

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Estudo comparativo da biossorção dos metais terras-raras
(Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³) pela biomassa melanizada e pigmento, na forma livre e
imobilizada, obtidos do fungo *Aspergillus nidulans*.**

MARIANA GONÇALVES MARTINS DE FREITAS

ARARAQUARA

2013

MARIANA GONÇALVES MARTINS DE FREITAS

Estudo comparativo da biossorção dos metais terras-raras (Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3}) pela biomassa melanizada e pigmento, na forma livre e imobilizada, obtidos do fungo *Aspergillus nidulans*.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Regina P. Sponchiado

ARARAQUARA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

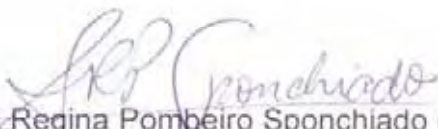
F866e	<p>Freitas, Mariana Gonçalves Martins de</p> <p>Estudo comparativo da bio sorção de metais terras-raras (Nd^{+3}, La^{+3} e Ce^{+3}) pela biomassa melanizada e pigmento, na forma livre e imobilizada, obtidos do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> / Mariana Gonçalves Martins de Freitas. – Araraquara : [s.n], 2013</p> <p>71 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Bio sorção de terras-raras. 3. Biomassa melanizada. I. Título.</p>
-------	--

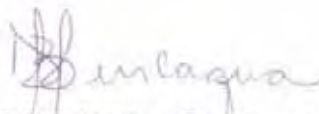
MARIANA GONÇALVES MARTINS DE FREITAS

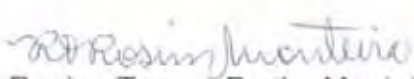
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª Denise Bevilaqua
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª Regina Teresa Rosim Monteiro
Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP, Piracicaba - SP

Dados curriculares

1. Dados pessoais

Nome: Mariana Gonçalves Martins de Freitas

Filiação: Jorge Diogo Parada de Freitas e Fátima Maria Gonçalves Martins

Nascimento: 13 de dezembro de 1986 – Lisboa, Portugal

Documento de Identidade: 43.724.219-5

Cadastro de Pessoa Física: 364.507.698-07

Endereço Pessoal: Rua Monte Sião, nº426, Cond. Monte Catine, Bairro Tijuco Preto, Vargem Grande Paulista – SP, CEP.06730-000.

2. Formação acadêmica

2011-2013: Mestrado em Biotecnologia, Programa de pós-graduação em Biotecnologia. Título: Estudo comparativo da bioabsorção dos metais terras-raras (Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3}) pela biomassa melanizada e pigmento, na forma livre e imobilizada, obtidos do fungo *Aspergillus nidulans*. Orientador: Sandra Regina P. Sponchiado, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, Brasil.

2007-2010: Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Centro de Ciências Agrárias – *campus* de Araras, São Paulo, Brasil.

3. Atividades de pesquisa

3.1. Trabalhos apresentados em congressos

FREITAS, M. G. M.; SPONCHIADO, S. R. P. O efeito da melanização da biomassa do fungo *Aspergillus nidulans* (MEL1) no desenvolvimento de um novo bioabsorvente para metais terras-raras. 2012. XXI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 2012, Santos, SP.

FREITAS, M. G. M. ; CAPORALIN, C. B. ; PRETTI, T. ; SPONCHIADO, S. R. P. Otimização das condições de cultivo para a produção de melanina por *Aspergillus nidulans* utilizando água de maceração de milho. 2011. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu, PR.

FREITAS, M. G. M. ; ASSAD, L. ; ANTONINI, S. ; ROSA, M. . Efeito do pH na solubilização por *Torulaspora globosa* de potássio contido em pó de rocha. In: FertBio 2010, 2010, Guarapari. Anais do FertBio 2010, 2010.

FREITAS, M. G. M. ; ANTONINI, S. ; ASSAD, L. ; ROSA, M. . Biossolubilização de potássio contido em pó de rocha por meio da levedura *Torulaspora globosa*. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2010, São Carlos. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2010.

FREITAS, M. G. M. ; ASSAD, L. ; ANTONINI, S. . Biossolubilização de pó de basalto por *Aspergillus niger*. In: XVIII Jornada Científica e Tecnológica da UFSCar, 2009, São Carlos. XVII Congresso de Iniciação Científica, 2009.

3.2. Participação em eventos

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012. Santos, SP, Brasil.

26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2011, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

1º Simpósio de Biotecnologia Agrícola e Ambiental. Biotecnologia Ambiental. 2011. Araras, SP, Brasil.

FertBio 2010. Efeito do pH na solubilização por *Torulaspora globosa* de potássio contido em pó de rocha. 2010. Guarapari, ES, Brasil.

XVII Congresso de Iniciação Científica. Biossolubilização de pó de Basalto por *Aspergillus niger*. 2009. São Carlos, SP, Brasil.

III Workshop sobre Biodegradação e Biorremediação. 2009. Campinas, SP, Brasil.

V Jornada Agrônômica e II Jornada Biotecnológica. 2008. Araras, SP, Brasil.

BioIndex 2º Encontro sobre o uso de organismos como bioindicadores ambientais. 2008. Araras, SP, Brasil.

Terceiro Seminário sobre Rotas Tecnológicas da Biotecnologia Oportunidades de Investimento e Inovações no Brasil. 2007. Ribeirão Preto, SP, Brasil.

3.3. Cursos

Ecotoxicologia: bioensaios no controle da qualidade ambiental. Umwelt Biotecnologia Ambiental. Blumenau, SC, Brasil. 2012.

Remediação Ambiental. Edutech Ambiental. São Paulo, SP, Brasil. 2009.

O método científico: alguns aspectos filosóficos. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP, Brasil. 2008.

Gametas de ouriço do mar em testes de toxicidade. Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Araras, SP, Brasil. 2008.

Introdução ao FITOPAC e aplicações na fitossociologia. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP, Brasil. 2008.

3.4. Extensão universitária

Integrante do Grupo de Estudos Pedológicos (GEPED). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP, Brasil.

3.5. Palestras proferidas

Ecotoxicologia e biorremediação. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Centro de Ciências Agrárias (CCA), Araras, SP, Brasil. 2010.

Taxonomia de Orchidaceae. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Centro de Ciências Agrárias (CCA), Araras, SP, Brasil. 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a toda minha família... Pais, mães e seus filhos... Irmãos e irmãs cujos laços vão além dos sanguíneos e são principalmente a escolha do companheirismo, carinho e respeito sinceros e perpétuos...

A todos vocês, a minha eterna gratidão e amor...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha Orientadora, Profa. Dra. Sandra Regina P. Sponchiado, por ter aberto as portas do Instituto de Química para mim, através do estágio e pelos ensinamentos, paciência e confiança.

Às queridas companheiras de trabalho Marina, Maira, Natália e Tatiana, pelos momentos de alegria, companheirismo, apoio e amizade sincera.

Aos técnicos de laboratório Waldenir e Tarcísio, pela valiosa ajuda, gentileza e simpatia com a qual sempre me trataram. E em especial à querida Fátima, cujos esforços, conselhos, apoio e incentivo serão sempre lembrados.

Às amigas Marina, Débora e Byanka, que acompanharam de longe todo o trabalho, incentivando e compreendendo minhas ausências.

À amiga e professora Alessandra, por me ensinar que autenticidade, respeito próprio e paixão pelo que se faz são ingredientes essenciais ao sucesso.

Às amigas da República Amazonas por terem sido parte fundamental desta etapa da minha vida, pelos momentos felizes da convivência diária e pela compreensão nas horas difíceis.

Ao meu namorado André, por ser meu melhor amigo, pelo incentivo, carinho, paciência e compreensão nos momentos difíceis.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação, da biblioteca e aos professores do Programa de pós-graduação em Biotecnologia, pela cordialidade e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

Os metais terras raras têm adquirido grande importância tecnológica e econômica em função da diversidade de suas aplicações. A biossorção apresenta-se como uma tecnologia alternativa para a obtenção destes metais, apresentando vantagens econômicas, ecológicas e operacionais em comparação com métodos tradicionais de separação e concentração de terras-raras. Este trabalho propõe a utilização da biomassa melanizada e do pigmento produzido pela linhagem MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* como potenciais biossorbentes (em sistemas livre e imobilizado) para a concentração de neodímio, lantânio e cério. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer as condições ótimas de cultivo que proporcionam a maior melanização da linhagem estudada, que são: cultivo constituído de duas etapas, sendo a pré-cultura suplementada com 1% de AMM e incubada por 48 horas, a 37 °C, sob agitação constante de 200 rpm, seguida de cultura suplementada com 0,2% de AMM, incubada por 3 dias, a 37 °C, sob agitação constante de 200 rpm. Também observamos que o grau de pigmentação da biomassa mostrou ter um efeito positivo na capacidade biossortiva da biomassa, porém não apresentou efeito na afinidade da interação metal-biossorvente. As condições ótimas para os ensaios de biossorção das terras-raras estudadas (Nd, La e Ce) são: tempo de contato (ou tempo de equilíbrio) de 90 minutos; concentração inicial de metal (ou concentração saturante) de 800 mg.L⁻¹ dosagem de biossorvente de 0,1%; temperatura de 28 °C e pH inicial da solução monometálica igual a 5,6. Verificamos que a biomassa melanizada apresenta maior capacidade biossortiva do que o pigmento tipo melanina produzido pelo fungo e que quando imobilizada em alginato de cálcio, esta biomassa apresenta maior capacidade biossortiva do que se imobilizada em PVA-SA. Os agentes dessorventes escolhidos (HCl e EDTA) apresentaram desempenho muito similar na recuperação dos metais para um mesmo biossorvente. Porém os percentuais de dessorção foram maiores com HCl (0,1 mol.L⁻¹), para os três metais em estudo, tanto para o biossorbentes imobilizados em alginato de cálcio, como para os imobilizados em PVA-SA. Assim, este estudo mostrou que a biomassa melanizada, produzida nas condições otimizadas de cultivo do fungo *A. nidulans* (MEL1) e imobilizada em alginato de cálcio, possui grande potencial para utilização como biossorvente de terras-raras e que esses metais podem ser recuperados em maiores porcentagens a partir do uso do agente dessorvente HCl (0,1 mol.L⁻¹).

Palavras-chave: biossorção, terras-raras, sistemas imobilizados, biomassa melanizada, pigmento, fungo.

ABSTRACT

The rare earth metals have gained great economical and technological importance due to the diversity of its applications. The biosorption process has been recognized as an alternative technology for obtaining these metals, with economical, ecological and operational advantages compared to the traditional methods of separation and concentration of rare earths. This work consists on evaluating the use of the melanized biomass and pigment produced by MEL1 strain of the fungus *Aspergillus nidulans* as potential biosorbents (in free and immobilized systems) for the concentration of neodymium, lanthanum and cerium. The results we obtained made it possible to determine the optimized culture conditions which can increase the fungus pigmentation, it consists of two stages, the pre-culture supplemented with 1% of corn steep liquor and incubated for 48 hours at 37 ° C under stirring constant 200 rpm, followed by culture supplemented with 0.2% of corn steep liquor, incubated for 3 days at 37 ° C under constant stirring of 200 rpm. The grade of pigmentation has shown a positive effect on the biosorption capacity, but had no effect on the affinity of the interaction metal-biosorbent. The optimum conditions of the biosorption process were: contact time of 90 minutes; initial concentration of metal (or saturating concentration) of 800 mg.L⁻¹; biosorbent dosage of 0.1%, temperature of 28 ° C and an initial pH of 5,6 in the single metal solutions. We found that the melanized biomass presents greater maximum biosorption capacity than the pigment produced by the fungus. When immobilized in calcium alginate, this biomass has a higher biosorption capacity compared to the PVA-SA immobilized biomass. The evaluated desorption agents (HCl and EDTA) showed very similar performance in the recovery of metals for the same biosorbent. However desorption percentages were higher with HCl for the three metals in the study, either to the PVA-SA immobilized biomass as to the calcium alginate immobilized biomass. Thus, this study reveals that the melanized biomass, produced under the optimized culture conditions of the fungus *A. nidulans* (MEL1) and immobilized in calcium alginate pellets, has great potential to be used as a biosorbent of rare earths and, that these elements can be recovered, in higher percentages, through desorption processes using HCl (0,1 mol.L⁻¹).

Key words: Biosorption, Rare earths, Immobilized systems, melanized biomass, pigment, fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reservas globais de minerais de terras-raras.....	3
Figura 2 – Mineral monazita	4
Figura 3 - Produção global de óxidos de terras-raras de 1950 a 2003 segundo a USGS (United States Geological Survey).....	5
Figura 4 - Crescimento da linhagem MEL1 do fungo <i>A. nidulans</i> , após 5 dias de incubação a 37°C, em meio mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e inositol.....	19
Figura 5 - Fluxograma do cultivo do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1) para a obtenção de biomassa e pigmento.....	20
Figura 6 - Fluxograma da extração do pigmento intracelular presente na biomassa do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1)	21
Figura 7 - Fluxograma da extração do pigmento extracelular a partir do caldo de cultivo do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1).....	22
Figura 8 - Fluxograma do protocolo, adaptado de Saravanan et al. (2012), para a imobilização da biomassa melanizada do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1) nas matrizes: Alginato de cálcio, PVA e PVA-SA	26
Figura 9 - Aspecto do cultivo e biomassa do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1) obtida em diferentes condições de cultivo	31
Figura 10 - Perfil de absorção, entre 250 nm e 750 nm, dos complexos ternários metal-XO-surfactante, formados na presença dos surfactantes Tween80® (a), TRITON X-100® (b) e CPB (c) e CTBA (d).....	34
Figura 11 - Cinéticas de biossorção para Nd ⁺³ , La ⁺³ e Ce ⁺³ , com concentração inicial igual a 800 mg.L ⁻¹ (5,5mmol. L ⁻¹).....	36

Figura 12 - Capacidades biossorbitivas (q) e percentuais de remoção (R%) obtidos após 90 minutos de contato do biossorbitivo (biomassa melanizada) com a solução do metal neodímio na concentração de 800 mg. L⁻¹	36
Figura 13 - Isotermas de biossorção de neodímio usando as biomassas com diferentes graus de melanização, obtidas de diferentes cultivos do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1)	39
Figura 14 - O efeito da melanização na capacidade biossorbitiva e na afinidade dos biossorbitivos pelo íon de neodímio	41
Figura 15 - Capacidades biossorbitivas da biomassa melanizada após 90 minutos de contato com diferentes concentrações de Nd⁺³, La e Ce em solução.....	43
Figura 16 - Pontos experimentais de capacidade biossorbitiva (q) nas isotermas de biossorção a 28°C para Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, usando como biossorbitivo a biomassa melanizada	44
Figura 17 - Pontos experimentais de capacidade biossorbitiva (q) nas isotermas de biossorção a 28°C para Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, usando como biossorbitivo a biomassa melanizada	45
Figura 18 - Perfil de biossorção para os metais Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, utilizando a biomassa melanizada livre como biossorbitivo, em diferentes pHs iniciais	47
Figura 19 - Determinação das concentrações iniciais de terras-raras nas soluções monometálicas a serem usadas em ensaios de biossorção, após o ajuste do pH inicial	48
Figura 20 - Máximas capacidades biossorbitivas (q_{max}) para os biossorbitivos: biomassa melanizada imobilizada em alginato de cálcio e biomassa melanizada imobilizada em PVA-SA, em relação aos metais Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³	53

Figura 21 - Máximas capacidades biossorbitivas (q_{max}) dos “pellets controle” (matrizes puras) em comparação aos pellets contendo biomassa, para os suportes alginato de cálcio (a) e PVA-SA (b)..... 54

Figura 22 - Procentagens de recuperação dos metais dessorvidos dos biossorbentes: biomassa imobilizada em alginato de cálcio (a) e biomassa imobilizada em PVA-SA (b), após o processo biossorbitivo a partir de soluções monometálicas e utilizando diferentes agentes químicos..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abundância dos terras-raras na crosta terrestre.....	1
Tabela 2 - Configuração eletrônica dos elementos terras-raras	3
Tabela 3 - Métodos convencionais de remoção de metais de sistemas aquosos.....	7
Tabela 4 - Modelos matemáticos de isotermas e suas expressões linearizadas.....	15
Tabela 5 - Equações não lineares e regressões lineares dos mínimos quadrados dos modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens	23
Tabela 6 - Efeito da concentração de água de maceração de milho (AMM) no crescimento e produção de pigmento pela linhagem MEL1 do fungo <i>A. nidulans</i>	28
Tabela 7 - Crescimento e produção de pigmento em diferentes condições de Pré-cultura e Cultura após o cultivo do fungo por 5 e 7 dias a 37°C, 200 rpm	30
Tabela 8 - Parâmetros dos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens para as cinéticas de bioadsorção usando diferentes bioadsorventes (0,1%) e concentração inicial de Nd^{+3} igual a 800 mg. L ⁻¹ ..	38
Tabela 9 - Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipos I e II), calculados para as isotermas de bioadsorção dos bioadsorventes com diferentes graus de melanização.....	40
Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Freundlich, calculados para as isotermas de bioadsorção dos bioadsorventes com diferentes graus de melanização	40

Tabela 11 - Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir dos dados experimentais das isothermas de bioissorção de Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, realizadas a 28 °C e 37 °C 46

Tabela 12 - Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir dos dados experimentais das isothermas de bioissorção para Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, realizadas em pH 2,0 e 5,6, utilizando como bioissorvente a biomassa melanizada livre 49

Tabela 13 - Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir das isothermas de bioissorção de Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, realizadas nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, utilizando como bioissorvente a biomassa imobilizada em alginato de cálcio 51

Tabela 14 - Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir das isothermas de bioissorção de Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³, realizadas nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, utilizando como bioissorvente a biomassa imobilizada em PVA-SA 52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Metais terras-raras	1
1.2. Biossorção	8
1.2.1. Fungos filamentosos como biossorventes	10
1.3. Isotermas de biossorção	14
1.4. Dessorção	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Solução de terras-raras.....	18
3.2. Micro-organismo.....	18
3.3. Preparo da suspensão de conídios	19
3.4. Cultivo do fungo	19
3.5. Extração da melanina.....	21
3.6. Cinéticas de biossorção	22
3.7. Quantificação dos metais (neodímio, lantânio e cério).....	23
3.8. Efeito da concentração inicial de terras-raras no processo biossortivo	24
3.9. Efeito da temperatura no processo biossortivo	24
3.10. Efeito do pH no processo biossortivo	24
3.11. Imobilização da biomassa melanizada em alginato de cálcio, PVA e PVA-SA.....	25
3.12. Dessorção	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Otimização do cultivo do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> (MEL1)	28
4.2. Padronização do método de quantificação de terras-raras.....	31
4.3. Ensaio de biossorção utilizando biossorventes (biomassa e pigmento) obtidos no cultivo do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> (MEL1)	35
4.3.1. Determinação do tempo de equilíbrio do processo biossortivo	35
4.3.2. Efeito da concentração do biossorvente no processo biossortivo	36
4.3.3. Efeito da melanização da biomassa obtida do cultivo do fungo <i>A. nidulans</i> (MEL1) na sua capacidade biossortiva	37

4.3.4. Efeito da concentração inicial de metal no processo biossortivo	42
4.3.5. Efeito da temperatura no processo biossortivo	44
4.3.6. Efeito do pH no processo biossortivo	47
4.4. Ensaio de biossorção com biossorventes imobilizados	50
4.5. Dessorção	55
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60
ANEXO 1	68
ANEXO 2	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metais terras-raras

Terras-raras (TRs) é a designação dada ao conjunto de 17 elementos químicos da Tabela Periódica com número atômico de 57 a 71 (lantanídeos), incluindo escândio (Sc) e ítrio (Y). Estes elementos foram assim denominados devido a sua ocorrência em forma de óxidos (“terras”, em uma nomenclatura arcaica); porém sabe-se que não são raros, pois sua abundância na litosfera é relativamente alta (da ordem de $8 \cdot 10^{-5} \text{ g g}^{-1}$) em comparação com alguns metais de valor industrial como ouro e mercúrio, sendo Ce, Y, Nd e La os mais abundantes, como mostrado na Tabela 1 (ABRÃO, 1994; HEDRICK, 1999).

