 **UNESP** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araraquara

**COMPARAÇÃO DA BIOSSORÇÃO DE METAIS TERRAS-RARAS PELA BIOMASSA
MELANIZADA DO FUNGO *Aspergillus nidulans* NAS FORMAS LIVRE E IMOBILIZADA**

CAROLINA BALDIN CAPORALIN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2011

CAROLINA BALDIN CAPORALIN

**COMPARAÇÃO DA BIODSORÇÃO DE METAIS TERRAS-RARAS PELA BIOMASSA
MELANIZADA DO FUNGO *Aspergillus nidulans* NAS FORMAS LIVRE E IMOBILIZADA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

**Araraquara
2011**

CAROLINA BALDIN CAPORALIN

1. Dados pessoais:

1.1. **Data de nascimento:** 11 de dezembro de 1986

1.2. **Naturalidade:** Votuporanga – SP

1.3. **Estado civil:** solteira

1.4. **Filiação:** Edimir Caporalin

Maria Lucia Baldin

2. Formação acadêmica:

2.1. Graduação:

Bacharelado em Química Ambiental – IBILCE/UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – 2005 / 2008.

2.2. Pós-graduação:

Mestrado em Biotecnologia – IQ/UNESP – Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – 2009 / atual.

3. Comunicações em eventos:

Caporalin, J.B.; Caporalin, C.B.; Sponchiado, S.R.P. Otimização da recuperação de neodímio usando diferentes quantidades de biomassa melanizada do fungo *Aspergillus nidulans*. III Workshop de Biodegradação & Biorremediação EMBRAPA Meio Ambiente, 2009.

Caporalin, C.B.; Caporalin, J.B.; Sponchiado, S.R.P. Influência da concentração de biomassa, produzida pelo fungo *Aspergillus nidulans*, na biossorção de neodímio. 17º Encontro da SBQ – regional interior paulista Waldemar Saffioti, 2009.

Caporalin, C.B., Caporalin, J.B., Fertoni, I.A.P. Interação do corante azul de metileno com sistemas micro-heterogêneos. 17º Encontro da SBQ – regional interior paulista Waldemar Saffioti, 2009.

Caporalin, J.B.; Caporalin, C.B.; Leite, C.A.; Pretti, T.S.; Marques, M.P.; Berlinck, R.G.S.; Sponchiado, S.R.P. Potencial aplicação de fungos marinhos para a concentração e recuperação de metais terras-raras. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009.

Caporalin, C.B.; Faiad, C.R.; Pastre, I.A. Estudo espectrofotométrico do corante Índigo Carmin em argilas modificadas. XX CIC – Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008.

Caporalin, C.B.; Faiad, C.R.; Barbosa, T.; Pastre, I.A. Comportamento espectrofotométrico do corante Índigo Carmin em argilas modificadas. XXXV Colóquio de Incentivo à Pesquisa, 2008.

Sertori, R.H.V.; Faiad, C.R.; Caporalin, C.B.; Strengari, N.C.; Pastre, I.A. Estudo da adsorção do antraceno e do ácido-9-antróico em suspensões aquosas de argilas modificadas. 60^a. Reunião Anual da SBPC, 2008.

Caporalin, C.B.; Faiad, C.R.; Tiera, V.A.O.; Plicas, L.M.A.; Pastre, I.A. Experiências Inovadoras para o Ensino de Química. V Semana de Química Ambiental, 2008.

Caporalin, C.B.; Tiera, V.A.O.; Plicas, L.M.A.; Pastre, I.A. A Química experimental como facilitadora do processo ensino-aprendizagem. XXXIV Colóquio de Incentivo à Pesquisa, 2007.

Caporalin, C.B.; Tiera, V.A.O.; Plicas, L.M.A.; Pastre, I.A. A Química experimental como facilitadora do processo ensino – aprendizagem. III Fórum Ambiental da Alta Paulista – UNESP / ANAP – Tupã, 2007.

Jordano, A.; Francisco, A.P; Faiad, C.R.; Caporalin, C.B.; Gonçalves, J.; Villela, P.; Margarido, T.; Ribeiro, Y.; Lima, D.; Yamada, M.; Rocha, S.; Pastre, I.A.; Tiera, V.A.O.; Agostinho, S.M.L.; Plicas, L.M.A. A Dinâmica na formação dos professores de Química do ensino médio de São José do Rio Preto. XXXIII Colóquio de Incentivo à Pesquisa, 2006.

Jordano, A.; Francisco, A.P; Faiad, C.R.; Caporalin, C.B.; Gonçalves, J.; Villela, P.; Margarido, T.; Ribeiro, Y.; Lima, D.; Yamada, M.; Rocha, S.; Pastre, I.A.; Tiera, V.A.O.; Agostinho, S.M.L.; Plicas, L.M.A. Inversão Térmica e chuva ácida. XXXIII Colóquio de Incentivo à Pesquisa, 2006.

Caporalin, C.B.; Villela, P.; Tiera, V.A.O.; Agostinho, S.M.L.; Pastre, I.A. Pesquisa sobre a formação dos professores de Química do ensino médio de São José do Rio Preto/SP. XVIII CIC – Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006.

FICHA CATALOGRÁFICA

C246c	<p>Caporalin, Carolina Baldin Comparação da bioissorção de metais terras-raras pela biomassa melanizada do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> nas formas livre e imobilizada / Carolina Baldin Caporalin. - Araraquara : [s.n], 2011 126 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Fungos. 3. Metais de terras raras. 4. Melanina. I. Título.</p>
-------	--


Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CAROLINA BALDIN CAPORALIN

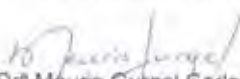
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 5 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Carlos Renato Corso
Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP, Rio Claro


Profª Drª Meuris Gurgel Carlos da Silva
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha mãe Maria Lucia, que me encaminhou na trilha do saber e por estar sempre comigo, oferecendo-me incondicional apoio, incentivo e amor; que me ensinou enfrentar desafios, sem nunca fugir deles, que por diversas vezes chorou e sorriu comigo. Ao lado dela nunca me faltou carinho, dedicação e compreensão. Te amo.

Aos meus avós José e Tereza que construíram esta preciosa família, fonte de esperança, coragem, determinação, garra e de todas as mais nobres atitudes e sentimentos existentes em minha vida.

