desempenho, em ordem crescente de concentração de rocha, conforme Tabela 4.24.

Tabela 4.24 - Avaliação da solubilização do segundo DCCR para o Isolado 7

---

Experimento	Rocha (g/L)	Fósforo (mg/L)	Solubilização (% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )
13	2,2	211	62,4
3	7	211,8	19,7
15	14	294,8	13,7
8	21	276	8,6
14	25,8	326	8,2

---

Constata-se pela Tabela 4.24 que o aumento da concentração de rocha repercutiu no aumento da concentração do fósforo em solução. O segundo DCCR buscou exatamente isto, a quantidade máxima de fósforo solúvel em solução. Mais ao observar os resultados, do ponto de vista da solubilização em porcentagem de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, o que se verificou foi o contrário, a solubilização tende a diminuir com o aumento da concentração de rocha. Estes resultados demonstram que a obtenção biológica de fósforo solúvel em rochas mais concentradas requer técnicas mais aprimoradas, possivelmente um reator sequencial.

Os ensaios das próximas etapas foram conduzidos nas condições ótimas definidas nos planejamentos.

#### **4.4 - Determinação da concentração inicial de esporos**

Após os planejamentos, foi avaliada a concentração inicial de esporo no sistema. A Tabela 4.25 apresenta os resultados obtidos das variações das concentrações iniciais de esporos, para os Isolados 7 e 9, e os resultados do teste estatístico de análise de variância (Anova).



Tabela 4.25 - Variação inicial da concentração de esporo para os Isolados 7 e 9.

Esporos/m L	Isolado 9 – conc. de fósforo			Isolado 7 - conc. de fósforo		
	Ensaio 1 (mg/L)	Ensaio 2 (mg/L)	Ensaio 3 (mg/L)	Ensaio 1 (mg/L)	Ensaio 2 (mg/L)	Ensaio 3 (mg/L)
10 <sup>8</sup>	295	283,4	281,7	382,1	372,4	366,9
10 <sup>7</sup>	275,1	282,2	280,3	369,2	363,1	370,5
10 <sup>6</sup>	260	268,3	259,9	360,5	364,3	351,9
10 <sup>5</sup>	223,6	232,6	224,2	343,3	356,2	252,1
Anova	p = 0,0000 < 0,05			p = 0,0092 < 0,05		

Condição experimental Isolado 9: Temperatura = 28 °C; Substrato = 33 g/L; Rocha = 19 g/L.

Condição experimental Isolado 7: Temperatura = 37 °C; Substrato = 41 g/L; Rocha = 36 g/L.

Grau de significância: 0,05.

Pelo teste de Anova apresentado na Tabela 4.25, obteve-se p igual a 0,0000 para o Isolado 9 e p igual a 0,0092 para o Isolado 7, ambos menores que  $\alpha$  (0,05). Logo, as concentrações iniciais de esporos promovem resultados diferenciados na solubilização do fósforo. Deste modo, é necessário continuar com avaliação estatística a fim de determinar a melhor concentração inicial.

As Tabelas 4.26 e 4.27 apresentam os testes de comparação múltipla entre médias (Teste de Tukey) e os testes aglomerativos (Teste de Scott - Knott) para os Isolados 9 e 7 respectivamente.

Tabela 4.26 – Testes estatísticos para o Isolado 9.

Esporos/mL	Médias (mg/L)	Resultados do teste de Tukey	Resultados do teste de Scott - Knott
10 <sup>5</sup>	226,8	a1	a1
10 <sup>6</sup>	262,7	a2	a2
10 <sup>7</sup>	279,2	a3	a3
10 <sup>8</sup>	286,7	a3	a3

Grau de significância: 0,05

Tabela 4.27 – Testes estatísticos para o Isolado 7.

Esporos/mL	Médias	Resultados do teste de Tukey		Resultados do teste de Scott - Knott
$10^5$	350,5	a1		a1
$10^6$	358,9	a1	a2	a1
$10^7$	367,6		a2	a2
$10^8$	373,8		a2	a2

Grau de significância: 0,05

A Tabela 4.26 apresenta para o teste de Tukey 3 grupos estatisticamente diferentes. As concentrações de esporos do grupo a3 apresentam melhores desempenhos de solubilização e são estatisticamente iguais. Na mesma Tabela, para o teste de Scott – Knott observa-se a mesma análise anterior. Deste modo, as concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  esporos/mL promoveram resultados de solubilização de fósforo diferenciados das demais concentrações e são estatisticamente iguais entre si para o Isolado 9.

A Tabela 4.27 apresenta para o teste de Tukey 2 grupos estatisticamente diferentes e uma ambiguidade entre os grupos. As concentrações do grupo a2 apresentam melhores desempenhos de solubilização e são estatisticamente iguais. Na mesma Tabela, para o teste de Scott – Knott observa-se 2 grupos de concentrações estatisticamente diferentes. Deste modo, levando em consideração a intersecção do teste de Tukey, não existe diferenças nos resultados de solubilização para as concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  esporos/mL para o Isolado 7.

#### 4.5 – Tempo de fermentação

Foi avaliada a cinética de solubilização para os Isolados 7 e 9 nas condições ótimas de trabalho definidas nos planejamentos.

A seguir são apresentadas as Figuras 4.15 e 4.16 referentes à cinética e a taxa de solubilização para o Isolado 7.

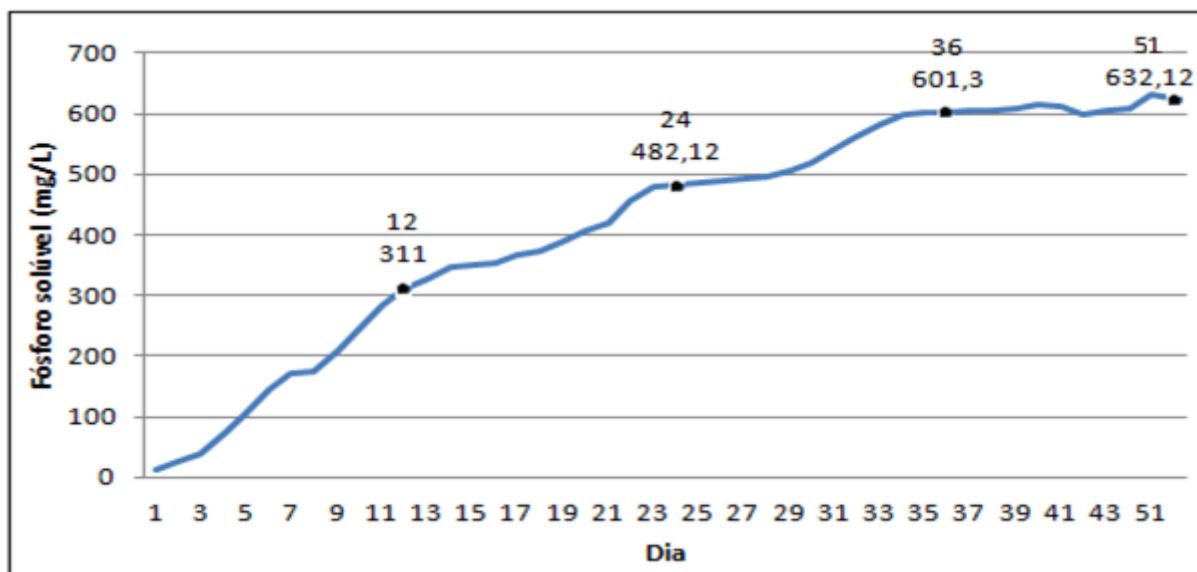


Figura 4.15 - Cinética de solubilização do fósforo referente ao Isolado 7.

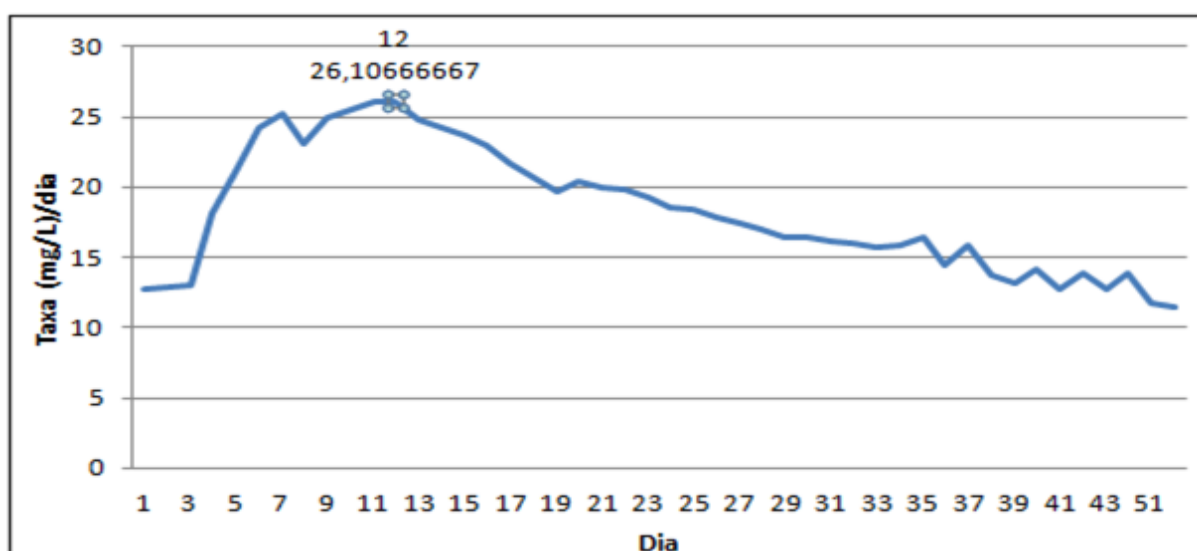


Figura 4.16 – Taxa de solubilização do fósforo referente ao Isolado 7.

A Figura 4.15 apresenta o aumento da concentração (solubilização) do fósforo com o tempo. Foram marcados pontos na Figura em intervalos de 12 dias aproximadamente para melhor compreensão do comportamento do sistema. A solubilização começou a se estabilizar a partir do dia 36 (5 semanas) após o início do ensaio chegando ao final do ensaio com valor de 632,1 mg/L de P em solução.

A Figura 4.16 apresenta a relação da concentração do fósforo em mg/L por tempo em dia. Verifica-se pelo ponto marcado na Figura que a taxa de solubilização foi crescente nos 12 primeiros dias do ensaio ( $\pm 2$  semanas) alcançando valor de 26,1 mg/L por dia.

A seguir são apresentadas as Figuras 4.17 e 4.18 referentes à cinética e a taxa de solubilização para o Isolado 9.

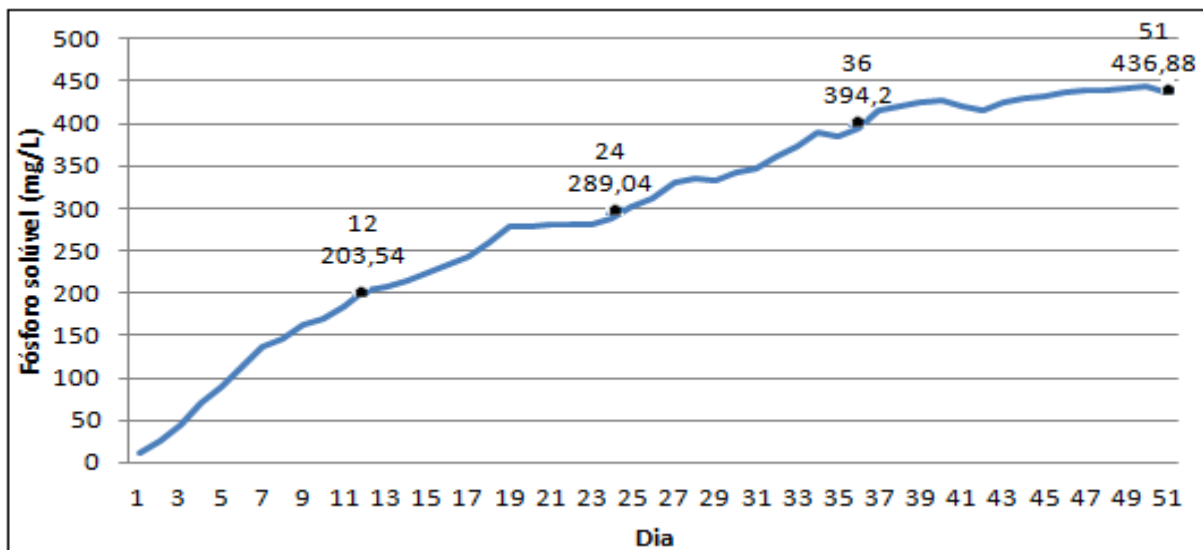


Figura 4.17 - Cinética de solubilização do fósforo referente ao Isolado 9.