Tabela 1. Abundância dos terras-raras na crosta terrestre.

Elemento	Abundância (ppm)	Elemento	Abundância (ppm)	Elemento	Abundância (ppm)
Ce	60	Sm	6	Eu	1,2
Y	33	Gd	5,4	Ho	1,2
La	30	Yb	3,4	Tb	0,9
Nd	28	Dy	3	Tm	0,5
Pr	8,2	Er	2,8	Lu	0,5

Fonte: : HEDRICK, 1999.

Íons trivalentes de terras raras (como Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3}) são classificados como ácidos duros de Pearson (espécies de alto estado de oxigenação, baixa eletronegatividade e tamanho pequeno) e tendem a reagir rapidamente com espécies classificadas como bases duras de Pearson (doadoras de elétrons, com alta eletronegatividade e baixa polarizabilidade), como átomos de oxigênio, enxofre e fósforo encontrados nos grupos funcionais presentes em paredes celulares (DINIZ & VOLESKY, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O estado trivalente é o mais comum e característico da grande maioria dos compostos de terras-raras, apresentando maior estabilidade

termodinâmica. O estado divalente é encontrado em haletos binários, contudo em solução e em complexos é pouco comum por ser facilmente oxidado para o estado trivalente. Para o estado tetravalente somente cério é suficientemente estável em solução (MARTINS & ISOLANI, 2005).

As grandes semelhanças química e física entre os metais terras-raras podem ser explicadas pela configuração eletrônica característica destes elementos. Todos os átomos neutros possuem a configuração $6s^2$ e uma ocupação variável do subnível 4f, com exceção do lantânio que não possui nenhum elétron f no seu estado fundamental (Tabela 2). Porém, no estado iônico trivalente este efeito desaparece e é observado um aumento regular na configuração $4f^n$ (onde, $1 \geq n \leq 14$) (ABRÃO, 1994; MARTINS & ISOLANI, 2005).

Tabela 2. Configuração eletrônica dos elementos terras-raras.

Elemento	Configuração eletrônica*
Sc (21)	[Ar] 3d ¹ 4s ²
Y (39)	[Kr] 4d ¹ 5s ²
La (57)	[Xe] 5d ¹ 6s ²
Ce (58)	[Xe] 4f ¹ 5d ¹ 6s ²
Pr (59)	[Xe] 4f ³ 6s ²
Nd (60)	[Xe] 4f ⁴ 6s ²
Pm (61)	[Xe] 4f ⁵ 6s ²
Sm (62)	[Xe] 4f ⁶ 6s ²
Eu (63)	[Xe] 4f ⁷ 6s ²
Gd (64)	[Xe] 4f ⁷ 5d ¹ 6s ²
Tb (65)	[Xe] 4f ⁹ 6s ²
Dy (66)	[Xe] 4f ¹⁰ 6s ²
Ho (67)	[Xe] 4f ¹¹ 6s ²
Er (68)	[Xe] 4f ¹² 6s ²
Tm (69)	[Xe] 4f ¹³ 6s ²
Yb (70)	[Xe] 4f ¹⁴ 6s ²
Lu (71)	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²

*Os colchetes representam a distribuição eletrônica do gás nobre equivalente.

Fonte: MARINS, 2011.

Um importante fenômeno típico destes elementos é a “contração lantanídica”, que consiste na diminuição nos tamanhos dos átomos e íons com o aumento do número atômico. Desta forma é observada uma mudança na química dos íons lantanídeos, por exemplo como consequência dessa contração, a basicidade dos elementos decresce ao longo da série e esta diferença é responsável pela separação dos mesmos por métodos de fracionamento e pelas pequenas variações nas propriedades desses elementos (MARTINS & ISOLANI, 2005).

As reservas minerais de terras-raras são globalmente distribuídas, sendo encontradas em 14 países asiáticos, 10 africanos, 8 europeus, Austrália, Estados Unidos, Canadá e Brasil (Figura 1).

Figura 1. Reservas globais de minerais de terras-raras



Fonte: CHEN, 2011.

Os minerais que contêm estes elementos em quantidades superiores às residuais podem ser divididos em três grupos principais: óxidos, carbonatos e fosfatos; sendo representantes destes grupos os minérios perovskita, monazita e bastnasita, respectivamente (W YLLIE & DENG, 1996).

A perovskita, descoberta nos montes Urais da Rússia por Gustav Rose em 1839, é um mineral relativamente raro ocorrendo na forma de cristais ortorrômbicos (pseudocúbicos), sendo a fórmula química básica ABO_3 , onde A

e B são cátions de diferentes tamanhos como, por exemplo, óxido de lantânio e manganês LaMnO_3 .

A bastnaesita é um mineral fluorcarbonatado, rica em TRs pesadas (ítricas), sendo suas principais reservas encontradas na China e nos Estados Unidos (SENA *et al.*, 2004; HEDRICK, 1995; REZENDE; CARDOSO, 2007).

A monazita é um mineral fosfatado de coloração marrom, variando de amarelada para avermelhada (Figura 2). A sua fórmula estrutural é R-PO_4 , sendo R o grupo de terras raras, onde 96,8% constituem-se dos óxidos dos elementos La, Ce, Nd, Pr e Sm, sendo o restante de itérbio e lantanídeos pesados (ABRÃO, 1994). As areias monazíticas são recorrentes como fontes secundárias importantes na Malásia, Sri Lanka, Índia, África do Sul, Tailândia e também no Brasil, onde as reservas concentram-se no Estado de Minas Gerais (REZENDE; CARDOSO, 2007).

Figura 2. Mineral monazita



Fonte: The mineral collector's newsletter

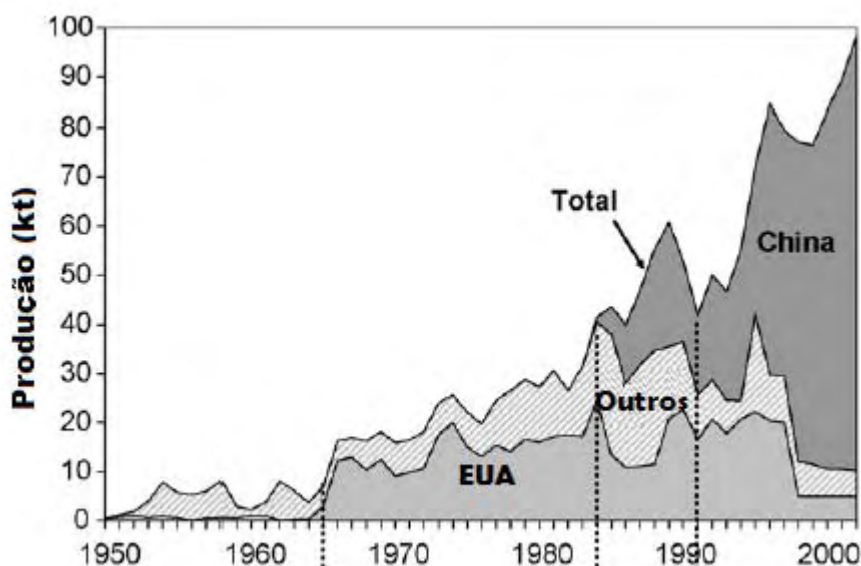
O interesse pelos metais terras-raras teve início durante a Segunda Guerra Mundial, com o “Manhattan Project”. No entanto, o uso individual dos elementos só foi possível na década de 50, com o avanço das tecnologias metalúrgicas e de separação que favoreceram a redução dos preços impulsionando o crescimento da demanda (DINIZ & VOLESKY, 2005).

Os preços de terras-raras dependem de sua pureza e qualidade, variando de acordo com a oferta e demanda, legislação ambiental e fatores econômicos,

dentre os quais se destacam a inflação e os custos de energia para o seu processamento (HEDRICK, 2000).

Segundo Falconnet (1993), a colocação inicial da China como potência isolada no setor de terras-raras nos anos 80, impactou fortemente o mercado. Além disso, a agressiva política chinesa para a promoção da indústria de terras-raras, durante a década de 90, gerou um aumento significativo na produção do setor no início dos anos 2000 (Figura 3). Em 2003, o governo chinês anunciou que iria firmar o controle do país sob a indústria de terras-raras e restringir suas exportações; desde então os preços das *commodities* têm aumentado (CASTOR, 2008). De acordo com relatório da USGS (United States Geological Survey), em 2005 a produção da China atingiu 95% do suprimento mundial de terras-raras (FIFAREK *et al.*, 2008).

Figura 3. Produção global de óxidos de terras-raras de 1950 a 2003 segundo a USGS (United States Geological Survey)



Fonte: modificado de Fifarek et al., 2008.

Segundo a USGS, em 2009 havia cerca de 99 milhões de toneladas em reservas mundiais de terras-raras, dentre as quais a China detinha a maior parte (36%) e o Brasil apenas 0,05%. Porém, a atual situação brasileira é peculiar, pois no relatório de 2010 da USGS, quando avaliadas as reservas com potencial para a produção industrial, o Brasil foi colocado em primeiro

lugar com 37%, isto porque nem todas as reservas identificadas no planeta são exploráveis dos pontos de vista econômico e/ou ambiental (CHEN, 2011).

Recentemente, o cenário internacional de comercialização das terras-raras e de seus produtos, tornou-se bastante complexo devido à crescente demanda destes metais nas indústrias de alta tecnologia e à competição com empresas chinesas que detêm não apenas algumas das maiores reservas minerais como também grande parte do conhecimento à cerca das tecnologias de separação/concentração das terras-raras (ELISEEVA & BUNZLI, 2011).

Com isso, a pesquisa e o desenvolvimento de novas ou aprimoradas técnicas de obtenção destes elementos adquirem maior importância e motivam grandes investimentos em diversos países. Nos Estados Unidos, por exemplo, a planta industrial de extração de terras-raras em Mountain Pass, Califórnia, desativada em 1998 devido à competição com os produtos chineses e problemas ambientais, foi parcialmente reativada em 2007 pela Chevron Mining Inc. para a produção de *commodities* contendo La, Nd e Pr (CASTOR, 2008).

De maneira geral, os elementos terras-raras são utilizados industrialmente como componentes para vidros, materiais fluorescentes, catalisadores, cerâmicas, supercondutores, ímãs, baterias recarregáveis e lâmpadas de LED; também podem ser encontrados em fertilizantes agrícolas e ainda na alimentação animal. O universo de aplicações dos metais terras-raras é muito abrangente, sendo que alguns foram valorizados comercialmente em função da sua utilização em indústrias de alta tecnologia, como o cério, devido à participação em superligas resistentes à alta temperatura e corrosão, conversores catalíticos automotivos, proteção e estabilização de silicões; o neodímio, por sua participação na liga neodímio-ferro-boro (NIB) utilizada em ímãs permanentes, além da fabricação de lasers e vidros e, o lantânio, pela participação no híbrido lantânio-níquel, amplamente utilizado em baterias recarregáveis (ABRÃO, 1994; ANDRÈS & GÉRENTE, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Uma característica peculiar da aplicação industrial de terras-raras é a frequente utilização de quantidades pequenas destes metais, pois em baixas concentrações podem ser garantidos os efeitos ou propriedades desejados,

como por exemplo, no caso da sílica dopada com 35 ppm de óxido de érbio utilizada para a produção de fibras óticas (ELISEEVA & BUNZLI, 2011).

Embora o Brasil possua grandes reservas de terras-raras, boa parte do material minerado não é devidamente aproveitada devido ao fato de estar presente em concentrações muito baixas, praticamente inacessíveis pelos métodos tradicionais de remoção de metais.

Estes métodos convencionais (Tabela 3), baseados em várias etapas de extração utilizando solventes orgânicos ou resinas de troca iônica, apresentam limitações quanto à complexidade dos processos, geração de resíduos tóxicos ao ambiente e alto custo operacional (PALMIERI et al., 2002; ANDRÉS et al., 2003; TSURUTA, 2007).

Tabela 3. Métodos convencionais de remoção de metais de sistemas aquosos.

Método	Vantagens	Limitações
Precipitação química	(a) Simplicidade; (b) Baixo custo.	(a) Difícil separação; (b) Resíduos tóxicos; (c) Pouco eficaz.
Tratamento eletroquímico	(a) Alto índice de recuperação do metal.	(a) Aplicável em altas concentrações de metais; (b) Sensível à condições específicas, como a presença de interferentes.
Osmose reversa	(a) Efluente puro, disponível para a reciclagem.	(a) Aplicação em altas pressões; (b) Durabilidade e manutenção das membranas; (c) Alto custo.
Troca-iônica	(a) Eficaz; (b) Possível recuperação do metal.	(a) Sensível à presença de partículas; (b) Uso de resinas de alto custo.
Adsorção	(a) Uso de adsorventes convencionais.	(a) Não muito eficaz para certos metais.

Fonte: ZOUBOULIS *et al.*, 2004.

Neste sentido, a biossorção vem despertando a atenção dos pesquisadores para a concentração de metais terras-raras, por se tratar de uma tecnologia econômica e ecologicamente viável, para a remoção de metais presentes em

baixas concentrações nas soluções aquosas (VOLESKY, 2003, GADD, 2009; PARK et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011), tornando possível o aproveitamento deste conteúdo não extraível por meio das técnicas tradicionais.

1.2. Biossorção

Na expressão “biossorção”, o prefixo “bio” denota o envolvimento de um fator biológico que pode ser um organismo (vivo ou morto), um componente do organismo ou um produto derivado de um organismo. Já o termo físico-químico “sorção” pode ser empregado tanto para “adsorção” como para “absorção”, por isso é importante diferenciar estes dois conceitos: a absorção é a incorporação de uma substância em um determinado estado em outra substância de diferente estado; já a adsorção é a aderência ou ligação de íons e moléculas em determinada superfície ou outra molécula (GADD, 1999).

A maioria dos sólidos, incluindo a biomassa de micro-organismos, apresenta grupos funcionais como hidroxilas e carboxilas nas suas superfícies. Os íons trivalentes de TR tendem a reagir prontamente com átomos de oxigênio, sendo importante estabelecer possíveis diferenças na afinidade entre os elementos que auxiliaria a separação dos íons de interesse através do processo biossortivo (CHEN, 2010; LÜ *et al.*, 2010; ZHENG & XIONG, 2011).

A biossorção é um processo bastante complexo devido à diversidade de mecanismos que podem estar envolvidos, dependendo do sorbato em questão, do biossorvente utilizado, dos fatores ambientais sob os quais o processo ocorre e finalmente, da dependência de vias metabólicas, no caso da utilização de organismos vivos (GADD, 1999).

Apesar da biossorção poder ser conduzida tanto com biomassa ativa como inativada, o uso de biomassa inativada apresenta vantagens devido à ausência de limitações quanto a possível toxicidade, ausência de requerimentos e nutrientes para o crescimento dos microrganismos (reduzindo custos de produção do biossorvente) e o fato dos metais poderem ser adsorvidos e recuperados, uma vez que são retidos passivamente, não

havendo participação em rotas metabólicas que poderiam inviabilizar a dessorção (MODAK & NATARAJAN, 1995; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1997; SHENG *et al.*, 2004).

As principais características relacionadas ao sucesso dos processos biossorbitivos são: baixo custo de obtenção dos biossorbentes, boa eficiência de remoção dos metais em baixas concentrações, potencial de regeneração do biossorbente, alta velocidade de sorção e dessorção, além da geração limitada de resíduos (CRINI, 2005; KRATOCHVIL & VOLESKY, 2000; VOLESKY & NAJA, 2005).

Diversos fatores podem influenciar a biossorção: o tipo e a natureza da biomassa ou do produto derivado, o pH da solução, a presença de outros ânions ou cátions, a temperatura durante o processo, a forma e propriedades físico-químicas dos metais de interesse (GADD, 2009; GARCIA-REYES *et al.*, 2009; KÜTAHYALI *et al.*, 2010; CÓRDOVA *et al.*, 2011; GIRI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dentre estes fatores, o pH da solução do sorbato é considerado um dos fatores ambientais que mais interferem na biossorção pois este parâmetro físico-químico é capaz de alterar não apenas as condições de ligação e dissociação, como também a química da solução em termos de favorecer reações de hidrólise, complexação, óxido-redução e precipitação, que tornam menos disponíveis os íons de interesse (ESPOSITO *et al.*, 2002; FIOL *et al.*, 2006; MACK *et al.*, 2007).

Muitos pesquisadores analisaram estes fatores individualmente; porém poucos exploraram a influência das interações entre tais parâmetros no processo biossorbitivo (FREITAS *et al.*, 2009; CÓRDOVA *et al.*, 2011). O estudo destas interações é necessário para a criação de um modelo que represente adequadamente a superfície de resposta da biossorção, investigando a influência de diferentes variáveis e determinando as condições ótimas para que o processo ocorra (CÓRDOVA *et al.*, 2011).

A informação quantitativa chave da biossorção pode ser obtida a partir de estudos de equilíbrio em bateladas (VOLESKY, 2003). Nestes experimentos são ensaiadas as condições ótimas para a condução de uma biossorção mais efetiva e podem ser usados para a pesquisa de modelos físico-químicos que descrevem as interações metal-biomassa.

Apesar da operação contínua em colunas ser o modo preferencial para ampliar o processo de bioissorção a uma escala piloto (VOLESKY, 2003), os sistemas em batelada serve para uma avaliação inicial dos fenômenos de bioissorção, principalmente no que diz respeito à avaliação preliminar dos bioissorventes e das condições operacionais antes da aplicação do processo em sistemas contínuos (GADD, 2008).

Diversos parâmetros calculados a partir das modelagens físico-químicas dos ensaios de bioissorção são utilizados no estudo do processo, dependendo do modelo aplicado aos dados experimentais. Entretanto, o principal parâmetro analisado é a chamada “capacidade bioissorativa” (q), que pode ser obtida em função do tempo de contato entre bioissorvente e metal (por meio das cinéticas de bioissorção) ou, em função da concentração final do metal em solução transcorrido o tempo de equilíbrio da reação (através das isotermas de bioissorção). A capacidade é calculada de acordo com a equação:

$$q = \frac{(C_o - C_f) \times V}{m}$$

Onde, “ q ” é a capacidade de bioissorção (mg. g^{-1}); “ C_o ” é a concentração inicial do metal (mg. L^{-1}); “ C_f ” é a concentração final do metal no tempo de amostragem (mg. L^{-1}); “ V ” é o volume da solução (L) e “ m ” é a massa de biomassa utilizada no ensaio (g).

1.2.1. Fungos filamentosos como bioissorventes

Uma ampla gama de materiais biológicos, provenientes de bactérias, algas, leveduras e fungos filamentosos têm recebido atenção para potencial uso como bioissorventes visando a separação e concentração de metais.

Estudos têm mostrado que a utilização da biomassa de fungos, em especial os filamentosos, no processo de bioissorção pode ser comparável a agentes químicos largamente usados para remoção de metais, como o Filtrasorb-400, e também apresenta importantes características como alta produção de biomassa, simplicidade e baixo custo do cultivo (PALMIERI et al., 2000;

ANDRÈS et al., 2003; VOLESKY, 2003; AKSU, 2005; W ANG & CHEN, 2009; KURODA et al., 2010).