A minha irmã Juliana, amiga e companheira, pelo carinho e confiança. Incentivadora permanente, que com seu amor compreendeu e acompanhou todos os meus passos. Esteve presente constantemente, apesar de nossa distância física, pois carrego seu coração comigo.

E, a todos os que lutam com a certeza de que vale a pena empregar todas as forças na busca de seus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi concretizada graças à participação, colaboração e incentivo de inúmeras pessoas, as quais contribuíram direta ou indiretamente não apenas para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para meu crescimento como ser humano.

Deixo aqui registrado os meus mais sinceros agradecimentos.

A Deus por me iluminar, inspirar e ajudar em todo o momento.

A minha irmã e companheira de vida Juliana, pelo grande e decisivo incentivo para seguir a carreira acadêmica, me sinto muito agradecida por ter tido a honra de trilhar os passos desta minha jornada ao seu lado. Nos momentos mais difíceis me espelhei na sua força de vontade e inteligência para que eu pudesse persistir neste sonho. Te amo.

A Prof^a. Ieda Aparecida Pastre Fertoni por acreditar em meu potencial durante toda trajetória de minha graduação.

A Prof^a. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela orientação, amizade, compreensão e apoio incondicional.

A grande amiga Fabiana que não mediu esforços para me ajudar, a amizade que tenho por você é algo muito valioso e não há nada neste mundo que me faça esquecê-la. Muito obrigada seja pela amizade, pelas risadas, desabafos, pelo auxílio, enfim por ter entrado em minha vida.

Aos meus amigos Marina, Natália e Messias, têm pessoas que não entram em nossa vida por acaso, e estes fizeram toda a diferença na minha. Muito obrigada pelas risadas, momentos de descontração, choros e desabafos.

Aos meus amigos de graduação, em especial Carol, Fran, Caio, Nayara, Dani, Nhonho, cuja distância física é superada pela proximidade de coração.

As amigas Carla, Tais, Maira e Bianca pelo auxílio, aprendizagem e por tornar minha rotina mais agradável.

Aos meus chefes Zislaine Beloti e Eduardo Fernandes Júnior que nunca deixaram de me apoiar, incentivar e agüentar meus choros durante este último ano. Muito obrigada por me permitirem concluir esta etapa de minha vida.

Ao amigo Juliano pela amizade, incentivo e sugestões, não só profissionais mas de vida. Seu apoio me possibilitou a realização de um dos meus objetivos.

Ao meu quase cunhado Lianderson, pela prestatividade, conselhos e momentos de descontração, somente ele para me fazer rir naqueles intermináveis finais de semana de trabalho.

A todos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química pela grande colaboração e momentos de descontração.

**Aos funcionários da biblioteca deste Instituto, pela cordialidade,
disponibilidade e atenção.**

EPÍGRAFE

*“ Mais importante que o conhecimento é a imaginação...”
Se o conhecimento nos permite alcançar os limites do
universo, a imaginação nos faz transpor os seus umbrais.
Não existe a formação do conhecimento sem a ousadia do
pensar.*

Albert Einstein

*“ Trate bem a Terra. Ela não foi doada a você pelo seus
pais. Ela foi emprestada a você pelos seus filhos.”*

Provérbio do Quênia

*“ O homem cauteloso jamais deplora o mal presente; emprega
o presente em prevenir as aflições futuras”*

William Shakespeare

RESUMO

Os metais terras-raras (TRs) apresentam um alto valor agregado, o qual não provém de sua baixa ocorrência mineral, mas sim da dificuldade na separação destes pelos métodos clássicos, uma vez que os elementos desta série apresentam semelhantes comportamentos físico-químicos. Desta maneira, altos custos são despendidos anualmente para a obtenção das TRs na forma pura, sendo esta necessária para as suas aplicações tecnológicas. Uma alternativa a esta problemática é o emprego da biossorção, a qual apresenta potencial aplicação para a extração e separação de metais valiosos, por ter como vantagem uma alta eficiência agregada a um baixo custo. Alguns requisitos são necessários para que o processo de biossorção possa ter competitividade técnica e econômica, tais como, o material biológico empregado deve apresentar um baixo custo, sendo assim necessário estabelecer as condições ótimas de cultivo do micro-organismo para sua produção em larga escala, e também a utilização do biossorvente na forma imobilizada possibilita seu uso como um adsorvente convencional, o qual apresenta tamanho desejado, alta porosidade e um bom desempenho físico-químico. Por esta razão, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a potencialidade de utilização da biomassa melanizada (inativa) obtida da linhagem mutante MEL 1 do fungo *Aspergillus nidulans*, na sua forma livre e imobilizada, no processo de biossorção dos metais terras-raras neodímio, lantânio e cério em soluções monometálicas. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer a condição ótima de cultivo da linhagem MEL 1 do *A. nidulans* que proporcionou uma biomassa mais melanizada, a qual apresentou uma maior capacidade biossortiva. Para tal condição, a massa micelial obtida após o crescimento do fungo por três dias, sob agitação à 37°C, em meio mínimo líquido suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L), Inositol (0,02g/L) e AMM (20mL/L), foi transferida para um outro frasco contendo meio mínimo líquido com a seguinte suplementação: glicose (1,3g/L), nitrato de sódio (1,5g/L), Inositol (0,02g/L) e AMM (2mL/L) e incubada por mais 4 dias à 37°C sob agitação. A análise da superfície química desta biomassa revelou que os grupos amina e carboxílico como também os lipídios participam como sítio ligante de metal, em função da redução da capacidade biossortiva observada após a modificação química destes grupos. Também foi possível verificar que o grupamento carboxílico apresentou uma maior afinidade por La

e Ce, devido a redução mais acentuada (em torno de 60%) na suas capacidades bioassortivas, o que pode ser indicativo de seletividade para estes metais. Os resultados referentes à cinética de bioassorção revelaram que há variação da capacidade bioassortiva das TRs entre as diferentes formas da biomassa (livre e imobilizada) e também em relação aos metais estudados, mas que 90 minutos é o tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido para ambas formas de biomassa utilizadas. A capacidade máxima de bioassorção ($Q_{m\acute{a}x}$) foi menor para a biomassa imobilizada comparada com a forma livre, sendo que esta redução foi de 60 e 33%, respectivamente, para lantânio e neodímio, enquanto que para o Ce foram obtidos valores de $Q_{m\acute{a}x}$ semelhantes para ambas biomassas (livre e imobilizada). Em relação à afinidade da biomassa pelos metais, observou-se que o lantânio apresentou um maior valor comparado com neodímio e cério, sendo que esta diferença torna-se mais evidente na biomassa imobilizada, sugerindo que esta forma exibe afinidades diferentes entre os terras-raras estudados. Assim, com este estudo foi possível demonstrar que a biomassa altamente melanizada do fungo *A. nidulans* (MEL 1) apresenta potencial biotecnológico para ser utilizada como bioassorvente, sendo que a forma imobilizada poderia ser aplicada no processo de separação dos terras-raras.