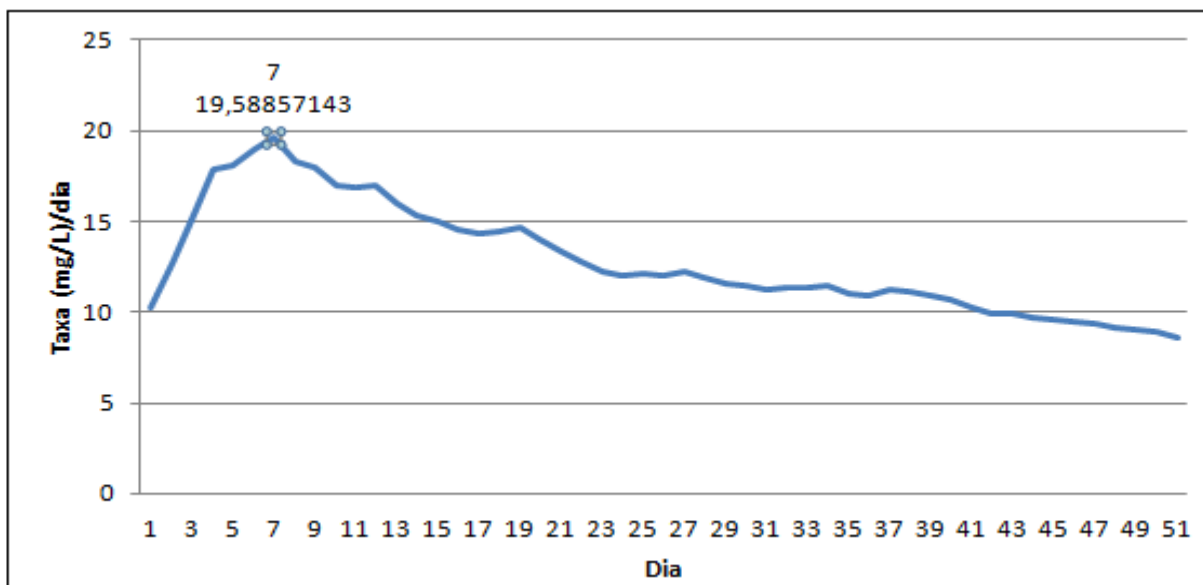


Figura 4.18 – Taxa de solubilização do fósforo referente ao Isolado 9.

A Figura 4.17 apresenta o aumento da concentração (solubilização) do fósforo com o tempo. Foram marcados pontos na Figura em intervalos de 12 dias aproximadamente para melhor compreensão do comportamento do sistema. A solubilização começou a se estabilizar a partir do dia 45 (6 semanas) após o início do ensaio chegando ao final do ensaio com valor de 436,9 mg/L de P em solução.

A Figura 4.18 apresenta a relação da concentração de fósforo em mg/L por tempo em dias. Verifica-se pelo ponto marcado na Figura que a taxa de solubilização foi crescente nos 7 primeiros dias (1 semana) do ensaio obtendo valor de 19,59 mg/L por dia.

Rinu e Pandey (2010) avaliaram a solubilização de fosfato tricálcico em temperaturas diferentes utilizando *A. niger* da região do Himalaia no Índico. Nas temperaturas 21 e 28 °C, a solubilização de fosfato mostrou-se diminuir dentro de 4 semanas de incubação alcançando valores de 2354 µg / mL de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (768 mg/L e P) e 1394 µg / mL de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (455 mg/L de P), ao passo que a 9 °C e 14 °C, continuou ainda até 6 semanas de incubação alcançando valores de a 83 µg / mL de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (27 mg/L de P) e 1452 µg / mL de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (474 mg/L de P).

#### 4.6 - Balanço de massa no sistema rocha, meio líquido e micélio fúngico

A Tabela 4.28 apresenta a massa do fósforo em grama no meio líquido e a porcentagem do mesmo em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Também são apresentadas as incertezas associadas às diluições para os Isolados 7 e 9.

Tabela 4.28 - Determinação do fósforo no líquido (meio de cultura).

Isolado	P no líquido (mg/L)	g de P	Tolerância (g)	% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
7	364,28	0,051	± 0,00064	5,96
9	203,57	0,0285	± 0,00035	3,33

Condições experimentais: Temperatura = 36 °C; Substrato = 39 g/L; Rocha = 14 g/L; Volume 140 mL.

A Tabela 4.29 exibe a massa do fósforo em grama na rocha após tratamento e na rocha sem tratamento (rocha fresca). Também são exibidas as porcentagens do fósforo em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> juntamente com suas respectivas incertezas associadas às diluições.

Tabela 4.29 - Determinação do fósforo nas rochas tratadas e na rocha fresca.

Material	Rocha (g)	g de P	Tolerância (g)	% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Rocha tratada Isolado 7	1,96	0,2538	± 0,001536	29,68
Rocha tratada Isolado 9	1,96	0,2768	± 0,001675	32,36
Rocha fresca	1,96	0,3055	± 0,001849	35,72

Condições experimentais: Temperatura = 36 °C; Substrato = 39 g/L; Rocha = 14 g/L; Volume 140 mL.

A determinação do fósforo na massa micelial por espectrofotometria não foi possível, pois os resultados demonstraram estar abaixo do limite de detecção do método (1 mg/L). Deste modo, a determinação do P micelial foi realizada por diferença entre os outros pontos do balanço de massa, conforme Tabela 4.30.

Tabela 4.30 - Determinação do fósforo no micélio.

Isolado	P Rocha fresca (g)	P rocha tratada (g)	P líquido (g)	P		Massa do micélio (g)	% P no Micélio
				micélio (g)	Tolerância (g)		
7	0,3055	0,2538	0,05172	0,0003658	± 0,00248	0,5965	0,0613
9	0,3055	0,2768	0,02850	0,0002239	± 0,00252	0,2737	0,0818

Pela Tabela 4.30 constatam-se valores poucos significativos do fósforo na massa micelial, menor que 0,1 % para os Isolados 7 e 9. As incertezas que acompanham os resultados são maiores que as próprias medidas, ficando evidente a necessidade de outro método para quantificação mais precisa do fósforo no micélio. De qualquer forma, para a realidade do trabalho, um valor abaixo de 1 mg/L demonstra que o micélio não é fonte significativa de fósforo.

Ainda na Tabela 4.30, confere-se ao Isolado 7 uma massa micelial em peso seco maior que a massa do Isolado 9, mais que o dobro. Este fato pode estar diretamente relacionado ao melhor desempenho de solubilização daquele isolado fúngico.

Os cálculos das incertezas, apresentadas nesta seção, estão descritos no APÊNDICE 2.

#### 4.7 - Proposta de Biorreator

Para ensaio com o biorreator foi selecionado o Isolado 7 devido ao seu melhor desempenho.

Como descrito no capítulo anterior o biorreator tem capacidade para seis 6 litros, reciclo contínuo e oxigenação constante. A Figura 4.19 mostra o biorreator em plena operação em processo fermentativo e uma ilustração do mesmo. Na ilustração observam-se as partes numeradas do biorreator, sendo:

- 1 = mangueira de ar;
- 2 = bomba peristáltica;
- 3 = termômetro graduado;
- 4 = recipiente do micélio;
- 5 = recipiente da rocha;
- 6 = conexão para transição do líquido.

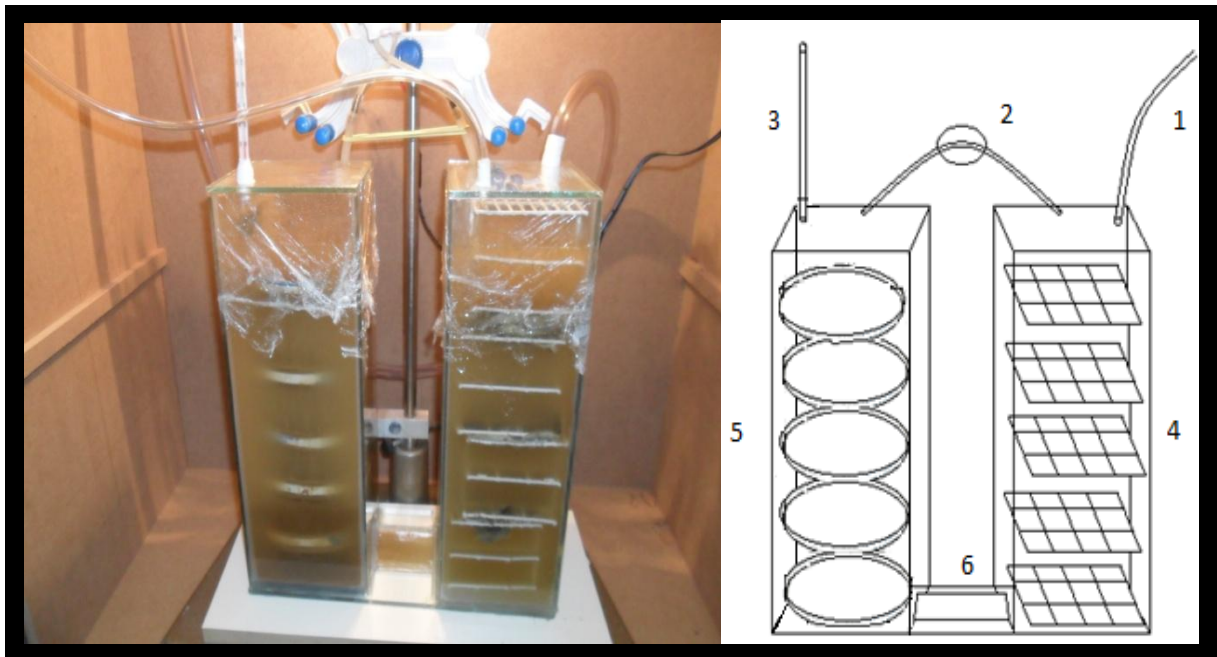


Figura 4.19 - Biorreator em processo fermentativo.

A Tabela 4.31 apresenta o resultado obtido no ensaio juntamente com as condições operacionais.

Tabela 4.31 - Resultado do ensaio com biorreator e condições operacionais.

Condições operacionais						Resultado
Temperatura °C	Substrato g/L	Rocha g/L	Micélio g	Volume L	Tempo Dias	P (mg/L)
37	41	36	8,9	6	12	123,3

Vazão de reciclo: 60 L/h

O biorreator demonstrou desempenho 3 vezes menor que os ensaios de bancada em Erlenmeyer. Vários são os fatores que podem ter contribuído para este resultado, tais como, necessidade de melhor aeração (dispersão de oxigênio no meio), necessidade de agitação mecânica do sistema, a estipulação de uma modelo matemática adequado principalmente em relação à biomassa e a proposta de outro modelo de biorreator que proporcione maior eficiência de solubilização do fósforo.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

#### 5.1 – Conclusões

O *Aspergillus niger* apresentou um bom rendimento em solubilização do fosfato de rocha (apatita) demonstrando ser um agente solubilizador promissor. Porém dentro da mesma espécie constatou-se heterogeneidade na capacidade de solubilização, variando de 253,3 a 387,4 mg/L de P para o tratamento sem agitação e de 316,3 a 460,3 mg/L de P para o tratamento com agitação. Em ambos os tratamentos o p (0,0000) foi bem menor que 0,05 de significância, demonstrando acentuada diferença. Deste modo, quanto mais fungos isolados forem obtidos maiores serão as chances de se obter um isolado fúngico com excelente potencial de solubilização.