O nosso laboratório (Laboratório de Fungos Filamentosos, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química no Instituto de Química de Araraquara - UNESP) desenvolve pesquisas em “Biossorção de metais terras-raras por fungos filamentosos” que têm como principais objetivos a seleção de espécies e subprodutos metabólicos destes micro-organismos capazes de concentrar e recuperar terras-raras (neodímio, lantânio e cério), bem como avaliar e estabelecer as condições ótimas do processo.

O primeiro trabalho desenvolvido pelo grupo (D'avoglio, 2007) teve por objetivo a seleção de espécies com grande capacidade de concentração de metais terras-raras a partir de um conjunto de fungos filamentosos coletados no litoral paulista por Vita-Marques (2003), os quais permanecem estocados no laboratório. Os resultados deste trabalho indicaram que o fungo *Cladosporium* sp. apresentava grande potencial biotecnológico para ser utilizado como biossorvente.

Paralelamente, o nosso grupo estava desenvolvendo projetos de pesquisas sobre a caracterização bioquímica dos mutantes (MEL1 e MEL2) do fungo *Aspergillus nidulans* superprodutores do pigmento tipo melanina e também sobre a influência das condições de cultivo deste fungo para a produção da biomassa melanizada. Os resultados obtidos motivaram a investigação do potencial aplicação do pigmento e da biomassa produzida por este fungo como biossorvente de terras-raras. As paredes celulares dos fungos são compostas por lipídeos e polissacarídeos, frequentemente complexados com proteínas, e também outras substâncias, como pigmentos. Alguns estudos têm mostrado que o uso de biomassas melanizadas apresenta vantagens para o processo de biossorção, pois este pigmento contém grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e aminas: potenciais sítios de ligação de íons metálicos (FOGARTY & TOBIN, 1996; FOMINA, 2002; VIJAYARAGHAVAN, 2010).

Por isso, os resultados obtidos em projetos de pesquisas na caracterização bioquímica e purificação do pigmento tipo melanina produzidos por mutantes do fungo *Aspergillus nidulans* e, no estudo da influência das condições de

cultivo deste fungo para a produção do pigmento, motivaram a investigação do potencial deste micro-organismo como bioissorvente de terras-raras.

Neste sentido, foram desenvolvidos no nosso laboratório trabalhos com enfoque voltado ao pigmento, suas características estruturais e bioquímicas (GONÇALVES, 2002; GONÇALVES 2008) e, estudos de otimização das condições de cultivo do fungo visando a máxima produção de pigmento, além do estudo do efeito de diferentes subprodutos agroindustriais na suplementação do meio de cultura, dentre os quais destacou-se a água de maceração de milho (AMM) (LISBOA, 2003; PRETTI, 2009).

O trabalho de Mestrado desenvolvido por Caporalin (2011) teve a importante contribuição de unir pela primeira vez estas diferentes linhas de pesquisa desenvolvidas no laboratório, tendo avaliado o potencial da biomassa melanizada, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio, do fungo *Aspergillus nidulans* (MEL1) para a bioissorção de terras-raras.

Bioissorventes utilizados na sua forma livre geralmente apresentam tamanho reduzido de partículas, baixa densidade, pouca força mecânica e pouca rigidez, podendo gerar limitações quanto à separação das fases sólida e líquida do processo bioissorativo, bem como possíveis deformações morfológicas do material, além da impossibilidade de sua regeneração e reutilização. Desta forma, a imobilização é vantajosa aos processos industriais contínuos, devido à possibilidade de desenvolvimento de estruturas sólidas de material bioissorvente com tamanho, força mecânica, rigidez, porosidade adequada, e ainda reutilizável ao longo de ciclos de sorção e dessorção de maneira similar às resinas de troca iônica, solucionando os entraves anteriormente mencionados (KHOO & TING, 2001; W ANG & CHEN, 2009; WANG *et al.*, 2010).

Diferentes suportes têm sido utilizados para a imobilização de biomassa em ensaios de bioissorção, sendo os mais comuns: fibras, espumas, alginato, quitosana, quitina, entre outros.

A popularidade do alginato como matriz de imobilização em vários processos biotecnológicos é baseada nas propriedades do polímero em si e na sua pouca dependência da temperatura (dentro de uma ampla faixa de variação), na presença de íons divalentes (como Ca^{2+} , por exemplo), os quais o

tornam disponíveis para o uso como matriz de imobilização (DeRAMOS *et al.*, 1997; DRAGET *et al.*, 2005). A sua capacidade de ligar metais fortemente é atribuída à alta hidrofiliçidade devido à presença de um grande número de grupos funcionais, à alta reatividade química dos grupos e à estrutura flexível da cadeia polimérica, de modo que o encapsulamento de biossorventes em alginato pode aumentar o desempenho e a capacidade de adsorção em sistemas de biossorção (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003; ARICA *et al.*, 2004; CRINI, 2005; MATA *et al.*, 2009).

O álcool polivinílico (PVA) é um material hidrossolúvel que contém grande quantidade de grupos hidroxilas. Esta matriz tem sido muito utilizada devido a vantagens como: baixo custo, atoxicidade, boa durabilidade e estabilidade química (KHOO &TING, 2001; WEI-CHEN *et al.*, 2009).

O PVA é outra matriz de imobilização estudada em processos biossortivos. Dentre as vantagens apontadas na sua utilização estão: propriedades mecânicas que garantem melhor resistência, grande quantidade de grupos hidroxilas, menor resistência de transferência e conseqüentemente, maior taxa de difusão, comparada ao alginato de cálcio (TSEKOVA *et al.*, 2011), baixo custo, atoxicidade, boa durabilidade e estabilidade química (KHOO &TING, 2001; WEI-CHEN *et al.*, 2009).

O interesse no uso de matrizes mistas na imobilização de biossorventes é recente. Neste enfoque, a matriz mista de PVA-SA (álcool polivinílico e alginato de sódio) tem sido a mais estudada. Ma *et al.* (2009) aperfeiçoaram as condições de imobilização de resíduos de *Lentinus edodes* na sorção de chumbo e cádmio, atingindo taxa de remoção de 95,4%; Saravanan *et al.* (2012) estudaram a biossorção de níquel por *pellets* e biofilmes de PVA-SA, inoculados com cultura de *E. coli*, indentificando maior capacidade biossortiva dos *pellets*; Zain *et al.* (2011), investigaram modificações no desenvolvimento da matriz PVA-alginato para posterior uso em imobilizações.

Os resultados obtidos por Caporalin (2011) mostraram que com a imobilização em alginato de cálcio da biomassa do fungo *A. nidulans* (MEL1) houve uma redução de 60% e 33% da capacidade biossortiva, respectivamente para lantânio e neodímio, comparada a biomassa na forma livre, enquanto que

para cério, o valor das capacidades bioabsorptivas das biomassas nas formas livre e imobilizada, foram semelhantes.

Em relação a outros estudos de bioabsorção de terras raras, Palmieri *et al.* (2002), obtiveram a máxima capacidade bioabsorptiva da biomassa inativa de *Sargassum fluitans* igual a 77 mg.g^{-1} para lantânio; Diniz & Volesky (2005), observaram a máxima capacidade bioabsorptiva da biomassa inativa de *Sargassum polycystum* igual a 145 mg.g^{-1} para lantânio e Sert *et al.* (2008), obtiveram máximas capacidades bioabsorptivas de *Platanus orientalis* iguais a $28,65 \text{ mg.g}^{-1}$ e $32,05 \text{ mg.g}^{-1}$, para lantânio e cério, respectivamente. Vijayaraghavan *et al.* (2010) avaliaram a biomassa da alga marrom *Turbinaria conoides* como bioabsorvente de terras raras e observaram máxima capacidade bioabsorptiva de aproximadamente 155 mg.g^{-1} para lantânio e 153 mg.g^{-1} para cério.

Neste contexto, é de fundamental importância avaliar a potencialidade de novos bioabsorventes, na forma livre e imobilizada, para a recuperação e concentração de elementos terras-raras visando uma possível aplicação industrial.

1.3. Isotermas de bioabsorção

O estudo do equilíbrio entre as fases sólida e líquida é um dos ramos da termodinâmica que relata a composição de equilíbrio nas duas fases e é representada pela concentração na fase estacionária (traduzida nos processos de bioabsorção pela “capacidade bioabsorptiva”) *versus* a concentração na fase móvel, que nada mais é do que a concentração final de metal em solução após determinado tempo de equilíbrio (GODLEWSKA-ZYLKIEWICZ, 2006).

Os modelos de adsorção e troca iônica são os mais aplicados, pois seus conceitos são facilmente estendidos a outros mecanismos de retenção de metais. Os modelos de adsorção em equilíbrio sólido-líquido são derivados de modelos em equilíbrio gás-sólido, a partir da isoterma de Gibbs e assumindo uma equação de estado para a fase adsorvida (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dentre os diversos modelos estudados, os mais aplicados em biossorção são os de Langmuir e de Freundlich (PARK, 2010).

Os parâmetros “ q_{\max} ” (capacidade máxima biossorbitiva), “ K_L ” e “ b ” (constantes de afinidade) do modelo de Langmuir, “ K_F ” (constante de afinidade) e “ n ” (número de monocamadas de adsorção) do modelo de Freundlich, foram calculados a partir da regressão linear dos gráficos obtidos pelos modelos matemáticos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Modelos matemáticos de isotermas e suas expressões linearizadas.

Modelo	Equação	Expressão linearizada	Gráfico
Freundlich	$q = K_F (C_{eq})^{n-1}$	$\ln (q) = \ln (K_F) + n^{-1} \cdot \ln(C_{eq})$	$\ln (q)$ vs. $\ln (C_{eq})$
Langmuir	$q = (q_{\max} \cdot b \cdot C_{eq}) / (1 + b \cdot C_{eq})$	Tipo (I): $C_{eq}/q = 1/b \cdot q_{\max} + C_{eq}/q_{\max}$	C_{eq}/q vs. C_{eq}
		Tipo (II): $1/q = 1/q_{\max} \cdot b \cdot C_{eq} + 1/q_{\max}$	$1/q$ vs. $1/C_{eq}$

Fonte: modificado de SALARIRAD & BEHNAMFARD, 2011.

O modelo de Langmuir descreve a adsorção em sistemas de monocamadas homogêneos, nos quais as energias de adsorção são iguais. Existem diferentes expressões linearizadas para este modelo, por isso, neste trabalho foram analisados dois dos quatro tipos encontrados na literatura, a fim de identificar aquele que apresenta melhor ajuste aos dados experimentais. Já o modelo de Freundlich diferencia-se do de Langmuir no que diz respeito à energia de adsorção envolvida no processo, isto porque também considera sistemas de monocamada, porém heterogêneos, ou seja, nos quais as energias de adsorção dos sítios ligantes são diferentes (VOLESKY, 2004; SALARIRAD & BEHNAMFARD, 2011).

1.4. Dessorção

Além da concentração do metal pela biomassa, há o interesse na recuperação do metal a partir da mesma. Para tanto, realiza-se o processo de dessorção do metal, cujo objetivo é enfraquecer a ligação metal-biomassa, de maneira que o dessorvente deve possuir uma afinidade com o metal maior que a do biossorvente (MODAK & NATARAJAN, 1995).

Geralmente, podem ser utilizados como dessorventes ácidos minerais diluídos, sais, bases e agentes complexantes (DINIZ; VOLESKY, 2006). No entanto, deve-se considerar que melhor será a dessorção quanto maiores forem a capacidade de remoção da biomassa e a concentração do metal no dessorvente (GADD, 1999).

Um dos agentes dessorventes mais utilizados é o ácido clorídrico (HCl) (HOLAN *et al.*, 1993; ALDOR *et al.*, 1995; DAVIS & VOLESKY, 2000; PALMIERI *et al.*, 2002; DINIZ & VOLESKY, 2006). O EDTA, por sua vez, atua como agente quelante dos metais, formando complexos de alta estabilidade (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995).

Diniz & Volesky (2006) avaliaram a dessorção de lantânio, európio e itérbio bioadsorvidos por *Sargassum polycystum* utilizando como agentes dessorventes os ácidos nítrico e clorídrico, EDTA, nitrato de cálcio e nitrato de cloro, ácidos oxálico e diglicólico; os resultados obtidos indicaram como melhor agente dessorvente o ácido clorídrico, que atingiu 95% a 100% de recuperação dos metais, dependendo da concentração do ácido.

A partir da dessorção do metal, outro aspecto muito importante é a capacidade de reutilização do bioadsorvente por vários ciclos bioadsorção-dessorção, de acordo com o balanço “custo-benefício” entre a perda da capacidade de bioadsorção durante as etapas de dessorção – devido à agressão da estrutura da biomassa – e o rendimento operacional de recuperação do metal. As perdas no desempenho de adsorção durante vários ciclos podem ter diferentes causas, desde modificações na química e na estrutura do bioadsorvente, como mudanças nas condições de vazão e transferência de massa (GADD, 1999; VOLESKY, 2001).

Assim, é importante avaliar vários dessorventes para que a escolha do agente esteja baseada tanto na porcentagem de metal recuperado, como também nos custos envolvidos no processo e nas diferentes características que os resíduos da operação podem apresentar dependendo na natureza desta substância.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade do uso da biomassa melanizada e pigmento produzidos pelo fungo *Aspergillus nidulans* (MEL1), como biossorventes (na forma livre e imobilizada) para a recuperação de metais terras-raras (neodímio, lantânio e cério). Para tanto foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- (a) Otimizar as condições de cultivo do fungo para produção de grande quantidade de biomassa melanizada e pigmento usando como suplemento do meio de cultura, água de maceração de milho (subproduto industrial);
- (b) Estabelecer as condições ótimas para a biossorção dos metais (neodímio, lantânio e cério) pela biomassa melanizada e pigmento (nas formas livre e imobilizada) em relação aos parâmetros: pH, temperatura e concentração do biossorvente;
- (c) Padronizar o método espectrofotométrico de quantificação das terras-raras para aumentar a sensibilidade da análise, obtendo valores menores dos limites de detecção;
- (d) Determinar as capacidades máximas de biossorção (q_{max}), bem como, a afinidade dos metais pela biomassa melanizada e pelo pigmento nas formas livre e imobilizada, além do percentual de remoção dos terras raras em solução;
- (e) Verificar a porcentagem de metal recuperado após os ensaios de dessorção nos sistemas estudados, usando diferentes dessorventes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Soluções de Terras-raras

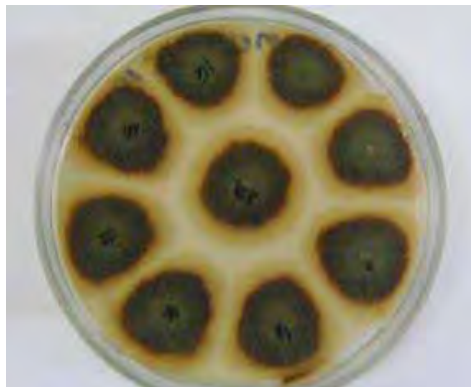
As soluções monometálicas dos metais terras-raras utilizadas nos experimentos (neodímio, lantânio e cério) foram preparadas a partir dos cloretos de Nd(III), La(III) e Ce(III) (Sigma Aldrich, 99,99%) com massas estimadas para a concentração igual a 800 mg. L⁻¹ de Nd⁺³, La⁺³ e Ce⁺³.

3.2. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a linhagem MEL1, um mutante do fungo *Aspergillus nidulans*, caracterizado pela produção excessiva de melanina, isolada por Pombeiro (1991) e está estocada no Laboratório de Fungos Filamentosos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química (UNESP).

A linhagem foi cultivada em placas de Petri contendo meio mínimo, descrito por Cove (1966), composto por: 1mL de solução de sais, 0,1mL de solução de elementos traços e 1,5 g de ágar para cada 100mL de meio e suplementado com solução de glicose (55mmol. L⁻¹), solução de nitrato de sódio (70 mmol. L⁻¹) e solução de inositol (20 µg. mL⁻¹). As colônias obtidas após o crescimento do fungo (Figura 4) foram armazenadas a 4 °C.

Figura 4. Crescimento da linhagem MEL1 do fungo *A. nidulans*, após 5 dias de incubação a 37°C, em meio mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e inositol.



Fonte: Próprio autor

3.3. Preparo da suspensão de conídios

As placas de Petri contendo meio mínimo, inoculadas com a linhagem MEL1, foram incubadas a 37°C por 5 dias. Após este período, fez-se a raspagem dos conídios, coletados em 5 mL de solução salina 0,85% e, em seguida filtrados em lã de vidro.

O número de conídios por mililitro é estimado por meio da contagem em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica, e a partir dele, é calculado o volume a ser inoculado para que a concentração final seja de 10^5 conídios/mL de meio.

3.4. Cultivo do fungo

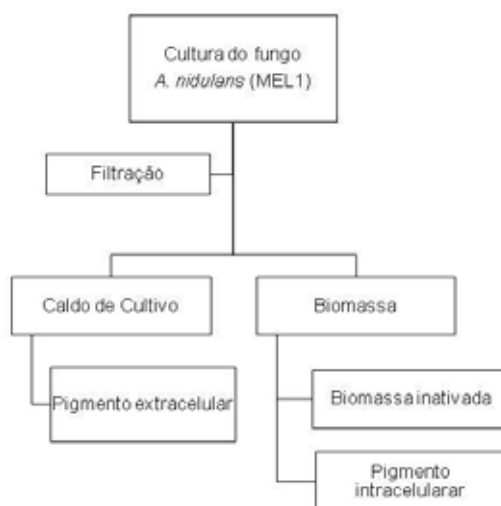
Para obter as condições ótimas para a máxima melanização do fungo foi realizado o cultivo em duas etapas: a pré-cultura, cujo objetivo é estimular o crescimento do micro-organismo e, a cultura propriamente dita, na qual ocorre a produção do pigmento. A pré-cultura foi feita em frascos Erlenmeyers contendo 200mL de Meio Mínimo, como descrito por Cove (1966), suplementado com glicose (55mmol. L^{-1}), nitrato de sódio (70mmol. L^{-1}), inositol (0,5%) e diferentes concentrações de água de maceração de milho (AMM) (1% v/v, 2% v/v, 4% v/v, 6% v/v e 8% v/v), inoculados com 10^5 conídios/mL, mantidos a 37°C, por 48 horas sob agitação constante. Após este tempo, foram

transferidas alíquotas de 40 mL da pré-cultura para frascos Erlenmeyers contendo 200 mL do meio mínimo de mesma composição, com diferentes concentrações de AMM (0% v/v; 0,1% v/v; 0,2% v/v), mantidos a 37°C por 5 dias, sob agitação constante.

Ao final do período de cultivo, a biomassa obtida foi separada do caldo de cultivo por filtração a vácuo, lavada com água destilada e seca em estufa a 55°C até peso constante. Esta biomassa, denominada inativada, foi utilizada nos ensaios de biossorção.

A Figura 5 apresenta um fluxograma do cultivo do micro-organismo para a obtenção da biomassa e do pigmento a serem testados neste trabalho.

Figura 5. Fluxograma do cultivo do fungo *A. nidulans* (MEL1) para a obtenção de biomassa e pigmento



Fonte: Próprio autor

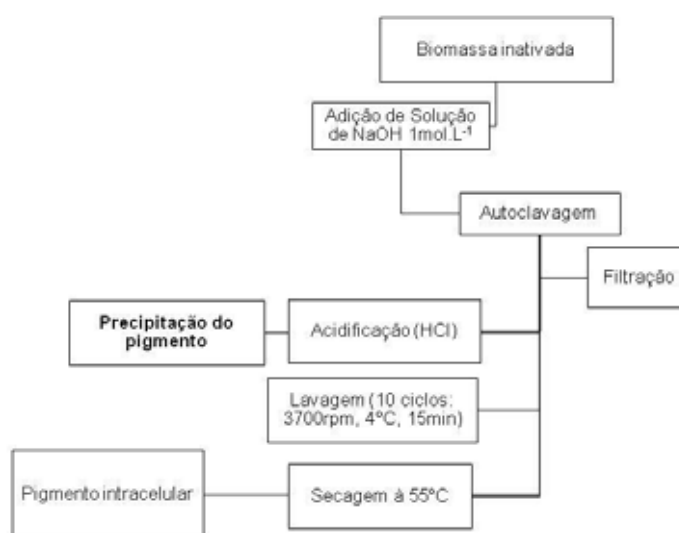
3.5. Extração da melanina

A extração do pigmento intracelular (presente na biomassa) foi feita seguindo a metodologia de Sava *et al.* (2001), com adição de NaOH 1mol/L seguida de autoclavagem da biomassa à 120°C (1atm) durante 20 minutos, com posterior etapa de precipitação da melanina por meio da acidificação da solução usando HCl concentrado até pH 2,0.