Palavras-chave: bioassorção, imobilização, metais terras-raras, fungos, melanina.

ABSTRACT

The rare-earth metals (TRs) have a high added value, which does not come from its low mineral occurrence, but the difficulty in separating these by classical methods, since the elements of this series show similar physical and chemical behavior. Thus, high costs are spent annually to obtain the TRs in pure form, which is necessary for their technological applications. An alternative to this problem is the use of biosorption, which has potential application for extraction and separation of valuable metals, having the advantage of a high aggregate efficiency at a low cost of production. Some requirements are necessary for the biosorption process may have technical and economic competitiveness, such as the biological material used must be low cost and it is necessary to establish the optimum conditions for cultivation of the microorganism to its large scale production, and also the use of biosorbent immobilized in the form enables its use as a conventional adsorbent, which has the desired size, high porosity and good physical and chemical performance. For this reason, this study aimed to evaluate the potential use of biomass melanized inactive mutant of the fungus *Aspergillus nidulans* MEL1 in its free form and immobilized in calcium alginate, in the process of biosorption of neodymium rare-earth metals, lanthanum and cerium. The results concerning the kinetics of biosorption showed that the ability of TRs biosorptive varied between different forms of biomass, and this capacity was higher compared to free biomass immobilized. Regarding the maximum biosorption capacity (Q_{max}), we observed that the immobilized biomass caused a reduction in Q_{max} of lanthanum and neodymium in approximately 60 and 33% respectively, have kept their C_e Q_{max} for both types of biomass (open and immobilized). The affinity of biomass for lanthanum and neodymium (b) was higher for the biosorbent in its free form, and with respect to cerium, the energy required for metal-biomass remained unchanged when the conversion of biomass in its free form to immobilized. The isotherm of biosorption of lanthanum by *A. nidulans* in free form showed the highest value of maximum biosorption, as well as greater intensity of metal-biomass.

Keywords: biosorption, immobilization, rare-earth metal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores das terras-raras cério, neodímio e lantânio de 1959 a 1998.....	6
Figura 2. Estrutura química da melanina.....	10
Figura 3. Isotermas de adsorção.....	17
Figura 4. Tipos de isotermas de adsorção na classificação BDDT	18
Figura 5. Diferentes métodos de imobilização celular de micro-organismos.....	24
Figura 6. Cinética de células imobilizadas no suporte pelo princípio de adsorção.....	26
Figura 7. Composição de alginatos.....	29
Figura 8. Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento.....	30
Figura 9. Aspecto da biomassa melanizada da linhagem MEL 1 do fungo <i>A. nidulans</i> , após inativação em estufa a 70°C e maceração.....	53
Figura 10. Aspecto dos pellets de biomassa melanizada da linhagem MEL 1 do fungo <i>A. nidulans</i> , imobilizada em alginato de cálcio.....	54
Figura 11. Aspecto da matriz de imobilização.....	54
Figura 12. Efeito da composição do inoculo nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e Inositol, sob agitação por 7 dias, a 37°C.....	63
Figura 13. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou à composição do inoculo.....	64
Figura 14. Melanizações obtidas nos meios pelas diferentes concentrações de conídios + hifas inoculadas.....	67
Figura 15. Efeito da forma de inoculação nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e Inositol, sob agitação por 7 dias, a 37°C.....	67
Figura 16. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou à forma de inoculação.....	68
Figura 17. Efeito da concentração de conídios nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e Inositol, sob agitação por 7 dias, a 37°C.....	70
Figura 18. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou à concentração de conídios.....	71
Figura 19. Efeito do volume do meio de cultura nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo de 1.10^6 conídios/mL do fungo em Meio Mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e Inositol, sob agitação por 7 dias, a 37°C.....	73
Figura 20. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou o volume do meio de cultura.....	74
Figura 21. Efeito da temperatura de incubação nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo de 1.10^6 conídios/mL do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e Inositol, sob agitação por 7 dias, a 37°C.....	76
Figura 22. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou a temperatura de incubação.....	77

Figura 23. Efeito das diferentes formas de cultivo nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo de 1.10^6 conídios/mL do fungo em 200mL de Meio Mínimo, sob agitação por 7 dias, a 37°C.....	79
Figura 24. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se testaram diferentes formas de cultivo da linhagem MEL 1.....	80
Figura 25. Cinética de biossorção de Nd, La e Ce para a biomassa inativa da linhagem MEL 1, do fungo <i>A. nidulans</i>	89
Figura 26. Cinética de biossorção para Nd, La e Ce utilizando a biomassa inativa da linhagem MEL 1, do fungo <i>A. nidulans</i> , na sua forma imobilizada.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Abundância de algumas terras-raras na crosta terrestre.....	3
Tabela 2. Porcentagem de elementos terras-raras na monazita brasileira.....	4
Tabela 3. Consumo de terras-raras pelos setores industriais.....	5
Tabela 4. Estudos referentes a utilização de micro-organismos na remoção/recuperação de terras-raras.....	9
Tabela 5. Modelos físico-químicos de adsorção.....	18
Tabela 6. Aplicações de micro-organismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.....	23
Tabela 7. Mutações presentes na linhagem do <i>A. nidulans</i> utilizada neste trabalho.....	42
Tabela 8. Capacidades biossorbitivas de diferentes espécies fúngicas para La e Nd, em pH 5,70 a 37°C.....	58
Tabela 9. Capacidades biossorbitivas para Nd das biomassas obtidas ao variar o tempo de incubação de 3 a 7 dias, havendo o cultivo de 1.10 ⁵ conídios/mL em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose, nitrato de sódio e Inositol, em pH 5,70 a 37°C.....	61
Tabela 10. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção para Nd obtidas pelos tratamentos em que se variou à composição do inoculo.....	65
Tabela 11. Concentração de conídios, crescimento de biomassa e produção do pigmento melanina obtidos pelo tratamento em que a inoculação do fungo se deu em tubos de ensaio..	66
Tabela 12. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção para Nd obtidas pelos tratamentos em que se variou à forma de inoculação.....	69
Tabela 13. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção para Nd obtidas pelos tratamentos em que se variou à concentração de conídios.....	71
Tabela 14. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção para Nd obtidas pelos tratamentos em que se variou o volume do meio de cultura.....	74
Tabela 15. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção para Nd obtidas pelos tratamentos em que se variou à temperatura de incubação.....	77
Tabela 16. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção para Nd obtidas pelos tratamentos em que se testaram diferentes formas de cultivo da linhagem MEL 1.....	81
Tabela 17. Capacidades de biossorção da biomassa sem tratamento e após a metilação dos seus grupamentos amina e seu efeito no processo biossortivo para Nd, La e Ce.....	84
Tabela 18. Capacidades de biossorção da biomassa sem tratamento e após a esterificação dos seus grupamentos carboxílicos e seu efeito no processo biossortivo para Nd, La e Ce.....	85
Tabela 19. Capacidades biossorbitivas da biomassa, sem tratamento e após a extração dos lipídios e seu efeito no processo biossortivo para Nd, La e Ce.....	86
Tabela 20. O efeito da concentração de biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 do fungo <i>A. nidulans</i> frente a capacidade biossorbitiva de neodímio e sua eficiência.....	87
Tabela 21. Valores das capacidades máximas de biossorção ($Q_{máx}$) e as constantes de afinidade (b) da biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 do fungo <i>A. nidulans</i> na sua forma livre, a 37°C.....	93