A redução do pH do meio e os valores de acidez titulável contribuíram para a solubilização do fosfato de rocha. Porém não foi evidenciado nem uma tendência clara no comportamento do P solúvel com os valores de pH e acidez quando se avaliam várias espécies do mesmo isolado fúngico.

O tratamento com agitação foi estatisticamente melhor que o tratamento sem agitação, isto por que a agitação auxilia na mistura de constituintes do meio de cultura reduzindo ou eliminando gradientes de concentração e de temperatura, tornando assim o meio mais homogêneo. A agitação também promove uma melhor transferência da massa ar-líquido e mantém os sólidos e a biomassa em suspensão, aumentando para os 2 casos, a área interfacial.

A respeito das variáveis estudadas observou-se que a temperatura, em particular, exerceu influência no sistema, sendo o controle da mesma muito importante para constância e rendimento dos resultados. A temperatura se mostrou também heterogeneia para as duas linhagens de *A. niger* estudadas, obtendo uma região ótima de 34 a 38 °C para o Isolado 7 e praticamente temperatura ambiente para o Isolado 9. Ficando evidente a necessidade de uma pré-avaliação antes de realizar o planejamento.

O substrato (glicose) também foi uma variável relevante na resposta do sistema. O mesmo se mostrou mais homogêneo, apresentando região ótima de 30 a 60 g/L



para o Isolado 7 e 28 a 37 g/L para o Isolado 9. No caso do Isolado 7 é possível trabalhar em uma concentração reduzida a metade, devido a maior amplitude da faixa ótima.

A rocha fosfática evidenciou ser uma variável significativa para o Isolado 7 e pouco expressiva para o Isolado 9. Tal comportamento para este fungo, como foi mencionado anteriormente, pode estar relacionado a alterações na sua morfologia, constatado pela diminuição de sua capacidade de esporular e diminuição de sua agressividade, mesmo o isolado fúngico sendo preservado a  $\pm 4$  °C e recoberto com óleo mineral. Deste modo, observa-se a necessidade de avaliar novas formas de preservação, conforme apresentado no ANEXO 1.

A respeito da solubilização, verificou-se com o planejamento o aumento do fósforo solubilizado com o aumento da concentração de rocha fosfática. Mais este aumento não foi proporcional, à porcentagem de solubilização em  $P_2O_5$  em relação à massa da rocha variou de 8,2 a 62,4 %, e os valores mais elevados de solubilização estavam relacionados às concentrações mais baixas de rocha.

A respeito da concentração inicial de esporos no sistema observou-se que apesar das variações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  esporos por mL terem apresentado diferenças estatísticas de solubilização, estas diferenças na prática não foram tão expressivas, principalmente para o Isolado 7.

Por fim o biorreator testado apresentou desempenho 3 vezes menor que os ensaios de bancada, sendo necessário melhorias na proposta do mesmo e nas condições de processo.

## **5.2 – Sugestões para Próximos Trabalhos**

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se para posteriores estudos como proposta para melhor desempenho da solubilização do fosfato de rocha, em concentrações de rocha elevadas, o emprego de reatores sequenciais em batelada (RSB). O RSB obedece a um ciclo de operação pré-determinado, composto por cinco etapas básicas: enchimento, reação, sedimentação, retirada do efluente e repouso. Antes de começar o enchimento, já existe no reator a biomassa fúngica juntamente com a rocha fosfática que permaneceram da fase anterior. Na etapa de reação, o liquor é misturado e aerado. Na fase de sedimentação, sem mistura, os sólidos são sedimentados, para então, durante a próxima fase, de retirada, o efluente é removido. Depois dessa fase, os constituintes que permaneceram no reator ficam em repouso até o começo do próximo ciclo.

Outra opção seria a separação da biomassa da rocha fosfática, ficando a rocha em tanque separado, sobre agitação mecânica, recebendo o efluente ácido de cada ciclo do RSB. A vantagem da separação está no fato de melhor controle sobre a biomassa, uma vez que esta pode sofrer modificações morfológicas devido às várias impurezas contidas na rocha, aumentando acentuadamente o número de variáveis do sistema.

Agora, sobre a melhor configuração do biorreator, seguem nos parágrafos a seguir algumas propostas potenciais.

Biorreatores tipo aerador agitador ("*aeration agitation bioreactor*"). Esse tipo de biorreator é o mais parecido com os fermentadores convencionais. A agitação é basicamente feita por meio de hélices conectadas a um eixo giratório. A grande desvantagem desse modelo de biorreator é que, para haver uma boa homogeneização do meio, é necessário que a hélice gire em velocidades suficientemente elevadas, o que pode ocasionar danos mecânicos acentuados ao material em cultivo.

Biorreator tipo tambor rotatório ("*roller drum bioreactor*"). Nesse tipo de biorreator, o frasco de cultivo gira suavemente em movimentos rotacionais sobre dois eixos, que servem não apenas de apoio, mas que também são responsáveis por imprimir ao frasco de cultivo o movimento rotatório. Nesse tipo de biorreator, o dano mecânico é mínimo. Entretanto, o nível de oxigenação só é adequado quando se utilizam meios de cultura com alta viscosidade (TANAKA et al., 1983).

Biorreator do tipo levantamento de ar ("*air lift bioreactor*"). O meio de cultura nesse tipo de biorreator é movido de baixo para cima dentro de um tubo situado verticalmente no interior do frasco pelas bolhas de ar produzidas no fundo do frasco de cultivo. Esse modelo apresenta bons resultados, uma vez que há uma boa aeração e homogeneização do meio de cultura e pouco dano mecânico ao material em cultivo (PARK et al, 1989).

Biorreator de aeração simples e coluna de bolha ("*bubble column bioreactor*"). A relação altura/diâmetro de 1 a 2 define o biorreator de aeração simples e se a relação é 3 ou acima, o biorreator é do tipo coluna de bolha. Esses modelos de biorreatores apresentam bons resultados no cultivo de hastes caulinares, bulbos, cormos e tubérculos (TAKAYAMA; MISAWA, 1981).

Por fim para avaliar as variáveis primordiais de processo fica a necessidade de uma modelagem matemática e simulação para melhor previsão do comportamento do sistema, inclusive em condições não empíricas. Na literatura estes modelos normalmente envolvem a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), a concentração de substrato (S) e a biomassa (X).

## ANEXO 1

### **Métodos de preservação em micologia (MOLINARO et al., 2010).**

Estes métodos têm como objetivo manter as culturas em estado viável sem mudança morfológica, fisiológica ou genética. Para se obter um bom resultado na aplicação de um método de preservação, a cultura deve estar em ótimas condições, deve-se respeitar as condições ótimas de crescimento, temperatura, umidade, aeração, iluminação e meio de cultivo.

#### **Blocos de ágar em água**

O método consiste em cultivar o micro-organismo em uma placa de Petri contendo um meio de ágar apropriado. Após o crescimento vigoroso o ágar é cortado com uma lâmina estéril em blocos de aproximadamente 4 a 6 mm. No caso de fungos, a partir do final do crescimento das colônias, um número apropriado de cubos é transferido assepticamente para tubos ou frascos contendo 10 a 15 mL de água destilada estéril. Para reativação, basta retirar assepticamente um dos cubos e depositá-los sobre um meio adequado, a sua aplicação fica restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar, como no caso de fungos filamentosos e algumas leveduras.

#### **Secagem em areia, solo e sílica-gel**

Também é considerado como um bom método de conservação de micro-organismos. Pode ser uma simples secagem de esporos ou secagem sob várias condições, como, por exemplo, em secador com ou sem vácuo. Para tanto, emprega-se a seguinte linha de trabalho: Preparar o tubo para estocagem (pode ser de tampa rosquiável ou frascos de penicilina), enchendo-o até  $\frac{3}{4}$  com gel (sílica-gel purificada, sem indicador, 6-22 mesh), depois esterilizar no mínimo durante três horas a 180°C (calor seco), e colocar em atmosfera seca para seguir em banho de gelo overnight. Fazer uma suspensão de esporos em leite frio desnatado (5%). Derramar a suspensão fria sobre a sílica gelada e depois levar para um banho de gelo, pelo menos durante quinze minutos. Deixar os géis à temperatura ambiente (25 a 30°C) dentro de dessecadores até que, com a agitação, os cristais sejam separados (cerca de uma a duas

semanas ou dois a três dias para fungos de crescimento rápido). Armazenar os tubos em dessecadores em sala fria ou recipientes com sílica em geladeira (4°C), embora bons resultados possam ser obtidos à temperatura ambiente.

### **Congelamento**

A preservação das características de micro-organismos armazenados em um freezer com faixa de temperatura de 0 a - 20 °C produz resultados diversos, sendo que seu sucesso depende da espécie do fungo.

Parâmetro de congelamento:

Escolha do tipo de refrigerador, escolha de ampolas e frascos, agentes crioprotetores, culturas e preparação de suspensão, velocidade de resfriamento, estocagem e velocidade de descongelamento.

Pré-resfriamento para congelamento:

- Freezer (velocidade de resfriamento,  $v_r = 1^\circ\text{C}/\text{min.}$ ).
- Gelo seco ( $v_r = 7^\circ\text{C}/\text{min.}$ ).

### **Método do papel de filtro (preservação de fungos entomopatogênicos)**

Procedimento:

- Tiras de papel de filtro previamente esterilizadas (estufa 105°C por 24h), são distribuídas sobre o meio BDA (batata, dextrose e agar), em placas de Petri, pouco antes de endurecer.
- Culturas fúngicas são transferidas para estas placas e incubadas por oito dias (dependendo do isolado) a 28°C.
- As tiras de papel apresentando estruturas fúngicas são retiradas das placas e transferidas para placas de Petri, para então serem mantidas em dessecador contendo sílica gel, onde deverão permanecer por 48 horas à temperatura ambiente.
- Após este período de incubação, as tiras são acondicionadas em saquinhos de papel-manteiga, previamente esterilizados, e armazenadas em dessecador à temperatura ambiente.

### **Método da sílica gel**

Procedimento:

- Preparar recipientes (vidrinhos com tampa ou tubos Eppendorfs) parcialmente cheios com sílica gel (6 a 22 meshs) sem indicador, seca e esterilizada com calor seco (180°C/90 min).
- Cultivar os isolados em meio de cultura até a fase de esporulação.
- Preparar suspensão de esporos em leite em pó desnatado (10%), esterilizado e esfriado a 4°C.
- Adicionar a suspensão de esporos à sílica, resfriada a 4 °C, sendo 0,5 mL da suspensão para 4 g de sílica.
- Incubar a 4°C por trinta minutos.
- Armazenar à temperatura ambiente por duas semanas e depois vedar as tampas.
- Transferir para geladeira (4 °C) para longo período de armazenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLA, M.H.; OMAR, S.A. Survival of rhizobia/bradyrhizobia and a rock-phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agro-industrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. J Plant Nutr 24, 261–272, 2001.
- ABNT/INMETRO. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM). Terceira edição brasileira em língua portuguesa. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, p. 120, 2003.
- AE, N.; ARIHARA, J.; OKADA, K.; YOSHIHARA, T.; JOHANSEN, C. Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. Science, Washington, v. 248, p. 477-480, 1990.
- AGNIHOTRI, V.P. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 16, p. 877-880, 1970.
- AHMAD, N.; JHA, K.K. Solubilization of rock phosphate by microorganism isolated from bihar soil. J. Can. Appl. Microbiol. 14, 89-95, 1968.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV. 2007.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. Rancidity in foods. London: Applied Science. p. 199, 1983.
- APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association , 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-H pH value.
- APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association , 1998. – part 2000 Physical & Aggregate properties, 2310 Acidity.
- APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association , 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-P Phosphorus.
- ASEA, P.E.A.; KUCEY, R.M.N.; STEWART, J.W.B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. Soil Biol. Biochem., v.20, p.459-464, 1988.
- ASTM E 288-03. Standard Specification for Laboratory Glass Volumetric Flasks. USA, ASTM, 2003.
- ASTM E 969-02. Standard Specification for Glass Volumetric (Transfer) Pipets. USA, ASTM, 2002.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. Experimentação agrícola. 3.ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 275, 1995.