Esta etapa de acidificação foi também realizada para a obtenção do pigmento extracelular (presente no caldo da cultura), que somado ao pigmento intracelular gerou o valor de “pigmento total” (P.T.). A melanina precipitada foi lavada com água destilada em 10 ciclos de centrifugação (3700 rpm, 4°C, 15 minutos) até que o teste para o íon cloreto fosse negativo e então foi seca à 55°C até peso constante.

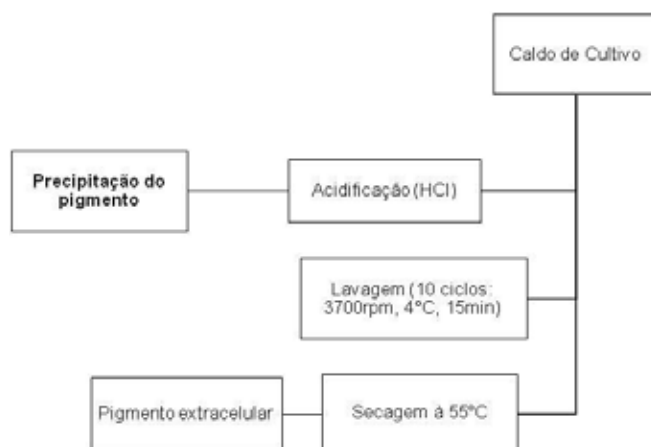
Nas Figuras 6 e 7 podemos observar as etapas para a extração do pigmento melanina intracelular (presente na biomassa do fungo) e do extracelular (solubilizado no caldo de cultivo).

Figura 6. Fluxograma da extração do pigmento intracelular presente na biomassa do fungo *A. nidulans* (MEL1)



Fonte: próprio autor

Figura 7. Fluxograma da extração do pigmento extracelular a partir do caldo de cultivo do fungo *A. nidulans* (MEL1)



Fonte: próprio autor

3.6. Cinéticas de biossorção

As cinéticas de biossorção foram realizadas com o objetivo de estabelecer o tempo de equilíbrio do processo biossortivo para os biossorventes estudados.

Os ensaios com os biossorventes (biomassa e pigmento) em sua forma livre foram realizados em frascos de plástico, contendo 50mL de solução monometálica das terras-raras (800 mg. L⁻¹) e concentração de 0,1% de biossorvente, mantidos sob agitação de 250rpm na temperatura de 28 ± 2°C.

Durante o experimento, foram retiradas amostras (5mL) de frascos individualizados, ~~preparados como descrito anteriormente~~, para os tempos de 5, 15, 30, 60 e 90 minutos. Estas alíquotas foram filtradas para a determinação da concentração residual de metal na fase líquida pelo método espectrofotométrico padronizado neste trabalho (descrito no próximo item).

Aos dados experimentais das cinéticas de biossorção foram aplicados os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens (Tabela 5).

Tabela 5. Equações não lineares e regressões lineares dos mínimos quadrados dos modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens.

Modelo	Equação	Expressão linearizada
Pseudo-primeira ordem	$q_t = q_E \cdot [1 - \exp(-K_1 \cdot t)]$	$\ln(q_E - q_t) = \ln(q_E) - K_1 \cdot t$
Pseudo-segunda ordem	$q_t = (q_E^2 \cdot K_2 \cdot t) / (1 + q_E^2 \cdot K_2 \cdot t)$	$t/q_t = 1/(K_2 \cdot q_E^2) + t/q_E$

Fonte: VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2010.

3.7. Quantificação dos metais (neodímio, lantânio e cério)

As concentrações residuais dos terras-raras estudados foi determinada por meio de análises espectrofotométricas, usando alaranjado de xilenol (1mmol. L⁻¹) como indicador metalocrômico em um sistema tamponado. Para aumentar a sensibilidade desta metodologia foram testados diferentes surfactantes, na concentração de 3mmol. L⁻¹: brometo de cetilpiridíneo (CPB), brometo de cetiltrimetilamônio (CTBA), Tween80[®] e TRITON X-100[®].

Após a padronização do método de análise das concentrações dos metais neodímio, lantânio e cério foram utilizadas as seguintes condições de ensaio:

1) Reação:

- 75 µL de alaranjado de xilenol 1mmol. L⁻¹;
- 125µL de CPB 3mmol. L⁻¹;
- 2765µL de tampão acetato 0,01mol. L⁻¹ - pH 5,6;
- 35µL de amostra.

2) Branco reacional:

- 75µL de alaranjado de xilenol 1mmol. L⁻¹;
- 125µL de CPB 3mmol. L⁻¹;
- 2800µL de tampão acetato 0,01mol. L⁻¹ - pH 5,6.

Após 20 min de repouso à temperatura ambiente foram feitas as leituras de absorbância em 610nm para determinar as concentrações residuais de metal, calculadas a partir dos coeficientes de absorvidade obtidos das curvas

padrão, com os seguintes valores: 0,896 mg. L⁻¹.cm⁻¹ para neodímio, 1,03 mg. L⁻¹.cm⁻¹ para lantânio e 0,928 mg. L⁻¹.cm⁻¹ para cério.

3.8. Efeito da concentração inicial de terras-raras no processo biossortivo

O efeito da concentração inicial foi estudado através de experimentos de Isotermas de Biossorção em sistemas monometálicos para as terras-raras estudadas, variando a concentração dos metais de 50 mg. L⁻¹, 100 mg. L⁻¹, 150 mg. L⁻¹, 200 mg. L⁻¹, 250 mg. L⁻¹, 300 mg. L⁻¹, 400 mg. L⁻¹, 500 mg.L⁻¹, 700 mg. L⁻¹ e 800 mg. L⁻¹, em recipientes individuais contendo soluções preparadas com água deionizada e pH inicial igual a 5,6. As amostras foram coletadas após 90 minutos de tempo de contato com o biossorvente, filtradas para a separação da fração líquida, a qual foi diluída para a determinação da concentração residual de metal por meio do método espectrofotométrico, descrito anteriormente.

3.9. Efeito da temperatura no processo biossortivo

Para avaliar o efeito da temperatura foram realizados experimentos de Isotermas de Biossorção em sistemas monometálicos para as terras raras estudadas, variando a concentração dos metais de 50 mg. L⁻¹ a 800 mg. L⁻¹, em recipientes individuais contendo soluções preparadas com água deionizada e pH inicial igual a 5,6.

Os frascos foram mantidos a 28°C ou 37°C, sob agitação constante de 200rpm. As amostras foram coletadas após 90 minutos de tempo de contato com o biossorvente, filtradas para a separação da fração líquida, a qual foi diluída para a determinação da concentração residual de metal por meio do método espectrofotométrico, descrito anteriormente.

3.10. Efeito do pH no processo biossortivo

A avaliação do efeito do pH teve início com ensaios de biossorção desenvolvidos em frascos individualizados, contendo soluções

monometálicas na concentração inicial igual a 800 mg. L⁻¹, 0,1% de bioissorvente (biomassa ou pigmento), sob agitação constante de 200 rpm, à 28°C, e pHs iguais a 2,0; 3,0; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6; 7,0; 8,0 (ajustados imediatamente antes do contato com o bioissorvente, em cada um dos frascos utilizados).

Em seguida, identificado o pH no qual os bioissorventes apresentavam a maior capacidade bioissorativa, foram realizadas isotermas de bioissorção nestas condições, a fim de verificar se, em termos de máxima capacidade bioissorativa, a alteração do pH provoca o aumento do desempenho dos bioissorventes, isto é, se suas afinidades pelos metais em estudo e/ou se “q_{max}” se tornam significativamente maiores.

As amostras foram coletadas após 90 minutos de tempo de contato com o bioissorvente, filtradas para a separação da fração líquida, a qual foi diluída para a determinação da concentração residual de metal por meio do método espectrofotométrico, descrito anteriormente.

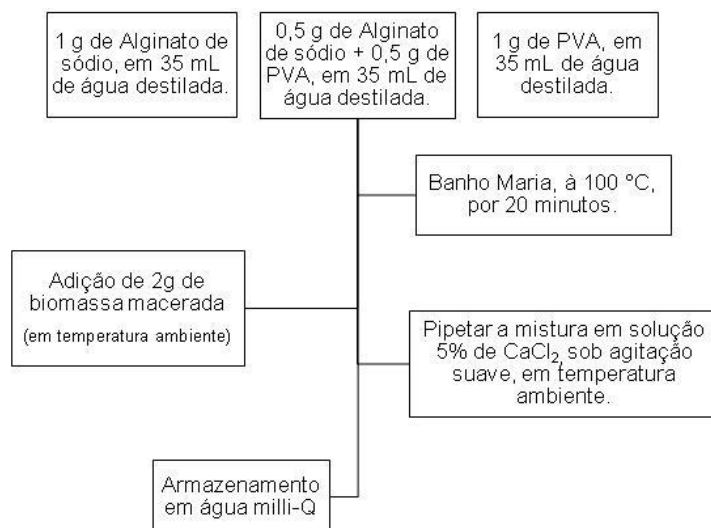
3.11. Imobilização da biomassa melanizada em alginato de cálcio, PVA e PVA-SA

A biomassa melanizada, inativada e macerada, do fungo *A. nidulans* (MEL1) foi imobilizada por encapsulamento, para a formação de *pellets* carregados deste bioissorvente. As matrizes escolhidas para a imobilização foram: o alginato de cálcio, o PVA e PVA-SA e o protocolo foi adaptado de Saravanan *et al.* (2012).

O fluxograma apresentado pela Figura 8 esquematiza as etapas de obtenção do bioissorvente (biomassa melanizada) imobilizados nas diferentes matrizes.

Figura 8. Fluxograma do protocolo, adaptado de Saravanan et al. (2012), para a imobilização da biomassa melanizada do fungo *A. nidulans* (MEL1) nas matrizes:

alginato de cálcio, PVA e PVA-SA



Fonte: Próprio autor

3.12. Dessorção

Os ensaios de dessorção foram realizados na mesma proporção de bioissorvente utilizada nos ensaios de bioissorção (0,1%), isto é, em frascos plásticos contendo biomassa imobilizada, proveniente dos ensaios de bioissorção, e 50mL da solução de agente dessorvente (EDTA 0,05mol. L⁻¹ ou HCl 0,1mol. L⁻¹), mantidos a 30°C sob agitação de 150rpm, durante 24 horas. Os ensaios controle foram realizados de maneira semelhante, porém sem a adição de biomassa.

Diniz e Volesky (2006) verificaram que lavando (1 e 2 vezes) ou não lavando a biomassa com água destilada após a bioissorção, a porcentagem de metal recuperado não é alterada. Por isso, foi utilizada a biomassa apenas filtrada da solução de bioissorção.

A concentração de metal dessorvida foi verificada por meio do método espectrofotométrico padronizado neste trabalho e o coeficiente de dessorção (q_d) foi calculado pela equação:

$$q_d = \frac{C_f \cdot V}{m}$$

Onde, “ q_d ” é a capacidade de dessorção da biomassa no equilíbrio, a qual representa a quantidade de metal liberado por unidade de biomassa; “ C_f ” é a concentração de metal após atingir o equilíbrio (g. L^{-1}); “ V ” é o volume da solução (L) e “ m ” é o peso da biomassa seca (g). O valor de “ q_d ” é expresso em miligrama de metal/grama de biomassa. A porcentagem de dessorção foi calculada a partir do valor de “ q_d ” em relação à capacidade de metal adsorvido no equilíbrio (q_{eq}), considerada como 100%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* (MEL1)

Na etapa de otimização do cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* (MEL1) para a máxima produção de pigmento foram analisadas diferentes concentrações de água de maceração de milho (AMM) tanto na pré-cultura como na cultura propriamente dita (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da concentração de AMM no crescimento e produção de pigmento pelo fungo *A. nidulans* (MEL1) após 7 dias de cultivo a 37°C, 200 rpm

Pré-cultura (% AMM)	Cultura (% AMM)	pH ^(a)	Biomassa (mg. mL ⁻¹) ^(b)	P.I. (mg. g ⁻¹) ^(c)	P.T. (mg. g ⁻¹) ^(d)
1	0	7,6 ± 0,87	2,7 ± 0,52	25,2 ± 1,77	43,3 ± 3,24
	0,1	7,6 ± 0,96	2,8 ± 0,4	29,1 ± 1,78	54,0 ± 4,58
	0,2	7,6 ± 0,8	2,8 ± 0,28	46,4 ± 6,51	61,3 ± 6,27
2	0	8,3 ± 0,04	2,9 ± 0,9	12,7 ± 3,76	12,7 ± 3,76
	0,1	8,1 ± 0,06	3,2 ± 0,55	10,0 ± 3,7	17,5 ± 2,25
	0,2	8,3 ± 0,07	3,3 ± 0,64	7,8 ± 7,23	7,8 ± 7,23
4	0	8,4 ± 0,49	3,0 ± 0,19	9,3 ± 1,65	9,3 ± 1,65
	0,1	8,1 ± 0,08	3,3 ± 0,47	10,3 ± 0,89	10,3 ± 0,89
	0,2	8,0 ± 0,04	3,6 ± 0,42	7,4 ± 2,61	7,4 ± 2,61
6	0	7,9 ± 0,18	4,1 ± 0,27	6,8 ± 4,53	6,8 ± 4,53
	0,1	7,9 ± 0,52	3,9 ± 0,98	6,9 ± 6,44	6,9 ± 6,44
	0,2	7,8 ± 0,33	4,2 ± 0,34	5,3 ± 5,5	5,3 ± 5,5
8	0	7,7 ± 0,23	4,7 ± 0,56	4,9 ± 3,53	4,9 ± 3,53
	0,1	7,7 ± 0,34	4,8 ± 0,84	5,8 ± 3,44	5,8 ± 3,44
	0,2	7,8 ± 0,24	5,2 ± 0,43	7,4 ± 4,93	7,4 ± 4,9

(a);(b);(c);(d) : os valores de pH após o cultivo; biomassa seca, pigmento intracelular (P.I.) e pigmento total (P.T.) correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que o aumento da concentração de AMM na pré-cultura promoveu uma maior produção de biomassa independentemente da

condição da cultura propriamente dita. No entanto, em relação à produção de pigmento verificamos um comportamento inverso, ou seja, em maior concentração de AMM ocorreu uma menor produção de pigmento.

Quanto ao efeito da AMM na cultura propriamente dita, observa-se que não houve um aumento de crescimento e produção de melanina proporcional ao aumento da concentração de AMM; exceto nas culturas com 1% de AMM. Nesta condição, a suplementação do meio de cultivo com 0,2% de AMM promoveu um aumento de 13,5% na produção de pigmento comparada à condição de 0,1% de AMM, cujo incremento na produção de pigmento foi de 42%, com relação ao tratamento sem suplementação de AMM na cultura. Hamano & Kilikian (2006), também verificaram que a produção de pigmentos vermelhos pelo fungo *Monascus ruber* não está relacionado à fase de crescimento do micro-organismo e que o uso de AMM na suplementação do meio de cultura aumenta em 35% a produção dos pigmentos.

Quanto ao pH, não foi observada alteração significativa nas diferentes condições de cultivo do fungo, indicando que a suplementação com diferentes concentrações de AMM não promove alteração deste parâmetro e ainda, que o mesmo não está relacionado à produção de pigmento.

A partir destes resultados, foi avaliada a necessidade da realização da etapa de pré-cultura e a influência do tempo de cultivo na produção de pigmento, dentro da melhor condição de cultivo estabelecida no experimento anterior (suplementação de 1% de AMM na etapa de pré-cultura e 0,2% de AMM na cultura propriamente dita).

Como pode ser observado na Tabela 7 e Figura 9, a ausência de uma das etapas de cultivo do fungo compromete a melanização da biomassa, que não ocorre ou ocorre em menor grau. Isto pode ser devido à utilização de cultura-semente (pré-cultura como inoculo da cultura propriamente dita) que permite a sincronização da fase de crescimento do micro-organismo, proporcionando melanização intensa.

Quanto ao tempo de incubação, verificamos que em 5 dias (sendo 2 dias de incubação da pré-cultura e 3 dias de incubação da cultura propriamente dita) as quantidades de pigmento intracelular e total obtidas

são maiores comparadas às obtidas após 7 dias de cultivo. Portanto, quando o fungo é cultivado por 2 dias com suplemento de 1% AMM na pré-cultura e em seguida transferido para a cultura suplementada com 0,2% AMM por 3 dias, a biomassa atinge alto grau de melanização.

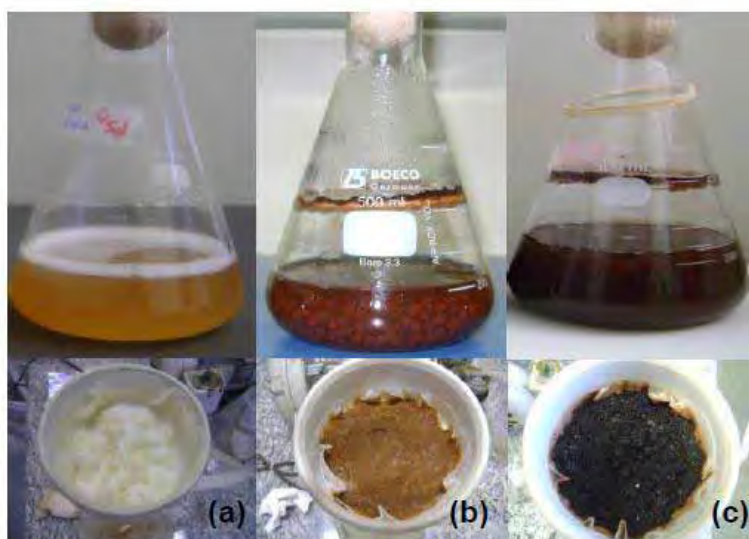
Tabela 7. Crescimento e produção de pigmento em diferentes condições de Pré-cultura e Cultura após o cultivo do fungo por 5 e 7 dias a 37°C, 200 rpm

Pré-cultura (% AMM)	Cultura (% AMM)	Tempo de incubação (dias)	pH ^(a)	Biomassa (mg. mL ⁻¹) ^(b)	P.I. (mg. g ⁻¹) ^(c)	P.T. (mg. g ⁻¹) ^(d)
Não realizada	0,2	5	8,5 ± 0,11	0,44 ± 0,05	0	0
		7	8,7 ± 0,07	0,49 ± 0,04	0	0
1	Não realizada	5	7,9 ± 0,04	4,44 ± 0,06	10,8 ± 3,23	10,8 ± 3,23
		7	7,9 ± 0,14	3,89 ± 0,01	16,25 ± 4,16	16,25 ± 4,16
1	0,2	5	8,0 ± 0,09	3,58 ± 0,02	50,21 ± 4,82	78,77 ± 5,71
		7	7,9 ± 0,33	3,54 ± 0,01	40,75 ± 6,25	52,82 ± 6,81

(a);(b);(c);(d) : os valores de pH após o cultivo; biomassa seca, pigmento intracelular(P.I.) e pigmento total (P.T.) correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

Fonte: Próprio autor

Figura 9. Aspecto do cultivo e da biomassa do fungo *A. nidulans* (MEL1) obtidos em diferentes condições de cultivo



- (a) uma única etapa de cultura suplementada com 0,2% AMM, incubada por 5 dias; (b) uma única etapa de cultura suplementada com 1% AMM, incubada por 5 dias; (c) cultivo com pré-cultura suplementada com 1% AMM, seguida de cultura suplementada com 0,2% AMM, incubada por 2 e 3 dias, respectivamente.