Tabela 22. Valores das capacidades máximas de bio sorção ($Q_{máx}$) e as constantes de afinidade (b) da biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans* na sua forma imobilizada, a 37°C.....93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Metais terras-raras.....	2
1.2. Biossorção de metais.....	7
1.3. Condições operacionais do processo biossortivo.....	13
1.4. Cinética do processo de biossorção.....	15
1.5. Modelagem matemática do processo.....	16
1.5.1. Isoterma de Langmuir.....	19
1.5.2. Isoterma de Freundlich.....	20
1.6. Imobilização.....	21
1.6.1. Imobilização por adsorção na superfície de um suporte sólido.....	25
1.6.2. Agregação celular.....	26
1.6.3. Contenção física dentro de uma barreira.....	27
1.6.4. Aprisionamento no interior de um suporte poroso.....	28
1.7. Modificação da superfície química do biossorvente.....	33
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1. Materiais.....	42
3.1.1. Fungo.....	42
3.1.2. Meio de cultura.....	42
3.1.3. Solução de metais.....	43
3.2. Métodos.....	44
3.2.1. Estoque do fungo.....	44
3.2.2. Preparo da suspensão de conídios para experimentos que não apresentavam hifas.....	44
3.2.3. Preparo da suspensão de conídios para experimentos que continham hifas.....	44
3.2.4. Crescimento da linhagem MEL 1 em frascos agitados.....	44
3.2.4.1. Tempo de cultivo.....	45
3.2.4.2. Composição do inoculo.....	45
3.2.4.3. Inoculação de micélios.....	45
3.2.4.4. Inoculação de hifas e conídios.....	46
3.2.4.5. Volume do meio de cultura.....	46
3.2.4.6. Temperatura de crescimento.....	46
3.2.4.7. Suplementação do meio com água de maceração de milho...47	
3.2.4.8. Diferentes formas de cultivo do fungo.....	47
3.2.5. Avaliação do crescimento.....	48
3.2.6. Quantificação do pigmento melanina.....	48
3.2.7. Avaliação da capacidade biossortiva da biomassa.....	49

3.2.8. Análise de variância.....	49
3.2.9. Estudo da superfície química do biossorvente.....	49
3.2.9.1. Metilação dos grupos aminas.....	50
3.2.9.2. Esterificação dos grupos carboxílicos.....	50
3.2.9.3. Extração de lipídios.....	50
3.2.10. Concentração de biomassa para o processo biossortivo.....	50
3.2.11. Cinética do processo biossortivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa da linhagem MEL 1 do <i>A. nidulans</i> na sua forma livre.....	51
3.2.12. Isotermas de biossorção para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa da linhagem MEL 1 do <i>A. nidulans</i> na sua forma livre.....	52
3.2.13. Imobilização da biomassa melanizada da linhagem MEL 1.....	53
3.2.14. Obtenção do peso das esferas de alginato de cálcio contendo biomassa imobilizada e o peso das células livres da referida linhagem.....	54
3.2.15. Cinética do processo biossortivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa imobilizada da linhagem MEL 1 do <i>A. nidulans</i>	55
3.2.16. Isotermas de biossorção para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa imobilizada da linhagem MEL 1 do <i>A. nidulans</i>	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1. Análise das capacidades biossortivas de diferentes espécies de fungos para Nd e La.....	58
4.2. Otimização das condições de cultivo do fungo <i>A. nidulans</i> para a produção de biomassa melanizada.....	60
4.2.1. Tempo de cultivo.....	60
4.2.2. Composição do inoculo.....	62
4.2.3. Inoculação de micélios.....	65
4.2.4. Influência de hifas.....	65
4.2.5. Concentração de conídios.....	69
4.2.6. Volume do meio de cultura.....	72
4.2.7. Temperatura de crescimento.....	75
4.2.8. Utilização de resíduo agroindustrial como fonte de nutrientes.....	78
4.3. Estudo da superfície química do biossorvente.....	83
4.4. Efeito da concentração de biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 de <i>A. nidulans</i> no processo biossortivo de Nd, La e Ce.....	88
4.5. Cinética do processo biossortivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa inativa da linhagem MEL 1 na sua forma livre.....	90
4.6. Cinética do processo biossortivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa inativa da linhagem MEL 1 na sua forma imobilizada.....	92

4.7. Isotermas de biossorção para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa da linhagem MEL 1 do <i>A. nidulans</i> nas formas livre e imobilizada.....	94
5. CONCLUSÕES.....	97
6. REFERÊNCIAS.....	99
7. ANEXOS.....	110

INTRODUÇÃO

1.1. Metais terras-raras

O grupo da tabela periódica denominado terras-raras (TRs) se estende do lantânio (La, Z=57) ao lutécio (Lu, Z=71), além dos elementos escândio (Sc, Z=21) e ítrio (Y, Z=39), sendo que, quando estes dois últimos não estão inclusos, a designação passa a ser lantanídeos, conforme recomendação da IUPAC (MARTINS; ISOLANI, 2005). A série destes metais apresenta 17 elementos como componentes e se encontra dividida em dois grupos, de acordo com suas características químicas, em: elementos leves, ou grupo do cério, e elementos pesados, ou grupo do ítrio (ABRÃO, 1994; JONES *et al.*, 1996).