- BARROSO, C.B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*, v.29, p. 73-83, 2005.
- BOJINOVA, D.; VELKOVA, R.; GRANCHAROV, I.; ZHELEV, S. The bioconversion of Tunisian phosphorite using *Aspergillus niger*. *Nutr Cycl Agroecosys* 47, 227–232, 1997.
- BOJINOVA, D.; VELKOVA, R.; IVANOVA, R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 99(15), p. 7348-7353, 2008.
- BOLAN, N.S.; ROBSON, A.D.; BARROW, N.J. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphates to plants. *Plant Soil*, v.99, p.401-410, 1987.
- BORGES, V.C.; FERRINI, M.T.; CAMPOS, F.G.; WAITSZERG, D.L.; OLIVEIRA, G.P.C.; BOTTONI, A. Minerais. In *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu. p. 117, 2004.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; FILHO, J.S.V.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v.1, n.2, p. 18-24, Dez 2001.
- CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. The fungi. London: Academic Press. p. 460, 1997.
- CERETI, C.F.; ROSSINI, F.; FEDERICI, F.; QUARANTINO, D.; VASSILEV, N.; FENICE, M. Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertilizer for wheat (*Triticum durum* Desf.). *Bioresour Technol* 91, 135–140, 2004.
- CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*. v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CETEM - CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL. Fosfato - Mina de Araxá - Serrana. Ministério da Ciência e Tecnologia. CTEC, RJ, Dez 2002. Encontrado em <http://www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2002-186-00.pdf> 12/07/2012.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J.Microbiol.*, v.39, p.941-947, 1993.
- CHEN X.; TANG, J.J.; FANG, Z.G.; HU, S.J. Phosphate - solubilizing microbes in rhizosphere soils of 19 weeds in southeastern China. *Journal of Zhejiang University Science*, Hangzhou, v. 3, p. 355-361, 2002.
- CHEW, V. Comparisons among treatments means in an analysis of variance. Washington: USDA, 1977.
- CHUANG, CHUN-CHAO.; KUO, YU-LIN.; CHAO, CHEN-CHING.; CHAO, WEI-LIANG. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 43(5), p. 575-584, 2007.

- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, p. 23, 2005.
- COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. 198f. Tese (Doutorado em Ciências). Pósgraduação em Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 1993.
- COUTINHO, F.P.; FELIX, W.P.; YANO-MELO, A.M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. *Ecological Engineering*. v.42, p.85-89, 2012.
- CROLLA, A.; KENNEDY, K.J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *Journal of Biotechnology*, v. 89, n. 1, p. 27-40, 2001.
- CUNNINGHAM, J.E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.5, p.1451-1458, 1992.
- CVM/IAN (Comissão de Valores Imobiliários/Informações Anuais da empresa). Informações anuais: Fosfertil. Comissão de Valores Mobiliários – CVM. São Paulo, 2008.
- DATTA, M.; BANIK, S.; LASKAR, S. Effect of inoculation of phosphate-dissolving bacteria on rice (*Oryza sativa*) in acid soil. *Indian J. Agric. Sci.*, v.62, p. 482-485, 1992.
- DEMIREL, G.; KURSAT, O.Y.; AHMET, Y. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. *Food Chemistry*, v.89, p.393-396, 2005.
- DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral. Anuário estatístico. Brasília, 2001.
- FELIPE, C.A.V. Influência das variáveis de processo na qualidade de semente de soja submetidas à secagem em leito deslizante e escoamentos concorrentes. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, 1999.
- FREITAS, J.R de.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate - solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola ( *Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 24, p. 358-364, 1997.
- GAIND, S.; GAUR, A.C. Shelf life of phosphate-solubilizing inoculants as influenced by type of carrier, high temperature, and low moisture. *Can. J. Microbiol.*, v.36, p.846-849, 1990.
- GAIND, S.; GAUR, A.C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mungbean. *Plant Soil*. v. 133. p. 141-149. 1991.
- GAUER, A.V. Ensaio in vitro - fosfatos: combinações e seus benefícios. Monografia de estudo, 1998.



- GERRETSEN, F.C. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. Plant and Soil, Dordrecht, v. 1, p. 51-81, 1948.
- GOLDSTEIN, A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. American Journal of Alternative Agriculture, v. 1, n. 2, p. 51-57, 1986.
- GREENFIELD, S.; CLIFT, M. Analytical chemistry of the condensed phosphates. International series in analytical chemistry. Pergamon Press. v. 57, p. 155, 1974.
- GRIMM, L.H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 69, p. 375-384, 2005.
- GUPTA, N.; DAS, S.; BASAK, U.C. TCP and rock phosphate solubilization by mangrovefungi grown under different pH and temperature in liquid culture. J. Agric. Technol. 6, 421-428, 2010.
- GUPTA, N.; SABAT, J.; PARIDA, R.D. Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. Acta Bot. Croat. 66. p. 197-204. 2007.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J. Cloning of mineral phosphate solubilizing genes from (*Synechocystis*) PCC 6803. Current Science, Bangalore, v. 74, p. 1097-1099, 1998.
- HAQ, I. et al. Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. J. Biotech., v.5, n.2, p., 2002.
- HOFFLAND, E.; FINDENEGG, G.R.; NELEMANS, J.A. Solubilization of rock phosphate by rape. I. Evaluation of the role of the nutrient uptake pattern. Plant Soil, v.113, p.155-160, 1989.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology, v.8, p. 301-306, 2005.
- HOURANT, P. General properties of the alkaline phosphates. Major food and technical applications. Proceedings of IMPHOS. Phosphorus research bulletin. The journal of phosphorus chemistry. v. 15, p. 85-94, 2004.
- ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$  with P solubilizing microorganisms. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 27, n. 3, p. 265-270, 1995.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem., v.27, n.3, p.265-270, 1995.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol. Biochem., v.24, p. 389-395, 1992.

- IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock phosphate solubilization by soil bacteria. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 41. 3. p. 297-302. 2006.
- KANABO, I.A.K.; GILKES, R.J. The role of soil pH in the dissolution of phosphate rock fertilizers. Fert. Res., v.12, p.165-174, 1987.
- KARA, A.; BOZDEMIR, T.O. Optimization of the growth parameters of *Aspergillus foetidus*. Acta Biotechnol., v.18, n.4, p.327-338, 1998.
- KORNBERG, A.; RAO, N.N.; AULT-RICHÉ, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many function. Annual review of biochemistry. v. 68, p. 89-125, 1999.
- KUBICEK, C.P.; ROHR, M. Citric acid fermentation. CRC - Critical Reviews in Biotechnology, v. 3, n. 4, p. 331-373, 1986.
- KUCEY, R.M.N.; JANZEN, H.H.; LEGGETT, M.E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Advances in Agronomy, New York, v. 42, p. 199-228, 1989.
- KULAIF, Y. Perfil do fosfato (Relatório Técnico nº 53 do Projeto de Assistência Técnica ao Setor de Energia – Projeto Estal). Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral - SGM. Ministério de Minas e Energia - MME, Brasília, p.55, 2009. Disponível em [http://www.mme.gov.br/portalmme/opencms/sgm/galerias/arquivos/plano\\_duo\\_dece\\_nal/a\\_mineracao\\_brasileira/P29\\_RT53\\_Perfil\\_do\\_Fosfato.pdf](http://www.mme.gov.br/portalmme/opencms/sgm/galerias/arquivos/plano_duo_dece_nal/a_mineracao_brasileira/P29_RT53_Perfil_do_Fosfato.pdf). Acessado em 17/07/2012.
- LAPIDO-LOUREIRO, F.E. ‘Problemática da produção de ácido fosfórico seguindo as rotas clorídrica e nítrica, com recuperação de subprodutos: Estado de arte’, CETEM, 2000.
- LORENZ, B. et al. Anti-HIV-1 activity of inorganic polyphosphates. J acquir. Immun. Defic. Synd. Hum. Retrovirol. v. 14, n. 2, p. 110-118, Fev, 1997.
- MANDAL, S.K.; BANERJEE, P.C. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. Process Biochem., v.40, p.1605-1610, 2005.
- MATTY, M. The production of organic acids. Rev. Biotechnol. 12, 87-132, 1992.
- MCDOWELL, L.R. Minerals in Animal and Human Nutrition. Ed. L.R. McDowell. Academic Press. Pg. 27-77. New York, 1992.
- MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.4, EPSJV, IOC, RJ, 2010.
- MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, New York, 4<sup>th</sup> ed, 704p, 1999.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora da Ufla, p. 626, 2002.

- NAHAS, E. Ciclo do fósforo: transformações microbianas. Jaboticabal – SP: FUNEP, p. 67, 1991.
- NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. World J. Microbiol. Biotech.,v.12, p.567-572, 1996.
- NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, p. 467-486, 1999.
- NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. Revista Brasileira de Ciência do solo, Campinas, v. 18, p. 43-48, 1994.
- NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V. L.; ANJOS J. T.; SILVA FILHO, G. N. Resposta da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. Pesq. Agropec. Bras., v.37, p.841-845, 2002.
- NARSIAN, V.; PATEL, H.H. Aspergillus aculeatus as a rock phosphate solubilizer. Soil Biol. Biochem. 32, 559-565, 2000.
- NAUTIYAL, C.S. Na efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Letters, v.170, p.265 -270, 1999.
- OGBO, F. C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. Bioresource Technology, June, v. 101(11), p. 4120(5), 2010.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Production of organic acids by solid state fermentation. In: Solid-state fermentation in biotechnology fundamentals and applications. Asistech Publishers, Inc.: New Delli , p. 113-126, 2001.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Physiological aspects of free and immobilized Aspergillus niger cultures producing citric acid under various glucose concentrations. Process Biochem., v.39, p.1963 -1970, 2004.
- PARK, J.M.; HU, W-S.; STABA, E.J. Cultivation of Artemisia annua L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. Biotechnol. and Bioeng. 34:1209-1213, 1989.
- PAZOUKI, M.; FELSE, P.A.; SINHA, J.; PANDA, T. Comparative studies on citric acid production by Aspergillus niger and Candida lipolytica using molasses and glucose. Bioprocess Engineering, v. 22, p. 353-361, 2000.
- PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of Mesorhizobium mediterraneum under growth chamber conditions. Soil Biol. Biochem., v.33, p.103-110, 2001.