Fonte: próprio autor

Vários estudos têm mostrado que a natureza e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio interferem no metabolismo do micro-organismo, em relação à proliferação celular (trofofase) e à formação do produto (idiofase), os quais na maioria dos casos são fenômenos separados e cada um tem suas condições favoráveis (SINHA *et al.*, 2001, BARBOSA *et al.*, 2004).

Assim, os resultados obtidos podem ser explicados pelo fato de que em altas concentrações de nutrientes o fungo prioriza o crescimento micelial (metabolismo primário). Por outro lado, o metabolismo secundário que está relacionado à produção de pigmento ocorre em condições limitantes de nutrientes.

4.2. Padronização do método de quantificação de terras-raras

A padronização do método de quantificação de terras-raras é uma etapa de fundamental importância nesta pesquisa, pois objetivou estabelecer as

melhores condições de ensaio que permitissem determinar quantidades traços dos metais em estudo por meio de análises espectrofotométricas.

Os íons lantanídeos possuem um grande número de níveis que podem proporcionar emissões desde o infravermelho até o ultravioleta, sendo que muitas ocorrem na região visível (ABRÃO, 1994).

Para contornar o problema dos baixos coeficientes de absorção dos íons lantanídeos livres, torna-se necessário complexá-los com sistemas ligantes que possuam altos coeficientes de absorção. Assim, esses ligantes absorvem energia num primeiro momento e em seguida, transferem a energia para o íon central, mais comumente chamado de efeito antena (MARINS, 2011).

Diferentes tipos de ligantes podem ser usados na complexação com os íons lantanídeos, dentre os vários reagentes cromogênicos usados para a determinação espectrofotométrica de terras-raras, o Alaranjado de Xilenol (XO) é uma das substâncias mais recomendadas para este propósito (SVOBODA & CROMY, 1966; MARTINS & ISOLANI, 2005).

Vários estudos têm mostrado que a adição de um surfactante pode aumentar a sensibilidade do método para a quantificação de concentrações traços de terras-raras.

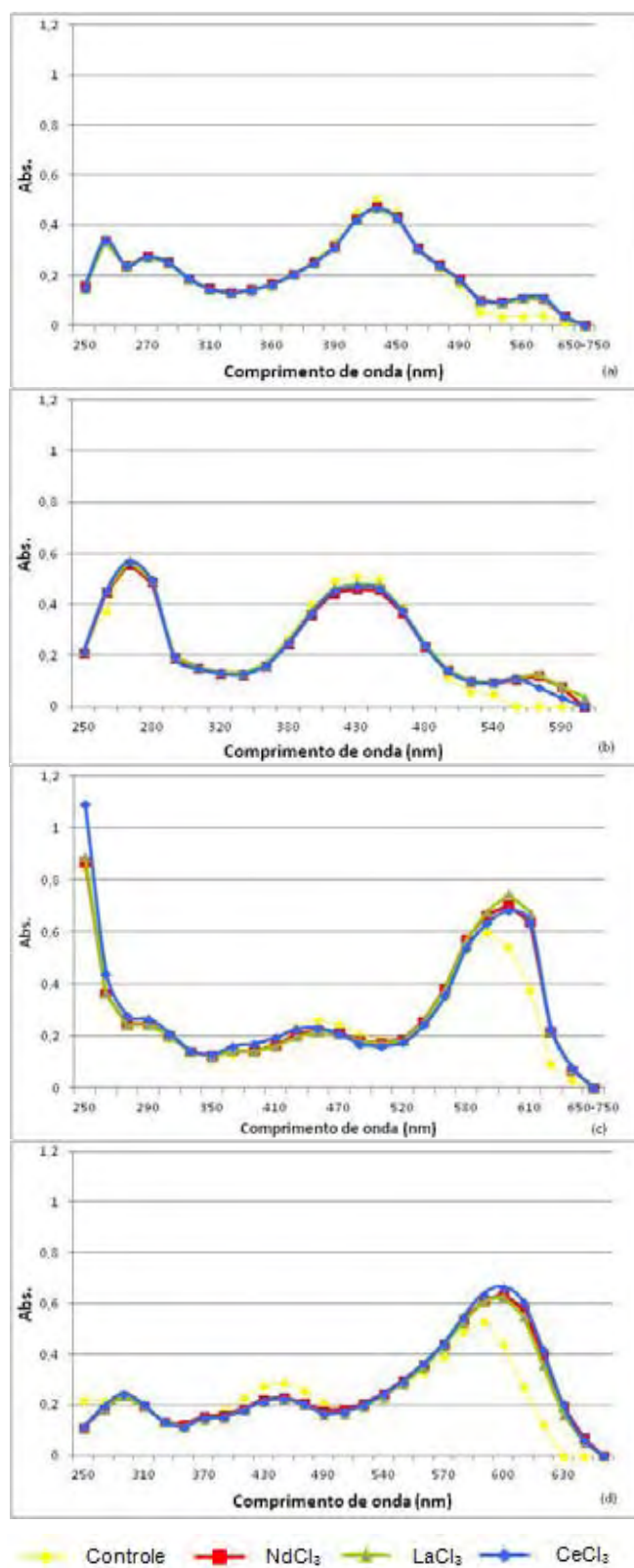
Estas substâncias, em geral, são detergentes catiônicos formadores de micelas e sua interação com os reativos cromogênicos, como o alaranjado de xilenol, acarreta um aumento da intensidade da cor do complexo ternário formado (GARCIA & SANZ-MEDEL, 1986). Com estes efeitos, o uso de surfactantes mostra-se vantajoso no desenvolvimento de métodos espectrofotométricos para determinação de concentrações muito reduzidas de íons metálicos.

Foram testados os surfactantes Brometo de Cetilpiridíneo (CPB), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTBA), Tween 80[®] e TRITON X-100[®] para selecionar a substância que promova a formação do complexo neodímio-XO-surfactante com maior absorção.

Na Figura 10 é possível observar as curvas de absorbância obtidas no intervalo de comprimento de onda de 250nm a 750nm para os diferentes complexos formados. Verificamos que a utilização do surfactante catiônico Brometo de Cetilpiridínio (CPB) resultou em maiores valores de absorbância

no comprimento de onda de 610 nm. Também foram obtidos os menores valores do limite de detecção para os três metais estudados, sendo 0,08 ppm para neodímio, 0,11 ppm para lantânio e 0,10 ppm para cério; evidenciando a alta sensibilidade da metodologia proposta.

Figura 10. Perfil de absorção, entre 250 nm e 750 nm, dos complexos ternários metal-XO-surfactante, formados na presença dos surfactantes Tween 80[®] (a), TRITON X-100[®] (b), CPB (c) e CTBA (d)



Fonte: próprio autor

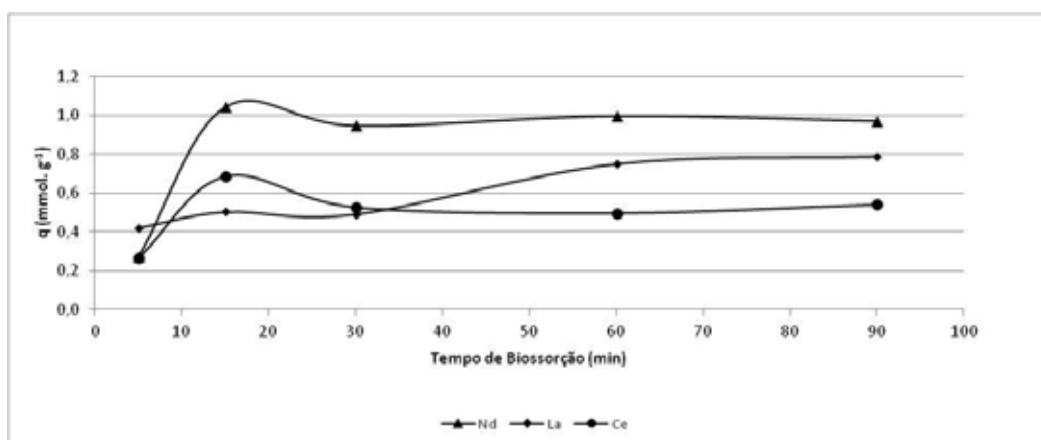
A estabilidade da reação também foi estudada por meio da medição da absorbância das soluções dos metais em intervalos de tempos regulares de 5 minutos na temperatura ambiente. A máxima absorbância foi atingida aos 20 minutos, tempo estabelecido para a leitura das absorbâncias das soluções nos ensaios posteriores.

4.3. Ensaio de bioadsorção utilizando bioadsorventes (biomassa e pigmento) obtidos no cultivo do fungo *A. nidulans* (MEL1)

4.3.1. Determinação do tempo de equilíbrio do processo bioadsorptivo

Primeiramente foram avaliadas as cinéticas de bioadsorção utilizando como bioadsorvente a biomassa melanizada obtida no cultivo otimizado do fungo *A. nidulans* (MEL1) para a determinação do tempo de equilíbrio do processo bioadsorptivo. Podemos observar na Figura 11 que o início do processo bioadsorptivo é rápido, gerando um pico de capacidade bioadsorptiva nos primeiros 15 minutos de tempo de contato. Aos 90 minutos as capacidades bioadsorptivas da biomassa melanizada estão constantes para os três metais, indicando a estabilidade do processo bioadsorptivo que pode também ser interpretada como o tempo necessário para a saturação dos sítios de ligação da biomassa disponíveis para os íons em solução. Com isso, foi escolhido o tempo de 90 minutos de contato do bioadsorvente com a solução monometálica para a avaliação da máxima capacidade bioadsorptiva que poderia ser obtida.

Figura 11. Cinéticas de bioissorção para Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , com concentração inicial igual a 800 mg. L^{-1} ($5,5 \text{ mmol. L}^{-1}$)

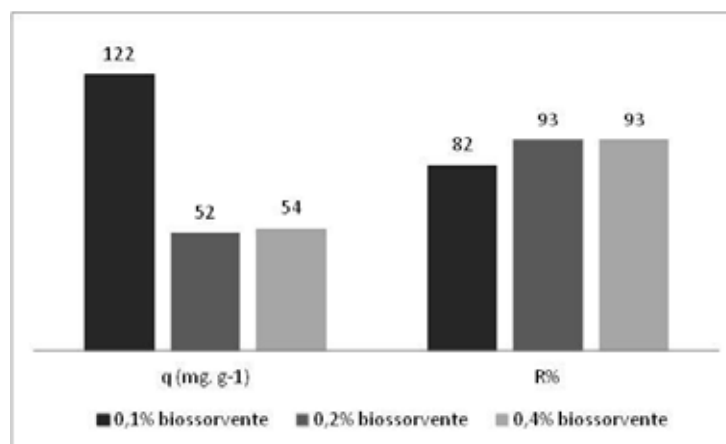


Fonte: próprio autor

4.3.2. Efeito da concentração do bioissorvente no processo bioissorativo

Definido o tempo de equilíbrio a ser considerado nos próximos ensaios, foram testadas diferentes concentrações de bioissorvente (biomassa melanizada livre). Na Figura 12 podemos verificar que na concentração de 0,1% (m/v), embora a biomassa melanizada não apresente o maior percentual de remoção, a sua capacidade bioissorativa nesta concentração foi muito superior às capacidades encontradas nas concentrações de 0,2% e 0,4% de bioissorvente.

Figura 12. Capacidades bioissorativas (q) e percentuais de remoção ($R\%$) obtidos após 90 minutos de contato do bioissorvente (biomassa melanizada) com a solução do metal neodímio na concentração de 800 mg.L^{-1}



Fonte: próprio autor

Pagnanelli *et al.* (2000), Tangaromsuk *et al.* (2002), Das (2010) e Xu *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho, demonstrando que o aumento da concentração do bioissorvente leva à diminuição da capacidade bioissorativa. Este fato foi atribuído ao possível “excesso” de sítios ligantes (gerado pelo aumento da concentração de bioissorvente) para relativamente baixa concentração dos íons de interesse presente em solução. Em função dos resultados obtidos, escolhemos a concentração de 0,1% (m/v) de bioissorvente para os próximos ensaios.

4.3.3. Efeito da melanização da biomassa obtida do cultivo do fungo *A. nidulans* (MEL1) na sua capacidade bioissorativa

Estabelecidas as condições de cultivo para a obtenção de pigmento e biomassa melanizada em grandes quantidades, o tempo de contato para os ensaios de bioissorção e a concentração de bioissorvente a ser utilizada, foram realizados os experimentos para a avaliação da capacidade bioissorativa da biomassa em diferentes graus de melanização e também do pigmento para os metais terras raras em estudo (neodímio, lantânio e cério).

Podemos observar na Tabela 8 os parâmetros calculados pelos modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens. O modelo de pseudo-primeira ordem não foi considerado adequado para a análise das cinéticas de bioissorção deste trabalho, pois apresenta baixos valores de correlação aos dados experimentais. Já o modelo de pseudo-segunda ordem apresentou ótima correlação ($R^2 > 0,9$) e indica que a biomassa altamente melanizada (obtida na condição otimizada) apresenta a maior capacidade bioissorativa no equilíbrio, seguida da biomassa parcialmente melanizada, biomassa não melanizada e pigmento.

Tabela 8. Parâmetros dos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens para as cinéticas de bioissorção usando diferentes bioissorventes (0,1%) e concentração inicial de Nd^{+3} igual a 800 mg. L^{-1}

Bioissorventes					
Modelo	Parâmetros	B.A.M.	B.P.M.	B.N.M.	PIG.
Pseudo-primeira ordem	q_{Eq} (mg. g^{-1})	149,5	63,8	34,3	4,4
	K_1 (min^{-1})	0,01	0,02	0,03	0,02
	R^2	0,77	0,92	0,57	0,3
Pseudo-segunda ordem	q_{Eq} (mg. g^{-1})	232,6	151,5	109,9	64,1
	K_2 ($\text{g. mg}^{-1}. \text{min}^{-1}$)	0,0002	0,0012	0,0018	0,001
	V_0 ($\text{mg. g}^{-1}. \text{min}^{-1}$)	11,5	28,1	21,5	25,3
	R^2	0,92	0,99	0,92	0,96

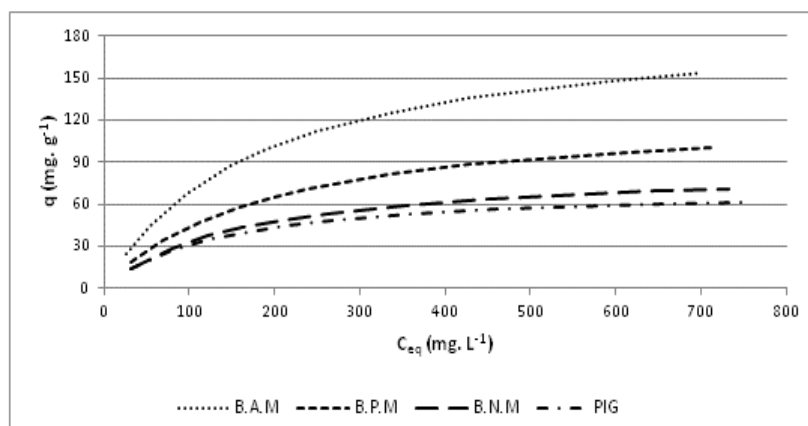
“B.A.M” (biomassa altamente melanizada); “B.P.M” (biomassa parcialmente melanizada); “B.N.M” (biomassa não melanizada); “PIG” (pigmento melanina); “ q_{Eq} ” (capacidade bioissorviva no equilíbrio); “ K_1 ” (constante do modelo cinético de pseudo-primeira ordem), “ K_2 ” (constante do modelo cinético de pseudo-segunda ordem), “ V_0 ” (velocidade inicial de adsorção), “ R^2 ” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

Para confirmarmos o efeito da melanização na capacidade bioissorviva e na afinidade dos bioissorventes pelo íon de neodímio, foram realizadas de isotermas de bioissorção.

A Figura 13 apresenta as curvas das isotermas de bioissorção para os diferentes bioissorventes avaliados, uma vez que esta representação permite a avaliação do desempenho de diferentes bioissorventes (em termos de “ q_{max} ”) com relação à variável independente do sistema (concentração final). Podemos identificar a superioridade da biomassa altamente melanizada para todas as concentrações testadas, pois é o bioissorvente que apresenta maior capacidade bioissorviva, ou seja, é capaz de adsorver mais terras-raras tanto em baixas como em altas concentrações. De fato, a melanização promove a melhoria no desempenho do bioissorvente, enquanto o pigmento puro é menos eficiente do que biomassa não melanizada.

Figura 13. Isotermas de biossorção de neodímio usando as biomassas com diferentes graus de melanização, obtidas de diferentes cultivos do fungo *A. nidulans* (MEL1)



Fonte: próprio autor

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados dos parâmetros calculados pelos modelos matemáticos de Langmuir (tipos I e II) e Freundlich, respectivamente. A análise de RMSE (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado) que determina os percentuais de erro entre os valores de “q” observados empiricamente e calculados pelos modelos matemáticos, indica que o modelo de Langmuir (tipo I) se ajusta melhor aos dados experimentais, pois apresenta os menores valores de RMSE que os calculados para o modelo de Langmuir (tipo II) e Freundlich.

Tabela 9. Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipos I e II), calculados para as isotermas de bioadsorção dos bioadsorventes com diferentes graus de melanização

Bioadsorvente	Langmuir							
	Tipo I				Tipo II			
	R ²	q _{max} (mg. g ⁻¹)	b (L. g ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	q _{max} (mg. g ⁻¹)	b (L. g ⁻¹)	RMSE (%)
B.A.M.	0,99	192	0,006	1,5	0,99	159	0,008	2,0
B.P.M.	0,99	128	0,005	1,3	0,99	118	0,006	1,8
B.N.M.	0,99	87	0,006	1,4	0,92	68	0,01	2,4
PIG.	0,99	73	0,007	1,6	0,86	57	0,015	2,6

“B.A.M” (biomassa altamente melanizada); “B.P.M” (biomassa parcialmente melanizada); “B.N.M” (biomassa não melanizada); “PIG” (pigmento melanina); “q_{max}” (máxima capacidade bioadsorvente), “b” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Langmuir), “RMSE” (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado), “R²” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

Tabela 10. Parâmetros do modelo de Freundlich, calculados para as isotermas de bioadsorção dos bioadsorventes com diferentes graus de melanização

Bioadsorvente	Freundlich			
	R ²	n	K _F (mg.L ^{1/n} .g ^{n/(n+1)})	RMSE (%)
B.A.M.	0,97	2,0	6,7	6,0
B.P.M.	0,97	1,9	3,9	5,4
B.N.M.	0,97	2,2	4,1	4,9
PIG.	0,97	2,6	5,0	5,6

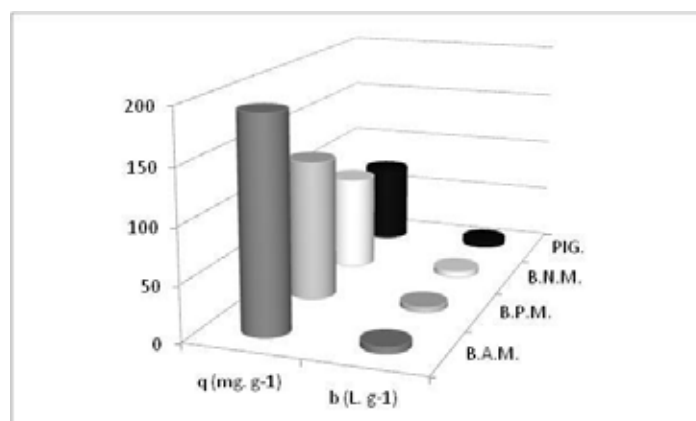
“B.A.M” (biomassa altamente melanizada); “B.P.M” (biomassa parcialmente melanizada); “B.N.M” (biomassa não melanizada); “PIG” (pigmento melanina); “n” (número de monocamadas adsorvidas no modelo de adsorção de Freundlich); “K_F” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Freundlich), “RMSE” (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado), “R²” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

Os resultados expostos na Tabela 9, calculados pelo modelo de Langmuir (tipo I) confirmaram a tendência observada nas cinéticas de bioadsorção, sendo o maior “q_{max}” observado para a biomassa altamente melanizada (192 mg. g⁻¹), seguida da biomassa parcialmente melanizada (128 mg. g⁻¹), da biomassa não melanizada (87 mg. g⁻¹) e do pigmento (73 mg. g⁻¹), após 90 minutos de bioadsorção.