A denominação terras-raras deve-se aos seus elementos constituintes terem sido, em uma primeira instância, observados na forma de seus óxidos, os quais apresentam semelhanças com materiais conhecidos por terras. Já a designação “raras” é feita erroneamente, uma vez que estes elementos são encontrados com maior abundância na natureza (com exceção do promécio) do que muitos outros metais. Como exemplo tem-se o túlio e o lutécio, que são as TRs menos abundantes na crosta terrestre, porém são encontradas em uma quantidade maior que a prata (0,07ppm) e o bismuto (0,008ppm) (HEDRICK, 2005; MARTINS; ISOLANI, 2005). A Tabela 1 fornece a abundância de algumas TRs na crosta terrestre.

A característica química destes elementos é, na sua maioria, a do estado de oxidação (+III), por ser termodinamicamente mais estável, o que faz com que apresentem sua extensão radial reduzida, não os possibilitando desta forma, fazerem ligações com outros átomos, havendo somente uma pequena interação entre seus orbitais. O estado divalente pode ser encontrado em haletos binários, mas como é facilmente oxidado para o estado trivalente, é pouco comum sua presença em solução e na forma de complexos. Já no estado tetravalente, somente o cério é suficientemente estável em solução (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Os lantanídeos apresentam propriedades químicas e físicas muito semelhantes, tal fato deve-se à configuração eletrônica dos mesmos, uma vez que todos os átomos neutros apresentam a configuração $6s^2$ e também uma ocupação variável no subnível 4f (com exceção do lantânio que não possui

elétron f em seu estado fundamental). Para os íons trivalentes este efeito não ocorre, sendo observado um aumento regular na configuração $4f^n$ ($n= 1-14$), podendo esta ser resumida da seguinte forma: $[Xe] 4f^n 5s^2 5p^6 5d^{1-10} 6s^2$. Esta representação, referente à configuração eletrônica das TRs, permite concluir que os orbitais 4f estão protegidos do ambiente químico pelos orbitais 5s, 5p, 5d e 6s (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Tabela 1. Abundância de algumas terras-raras na crosta terrestre. Fonte: HEDRICK, 1999.

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

Outra propriedade peculiar é a ocorrência de contração lantanídica, que consiste na diminuição de seus raios, tanto atômico quanto iônico, conforme aumenta o seu número atômico. Esta contração é decorrente do efeito eletrostático associado com o aumento da carga blindada em seu núcleo pelos elétrons na subcamada 4f, o que possibilita às transições que geram a luminescência característica destes elementos. Estas propriedades particulares acarretam uma mudança na química das TRs, fazendo com que a basicidade dos elementos decresça ao longo de sua série, permitindo assim, a separação de seus íons por métodos de fracionamento (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Estes elementos estão contidos em pelo menos 250 espécies de minérios, sendo que a monazita, a bastnaesita, o xenotímio, a gadolinita, a allanita, a loparita, a euxenita e a apatita são as de maior interesse econômico. As reservas mundiais destes minérios estão estimadas em 112,6 milhões de toneladas, com mais de 40% deste total encontrado na China, 18% na Rússia, 12,4% nos Estados Unidos, Austrália (5%), Índia (1,2%) e países com menos de 1%, sendo eles: Canadá, África do Sul, Brasil, Malásia, Sri-Lanka, Tailândia, Zaire, entre outros (VIEIRA; LINS, 1997).

A bastnaesita é um mineral fluorcarbonatado, rica em TRs pesadas (ítricas), tendo certa estabilidade (SENA *et al.*, 2004; HEDRICK, 1995). Suas principais reservas são encontradas na China e nos Estados Unidos, já as areias monazíticas são recorrentes como fontes secundárias importantes no Brasil, Malásia, Sri Lanka, Índia, África do Sul e também na Tailândia (REZENDE; CARDOSO, 2007).

As reservas monazíticas brasileiras, medidas e indicadas, acumulam um montante de 43.305 e 570 ton, respectivamente, sendo formadas por um composto de fosfato anidro, que tem a fórmula estrutural R-PO₄, sendo R o grupo das TRs, o qual se constitui em cerca de 90% dos elementos La, Ce, Pr, Sm e Nd, enquanto que o restante é composto de itérbio e lantanídeos pesados (GSCHNEIDNER, 1980; ABRÃO, 1994). Na Tabela 2, pode-se observar a porcentagem de seus constituintes.

Tabela 2. Porcentagem de elementos terras-raras na monazita brasileira. Fonte: HEDRICK, 2005.

Monazita	Composição (%)
Ítrio	1,40
Lantânio	24,00
Cério	47,00
Praseodímio	4,50
Neodímio	18,50
Samário	3,00
Európio	0,10
Gadolínio	1,00
Térbio	0,10
Disprósio	0,40
Hólmio	Traço
Érbio	0,10
Túlio	Traço
Itérbio	0,02
Lutécio	Não determinada

A primeira aplicação industrial das TRs foi na fabricação de camisas de lâmpões e, atualmente, sua utilização é muito abrangente, decorrente de suas propriedades ímpares, tais como; as espectroscópicas e magnéticas. Dentre estas aplicações pode-se enfatizar sua participação em conversores catalíticos

no tratamento de emissões automotivas, craqueamento de petróleo, material luminescente (“fósforos”); na fabricação de lâmpadas fluorescentes, lasers, vidros especiais (lentes ópticas, fibras ópticas, etc), ímãs permanentes, sensores, super ligas, aço modificado e cerâmicas especiais; como drogas anti-sépticas para bactérias gram-negativas; detectores de raios X; agentes de contraste para ressonância magnética; no tratamento de câncer; levitação magnética (trem bala); dentre outras (GSCHNEIDNER, 1980; ANDRÈS *et al.*, 2003; DINIZ; VOLESKY, 2005a; CHEPCANOFF, 2006). Os principais setores consumidores das TRs estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Consumo de terras-raras pelos setores industriais. Fonte: RAO; KALA, 2004.