- PEREIRA, J.C.B. Estudo físico-químico do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para nutrição parenteral. Dissertação de mestrado para o programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas - UFPE, 2007.
- PIKOVSKAYA, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17, 362-370, 1948.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 12a ed. Piracicaba: Nobel, p.430, 1987.
- POURBAIX, M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. 2nd ed, Houston, Texas : National Association of Corrosion Engineers, 1974.
- RASHCHI, F.; FINCH, J.A. Polyphosphates: a review their chemistry and application with particular reference to mineral processing. *Mineral engineering*. v. 13, n.10-11, p, 1019-1035, 2000.
- REYES, I. et al. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.*, v.33, p.1741-1747, 2001.
- RINU, K.; PANDEY, A. Temperature-dependent phosphate solubilization by cold- and pH-tolerant species of *Aspergillus* isolated from Himalayan soil. *Mycoscience*, v. 51(4), p. 263-271, 2010.
- RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2º ed, Cárita Editora, Campinas -SP, Casa do espírito amigo fraternidade fé e amor, 2009.
- RODRIGUEZ, M.H.; GALLEGO, A.S. Tratado de nutrición. Edicione Díaz de Santos. Madri, 1999.
- ROHR, M.; KUBICEK, C.P.; KOMINEK, J. Citric acid. In: *Biotechnology*. 3, G. Reed and H. J. Rehm Eds. Verlag Chemie, Weiheim, p.419-454, 1983.
- ROSA, C.A.R.; CAMPOS, S.G.; BARONI, F.A. Práticas de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.
- RUIJTER, G.J.G.; PANNEMAN, H.; VISSER, J. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophysica Acta*, v.1334, p.317-326, 1997.
- SABER, W.I.A.; GHANEM, K.M.; EL-HERSH, M.S. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. and their promotion to mung bean plants. *Res. J. Microbiol.* 4, 235–250, 2009.
- SALIH, H.M. et al. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant Soil*, v.120, p.181-185, 1989.

- SAMPAIO, R.M.; ALEGRE, R.M.; MARCOS, S.K.; BARROTI, G.; UBEDA, B. T. Estudo da Solubilidade de Fosfato de Rocha Tipo Tapira por Fungos do Gênero *Aspergillus*. In: XIV Simpósio Brasileiro de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis. Anais do. XIV Simpósio Brasileiro de Fermentações - SINAFERM, 2003.
- SANKPAL, N.V.; JOSHI, A.P.; KULKARNI, B.D. Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: influence of morphological and fermenter conditions on productivity. Process Biochem., v.39, p.1129-1139, 2001.
- SANTOS, S.F.M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.
- SAYER, J.A.; KIERANS, M.; GADD, G.M. Solubilisation of some naturally occurring metal-bearing minerals, limescale and lead phosphate by *Aspergillus niger*. Fems Microb. Letters, v. 154, p. 29-35, 1997.
- SCHNEIDER, K.D.; VAN STRAATEN, P.; DE ORDUÑA, R.M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P.S. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. Journal of Applied Microbiology, v.108(1), p. 366-374, 2010.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics, Washington, v. 30, p. 507-512, Sept. 1974.
- SESHADRI, S. et al. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. Current. Science, v.79, n.5, p.565-567, 2000.
- SHRIVASTAVA, M.; KALE, S.P.; D'SOUZA, S.F. Rock phosphate enriched post-methanation bio-sludge from kitchen waste based biogas plant as P source for mungbean and its effect on rhizosphere phosphatase activity. European Journal of Soil Biology, v.47(3), p. 205-212, 2011.
- SILVA FILHO, G.N. Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo. 140p. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- SILVA, E.C. Avaliação do poder e taxas de erro tipo I do teste Scott - Knott por meio do método de Monte Carlo. Lavras: UFLA, 54p. (Dissertação - Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária), 1998.
- SILVA, I.P.; SILVA, J.A.A. Métodos estatísticos aplicados à pesquisa científica: uma abordagem para profissionais da pesquisa agropecuária. Recife: UFRPE, p.305, 1999.
- SINGH, S.M.; YADAV, L.S.; SINGH, S.K.; SINGH, P.; SINGH, P.N.; RAVINDRA, R. Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus* strains. Polar Res 30:7283–7289, 2011.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, p. 236, 1988.

- SPERBER, J.I. Solution of mineral phosphates by soil bacteria. Nature, London, v. 180, p. 994-995, 1957.
- SPERBER, J.I. The incidence of apatite- solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res., v.9, p.778-781, 1958a.
- SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, v. 9, p. 778-781, 1959.
- STAMFORD, N. et al. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and *Acidithiobacillus* in a soil with low available-P. Scien. Agricola, v. 60, p.767-773, 2003.
- SUDHAKARA REDDY, M.; KUMAR, S.; BABITA, K., REDDY, M.S. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. v. 84, p. 187-189, 2002.
- SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. Field Crops Res., v.77, p.43-49, 2002.
- SWART, P.H.; DIEST, A.V. The rock- phosphate solubilizing capacity of *Pueraria javanica* as affected by soil pH, superphosphate priming effect and symbiotic N<sub>2</sub> fixation. Plant Soil, v.100, p.135-147, 1987.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras da Amazônia. Acta Amazônica, Manaus, v. 12, n.1, p. 15-22, mar. 1982.
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. Plant & Cell Physiol. 22(3):461-467. 1981.
- TANAKA, H.; NISHIJIMA, F.; SUWA, M.; IWAMOTO, T. Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnol. Bioeng. 25:2359-2370. 1983.
- TANAKA, M.A.S. Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes. In: SDAVE, J. & WETEZEL, M.M.V.S. (Eds.). Patologia de sementes. p. 313-29. 1987.
- TIMEIS - Technology innovation management and entrepreneurship information service. Citric acid. Índia, 2000. Sitado em RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- TSAY, S.S.; TO, K.Y. Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. Biotechn. Bioengineering, v.24, p.297-304, 1987.
- ÜNAL, S.B.; ERDOGDU, F.; EKIZ, H.I. Effect of temperature on phosphate diffusion in meats. Journal of food engineering. v. 76, n. 2, p. 119-127, 2006.

- USGS. United States Geological Survey. Phosphate rock. Mineral Commodity Summaries. Reston, 2009c. Disponível em: <http://minerals.er.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2009/mcs2009.pdf>. Acessado em 12/09/2012.
- VAN WAZER, J.R.; CALLIS, C.F. Metal complexing by phosphates. Chemical review. v. 58, n. 6, p. 1011-1046, 1958.
- VASSILEV, N. et al. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. J. Biochn., v.91, p.237-242, 2001.
- VASSILEV, N.; BACA, M.T.; VASSILEVA, M.; FRANCO, I.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. Appl Microbiol Biotechnol 44, 546–549. 1995.
- VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; VASSILEVA, M. Stress-tolerant P solubilizing microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 95(4), p.851-859, 2012.
- VASSILEVA, M. et al. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. Bioresource Technology, v.67, p.229-232, 1999.
- VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. J Biotechnol 63, 67–72, 1998.
- VASSILEVA, M.; VASSILEV, N.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. World J. Microbiol. 14. p. 281-284. 1997.
- VAZQUEZ, P.; HOLGUIM, G.; PUENTE, M.E.; CORTES, A.L.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol Fertil Soils. v. 30. p. 460-468. 2000.
- WAHID, O.A.A.; MEHANA, T.A. Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorusuptake by wheat and faba bean plants. Microbiol Res 155, 221–227, 2000.
- WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Adv. Agron, v.96, p.99 -151, 2000.
- WU, S.C. et al. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma, v.125, p.155-166, 2005.
- YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. Fósforo na agricultura brasileira. Associação brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato. Piracicaba. 2004.
- YOKOYA, F. Fermentação cítrica. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 79 p., 1992.
- ZAYED, G. Can immobilization of *B. megaterium* cells in alginate beads protect them against bacteriophages. Plant Soil, v.197, p.1-7, 1997.

## APÊNDICE 1

### Equação de Nernst e os diagramas de Pourbaix

A equação de Nernst serve para mostrar o que efetivamente ocorre quando células eletroquímicas operam fora das condições padrão. Podemos demonstrar a equação de Nernst relacionando a variação livre de energia de Gibbs da reação e a diferença de potencial da pilha através da seguinte relação:

$$\Delta G(\text{reação}) = -nFE \quad e \quad \Delta G^0 = -nFE^0$$

Revisando:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q \quad Q = \text{quociente reacional}$$

Substituindo em  $\Delta G$  e  $\Delta G^0$ , teremos:

$$-nFE = -nFE^0 + RT \ln Q \quad (\text{dividindo tudo por } nF)$$

Teremos

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \log Q \quad \text{Em que temos uma expressão válida para qualquer temperatura.}$$

$E^0$  = potencial nas condições padrão.

$Q$  = quociente reacional das espécies envolvidas.

Obs: lembre-se que para água e sólidos a concentração dos reagentes ou produtos é igual uma unidade e quando se trata de gases em vez da concentração utiliza-se a pressão parcial da substância.

$T$  = temperatura (K)

$n$  = número de elétrons envolvidos nas semi-reações.

$R$  = constante geral dos gases: 8,31 J/Kmol.

$F$  = Faraday:  $9,65 \times 10^4$  J/Vmol ou 23,09 Kcal/V



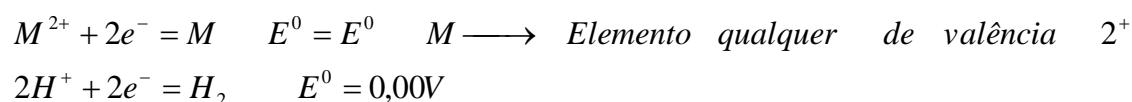
Substituindo os valores das constantes e considerando a temperatura 25°C (298 K), e sabendo que  $\ln K = 2,303 \log K$  a equação de Nernst pode ser reescrita como:

$$E = E^0 - \frac{0,0257}{n} \ln Q \quad \text{ou} \quad E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log Q \quad \text{a} \quad 25^\circ\text{C}$$

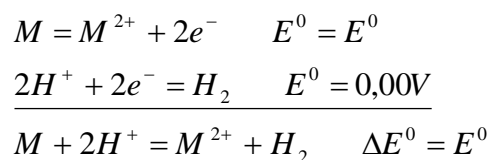
### Equação de Nernst e o pH

Em células eletroquímicas nas quais o hidrogênio é o reagente ou produto é possível calcular o pH da solução a partir da equação de Nernst. A idéia é de partindo de um potencial da pilha conhecido, obter a concentração de  $H^+$  na equação de Nernst.

Aplicando:



Resolvendo



Quociente reacional:  $Q = \frac{[M^{2+}] \times P_{H_2}}{[H^{2+}]^2}$  substituindo;

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{2} \log \frac{[M^{2+}] \times P_{H_2}}{[H^{2+}]^2} \quad P_{H_2} = 1 \text{ atm}$$

$$E = E^0 - 0,0296 \log [M^{2+}] - 0,0296 \log [H^+]^2 \quad pH = -\log [H^+]$$

$$E = E^0 - 0,0296 \log [M^{2+}] + 0,0592 pH$$

Desta forma, esta equação traduz uma relação entre potencial e o pH da solução.

## Diagramas de Pourbaix

Os diagramas de Pourbaix, desenvolvidos por Marcel Pourbaix (1904-1998), são diagramas de equilíbrio termodinâmico nos quais se relaciona o potencial de um dado elemento com o pH da solução com a qual ele contacta, e que permite prever se esse elemento apresenta ou não tendência para se dissolver (perda de elétrons) nesse meio.

A ferramenta para construção desses diagramas é a equação de Nernst, desenvolvida a partir da relação entre a variação da energia livre de Gibbs da reação e a diferença de potencial de uma pilha, cuja representação no diagrama de E-pH origina uma reta ( $E = m\text{pH} + b$ ). Essas retas podem apresentar três situações:

- Reações eletroquímicas que não envolvem  $\text{H}^+$  (originam linhas horizontais).
- Reações eletroquímicas que envolvem  $\text{H}^+$  (originam linhas oblíquas/inclinadas).
- Reações químicas (originam linhas verticais).

A Figura 1 apresenta um esquema do diagrama de Pourbaix com linhas horizontais, inclinadas e verticais.