A afinidade do bioissorvente pelo metal de interesse é representada no modelo de Langmuir pela constante “b”, relacionada com a energia de adsorção da equação de Arrhenius. Quanto maior o valor de “b” maior a afinidade do sorvente pelo sorbato (VOLESKY, 2004). Com os cálculos realizados pelo mesmo modelo (Tabela 9) podemos afirmar que, diferentemente do que ocorre com a capacidade bioissorviva, o grau de melanização não provoca alterações na afinidade (“b”), pois os valores encontrados são muito próximos e aproximadamente iguais a $0,01 \text{ L.g}^{-1}$ para todos os bioissorventes analisados (Figura 14).

Figura 14. O efeito da melanização na capacidade bioissorviva e afinidade dos bioissorventes pelo íon de neodímio



Fonte: próprio autor

Estes resultados indicam que a capacidade bioissorviva da biomassa do fungo *A. nidulans* (MEL1) está correlacionada com o grau de melanização, devido a sua pigmentação contribuir para o incremento desta capacidade. Isto pode ser explicado pela presença de grupos funcionais no pigmento que em associação com alguns grupos químicos da parede celular do fungo promovem maior disponibilidade de potenciais sítios ligantes. BUSZMAN *et al.* (2006) confirmaram a alta capacidade de ligação de íons de zinco e cobre por *C. cladosporoides* melanizado, através da análise por espectroscopia de EPR (Ressonância Paramagnética Eletrônica), relacionando esta capacidade bioissorviva com a distribuição homogênea de radicais livres na melanina presente no fungo.

Os resultados deste trabalho confirmam aqueles obtidos anteriormente em nosso laboratório, que mostraram que a bioissorção de metais terras raras (neodímio e lantânio) pela biomassa da linhagem MEL1 do fungo *A. nidulans* também variou em função do estágio de crescimento do fungo, sendo que a biomassa de 72 horas apresentou um aumento significativo na capacidade de bioissorção (em torno de 75%) comparado com a biomassa de 48 horas. A explicação para este resultado foi que a produção de pigmento melanina ocorre em função do tempo de cultivo, ou seja, a biomassa de 48 horas apresenta-se pouco pigmentada enquanto aquela de 72 horas torna-se escura em função da alta produção de pigmento (CAVALLIERI *et al.*, 2007; CAPORALIN *et al.*, 2011).

Quanto ao efeito da pigmentação na capacidade bioissorviva, outros estudos como o de Siegel *et al.* (1986) relataram que a biomassa melanizada do fungo *Cladosporium cladosporoides* bioissorveu de 2,5 a 4 vezes mais Ni, Cu, Zn, Cd, e Pb que o fungo não pigmentado *Penicillium digitatum*. Devido às possíveis diferenças existentes entre os dois gêneros de fungos, estes autores estudaram a cultura de *C. cladosporoides* em diferentes tempos de crescimento e verificaram que uma cultura jovem (crescida por dois dias) não está pigmentada e apresenta apenas 34% da taxa de adsorção de Cd observada para a biomassa melanizada, obtida após quatro dias de crescimento (SIEGEL *et al.*, 1990).

Os resultados dos experimentos com os bioissorventes livres (biomassa e pigmento) confirmaram o grande potencial da biomassa altamente melanizada do fungo *A. nidulans* (MEL1) para a bioissorção de terras-raras, em comparação com o pigmento tipo melanina.

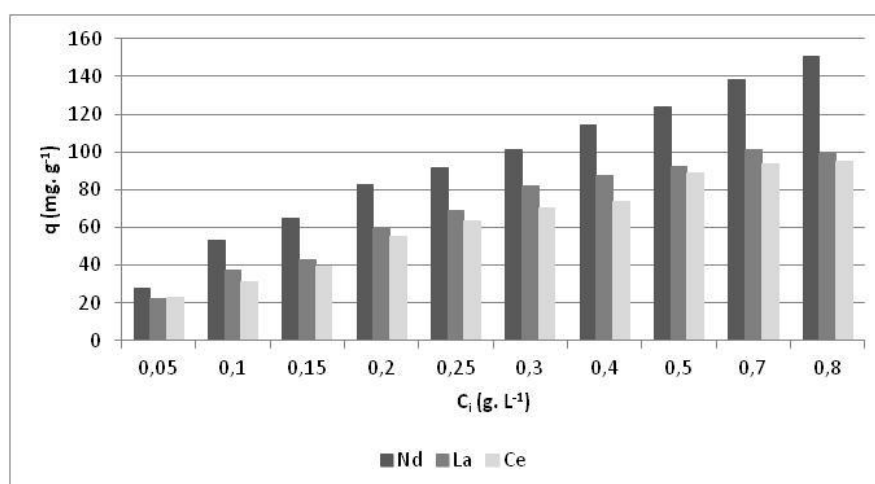
4.3.4. Efeito da concentração inicial de metal no processo bioissorvivo

A partir destes resultados, foi avaliado o efeito da concentração inicial de metal na bioissorção para estabelecer a concentração a ser utilizada nos ensaios seguintes. Este é um parâmetro importante para o estudo da bioissorção, pois a concentração inicial do íon metálico fornece uma importante força para superar a resistência da transferência de massa entre

as fases líquida e sólida do sistema no qual ocorre a biossorção, de forma que maiores concentrações podem proporcionar o aumento da capacidade biossortiva (QING, 2010; LALHRUAILUANGA *et al.*, 2010). No entanto, em concentrações excessivamente elevadas, pode haver a competição entre íons pelos sítios ligantes ou ainda a formação de aglomerados (precipitados), provocando a queda da capacidade biossortiva com o aumento da concentração (SERT *et al.*, 2008; KÜTAHYALI *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2011).

A Figura 15 apresenta os resultados obtidos das isotermas de biossorção realizadas para avaliar o efeito da concentração inicial de Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} no processo biossortivo.

Figura 15. Capacidades biossortivas da biomassa melanizada após 90 minutos de contato com diferentes concentrações de Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} em solução



Fonte: próprio autor

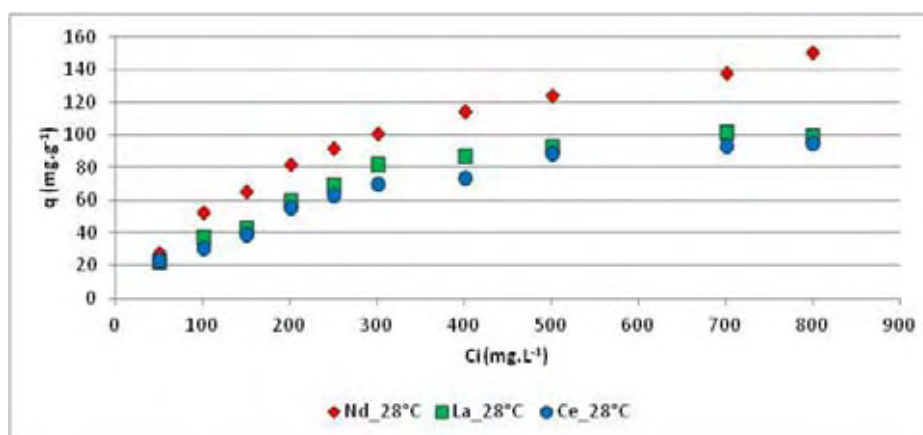
Podemos observar que o aumento das concentrações iniciais testadas provoca o aumento da capacidade biossortiva observada para todos os íons metálicos em estudo, sendo que na concentração de aproximadamente 800 mg.L^{-1} ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$) as capacidades biossortivas permanecem constantes, indicando ser esta a concentração iônica saturante. Kütahyalı *et al.* (2012), Xu *et al.* (2011), Qing (2010), Sert *et al.* (2008) e Texier *et al.* (2002) também observaram este fenômeno no estudo da biossorção de terras-raras.

4.3.5. Efeito da temperatura no processo biossortivo

Estabelecidas as condições iniciais para os ensaios de biossorção (concentração inicial de metal, tempo de equilíbrio e concentração de biossorvente), iniciamos a fase de avaliação do efeito dos parâmetros temperatura e pH no desempenho dos biossorventes estudados neste trabalho.

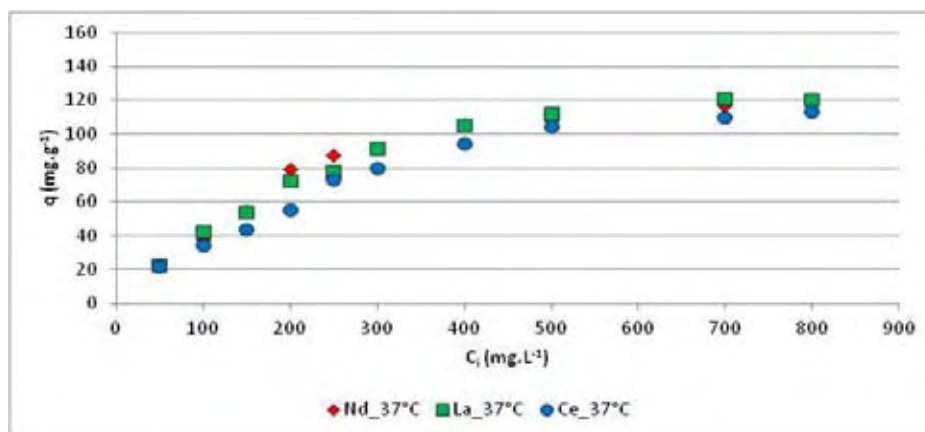
Nas Figuras 16 e 17 observamos as isotermas de biossorção realizadas nas temperaturas de 28°C e 37°C, respectivamente, representadas pelos pontos experimentais.

Figura 16. Pontos experimentais de capacidade biossortiva (q) nas isotermas de biossorção a 28°C para Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , usando como biossorvente a biomassa melanizada



Fonte: próprio autor

Figura 17. Pontos experimentais de capacidade biossorbitiva (q) nas isotermas de biossorção a 37°C para Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , usando como biossorvente a biomassa melanizada



Fonte: próprio autor

A partir dos dados experimentais destas isotermas, foram calculados os parâmetros dos modelos matemáticos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, sumarizados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir dos dados experimentais das isotermas de bioadsorção de Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , realizadas a 28°C e 37°C

28°C	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	B (L. mg ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg. L ^{1/n} . g ^{n/(n+1)})	n	RMSE (%)
Nd	0,99	192,0	0,006	5,0	0,97	6,7	2,0	6,0
La	0,99	120,5	0,008	3,0	0,95	5,6	2,1	6,0
Ce	0,99	119,0	0,006	2,0	0,96	4,5	2,1	2,0
37°C	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	b (L. mg ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg. L ^{1/n} . g ^{n/(n+1)})	n	RMSE (%)
Nd	0,99	144,9	0,007	4,0	0,9	5,0	1,9	10,0
La	0,99	149,3	0,007	2,0	0,95	5,6	2,0	7,0
Ce	0,99	147,1	0,005	3,0	0,97	4,3	1,9	6,0

“q_{max}” (máxima capacidade bioadsorção), “b” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Langmuir), “n” (número de monocamadas adsorvidas no modelo de adsorção de Freundlich); “K_F” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Freundlich), “RMSE” (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado), “R²” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

Primeiramente, podemos destacar que o modelo de Langmuir (tipo I) continua apresentando melhor ajuste aos dados experimentais e, portanto, deve descrever melhor o processo bioadsorção em estudo.

Observando os dados deste modelo, verificamos que a 28°C a biomassa melanizada livre apresenta maior afinidade (“b”) pelo íon La^{+3} , seguido de Nd^{+3} e Ce^{+3} . Por outro lado, com o aumento da temperatura do ensaio para 37°C as afinidades pelos íons Nd^{+3} e La^{+3} passam a ser iguais e maiores do que pelo íon Ce^{+3} . No entanto, mesmo com essa alteração de ordem, os valores de afinidade ainda são muito próximos para a variação da temperatura possa ser uma alternativa de controle das condições de ensaio para a separação destes íons, supondo uma solução monometálica.

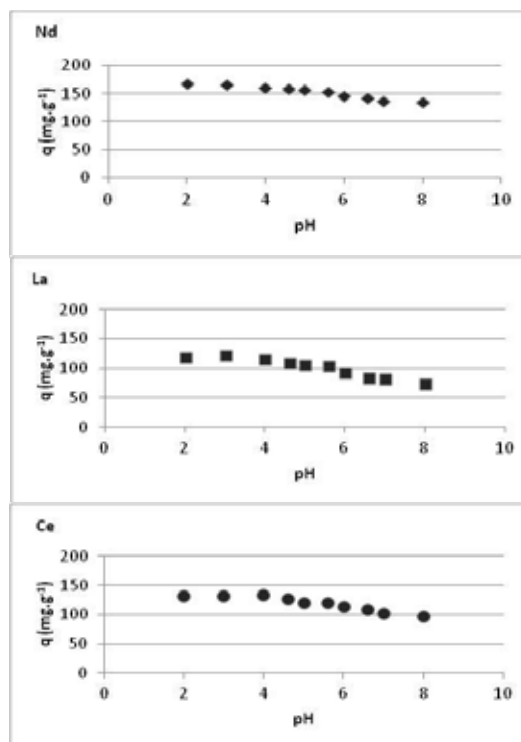
Quanto ao efeito da temperatura na capacidade bioadsorção da biomassa melanizada, podemos verificar que a 28°C o maior valor foi obtido para neodímio (192mg. g⁻¹); já para lantânio e cério, os valores são praticamente iguais (120,5mg. g⁻¹ e 119mg. g⁻¹). Apesar da capacidade bioadsorção

aumentar um pouco nos ensaios realizados a 37°C para estes dois metais, a temperatura de 28°C apresenta vantagens econômica e operacional de ser dispensado um aparato que mantenha em temperatura elevada uma coluna de leito fixo para futuros estudos dos mecanismos envolvidos na biossorção ou para a ampliação de escala de um projeto. Por isso, levando em conta os resultados obtidos neste trabalho, será mantida a temperatura de 28°C para os demais ensaios de biossorção.

4.3.6. Efeito do pH no processo biossortivo

A Figura 18 apresenta as curvas obtidas dos ensaios de biossorção utilizando biomassa melanizada, para os três metais em estudo. Como podemos observar, quanto mais ácido o pH inicial da solução monometálica, maior a capacidade biossortiva (“q”) observada, para a biomassa melanizada livre.

Figura 18. Perfil de biossorção para os metais Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , utilizando a biomassa melanizada livre como biossorvente, em diferentes pHs iniciais



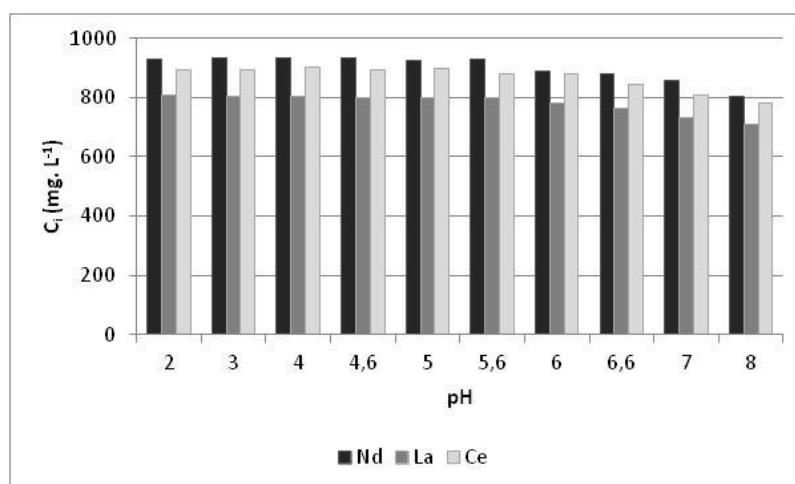
Fonte: próprio autor

Supondo que o processo de biossorção envolva mecanismos de troca iônica na ligação entre sorbato e biossorvente, os dados experimentais mostraram um comportamento esperado para faixa de pH estudada (de 2,0 a 8,0). Nas soluções com pH inicial mais ácido, os grupos ligantes da superfície do biossorvente são protonados e com isso, a troca iônica pelo cátion de terra-rara é facilitada. Conseqüentemente, com o aumento de pH inicial observamos perfis decrescentes das curvas de biossorção.

Esta queda dos valores de capacidade de biossorção acentua-se quando o pH passa da faixa de neutralidade em direção à basicidade. No estudo de terras-raras é importante considerar que em pH acima de 6,0, pode iniciar a formação de aglomerados ou complexos de terras-raras, que tendem a precipitação quanto mais básica a solução (VIJAYARAGAVAN *et al.*, 2010).

Para verificar este fenômeno e associá-lo aos resultados encontrados, mantivemos a amostragem dos frascos contendo as soluções monometálicas de terras-raras, imediatamente após o ajuste do pH inicial e antes da adição do biossorvente ao sistema. Assim, foi possível confirmar por meio deste monitoramento das concentrações iniciais experimentais que, de fato, as concentrações iniciais amostradas são inferiores às teóricas a partir do pH inicial igual a 6,6 (Figura 19).

Figura 19. Determinação das concentrações iniciais de terras-raras nas soluções monometálicas a serem utilizadas em ensaios de biossorção, após o ajuste do pH inicial



Fonte: próprio autor

Dando continuidade ao estudo, foram avaliadas as máximas capacidades bioassortivas da biomassa melanizada livre variando as concentrações iniciais de terras-raras e fixando o pH inicial em 2,0 por ter sido este o valor de pH para o qual a maior capacidade bioassortiva foi encontrada nos experimentos anteriores (Figura 18). A Tabela 12 mostra os resultados obtidos desta isoterma comparados com os resultados da isoterma de bioassorção feita da mesma maneira, porém com pH inicial ajustado em 5,6, valor pertencente à faixa de pH tida como ótima na literatura para a bioassorção de terras-raras (GADD, 1999; VOLESKY, 2003; VIJAYARAGAVAN *et al.*, 2010).