Setor industrial	Consumo (%)
Catalisadores/ Reagentes químicos	39
Metalurgia	30
Vidros / Cerâmicas	25
Fósforos / Eletrônicos	6

Em decorrência do crescimento do uso destes metais nas indústrias de alta tecnologia, as TRs tiveram seus preços valorizados (Figura 1) em função da especificidade de suas aplicações, como o óxido de cério, considerado o mais apropriado agente de polimento para vidros; o neodímio, por sua participação na liga neodímio-ferro-boro (NIB) utilizada em ímãs permanentes e, o lantânio, pela participação no híbrido lantânio-niquel, amplamente utilizado em baterias recarregáveis principalmente de equipamentos sem fio, como telefones celulares e computadores portáteis (HEDRICK, 2007).

Entretanto, para que as TRs possam ser utilizadas, é necessário que estas apresentem um alto grau de pureza, o que acarreta maiores valores agregados, uma vez que o semelhante comportamento físico-químico destes elementos torna difícil a sua obtenção mediante as técnicas tradicionais (GUPTA; KRISHNAMURTHY, 1992).

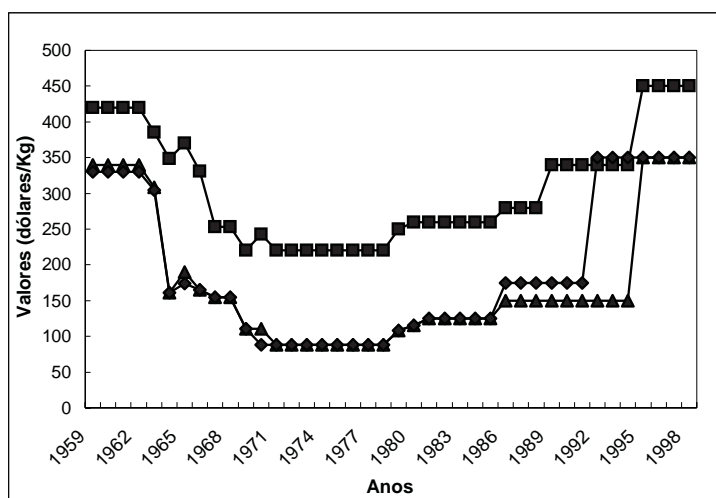


Figura 1. Valores das terras-raras cério (◆), neodímio (■) e lantânio (▲) de 1959 a 1998. Fonte: http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/rare_earth/740798.pdf.

Os métodos clássicos mais comumente utilizados para separar estes elementos são cristalização e precipitação fracionada, oxidação/redução química seletiva, processos térmicos, extração por solventes, floculação, filtração por membrana, troca iônica e adsorção por carbono ativado (CHEPCANOFF, 2006; KENTISH; STEVENS, 2001). Entretanto, estas técnicas mostram-se inexecutáveis em função da sua baixa eficiência de recuperação, geração de resíduos secundários de difícil tratamento e também pelos elevados custos operacionais, além da necessidade de reagentes e/ou energia (SIEGEL *et al.*, 1990; KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995; FILIPOVIC-KOVACEVIC *et al.*, 2000; PALMIERI *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2004; AKSU, 2005).

Devido a todas estas dificuldades, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas para obter os metais terras-raras de uma forma mais eficiente e que acarrete em um menor custo.

1.2. Bioissorção de metais

Os micro-organismos apresentam a habilidade de interagir com os metais que os cercam, sendo esta uma atividade natural no meio ambiente e que está presente desde o aparecimento dos seres vivos. Tal fato ocorre devido a alguns metais serem componentes de suas moléculas biológicas, participarem de reações metabólicas e por constituírem um mecanismo de proteção para a toxicidade dos metais (GRIFFIN, 1994; GARCIA JUNIOR, 1997; PALMIERI, 2001).

As interações realizam-se tanto nos revestimentos celulares (paredes e membranas) quanto no interior das células e estão ligadas aos fenômenos básicos de absorção e adsorção (PALMIERI, 2001), os quais podem ser promovidos pelos quatros mecanismos a seguir:

a) **Volatilização:** Os cátions metálicos tóxicos são convertidos em suas formas metiladas, sendo assim denominados de metalóides.

b) **Precipitação extracelular:** consiste na ligação dos metais com produtos provindos do metabolismo microbiano, os quais depois de serem excretados se apresentam em solos e sedimentos, promovendo assim, a imobilização dos cátions.

c) **Bioacumulação:** trata-se do transporte dos íons metálicos através da membrana, em direção ao citoplasma. Este mecanismo ocorre somente em organismos vivos, uma vez que necessita da energia advinda do metabolismo (DÖNMEZ *et al.*, 1999).

d) **Adsorção:** é promovida por ligação passiva dos íons metálicos aos grupos funcionais contidos na superfície celular do bioissorvente, podendo ocorrer em organismos vivos ou não, já que não se trata de um mecanismo controlado metabolicamente (KAPOOR *et al.*, 1999; PALMIERI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2004; AKSU, 2005).

Em processos ativos, os organismos tendem a apresentar tolerância e/ou resistência aos metais, quando estes estão em altas concentrações e/ou não fazem parte de sua nutrição (ZOUBOULIS *et al.*, 2004).

O processo biossortivo apresenta-se como uma promissora alternativa na remoção de metais tóxicos contidos em efluentes domésticos e industriais, já que possui inúmeras vantagens, tais como: alta eficiência e seletividade, podendo ser comparada às resinas comerciais de troca iônica; menor custo de produção em relação aos métodos tradicionais e, por permitir a utilização de biomassa de fácil obtenção provinda de processos fermentativos industriais, como cervejarias e laticínios, além de possibilitar sua reutilização por vários ciclos de biossorção/dessorção (MURALEEDHARAN *et al.*, 1991; KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995; PALMIERI *et al.*, 2000; ANDRÈS *et al.*, 2003; BAYRAMOGLU *et al.*, 2003; AKSU, 2005).

Esta técnica consiste em um fenômeno de adsorção em que os íons metálicos ligam-se, através de forças de interação eletrostática, troca-iônica, complexação, quelação ou microprecipitação, a determinados sítios (carboxilas, aminos, sulfatos) presentes na superfície celular de micro-organismos (KAPOOR *et al.*, 1999; PALMIERI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2004; AKSU, 2005).