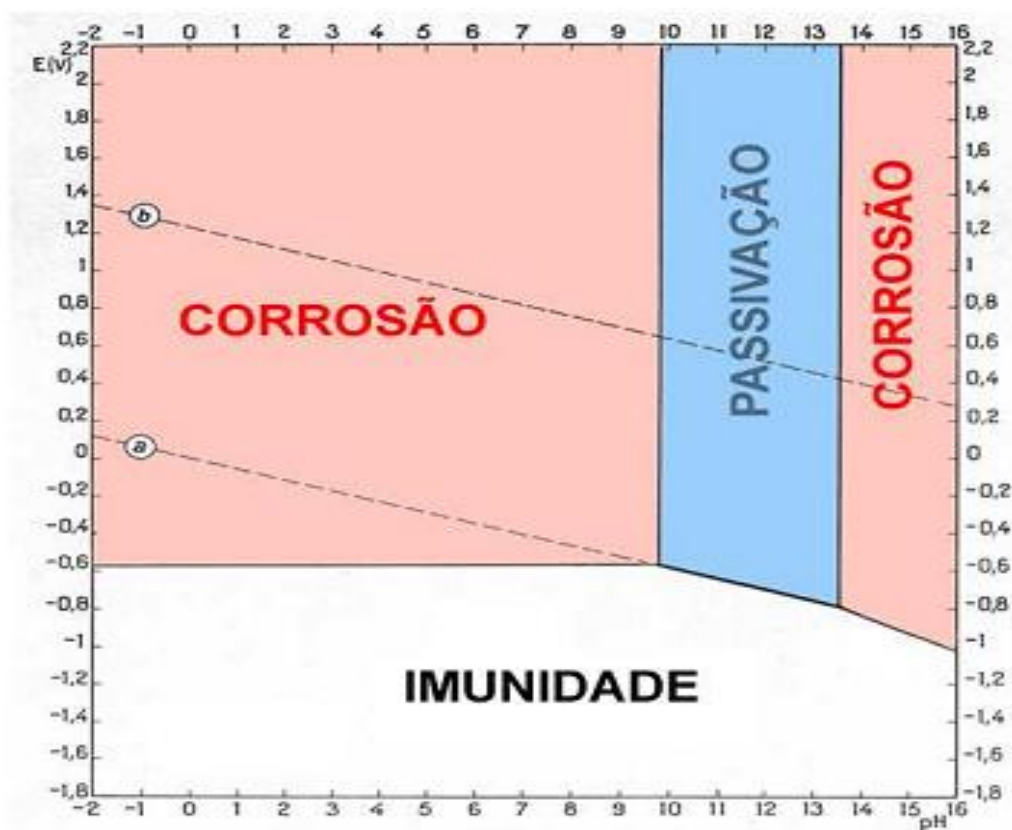


Figura 1 - Esquema geral do diagrama de Pourbaix.

Como as reações acontecem em meio aquoso é comum representar nesses diagramas o comportamento da água em soluções aeradas e desaeradas.

Solução desaerada:  $2H^+ + 2e^- = H_2$  linha a na Figura 1.

Solução aerada:  $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- = H_2O$  linha b na Figura 1.

Na região entre a e b a água é estável, enquanto que acima da linha b se verifica liberação de  $O_2$  (oxidação) e abaixo da linha a ocorre liberação de  $H_2$  (redução).

Dependendo onde o elemento em estudo estiver posicionado na Figura 1 em determinado E e pH o mesmo pode sofrer redução (passivação) ou oxidação (corrosão ou dissolução) através das duas equações descritas acima.

### Limitações dos diagramas de Pourbaix

Pelo que foi referido fica claro a importância dos diagramas de Pourbaix em engenharia, pois os mesmos proporcionam uma base muito firme, sob o ponto de vista termodinâmico, na interpretação das reações de corrosão, oxidação e dissolução. Contudo, deve-se tomar cuidado na sua utilização, já que os diagramas apresentam as mesmas limitações de qualquer cálculo termodinâmico:

- Pressupõem que todas as reações consideradas são reversíveis e rápidas, que nem sempre acontece.
- Não informam sobre a cinética dos processos (velocidade das reações) apenas indicando se uma reação é ou não termodinamicamente possível.

### **Diagrama de Pourbaix para o fósforo**

A seguir, a Figura 2 representa o diagrama de Pourbaix para o fósforo, demonstrando o comportamento deste elemento em meio aquoso sobre a variação do potencial e do pH do meio.

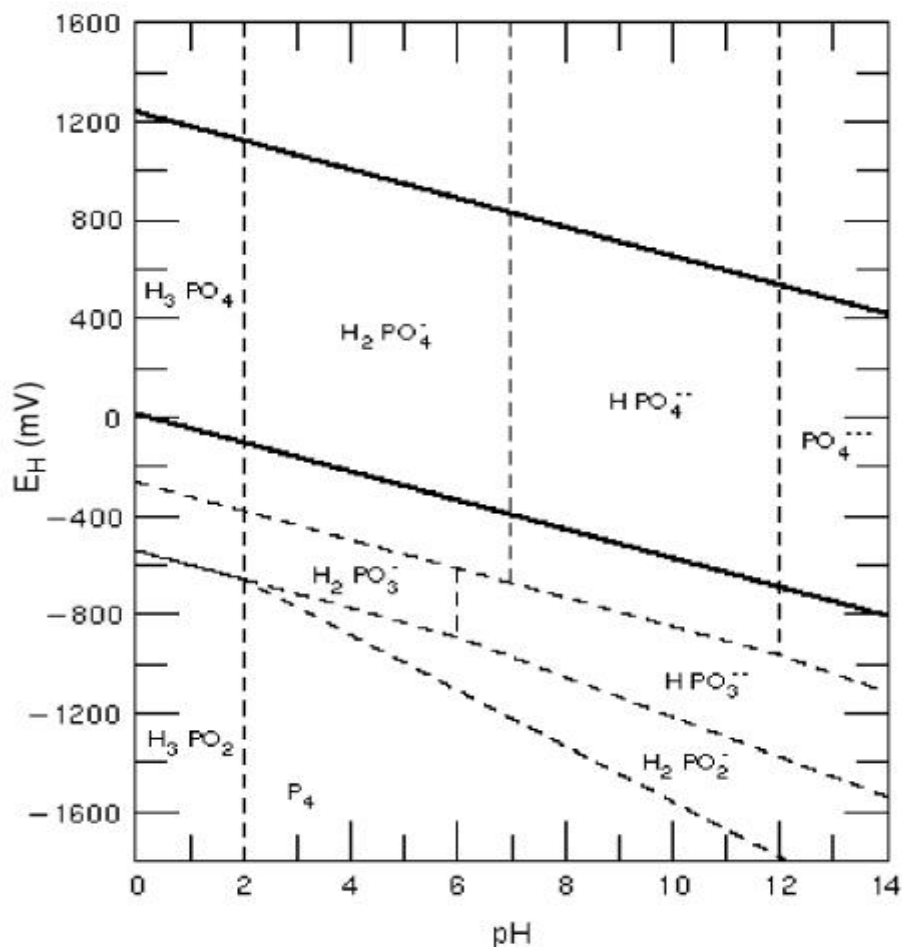


Figura 2 - Diagrama de Pourbaix para o fósforo (POURBAIX, 1974).

O ácido (orto) fosfórico  $H_3PO_4$  e os (orto) fosfatos  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  e  $PO_4^{3-}$  são as formas de fósforo termodinamicamente estáveis na presença de água e soluções aquosas, tanto na ausência como na presença de oxigênio (região de estabilidade da água).

A posição do domínio e predomínio do ácido hipofosforoso  $H_3PO_2$  e o hipofosfito  $H_2PO_2^-$  na Figura 2 mostram que essas substâncias são poderosos agentes redutores, termodinamicamente instáveis em soluções aquosas para todos os pH. Teoricamente, eles devem tender para decomposição da água com a evolução de hidrogênio, convertendo-se em ácido fosforoso  $H_3PO_3$  ou fosfitos  $H_2PO_3^-$  e  $HPO_3^{2-}$ .

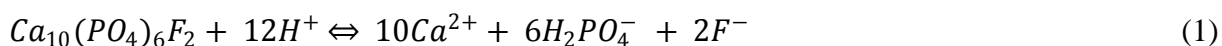
As posições dos domínios e predomínio dos ortofosfitos  $H_2PO_3^-$  e  $HPO_3^{2-}$ , mostram que eles são agentes redutores (menos poderosos do que ácido hipofosforoso  $H_3PO_2$  e o hipofosfito  $H_2PO_2^-$ ), termodinamicamente instáveis em soluções aquosas.

Teoricamente, estes compostos tendem a reduzir a água com a evolução de

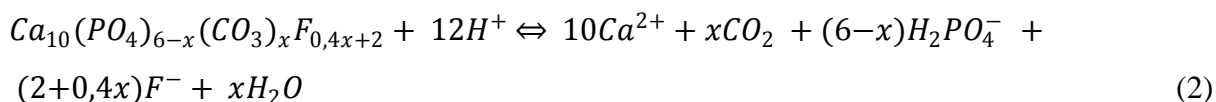
hidrogênio e conseqüentemente oxidados a compostos em que o fósforo se encontra no estado pentavalente: ácido fosfórico  $H_3PO_4$  ou fosfatos  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  e  $PO_4^{3-}$ .

Mas na realidade, a ação redutora do ácido hipofosforoso, hipofosfito e fosfitos é muito lenta. No entanto, a cinética reacional pode ser elevada pela oxidação destes compostos a ácido fosfórico ou fosfatos por agentes oxidantes como ácido nítrico, ácido crômico, demais ácidos, cromatos de metal alcalino,  $Fe^{2+}$  etc.

Pelo diagrama acima verifica-se que termodinamicamente o Fósforo em solução líquida ou em solução do solo para uma faixa de pH entre 2 a 6 encontra-se predominantemente na forma do íon  $H_2PO_4^-$ . Com isso, pode-se representar a reação de dissolução da fluorapatita em meio ácido, representada simplificadamente pela Equação 1



A reatividade e a cristalinidade das rochas estão relacionadas com o grau de substituições isomórficas, principalmente de  $PO_4^{3-}$  por  $CO_3^{2-}$  mais  $F^-$ . Estas substituições ocorrem no momento da formação da rocha. Deste modo, a equação química anterior pode ser descrita de uma forma mais geral como apresentada na Equação 2:



Sendo x = números de  $CO_3^{2-}$  que substituem isomorficamente  $PO_4^{3-}$

## APÊNDICE 2

### Cálculo da incerteza das diluições

No presente trabalho se fez necessário o cálculo da incerteza de diluição, pois a concentração do fósforo geralmente encontrou-se acima do limite superior de quantificação dos aparelhos analíticos de leitura.

De acordo com o Guia para determinação da incerteza em medição (GUM) (ABNT/INMETRO, 2003) para o cálculo da incerteza em uma medida deve-se definir a relação matemática entre os valores estimados das grandezas de entrada e o valor estimado da grandeza de saída, ou seja, definir a equação do modelo.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

Para cálculo da diluição vale os seguintes modelos:

Modelo 1 - Diluição devido adição de dois ou mais líquidos:

$$V_f = V_1 + V_2 + \dots + V_n \quad (1)$$

Modelo 2 - Cálculo da concentração em diluições.

$$M_i x V_i = M_f x V_f \quad (2)$$

Em seguida deve-se determinar o valor da incerteza para cada variável do modelo,  $u(x_i)$ . No caso das diluições volumétricas esses valores são encontrados em tabelas da vidraria de interesse, Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1 - Tolerância para balões volumétricos.

Capacidade, mL	Tolerância Classe A, ± mL	Tolerância Classe B, ± mL
5	0,02	0,04
10	0,02	0,04
25	0,03	0,06
50	0,05	0,10
100	0,08	0,16
200	0,1	0,20
250	0,12	0,24
500	0,20	0,40
1000	0,30	0,60
2000	0,50	1,00

(ASTM E 288-03, 2003)

Tabela 2 - Tolerância para pipetas volumétricas.