Tabela 12. Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir dos dados experimentais das isotermas de bioassorção para Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , realizadas em pH 2,0 e 5,6, utilizando como bioassorvente a biomassa melanizada livre

pH 2,0	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	b (L.g ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg.L ^{1/n} .g ^{n/(n+1)})	n	RMSE (%)
Nd	0,99	182,0	0,002	2,0	0,97	1,3	1,4	6,0
La	0,99	151,5	0,004	1,0	0,98	2,0	1,6	2,0
Ce	0,99	80,0	0,004	1,0	0,98	0,1	1,7	2,0
pH 5,6	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	b (L.g ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg.L ^{1/n} .g ^{n/(n+1)})	n	RMSE (%)
Nd	0,99	192,0	0,006	5,0	0,97	6,7	2,0	6,0
La	0,99	120,5	0,008	3,0	0,95	5,6	2,1	6,0
Ce	0,99	119,0	0,006	2,0	0,96	4,5	2,1	2,0

“q_{max}” (máxima capacidade bioassortiva), “b” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Langmuir), “n” (número de monocamadas adsorvidas no modelo de adsorção de Freundlich); “K_F” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Freundlich), “RMSE” (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado), “R²” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

Verificamos nos resultados que, novamente, o modelo de Langmuir (tipo I) apresentou melhor ajuste aos dados experimentais. A acidificação do pH inicial não gerou aumento de “q_{max}” para Nd^{+3} e Ce^{+3} . Enquanto que para La^{+3} proporcionou um acréscimo de 25,7% na máxima capacidade bioassortiva. Quanto à afinidade (“b”), observamos que em pH 2,0 ocorre a queda dos

valores de afinidade para todos os metais em estudo, provavelmente devido as alterações químicas na estrutura do bioissorvente.

Portanto, tendo em vista as maiores capacidades bioissortivas da biomassa melanizada para Nd^{+3} e La^{+3} , além da maior afinidade deste bioissorvente pelos três metais em estudo, o pH 5,6 foi selecionado como ótimo para os ensaios bioissortivos subsequentes.

4.4. Ensaios de bioissorção com bioissorventes imobilizados

Durante o processo de obtenção dos bioissorventes imobilizados, a matriz de PVA não apresentou resistência suficiente para formar *pellets* no contato com a solução 5% CaCl_2 , por isso, esta matriz foi descartada do conjunto testado, permanecendo a matriz de alginato de cálcio e a matriz mista de PVA e alginato de sódio (PVA-SA) .

O uso de alginato de cálcio como matriz de imobilização é especialmente sensível à variação de pH, já que para a desestabilização de sua estrutura basta que a solução seja mais ácida (abaixo do valor de pK_a aproximadamente igual a 3,5), por isso, não foram realizados ensaios de isotermas de bioissorção em pH igual a 2,0. O pH da solução metálica igual a 5,5, no processo de bioissorção não interfere na resistência dos *pellets* (como observamos no laboratório durante os procedimentos de encapsulamento da biomassa nas matrizes de imobilização).

Os parâmetros obtidos a partir das isotermas de bioissorção, realizadas nas temperaturas de 28°C e 37°C, para biomassa imobilizada em alginato de cálcio e biomassa imobilizada em PVA-SA estão resumidos nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir das isotermas de bioadsorção de Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , realizadas nas temperaturas de 28°C e 37°C, utilizando como bioadsorvente a biomassa imobilizada em alginato de cálcio

28°C	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	b (L.g ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg.L ^{1/n} .g ^{n/(n+1)})	N	RMSE (%)
Nd	0,98	196,0	0,003	3,0	0,98	2,9	1,6	5,0
La	0,99	169,5	0,004	2,0	0,96	3,0	1,7	6,0
Ce	0,99	163,9	0,004	2,0	0,95	2,9	1,7	5,0
37°C	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	b (L.g ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg.L ^{1/n} .g ^{n/(n+1)})	N	RMSE (%)
Nd	0,99	145,0	0,004	3,0	0,97	2,8	1,7	4,0
La	0,99	123,5	0,006	2,0	0,89	3,2	1,8	8,0
Ce	0,99	74,6	0,009	2,0	0,83	4,5	2,3	5,0

“q_{max}” (máxima capacidade bioadsorptiva), “b” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Langmuir), “n” (número de monocamadas adsorvidas no modelo de adsorção de Freundlich); “K_F” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Freundlich), “RMSE” (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado), “R²” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

Tabela 14. Parâmetros dos modelos de Langmuir (tipo I) e Freundlich, calculados a partir das isotermas de bioadsorção de Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3} , realizadas nas temperaturas de 28°C e 37°C, utilizando como bioadsorvente a biomassa imobilizada em PVA-SA.

28°C	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	B (L. mg ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg. L ^{1/n} . g ^{n/(n+1)})	N	RMSE (%)
Nd	0,98	74,0	0,003	1,0	0,93	2,8	2,1	3,0
La	0,99	74,6	0,006	5,0	0,93	2,5	2,0	7,0
Ce	0,99	73,5	0,006	1,0	0,90	2,1	1,9	4,0
37°C	Langmuir (tipo I)				Freundlich			
	R ²	q _{max} (mg.g ⁻¹)	b (L. mg ⁻¹)	RMSE (%)	R ²	K _F (mg. L ^{1/n} . g ^{n/(n+1)})	N	RMSE (%)
Nd	0,99	71,0	0,005	1,0	0,95	2,4	2,0	3,0
La	0,99	70,9	0,006	5,0	0,95	2,4	2,0	3,0
Ce	0,99	69,9	0,005	1,0	0,93	1,8	1,9	2,0

“q_{max}” (máxima capacidade bioadsorptiva), “b” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Langmuir), “n” (número de monocamadas adsorvidas no modelo de adsorção de Freundlich); “K_F” (constante de afinidade no modelo de adsorção de Freundlich), “RMSE” (raiz quadrada dos erros médios ao quadrado), “R²” (coeficiente de correlação).

Fonte: próprio autor

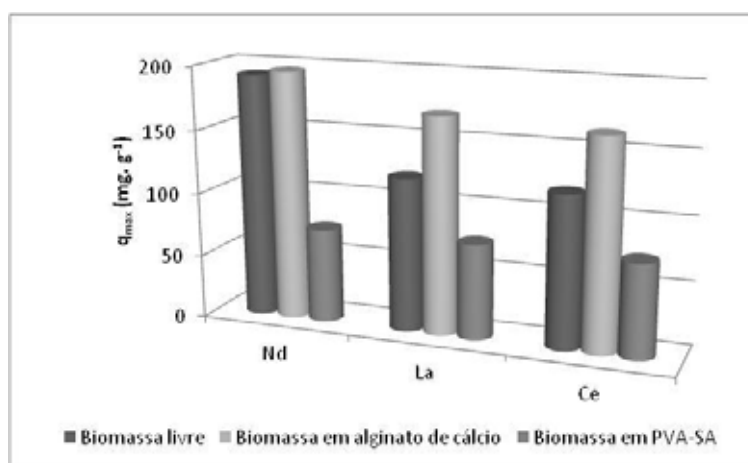
Como podemos observar, novamente o modelo de Langmuir (tipo I) apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais. Diferentemente do que foi observado com a biomassa melanizada livre, verificamos uma queda nos valores de “q_{max}” para a biomassa imobilizada com o aumento da temperatura dos experimentos, e pouca variação nos valores de afinidade.

Comparando os bioadsorventes livres e imobilizados entre si (Figura 20), podemos verificar que, a 28°C, a máxima capacidade bioadsorptiva da biomassa imobilizada em alginato de cálcio foi superior em relação à biomassa livre e também àquela imobilizada em PVA-SA para todos os metais estudados: para Nd^{+3} , 2% maior do que a biomassa livre e 165% maior do que a imobilizada em PVA-SA; para La^{+3} , 41% maior do que a biomassa livre e 127% maior do que a imobilizada em PVA-SA e, para Ce^{+3} , 37% maior do que a biomassa livre e 123% maior do que a imobilizada em PVA-SA. Wang & Hu (2007) compararam diferentes suportes de imobilização do fungo *Aspergillus fumigatus* e também verificaram o melhor desempenho

da biomassa imobilizada em alginato de cálcio em relação aos resultados obtidos para a biomassa imobilizada em PVA-SA.

O uso de biossorventes imobilizados é de extrema importância para o desenvolvimento e aplicação do processo biossortivo em grandes escalas, pois confere tamanho apropriado, resistência mecânica, além de proporcionar a recuperação do metal a partir da reutilização do material biossorvente. Caporalin (2011) havia verificado que a biomassa do fungo *A. nidulans* (MEL1) imobilizada em alginato de cálcio atingia 60% e 33% de redução da capacidade biossortiva observada para a biomassa na forma livre, para lantânio e neodímio, respectivamente, enquanto que para cério, o valor de capacidade biossortiva das biomassas nas formas livre e imobilizada, foram semelhantes. Os resultados de capacidade biossortiva da biomassa melanizada do fungo *A. nidulans* (MEL1) imobilizada em alginato de cálcio apresentados neste trabalho merecem grande destaque porque através da otimização do cultivo do fungo (com consequente aumento da pigmentação da biomassa) e à modificação do protocolo de imobilização, conseguimos obter melhores resultados.

Figura 20. Máximas capacidades biossortivas (q_{max}) para os biossorventes: biomassa melanizada imobilizada em alginato de cálcio e biomassa melanizada imobilizada em PVA-SA, em relação aos metais Nd^{+3} , La^{+3} e Ce^{+3}



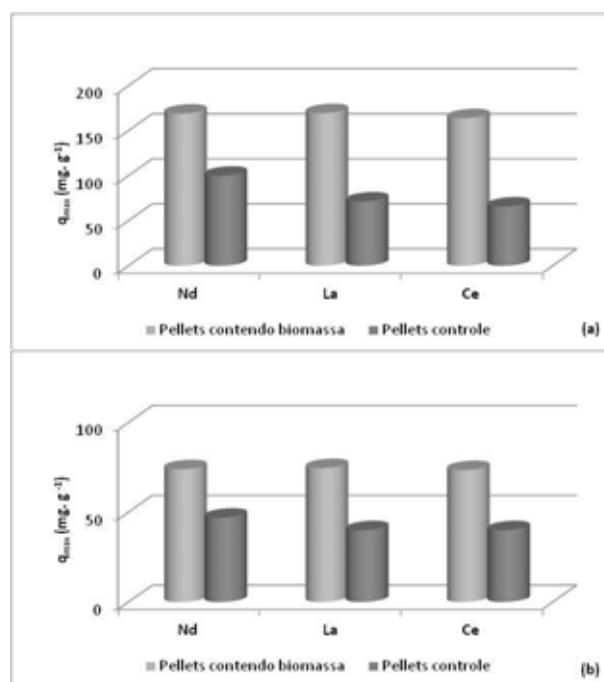
Fonte: próprio autor

As diferenças na capacidade biossortiva entre as biomassas imobilizadas em diferentes matrizes podem estar associadas às características físicas e/ou químicas, como por exemplo, o tamanho dos poros formados e

consequentemente a maior ou menor taxa de difusão ou, a presença de determinados grupos funcionais em um suportes que, somados aos ligantes presentes na superfície do bioissorvente, possam disponibilizar mais sítios de ligação para os íons metálicos. Isto revela a importância da escolha do suporte para a imobilização de um bioissorvente.

Devido ao fato dos resultados de desempenho (em termos de “ q_{\max} ”) terem sido tão distintos dentro das mesmas condições de temperatura, pH, concentração inicial de metal e dosagem do bioissorvente, avaliamos as capacidades bioisortivas das matrizes “puras” em experimentos independentes dos anteriores. Para isso, foram realizadas isotermas de bioissorção utilizando como bioissorventes os “*pellets* controle” das matrizes sem a adição de biomassa; estes resultados estão representados na Figura 21.

Figura 21. Máximas capacidades bioisortivas (q_{\max}) dos “*pellets* controle” (matrizes puras) em comparação aos *pellets* contendo biomassa, para os suportes alginato de cálcio (a) e PVA-SA (b)



Fonte: próprio autor

Verificamos que para Nd^{+3} , o alginato de cálcio apresenta 59% do “ q_{\max} ” da biomassa imobilizada nesta matriz, para La^{+3} , 42% e para Ce^{+3} 40%. Já o PVA-SA apresentou 63% do “ q_{\max} ” da biomassa imobilizada neste suporte

para Nd^{+3} e 54% para La^{+3} e Ce^{+3} .

Assim, podemos afirmar que dentre os bioissorventes estudados neste trabalho, a biomassa melanizada do fungo *A. nidulans* (MEL1) imobilizada em alginato de cálcio apresenta grande potencial para utilização como bioissorvente de terras-raras devido a sua superior capacidade bioisortiva e às importantes vantagens operacionais que a imobilização de um bioissorvente confere ao processo de concentração e posterior recuperação dos metais de interesse.

4.5. Dessorção

Como já foi mencionado anteriormente, além do interesse na concentração de terras-raras, existe a preocupação em desenvolver metodologias de recuperação dos metais após o processo bioisortivo.

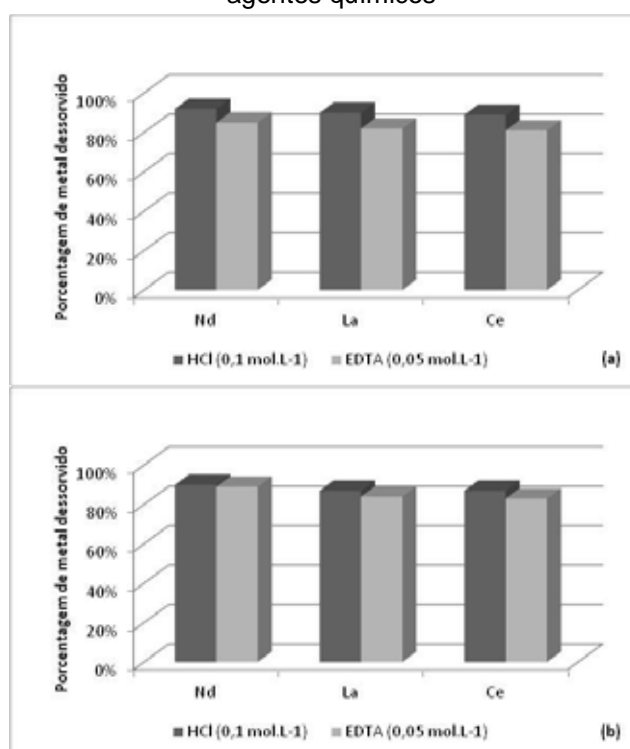
Como observado na Figura 22, os percentuais de dessorção foram maiores com HCl (de 87% a 92% de recuperação dos metais bioisorvidos) do que com EDTA (de 81% a 89% de recuperação dos metais bioisorvidos).

Quando foi usado o agente dessorvente HCl ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) conseguimos recuperar 92% do Nd^{+3} , 90% do La^{+3} e 89% do Ce^{+3} adsorvido aos *pellets* de alginato de cálcio contendo biomassa melanizada. Enquanto que, para os *pellets* de biomassa imobilizada em PVA-SA, 90% do Nd^{+3} , 87% do La^{+3} e 87% do Ce^{+3} . Quando foi utilizado o EDTA ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$) como agente dessorvente, as porcentagens de recuperação não foram tão elevadas, resultando em 85% para Nd^{+3} , 82% para La^{+3} e 81% para Ce^{+3} , quando utilizada a biomassa imobilizada em alginato de cálcio. Já a biomassa imobilizada em PVA-SA teve 89% de taxa de remoção para Nd^{+3} , 84% para La^{+3} e 83% para Ce^{+3} .

Utilizando tanto o HCl ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) como o EDTA ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$), os maiores percentuais de dessorção foram identificados para Nd^{+3} , seguido de La^{+3} e Ce^{+3} ; para ambos os bioissorventes analisados (biomassa imobilizada em alginato de cálcio e biomassa imobilizada em PVA-SA). D'avoglio (2007) utilizou HCl ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) como agente dessorvente para recuperar lantânio e neodímio adsorvidos em biomassas de diversos fungos filamentosos e pôde concluir a partir dos seus resultados que quanto maior a afinidade do

biossorvente pelo metal, menor a porcentagem de recuperação. Nossos resultados corroboram esta observação pois, apesar das diferenças entre os valores de afinidades (b) não serem tão distantes de um metal para outro, este parâmetro apresentou valores inferiores para Nd^{+3} , tanto para a biomassa imobilizada em alginato de cálcio, como para a imobilizada em PVA-SA. Além disso, podemos observar que para La^{+3} e Ce^{+3} as afinidades (b) foram iguais para ambos os biossorventes imobilizados, o que se reflete nos resultados dos ensaios de dessorção como porcentagens de recuperação praticamente iguais.

Figura 22. Porcentagens de recuperação dos metais dessorvidos dos biossorventes: biomassa imobilizada em alginato de cálcio (a) e biomassa imobilizada em PVA-SA (b), após o processo biossorbitivo a partir de soluções monometálicas e utilizando diferentes agentes químicos



Fonte: próprio autor

Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com a literatura. Diniz & Volesky (2006) avaliaram diversos agentes para a dessorção de lantânio, európio e itérbio, entre os quais o HCl (nas concentrações de 0,3 mol. L⁻¹, 0,2 mol. L⁻¹ e 0,1 mol. L⁻¹) e o EDTA (0,05 mol. L⁻¹) e observaram que o HCl (0,1 mol. L⁻¹) apresentou taxas de recuperação dos metais de 80% a 90%

após 24 horas de contato do bioissorvente com o agente dessorvente; já para o EDTA foram observadas porcentagens de recuperação dos metais de 85% a 90%. Texier *et al.* (2002) verificaram que 92% a 100% do lantânio adsorvido na biomassa de *Pseudomonas aeruginosa* poderia ser recuperado com a utilização do EDTA (0,1 mol. L⁻¹) como dessorvente.

5. CONCLUSÕES

A avaliação dos resultados deste trabalho nos permitem concluir que:

- As condições ótimas de cultivo do fungo *A. nidulans* (MEL1) que proporcionam a maior melanização são: cultivo constituído de duas etapas, sendo a pré-cultura suplementada com 1% de AMM e incubada por 48 horas, a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm, seguida de cultura suplementada com 0,2% de AMM, incubada por 3 dias, a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm;
- O grau de pigmentação (ou melanização) da biomassa mostrou ter um efeito positivo na capacidade bioabsorvente da biomassa, porém não apresentou efeito na afinidade da interação metal-bioabsorvente;
- O CPB foi o surfactante que proporcionou a formação de um complexo com o maior coeficiente de absorção, no comprimento de onda de 610nm;
- Com a padronização do método espectrofotométrico para a quantificação de TRs obtivemos valores menores dos limites de detecção (0,08ppm para Nd^{+3} , 0,11ppm para La^{+3} e 0,10ppm para Ce^{+3}) melhorando a sensibilidade do método;
- As condições ótimas para os ensaios de bioabsorção das terras-raras estudadas (Nd, La e Ce) são: tempo de contato (ou tempo de equilíbrio) de 90 minutos; concentração inicial de metal (ou concentração saturante) de $5,5\text{mol.L}^{-1}$; dosagem de bioabsorvente de 0,1%; temperatura de 28°C e pH inicial da solução monometálica igual a 5,6;
- Quanto aos bioabsorventes livres, verificamos que a biomassa melanizada apresenta uma capacidade bioabsorvente 50% maior do que a biomassa parcialmente melanizada, 120% maior do que a da biomassa não melanizada e 163% maior do que a do pigmento tipo melanina produzido pelo fungo;
- Quanto aos bioabsorventes imobilizados, verificamos que a biomassa melanizada imobilizada em alginato de cálcio apresenta uma capacidade bioabsorvente 2% maior do que da biomassa melanizada imobilizada em PVA-SA, para Nd^{+3} ; 41% maior para La^{+3} e 37% maior para Ce^{+3} .

- Dentre os biossorventes estudados neste trabalho, a biomassa melanizada imobilizada em alginato de cálcio apresentou os maiores valores de capacidade biossortiva, sendo 196 mg. g⁻¹ para Nd⁺³, 169,5 mg. g⁻¹ para La⁺³ e 163,9 mg. g⁻¹ para Ce⁺³;
- Ambos os agentes dessorventes analisados (HCl e EDTA) são capazes de recuperar os metais em porcentagens muito semelhantes para um mesmo biossorvente; porém os percentuais de dessorção foram maiores com o HCl (de 87% a 92% de recuperação dos metais biossorvidos).