Uma grande variedade de micro-organismos como bactérias, fungos, leveduras e algas, vêm sendo utilizados como biossorbentes devido à capacidade de ligação de vários metais, sendo que a eficiência varia em função das diferenças presentes na composição da parede celular (VOLESKY; HOLAN, 1995). Na Tabela 4 são apresentados alguns estudos onde micro-organismos são utilizados na remoção/recuperação de TRs.

Tabela 4. Estudos referentes a utilização de micro-organismos na remoção/recuperação de terras-raras. Fonte: CAPORALIN, 2007.

Biossorvente	Terra-rara	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Ralstonia metallidurans</i>	Gd ³⁺	Andrès <i>et al.</i> , 2000
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Neurospora</i> sp.		
<i>Humicola</i> sp.		
<i>Penicillium</i> sp.		
<i>Rhizopus</i> sp.		
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>		
<i>Ankistrodesmus densus</i>		Palmieri <i>et al.</i> , 2000
<i>Monoraphidium</i> sp.	Nd ³⁺	
<i>Chlorella minutíssima</i>		
Levedura F Linhagens (UB1193, UB1194 e UBIR92) de <i>Saccharomyces</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Philip <i>et al.</i> , 2000
<i>Spirulina platenses</i>		Maquieira <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus subtilis</i>		Markai <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Eu ³⁺	Texier <i>et al.</i> , 1999;2000;2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Philip <i>et al.</i> , 2000
<i>Sargassum</i>		Diniz; Volesky, 2005 ^a
<i>Sargassum fluitans</i>		Palmieri <i>et al.</i> , 2002
<i>Sargassum polycystrum</i>		Diniz; Volesky, 2005b
<i>Pseudomonas</i> sp.		Kazy <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	La ³⁺	Texier <i>et al.</i> , 1999;2000;2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Philip <i>et al.</i> , 2000
<i>Platanus orientalis</i>		Sert <i>et al.</i> , 2008
<i>Spirulina platensis</i>		Maquieira <i>et al.</i> , 1996
<i>Sargassum</i>		Diniz; Volesky, 2005 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yb ³⁺	Texier <i>et al.</i> , 1999;2000;2002
<i>Sargassum</i>		Diniz; Volesky, 2005 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pr ³⁺	Philip <i>et al.</i> , 2000
<i>Platanus orientalis</i>	Ce ³⁺	Sert <i>et al.</i> , 2008
<i>Spirulina platensis</i>		Maquieira <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dy ³⁺	Philip <i>et al.</i> , 2000

Estudos têm mostrado que a utilização da biomassa de fungos, em especial os filamentosos, apresenta-se vantajosa em função da grande quantidade de exopolissacarídeos, como por exemplo, as glicanas, quitosanas, celulosas e quitinas, os quais são sítios ligantes de metal. Entretanto, a eficiência do processo biossortivo varia entre as diferentes espécies deste micro-organismo, sendo esta variável uma função da composição de sua parede celular, pois a presença de grupos funcionais potencializa a capacidade de ligação metal-biomassa (MURALEEDHARAN *et al.*, 1991).

Algumas espécies de fungos ainda produzem pigmentos, como exemplo, a melanina, a qual pode estar incorporada à parede celular dos esporos e hifas, sendo denominada melanina intracelular, enquanto que, quando este pigmento está presente no meio de cultura na forma de polímero extracelular, denomina-se melanina extracelular (GADD; ROME, 1988; JACOBSON, 2000). Este pigmento é formado através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, sendo constituído por diversos grupos funcionais, como carboxilas, fenólicos, hidroxilas e aminas (Figura 2), os quais possuem a capacidade de ligar íons metálicos, potencializando desta forma, a capacidade de ligação metal-biomassa (BLOIS, 1978; GADD; ROME, 1988; FOGARTY; TOBIN, 1996).

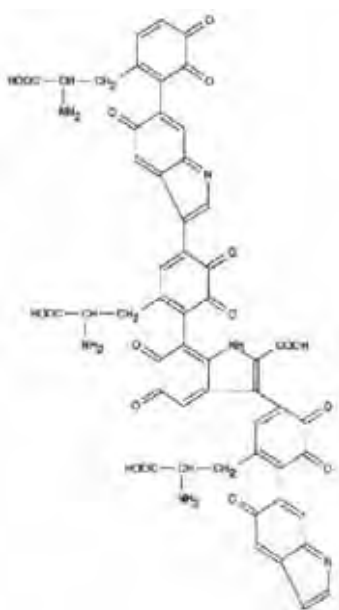


Figura 2. Estrutura química da melanina. Fonte: FOGARTY; TOBIN, 1996.

Na literatura pode se encontrar alguns trabalhos que reafirmam o fato da presença da melanina potencializar a interação da biomassa com metais. Siegel *et al.* (1986) observaram 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*. Entretanto, 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 4 dias de crescimento (SIEGEL *et al.*, 1990).

Os estudos de Rizzo *et al.* (1992) indicaram que o fungo melanizado *Armillaria* adsorveu altas concentrações de cátions do ambiente, sendo que alguns íons (como Al, Zn, Fe, Cu e Pb) estavam 50 a 100 vezes mais concentrados no micélio que no solo. Garcia-Rivera e Casadevall (2001) observaram que a produção de melanina por *Cryptococcus neoformans* reduz a sua susceptibilidade ao nitrato de prata devido a quelação do íon metálico pela melanina.

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório utilizando uma linhagem melanizada do fungo *Aspergillus nidulans* também mostraram que a bioissorção de neodímio e lantânio 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. Este resultado foi devido à produção da melanina ocorrer em função do tempo de cultivo, ou seja, a biomassa de 48 horas apresenta-se pouco pigmentada, enquanto que a de 72 horas torna-se escura em função da alta produção de pigmento (CAVALLIERI *et al.*, 2007).

A recuperação do metal adsorvido ao bioissorvente constitui uma etapa bastante relevante, sendo esta denominada dessorção, a qual consiste no enfraquecimento da ligação metal-biomassa através da utilização de um agente dessorvente que possua uma afinidade maior pelo metal do que pela biomassa (MODAK; NATARAJAN, 1995). Diversos tipos de dessorventes vem sendo empregados, como as soluções de ácidos minerais, sais, bases e agentes complexantes (KAPOOR *et al.*, 1999; DINIZ; VOLESKY, 2006).