Capacidade mL	Tolerância Classe A, ± mL	Tolerância Classe B, ± mL
0,5	0,006	0,012
1	0,006	0,012
2	0,006	0,012
3	0,01	0,02
4	0,01	0,02
5	0,01	0,02
10	0,02	0,04
15	0,03	0,06
20	0,03	0,06
25	0,03	0,06
50	0,05	0,10
100	0,08	0,16

(ASTM E 969-02, 2002)

Segundo o GUM, o cálculo da incerteza padrão combinada para grandezas correlacionadas deve-se seguir a seguinte expressão geral.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial f}{\partial x_j} u(x_i, x_j)} \quad (3)$$

No caso das diluições as grandezas não estão correlacionadas, ou seja, são independentes entre si. Deste modo o segundo termo do lado direito pode ser desconsiderado.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i)} \quad (4)$$

Para o primeiro modelo, com dois componentes, Equação 1:

$$u(V_f) = \sqrt{\left(\frac{\partial V_f}{\partial V_1}\right)^2 u^2(V_1) + \left(\frac{\partial V_f}{\partial V_2}\right)^2 u^2(V_2)} \quad (5)$$

Aplicando as derivadas parciais na equação 1 tem-se:

$$\frac{\partial V_f}{\partial V_1} = 1 \quad \frac{\partial V_f}{\partial V_2} = 1$$

Com isso a Equação 5 fica da seguinte forma:

$$u(V_f) = \sqrt{u^2(V_1) + u^2(V_2)} \quad (6)$$

Para o segundo modelo, rearranjando a Equação 2:

$$M_i = \frac{M_f x V_f}{V_i}$$

$$u(M_i) = \sqrt{\left(\frac{\partial M_i}{\partial V_f}\right)^2 u^2(V_f) + \left(\frac{\partial M_i}{\partial M_f}\right)^2 u^2(M_f) + \left(\frac{\partial M_i}{\partial V_i}\right)^2 u^2(V_i)}$$

Como neste caso esta sendo levada em consideração apenas a incerteza das diluições o termo  $u(M_f)$  é igual à zero, incerteza de concentração relacionada à oscilação de leituras dos aparelhos analíticos (espectrofotômetro, cromatografia gasosa, etc).

Aplicando as derivadas parciais na Equação 2 tem-se:

$$\frac{\partial M_i}{\partial V_f} = \frac{M_f}{V_i} = \frac{M_i}{V_f} \quad \frac{\partial M_i}{\partial V_i} = -\frac{M_f x V_f}{V_i^2} = -\frac{M_i}{V_i}$$

Substituindo as derivadas parciais.

$$u(M_i) = \sqrt{\left(\frac{M_i}{V_f}\right)^2 u^2(V_f) + \left(-\frac{M_i}{V_i}\right)^2 u^2(V_i)}$$

$$u(M_i) = M_i \sqrt{\left(\frac{u(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{u(V_i)}{V_i}\right)^2} \quad (7)$$



Com isto, de forma geral, modelos que apresentam soma e/ou subtração seguem a equação 6 enquanto modelos com multiplicação e/ou divisão seguem a equação 7, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Propagação da incerteza segundo funções.

Função	Sr
$R = A + B$	$Sr = \sqrt{S_A^2 + S_B^2}$
$R = A - B$	$Sr = \sqrt{S_A^2 + S_B^2}$
$R = A \times B$	$\frac{Sr}{R} = \sqrt{\left(\frac{S_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{S_B}{B}\right)^2}$
$R = \frac{A}{B}$	$\frac{Sr}{R} = \sqrt{\left(\frac{S_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{S_B}{B}\right)^2}$

R Grandeza de interesse (volume, concentração e etc); A e B Variáveis de entrada (concentração, volume e etc);  $S_A$  e  $S_B$  Tolerância (incerteza) independentes entre si; Sr incerteza absoluta; Sr/R incerteza relativa.

### Cálculo da incerteza para rocha fresca e rochas tratadas

Para a rocha tratada e rocha fresca foi necessário diluição de 100 vezes para atender a faixa de leitura do método de determinação do fósforo. Após a digestão a rocha tratada foi filtrada e o extrato transferido para balão volumétrico de 100 mL classe A, em seguida completou-se com água destilada até o menisco. Foi retirado do mesmo balão 1 mL da solução com auxílio de pipeta volumétrica classe A de mesmo valor da medida para outro balão de 100 mL classe A. Completou-se até o menisco.

Equação do modelo:  $M_i \times V_i = M_f \times V_f$

Logo:

$$\frac{Sr}{R} = \sqrt{\left(\frac{0,006 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0,08 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}\right)^2} = 0,006053$$

#### Rocha fresca

$$M_i = R = \frac{M_f \times V_f}{V_i} = \frac{30,5248(\text{mg/L}) \times 100(\text{ml})}{1(\text{ml})} = 3052,48(\text{mg/L})$$

$$Sr = R \times 0,006053 = 3052,48 \text{ (mg/L)} \times 0,006053 = 18,4770 \text{ mg/L} \times \left(\frac{0,1 \text{ L} \times 1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}\right)$$

$$Sr = 0,0018477 \text{ g}$$

#### Isolado 7 - Rocha tratada

$$M_i = R = \frac{M_f \times V_f}{V_i} = \frac{25,3883 \text{ (mg/L)} \times 100 \text{ (ml)}}{1 \text{ (ml)}} = 2538,83 \text{ (mg/L)}$$

$$Sr = R \times 0,006053 = 2538,83 \text{ (mg/L)} \times 0,006053 = 15,3677 \text{ mg/L} \times \left(\frac{0,1 \text{ L} \times 1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}\right)$$

$$Sr = 0,00153677 \text{ g}$$

#### Isolado 9 - Rocha tratada

$$M_i = R = \frac{M_f \times V_f}{V_i} = \frac{27,6806 \text{ (mg/L)} \times 100 \text{ (ml)}}{1 \text{ (ml)}} = 2768,06 \text{ (mg/L)}$$

$$Sr = R \times 0,006053 = 2768,06 \text{ (mg/L)} \times 0,006053 = 16,7553 \text{ mg/L} \times \left(\frac{0,1 \text{ L} \times 1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}\right)$$

$$sr = 0,00167553 \text{ g}$$

### **Cálculo da incerteza para o líquido**

O líquido (extrato) foi diluído em 12 vezes para atender a faixa de leitura do método. Para isto foi retirado do extrato 0,5 mL com pipeta volumétrica classe A de mesmo volume e transferido em seguida para cubeta de leitura. Na mesma cubeta foi acrescentado 5,5 ml de água destilada por meio de pipeta graduada de 10 mL.

Inicialmente foi necessário calcular a incerteza da adição de 0,5 mL dos extratos dos Isolados 7 e 9 mais 5,5 mL de água destilada.

$$\text{Total de líquido na cubeta} = 0,5 \text{ ml} + 5,5 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$$

Logo:

$$Sr = \sqrt{(0,006)^2 + (0,02)^2} = 0,021 \text{ ml}$$

$$M_i \times V_i = M_f \times V_f$$

$$\frac{Sr}{R} = \sqrt{\left(\frac{0,006 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0,021 \text{ ml}}{6 \text{ ml}}\right)^2} = 0,0125$$

#### Isolado 7 - líquido

$$M_i = R = \frac{M_f \times V_f}{V_i} = \frac{30,3566 \left(\frac{mg}{L}\right) \times 6(ml)}{0,5 (ml)} = 364,28 (mg/L)$$

$$S_r = R \times 0,0125 = 364,28 \left(\frac{mg}{L}\right) \times 0,0125 = 4,5535 \frac{mg}{L} \times \left(\frac{0,14 L \times 1g}{1000 mg}\right) = 0,00064 g$$

#### Isolado 9 - líquido

$$M_i = R = \frac{M_f \times V_f}{V_i} = \frac{16,964 \left(\frac{mg}{L}\right) \times 6(ml)}{0,5 (ml)} = 203,57 (mg/L)$$

$$S_r = R \times 0,0125 = 203,57 (mg/L) \times 0,0125 = 2,5446 \frac{mg}{L} \times \left(\frac{0,14 L \times 1g}{1000 mg}\right) = 0,00035 g$$

#### **Incerteza para o micélio**

A quantidade do fósforo no micélio foi encontrada por diferença em grama. Deste modo, o cálculo da incerteza absoluta para o micélio é dado por:

$$S_r \text{ Isolado 7} = \sqrt{(0,0018477)^2 + (0,00153677)^2 + (0,00064)^2} = 0,00248 g$$

$$S_r \text{ Isolado 9} = \sqrt{(0,0018477)^2 + (0,00167553)^2 + (0,00035)^2} = 0,00252 g$$

---

## APÊNDICE 3

Determinação dos pontos ótimos para temperatura, substrato e concentração de rocha para o Isolado 7, através da equação do modelo completo, Equação 4.1.

```

Coeficientes da equação do modelo completo codificada

(%i1) x1:-4.9;
      x2:18.3;
      x3:32.2;
      x11:-30.8;
      x22:-37.2;
      x33:-5.6;
      x1x2:9.2;
      x1x3:9.5;
      x2x3:-4.7;
      a0:291.9;

(%o1) -4.9
(%o2) 18.3
(%o3) 32.2
(%o4) -30.8
(%o5) -37.2
(%o6) -5.6
(%o7) 9.2
(%o8) 9.5
(%o9) -4.7
(%o10) 291.9

(%i11) A:float(matrix( [x11, (x1x2)/2, (x1x3)/2], [(x1x2)/2, x22, (x2x3)/2], [(x1x3)/2, (x2x3)/2, x33]));
(%o11) 
$$\begin{bmatrix} -30.8 & 4.6 & 4.75 \\ 4.6 & -37.2 & -2.35 \\ 4.75 & -2.35 & -5.6 \end{bmatrix}$$

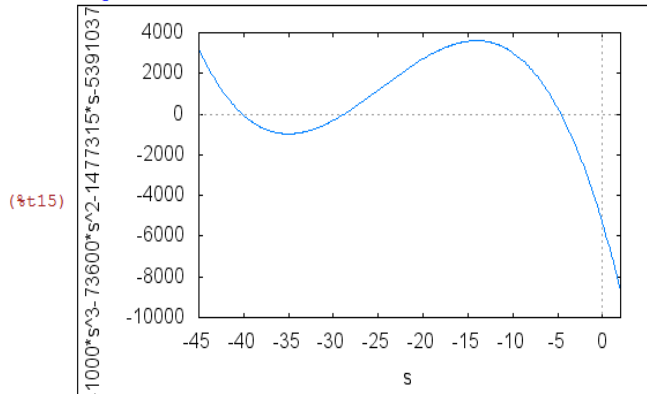

(%i12) C:matrix([-30.8-s, 4.6, 4.75], [4.6, -37.2-s, -2.35], [4.75, -2.35, -5.6-s]);
(%o12) 
$$\begin{bmatrix} -s-30.8 & 4.6 & 4.75 \\ 4.6 & -s-37.2 & -2.35 \\ 4.75 & -2.35 & -s-5.6 \end{bmatrix}$$


(%i13) transpose(C);
(%o13) 
$$\begin{bmatrix} -s-30.8 & 4.6 & 4.75 \\ 4.6 & -s-37.2 & -2.35 \\ 4.75 & -2.35 & -s-5.6 \end{bmatrix}$$


(%i14) ratsimp(determinant(C));
rat: replaced 4.75 by 19/4 = 4.75
rat: replaced -10.81 by -1081/100 = -10.81
rat: replaced -4.75 by -19/4 = -4.75
rat: replaced -37.2 by -186/5 = -37.2
rat: replaced -4.6 by -23/5 = -4.6
rat: replaced 11.1625 by 893/80 = 11.1625
rat: replaced 4.6 by 23/5 = 4.6
rat: replaced -5.6 by -28/5 = -5.6
rat: replaced -5.5225 by -2209/400 = -5.5225
rat: replaced -37.2 by -186/5 = -37.2
rat: replaced -5.6 by -28/5 = -5.6
rat: replaced -30.8 by -154/5 = -30.8
(%o14) 
$$-\frac{1000 s^3 + 73600 s^2 + 1477315 s + 5391037}{1000}$$