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, A. **Química e tecnologia das terras-raras: tecnologia mineral**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral, 1994. p. 1-166.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 997-1026, 2005.
- ALDOR, I. et al. Desorption of cadmium from algal biosorbent. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 73, p. 516-522, 1995.
- ANDRÈS, Y.; GÉRENTE, C. Removal of rare earth elements and precious metal species by biosorption. In: KOTRBA, P. et al. **Microbial biosorption of metals**. New York: Springer, 2011. p. 179-196.
- ANDRÈS, Y.; TEXIER, A. C.; LE CLOIREC, P. Rare earth elements removal by microbial biosorption: a review. **Environmental Technology**, v. 24, p. 1367-1375, 2003.
- ARICA, M. et al. Biosorption of Hg^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia troglia*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 109, n. 1-3, p. 191-199, 2004.
- BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicação de exopolissacarídeos fúngicos. **Seminário Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BAYRAMOGLU, G.; BEKTAS, S.; ARICA, M. Y. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 101, n. 3, p. 285-300, 2003.
- BUSZMAN, E. et al. EPR examination of Zn^{2+} and Cu^{2+} binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporoides*. **Science of the Total Environment**, v. 363, p. 195-205, 2006.
- CAPORALIN, C. B. **Comparação da biossorção de metais terras-raras pela biomassa melanizada do fungo *Aspergillus nidulans* nas formas livre e imobilizada**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- CASTOR, S. B. Rare earth deposits of North America. **Resource Geology**, v. 58, n. 4, p. 337-347, 2008.
- CAVALLIERI, A. P.; GARCIA JUNIOR, O.; SPONCHIADO, S. R. P. Biossorção de lantânio e neodímio pela biomassa de *Aspergillus nidulans*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 19., 2007, Botucatu. **Anais...** São Paulo: UNESP, 2007.

CHEN, Q. Study on the adsorption of lanthanum(III) from aqueous solution by bamboo charcoal. **Journal of Rare Earths**, v. 28, p. 125-131, 2010. Special Issue.

CHEN, Z. et al. Global rare earth resources and scenarios of future rare earth industry. **Journal of Rare Earths**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2011.

CÓRDOVA, F. J. C. et al. Response surface methodology for lead biosorption on *Aspergillus terreus*. **Journal of Environmental and Science Technology**, v. 8, n. 4, p. 695-704, 2011.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 113, p. 51-56, 1996.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 1, p. 38-70, 2005.

D'AVOGLIO, J. B. C. **Comparação dos parâmetros de biossorção dos elementos terras-raras lantânio e neodímio utilizando biomassas de fungos filamentosos**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

DAS, N. Recovery of precious metals through biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 103, p. 180-189, 2010.

DAVIS, T.; VOLESKY, B. *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4270-4278, 2000.

DINIZ, V.; VOLESKY, B. Biosorption of La, Eu and Yb using *Sargassum* biomass. **Water Research**, v. 39, p. 239-247, 2005.

DINIZ, V.; VOLESKY, B. Desorption of lanthanum, europium and ytterbium from *Sargassum*. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p. 71-76, 2006.

DRAGET, K. I. et al. **Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production and patents**. Wienheim: Wiley, 2005. p. 1-29.

ELISEEVA, S. V.; BUNZLI, J. C. G. Rare earths: jewels for functional materials of the future. **New Journal of Chemistry**, v. 35, p. 1165-1176, 2011.

ESPOSITO, A. et al. pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 307-313, 2002.

FALCONNET, P. The rare earth industry: a world of rapid change. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 192, p. 114-117, 1993.

FIFAREK, B. J. et al. Offshoring technology innovation: a case study of rare-earth technology. **Journal of Operations Management**, v. 26, p. 222-238, 2008.

FIOL, N. et al. Sorption of Pb(II), Ni(II), Cu(II) and Cd(II) from aqueous solution by olive stone waste. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p.132-140, 2006.

FOGARTY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanin and their interactions with metals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 311-317, 1996.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Metal sorption by biomass of melanin-producing fungi grown in clay-containing medium. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 23-34, 2002.

FREITAS, O. et al. Optimization of Cu(II) biosorption onto *Ascophyllum nodosum* by factorial design methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1/3, p. 449-454, 2009.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2008.

GARCIA, M. E.; SANZ-MEDEL, A. Dye-surfactant interactions: a review. **Talanta**, v. 33, n. 3, p. 255-264, 1986

GARCIA-REYES, R. B. et al. Chromium (III) uptake by agrowaste biosorbents: Chemical characterization, sorption-desorption studies, and mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2/3, p. 845-854, 2009.

GIRI, A. K. et al. Artificial neural network (ANN) approach for modelling of arsenic (III) biosorption from aqueous solution by living cells of *Bacillus cereus* biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 178, p. 15-25, 2011.

GODLEWSKA-ZYLKIEWICZ, B. Microorganisms in inorganic chemical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 1, p. 114-123, 2006.

GONÇALVES, R. C. R. **Caracterização e purificação do pigmento tipo-melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans***. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

- HAMANO, P. S.; KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.
- HEDRICK, J. B. Rare earths. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 79, n. 8, p. 74-77, 2000.
- HOLAN, Z. R. et al. Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 819-825, 1993.
- KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption: an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.
- KHOO, K. M.; TING, Y. P. Biosorption of gold by immobilized fungal biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 51-59, 2001.
- KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Multicomponent biosorption in fixed beds. **Water Research**, v. 34, p. 3186-3196, 2000.
- KURODA, K. et al. Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 53-60, 2010.
- KÜTAHYALI, C. et al. Factors affecting lanthanum and cerium biosorption on *Pinus brutia* leaf powder. **Separation Science and Technology**, v. 45, p. 1456-1462, 2010.
- KÜTAHYALI, C. et al. Biosorption of Ce(III) onto modified *Pinus brutia* leaf powder using central composite design. **Wood and Science Technology**, v. 46, p. 721-736, 2012.
- LALHRUAITLUANGA, H. et al. Lead(II) adsorption from aqueous solutions by raw and activated charcoals of *Melocanna baccifera* Roxburgh (bamboo) - A comparative study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 311-318, 2010.
- LISBOA, H. C. F. **Estudo das condições de cultivo na produção de pigmento melanina por linhagens (mutantes) do fungo *Aspergillus nidulans***. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- LÜ, L. et al. Equilibrium and kinetic modeling of pb(ii) biosorption by a chemically modified orange peel containing cyanex 272. **Journal of Chemical Engineering**, v. 55, p. 4147-4153, 2010.
- MA, P. et al. Effect of competitive interference on biosorption of cadmium by immobilized *Lentinus edodes* residue. **Desalination and Water Treatment**, v. 12, p. 292-298, 2009.

MACK, C. et al. Biosorption of precious metals. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 264-271, 2007.

MARINS, F. A. **Luminescência dos lantanídeos trivalentes**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2011. 21 f. (Relatório de Química Inorgânica).

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras-raras: aplicações industriais e biológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 111-117, 2005.

MATA, Y. N. et al. Biosorption of cadmium, lead and copper with calcium alginate xerogels and immobilized *Fucus vesiculosus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 555-562, 2009.

MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A. Biosorption of metals using nonliving biomass: a review. **Mineral and Metallurgical Processing**, v. 12, n. 4, p. 189-196, 1995.

NIKISCHER, T. **Mineral monazita**. Disponível em: <<http://www.mineralnews.com/>>. Acesso em: 21 jul. 2012.

OLIVEIRA, R. C. et al. Biosorption of metals: state of the art, general features, and potential applications for environmental and technological processes. In: SHAUKAT, S. S. **Progress in biomass and bioenergy production**. Rijeka: InTech, 2011a. p. 152-176.

OLIVEIRA, R. C. et al. Samarium(III) and praseodymium(III) biosorption on *Sargassum* sp.: Batch study. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 736-744, 2011b.

PAGNANELLI, F. et al. Biosorption of metal ions on *Arthrobacter* sp.: biomass characterization and biosorption modeling. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 2773-2778, 2000.

PALMIERI, M. C. et al. Neodymium biosorption from acidic solutions in batch system. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 441-444, 2000.

PALMIERI, M. C. et al. Biosorption of lanthanum using *Sargassum fluitans* in batch system. **Hidrometallurgy**, v. 67, p. 31-36, 2002.

PARK, D. et al. The past, presente and future trends in biosorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 110-118, 2010.

POMBEIRO, S.R.C. **Controle da expressão gênica do transporte e metabolismo de fontes de nitrogênio em *Aspergillus nidulans*: influência da concentração de nitrito, do pH e da presença de citrato**. 1991. 130 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

PRETTI, T. S. **Otimização das condições de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais.** 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

QING, C. Study on the adsorption of lanthanum(III) from aqueous solution by bamboo charcoal. **Journal of Rare Earths**, v. 28, p. 125-131, 2010. Special Issue.

RAMOS, C. M. et al. ¹³C NMR and molecular modeling studies of alginic acid binding with alkaline earth and lanthanide metal ions. **Inorganica Chimica Acta**, v. 256, n.1, p. 69-75, 1997.

SALARIRAD, M. M.; BEHNAMFARD, A. Modeling of equilibrium data for free cyanide adsorption onto activated carbon by linear and non-linear regression methods. **International Conference on Environment and Industrial Innovation**, v. 12, p. 79-84, 2011.

SARAVANAN, N. et al. Biosorption of nickel on biobeads and biofilm using immobilized *Escherichia coli*. **European Journal of Scientific Research**, v. 81, n. 2, p. 231-245, 2012.

SAVA, V. M. et al. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity. **Food Research International**, v. 34, p. 337-343, 2001.

SERT, S. et al. Biosorption of lanthanum and cerium from aqueous solutions by *Platanus orientalis* leaf powder. **Hidrometallurgy**, v. 90, p. 13-18, 2008.

SHENG, P. X. et al. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 131-141, 2004.

SIEGEL, S. M. et al. Fungal biosorption: a comparative study of metals uptake by *Penicillium* and *Cladosporium*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF METAL SPECIATION, SEPARATION AND RECOVERY, 3rd, 1986, Chicago. **Proceedings...**[S.l.; s.n.], 1986. p. 77-94.

SIEGEL, S. M. et al. Filamentous fungi as metal biosorbents: a review. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 53, p. 335-344, 1990.

SINHA, J. et al. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 392-399, 2001.

SVOBODA, V.; CROMY, V. Reactions of metallochromic indicators on micelles-III Spectrophotometric determination of minute amounts of lanthanum with xylenol orange. **Talanta**, v. 13, n. 2, p. 237-244, 1966.

TANGAROMSUK, J. et al. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. **Bioresource Technology**, v. 85, p.103-105, 2002.

TEXIER, A. C. et al. Fixed-bed study for lanthanide (La, Eu, Yb) ions removal from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa*: experimental data and modelization. **Chemosphere**, v. 47, p. 333-342, 2002.

TSEKOVA, K. et al. Biosorption of copper(II) and cadmium(II) from aqueous solutions by free and immobilized biomass of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1727-1731, 2010.

TSURUTA, T. Accumulation of REE elements in various microorganisms. **Journal of Rare Earths**, v. 25, p. 526-532, 2007.

VIJAYARAGHAVAN, K. et al. Biosorption of lanthanum, cerium, europium, and ytterbium by a brown marine alga, *Turbinaria conoides*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 4405-4411, 2010.

VITA-MARQUES, A. M. **Isolamento, atividade biológica e análise do perfil químico de fungos coletados no litoral do estado de São Paulo**. 2003. 192 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 203-216, 2001.

VOLESKY, B. Biosorption process simulation tools. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 179-190, 2003.

VOLESKY, B. Equilibrium (bio-)sorption. In: VOLESKY, B. **Sorption and biosorption**. Montreal: B-V Sorbex, 2004. p. 103-116.

VOLESKY, B.; NAJA, G. Biosorption: application strategies. In: INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY SYMPOSIUM, 16th, 2005, Cape Town. **Proceedings...** Cape Town: Compress Company, 2005. p. 531-542.

WANG, B.; HU, Y. Comparison of four supports for adsorption of reactive dyes by immobilized *Aspergillus fumigatus* beads. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 451-457, 2007.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 195-226, 2009.

WANG, J. S. et al. Biosorption of uranium (VI) by *Aspergillus fumigatus* beads. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 101, p. 504-508, 2010.

WEI-CHEN, K. et al. Cadmium biosorption by polyvinyl alcohol immobilized recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 651-658, 2009.

WYLLIE, P. J.; DENG, J. Rare earth elements in carbonate-rich melts from mantle to crust. In: JONES, A. P.; WALL, F.; WILLIAMS, C. T. **Rare earth minerals: chemistry, origin and ore deposits**. London: Chapman and Hall, 1996. p. 77-103.

XU, S. et al. Biosorption of La^{3+} and Ce^{3+} by *Agrobacterium* sp. HN1. **Journal of Rare Earths**, v. 29, n. 3, p. 265-270, 2011.

ZAIN, N. A. M. et al. Development and modification of PVA–alginate as a suitable immobilization matrix. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2122-2129, 2011.

ZHENG, Z.; XIONG, C. Adsorption behavior of ytterbium (III) on gel-type weak acid resin. **Journal of Rare Earths**, v. 29, n. 5, p. 407-412, 2011.

ZOUBOULIS, A. I.; LOUKIDOU, M. X.; MATIS, K. A. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacterial strain isolated from metal-polluted soils. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 909-916, 2004.

ANEXO 1

1) A solução de sais (100x concentrada) foi preparada segundo Cove (1966) e apresenta a seguinte composição:

- Solução de sais:

14g de fosfato de potássio monobásico (KHPO_4)

6,86g de fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4)

1g de cloreto de potássio (KCl)

1g de sulfato de magnésio

Dissolver cada sal separadamente e completar para 100ml de água destilada e esterilizada.

A solução de elementos traços também foi descrita por Cove (1966), sendo constituída por:

40mg de borato de sódio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)

400mg de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

532mg de sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

292mg de sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

800mg de molibdato de sódio bihidratado ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)

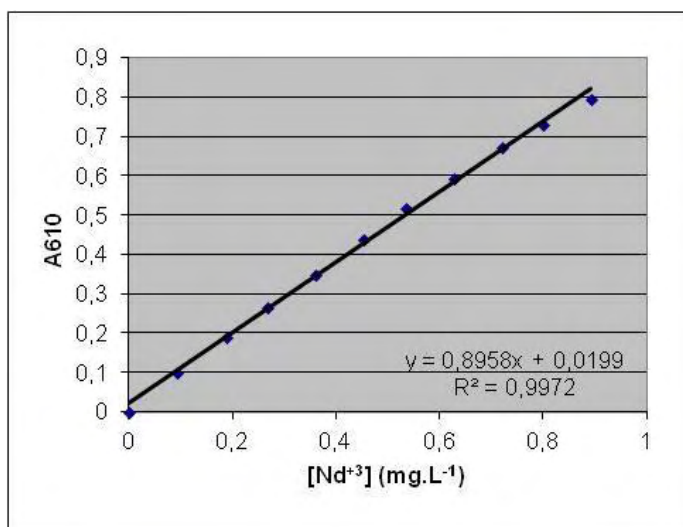
8mg de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

Dissolver cada reagente separadamente e completar para 1000 ml de água destilada e esterilizada.

ANEXO 2

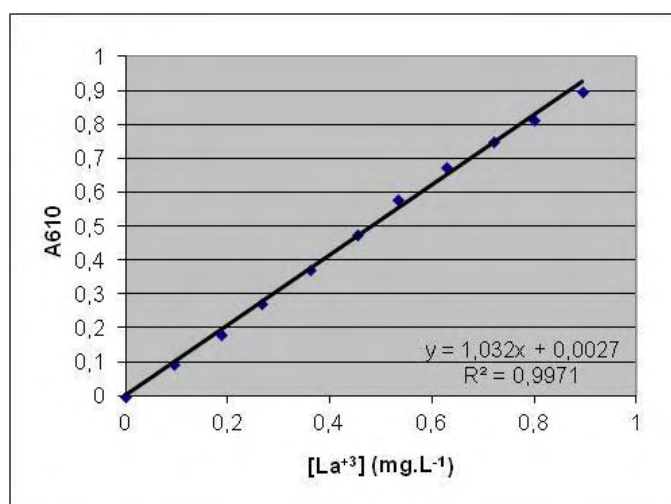
1) Curva Padrão Neodímio

⁺³ [Nd]		NdCl (µL)	TP Acetato (µL)	A610			MÉDIA	D.P
(mg/L)	(µmol/L)			T1	T2	T3		
0	0	0	0	0	0	0	0	
0,093	0,646	35	2765	0,092	0,092	0,109	0,098	0,010
0,187	1,293	70	2730	0,179	0,189	0,195	0,188	0,008
0,267	1,847	100	2700	0,264	0,269	0,263	0,265	0,003
0,360	2,493	135	2665	0,349	0,343	0,349	0,347	0,003
0,453	3,139	170	2630	0,433	0,433	0,447	0,438	0,008
0,533	3,693	200	2600	0,524	0,513	0,516	0,518	0,006
0,627	4,340	235	2565	0,584	0,613	0,576	0,591	0,019
0,720	4,986	270	2530	0,669	0,664	0,684	0,672	0,010
0,800	5,540	300	2500	0,722	0,729	0,736	0,729	0,007
0,893	6,186	335	2465	0,78	0,795	0,804	0,793	0,012
0,987	6,833	370	2430	0,848	0,835	0,84	0,841	0,007



2) Curva Padrão Lantânio

⁺³ [La]		LaCl	TP Acetato	A610			MÉDIA	D.P
(mg/L)	(μ mol/L)	(μ L)	(μ L)	T1	T2	T3		
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,093	0,646	35	2765	0,086	0,089	0,108	0,094	0,012
0,187	1,293	70	2730	0,175	0,171	0,199	0,182	0,015
0,267	1,847	100	2700	0,266	0,276	0,276	0,273	0,006
0,360	2,493	135	2665	0,353	0,39	0,378	0,374	0,019
0,453	3,139	170	2630	0,468	0,481	0,478	0,476	0,007
0,533	3,693	200	2600	0,568	0,567	0,611	0,582	0,025
0,627	4,340	235	2565	0,674	0,671	0,678	0,674	0,004
0,720	4,986	270	2530	0,754	0,742	0,763	0,753	0,011
0,800	5,540	300	2500	0,796	0,825	0,828	0,816	0,018
0,893	6,186	335	2465	0,869	0,903	0,92	0,897	0,026
0,987	6,833	370	2430	0,894	0,938	0,905	0,912	0,023



2) Curva Padrão Cério

⁺³ [Ce]		CeCl ₃ (μL)	TP Acetato (μL)	A610			MÉDIA	D.P
(mg/L)	(μmol/L)			T1	T2	T3		
0	0	0	0	0	0	0	0	
0,093	0,646	35	2765	0,08	0,083	0,093	0,085	0,007
0,187	1,293	70	2730	0,176	0,187	0,203	0,189	0,014
0,267	1,847	100	2700	0,248	0,268	0,293	0,270	0,023
0,360	2,493	135	2665	0,331	0,374	0,378	0,361	0,026
0,453	3,139	170	2630	0,436	0,489	0,471	0,465	0,027
0,533	3,693	200	2600	0,53	0,535	0,555	0,540	0,013
0,627	4,340	235	2565	0,604	0,594	0,63	0,609	0,019
0,720	4,986	270	2530	0,694	0,7	0,685	0,693	0,008
0,800	5,540	300	2500	0,738	0,773	0,785	0,765	0,024
0,893	6,186	335	2465	0,79	0,798	0,805	0,798	0,008
0,987	6,833	370	2430	0,853	0,859	0,879	0,864	0,014