```

```
(%i15) wxplot2d(-(1000*s^3+73600*s^2+1477315*s+5391037)/1000,[s,-45,2]);
```



```
(%o15)
```

```
(%i16) load(mnewton);
EE1:mnewton([- (1000*s^3+73600*s^2+1477315*s+5391037)/1000=0],[s],[-43])[1];
EE2:mnewton([- (1000*s^3+73600*s^2+1477315*s+5391037)/1000=0],[s],[-30])[1];
EE3:mnewton([- (1000*s^3+73600*s^2+1477315*s+5391037)/1000=0],[s],[-6])[1];
(%o16) C:/PROGRA~2/MAXIMA~1.0/share/maxima/5.25.0/share/contrib/mnewton.mac
;Compiler warnings for "C:/PROGRA~2/MAXIMA~1.0/share/maxima/5.25.0/share/linearalgebra/linalg-extra.lis
; In $VANDERMONDE_MATRIX: IGNORE declaration for unknown variable LK
;Compiler warnings for "C:/PROGRA~2/MAXIMA~1.0/share/maxima/5.25.0/share/linearalgebra/linalg-extra.lis
; In $VANDERMONDE_MATRIX: Unused lexical variable LK
(%o17) [s=-40.14750083969172]
(%o18) [s=-28.78803481891003]
(%o19) [s=-4.664464341398243]
```

```
(%i20) lambda1:-40.147;
lambda2: -28.788;
lambda3: -4.664;
(%o20) -40.147
(%o21) -28.788
(%o22) -4.664
```

lambdas negativos implicam em ponto de máximo.

```
(%i23) b:matrix([x1],[x2],[x3]);
```

```
(%o23) [-4.9]
[18.3]
[32.2]
```

```
(%i24) B:invert(A);
```

```
(%o24) [-0.0376175307273907 -0.00270773507954036 -0.0307714452711046]
[-0.00270773507954036 -0.0278086572212359 0.00937296479322995]
[-0.0307714452711046 0.00937296479322995 -0.208605505768185]
```

```
(%i25) x0:-0.5*B.b;
```

```
(%o25) [0.428033094560472]
[0.0969105294584326]
[3.197395974095523]
```

```
(%i26) x10:x0[1,1];  
      x20:x0[2,1];  
      x30:x0[3,1];  
(%o26) 0.428033094560472  
(%o27) 0.0969105294584326  
(%o28) 3.197395974095523
```

Como  $\lambda_1 < 0$ ,  $\lambda_2 < 0$  e  $\lambda_3 < 0$  implicam que  $x_{10}$ ,  $x_{20}$  e  $x_{30}$  são pontos que maximizam a superfície de resposta.

```
(%i29) T:x10*((39-33)/2)+36;  
(%o29) 37.28409928368141
```

```
(%i30) S:x20*((60.3-18.3)/2)+39.3;  
(%o30) 41.33512111862708
```

```
(%i31) R:x30*((21-7)/2)+14;  
(%o31) 36.38177181866866
```

Resultado fora da região experimental para concentração de rocha

---

## APÊNDICE 4

Determinação da região ótima para temperatura, substrato e concentração de rocha para o Isolado 9, através da equação do modelo completo, Equação 4.6.

```

Entrada dos coeficientes da equação do modelo, autovalores e autovetores

(%i74) x1:-23.6;
      x2:-0.1;
      x3:2.8;
      x11:1.1;
      x22:-16.9;
      x33:-2.5;
      x1x2:6.8;
      x1x3:0.7;
      x2x3:-0.7;
      a0:133.9;

(%o74) -23.6
(%o75) -0.1
(%o76) 2.8
(%o77) 1.1
(%o78) -16.9
(%o79) -2.5
(%o80) 6.8
(%o81) 0.7
(%o82) -0.7
(%o83) 133.9

(%i84) lambda1:-17.5318;
      lambda2:-2.50769;
      lambda3: 1.73953;

(%o84) -17.5318
(%o85) -2.50769
(%o86) 1.73953

(%i87) v11:-0.179945;
      v21:0.983304;
      v31:0.027085;

(%o87) -0.179945
(%o88) 0.983304
(%o89) 0.027085

(%i90) v12:-0.0604479;
      v22:-0.038536;
      v32:0.997427;

(%o90) -0.0604479
(%o91) -0.038536
(%o92) 0.997427

(%i93) v13:0.981818;
      v23:0.177845;
      v33:0.066373;

(%o93) 0.981818
(%o94) 0.177845
(%o95) 0.066373

(%i96) A:float(matrix( [x11, (x1x2)/2, (x1x3)/2], [(x1x2)/2, x22, (x2x3)/2], [(x1x3)/2, (x2x3)/2, x33]));

(%o96) [ 1.1  3.4  0.35
        3.4 -16.9 -0.35
        0.35 -0.35 -2.5 ]

```

```

(%i97) b:matrix( [x1], [x2], [x3]);
(%o97) 
$$\begin{bmatrix} -23.6 \\ -0.1 \\ 2.8 \end{bmatrix}$$


(%i98) B:invert(A);
(%o98) 
$$\begin{bmatrix} 0.550848288712366 & 0.109542022163381 & 0.0617828773168579 \\ 0.109542022163381 & -0.0375600666862803 & 0.0205942924389526 \\ 0.0617828773168579 & 0.0205942924389526 & -0.394233598117093 \end{bmatrix}$$


(%i99) x0:-0.5*B.b;
(%o99) 
$$\begin{bmatrix} 6.418990879670492 \\ 1.261885848779053 \\ 1.281994704324801 \end{bmatrix}$$


(%i100) x10:x0[1,1];
x20:x0[2,1];
x30:x0[3,1];
(%o100) 6.418990879670492
(%o101) 1.261885848779053
(%o102) 1.281994704324801

(%i103) y0:a0+x11*x10^2+x1x2*x10*x20+x1x3*x10*x30+x1*x10+x22*x20^2+x2x3*x20*x30+x2*x20+x33*x30^2+x3*x30;
(%o103) 59.88760591350396

(%i104) f:(v11)^2+(v21)^2+(v31)^2;
(%o104) 1.000000556666

(%i105) e11:(v11)/(f^0.5);
e21:(v21)/(f^0.5);
e31:(v31)/(f^0.5);
(%o105) -0.179944949915389
(%o106) 0.983303726314162
(%o107) 0.0270849924613538

(%i108) (e11)^2+(e21)^2+(e31)^2;
(%o108) 1.0

(%i109) g:(v12)^2 + (v22)^2 + (v32)^2;
(%o109) 0.99999959223941

(%i110) e12:(v12)/(g^0.5);
e22:(v22)/(g^0.5);
e32:(v32)/(g^0.5);
(%o110) -0.0604479123241395
(%o111) -0.0385360078567335
(%o112) 0.997427203355773

(%i113) (e12)^2+(e22)^2+(e32)^2;
(%o113) 1.0

(%i114) h:(v13)^2 + (v23)^2 + (v33)^2;
(%o114) 1.000000804278

(%i115) e13:(v13)/(h^0.5);
e23:(v23)/(h^0.5);
e33:(v33)/(h^0.5);
(%o115) 0.98181760517293
(%o116) 0.177844928481633
(%o117) 0.0663729733088443

```



```

(%i118) (e13)^2+(e23)^2+(e33)^2;
(%o118) 1.0

(%i119) M:matrix( [e11,e12,e13], [e21,e22,e23], [e31,e32,e33]);
(%o119)
[[-0.179944949915389 -0.0604479123241395 0.98181760517293]
 [0.983303726314162 -0.0385360078567335 0.177844928481633]
 [0.0270849924613538 0.997427203355773 0.0663729733088443]]

(%i120) M_inv:invert(M);
(%o120)
[[-0.17994511906735 0.983303695804379 0.0270849763026731]
 [-0.0604478634339229 -0.0385360037923293 0.997427206475738]
 [0.981817633269151 0.1778447569025 0.0663730174399581]]

(%i121) z1:matrix( [X1-x10], [X2-x20], [X3-x30]);
(%o121)
[X1-6.418990879670492]
[X2-1.261885848779053]
[X3-1.281994704324801]]

(%i137) z:expand(float(matrix([(T-36)/((39-33)/2)-x10], [(S-39)/((60-18)/2)-x20], [(R-14)/((21-7)/2)-x30])));
(%o137)
[0.3333333333333333 T-18.41899087967049]
[0.0476190476190476 S-3.11902870592191]
[0.142857142857143 R-3.281994704324801]]

(%i123) w:expand(M_inv.z);
(%o123)
[-0.0599817063557832 T+0.0468239855144943 S+0.0038692823289533 R+0.158562304297635]
[-0.0201492878113076 T-0.00183504779963473 S+0.142489600925105 R-2.039967262278067]
[0.32727254442305 T+0.00846879794773811 S+0.00948185963427973 R-18.85662882640877]]

(%i124) w1:w[1,1];
w2:w[2,1];
w3:w[3,1];
(%o124) -0.0599817063557832 T+0.0468239855144943 S+0.0038692823289533 R+0.158562304297635
(%o125) -0.0201492878113076 T-0.00183504779963473 S+0.142489600925105 R-2.039967262278067
(%o126) 0.32727254442305 T+0.00846879794773811 S+0.00948185963427973 R-18.85662882640877

y = y0 + lambda1*w1^2 + lambda2*w2^2 + lambda3*w3^2

(%i127) y:expand(y0+lambda1*w1^2+lambda2*w2^2+lambda3*w3^2);
(%o127) 0.122222287463723 T^2+0.107936152152768 S T+0.0333333061550927 R T-21.34284042486727 T-0.0383219037510036 S^2-0.00476188944608351 R S-0.8346865843251
S-0.0510204292445184 R^2+0.814287181532661 R+667.5400987278372

É necessário colar o lado direito da equação acima na expressão do for

(%i135) for T:30.9546 thru 42 step 1.2 do
(for S:3.68179 thru 81 step 0.4 do
(for R:2.22747 thru 28 step 2.8 do
if (0.122222287463723*T^2+0.107936152152768*S*T+0.0333333061550927*R*T-21.34284042486727*T-0.0383219037510036*S^2
-0.00476188944608351*R*S-0.8346865843251*
S-0.0510204292445184*R^2+0.814287181532661*R+667.5400987278372)>=165
then display(T,S,R,
P=0.122222287463723*T^2+0.107936152152768*S*T+0.0333333061550927*R*T-21.34284042486727*T-0.0383219037510036*S^2
-0.00476188944608351*R*S-0.8346865843251*
S-0.0510204292445184*R^2+0.814287181532661*R+667.5400987278372)else false ));

```

T=30.9546  
S=20.48179  
R=5.02747  
P=166.7542599213768  
T=30.9546  
S=20.48179  
R=7.827469999999999  
P=169.8138472602706  
T=30.9546  
S=20.48179  
R=10.62747  
P=172.0734342686105  
T=30.9546  
S=20.48179  
R=13.42747  
P=173.5330209463963  
T=30.9546  
S=20.48179  
R=16.22747  
P=174.192607293628  
T=30.9546  
S=20.48179  
R=19.02747  
P=174.0521933103056  
T=30.9546  
S=20.48179  
R=21.82747  
P=173.1117789964293

---