Vários estudos têm mostrado que nos experimentos de dessorção, a biomassa pode ser regenerada e reutilizada em vários ciclos de bioadsorção/dessorção subseqüentes, mantendo, com isso, o baixo custo que é peculiar do processo (MODAK; NATARAJAN, 1995; KAPOOR *et al.*, 1999; ANDRÈS *et al.*, 2003; DINIZ; VOLESKY, 2006).

Para que o processo de dessorção seja otimizado faz-se necessário a maior concentração possível do metal, além de que o bioadsorvente seja restaurado de forma a perder o mínimo de sua condição original, possibilitando seu reuso de forma eficaz. Os motivos que promovem a perda do desempenho de adsorção pela biomassa são variados, podendo ser enumerados em: modificações na química e estrutura do bioadsorvente, mudanças nas condições de vazão e transferência de massa e contaminantes-traço que podem se acumular na biomassa e bloquear os sítios de ligação ou afetar a estabilidade dessas moléculas (VOLESKY, 2001; VOLESKY *et al.*, 2003).

O processo de bioadsorção/dessorção também é efetivo quando o propósito constitui-se em separar os elementos químicos, uma vez que os diversos sítios de adsorção presentes na biomassa podem possuir afinidades diferentes pelos íons, fazendo com que exista uma heterogeneidade na intensidade das ligações metal-biomassa. Assim, durante a etapa de dessorção, os elementos podem ser liberados em tempos diferentes, proporcionado a separação dos íons pelos seus diferentes tempos de eluição (VOLESKY, 2001).

1.3. Condições operacionais do processo biossortivo

Alguns fatores têm o potencial de afetar a biossorção, dentre estes, o pH da solução, o íon metálico utilizado, a presença de demais ligantes em solução e os pré-tratamentos efetuados na biomassa, os quais podem ser químicos e/ou físicos (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003; BLACKWELL *et al.*, 1995; KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995; WANG; CHEN, 2006).

Estudos realizados demonstraram que variações no pH da solução afetam a adsorção dos íons metálicos na biomassa, pois quando a concentração de íons hidróxidos está elevada em solução, estes irão se complexar com o metal levando a sua precipitação na forma de óxidos ou hidróxidos metálicos, acarretando uma diminuição na capacidade biossortiva da biomassa. Já em baixos valores de pH, também há uma redução no potencial de interação do metal com a superfície celular do biossorvente devido, provavelmente, a protonação dos grupos carboxílicos (HUANG *et al.*, 1988; FOUREST; ROUX, 1992; BLACKWELL *et al.*, 1995; KAPOOR *et al.*, 1999). Estes grupamentos são de suma importância para a biossorção, uma vez que representam de 80 a 90% dos sítios ligantes aos cátions metálicos (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

Outros cátions presentes em solução, junto ao íon de interesse, também podem promover uma diminuição da capacidade biossortiva, em resposta a competição entre espécies de carga iguais pelos mesmos sítios de ligação. De forma análoga, a presença de ânions pode ocasionar uma diminuição na eficiência de biossorção devido à competição destes com os sítios ligantes presentes na biomassa (CAPORALIN, 2007). Diniz e Volesky (2005b) observaram uma diminuição na capacidade de remoção dos íons La^{3+} por *Sargassum polycystrum* devido à presença do ânion sulfato em solução.

Uma vez que a biossorção não requer crescimento celular, a utilização de biomassa submetida à pré-tratamento, podendo este ser químico ou físico, apresenta-se mais vantajosa do que células vivas, pois assim, eliminam-se possíveis problemas de contaminação, toxicidade do metal a ser removido, bem como, a necessidade de adequação de todo processo biossortivo às condições de cultivo do micro-organismo. Além do mais, a inativação da biomassa proporciona uma maior área de superfície passível de interação com

metais, uma vez que esta destrói as membranas da célula facilitando, portanto, a exposição de componentes intracelulares e de sítios que anteriormente encontravam-se bloqueados (TOBIN *et al.*, 1994; GAVRILESCU, 2004; WANG; CHEN, 2006). Kapoor *et al.* (1999) relataram que a biomassa de *Aspergillus niger* quando aquecida por 15 minutos em uma solução de NaOH 0,1mol.L⁻¹ apresenta um maior potencial de remoção dos íons Pb, Cd e Cu, quando comparado com a biomassa não tratada.

Sendo assim, o desempenho do processo biossortivo pode ser controlado pelos seguintes fatores físico-químicos: (a) natureza da biomassa, englobando suas estruturas físicas (porosidade, área superficial e tamanho das partículas) e químicas (variedade e densidade dos grupos funcionais); (b) a disponibilidade e a química do adsorbato; e (c) as condições da solução, sendo estas: força iônica, pH e concentração do adsorbato (CRINI, 2005).

1.4. Cinética do processo de bioadsorção

Para o entendimento e otimização do processo bioadsorptivo, faz-se necessário a realização de experimentos de cinética, os quais determinam o tempo de contato necessário entre a biomassa e a solução do metal para que a bioadsorção atinja o equilíbrio (CAPORALIN, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007).

A cinética de adsorção é controlada por processos convectivos e difusivos, sendo: (a) transferência do metal em solução para os limites da superfície do adsorvente; (b) transferência do metal da superfície do adsorvente para os sítios ativos intrapartículas; (c) remoção do íon metálico em solução pelos sítios ativos via complexação, adsorção e precipitação intrapartícula. Os passos (a) e (b) representam as resistências às transferências de massa convectiva e difusiva, e o (c) é rápido, sendo a fase não limitante (OLIVEIRA, 2007).

Este tempo de contato para que o equilíbrio entre as fases seja atingido ocorre em função de vários fatores, entre eles: o tipo da biomassa (quantidade e sítios envolvidos na bioadsorção), seu tamanho, forma e estado (ativa, passiva, livre ou imobilizada), além do metal envolvido no sistema (FERREIRA *et al.*, 2007).

É com a utilização deste fator que se determina o tamanho do equipamento necessário para a bioadsorção, o que influencia diretamente nos custos de capital e operação do processo. A grande maioria dos sistemas de tratamentos de efluentes opera em condições dinâmicas, as quais requerem menores tempos de processamento do que as condições estáticas.

Na literatura podem ser encontrados testes cinéticos em que o tempo de contato entre as fases (metal/biomassa) varia de alguns minutos a mais de dez dias (NOURBAKHSI *et al.*, 1994).

Os modelos pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem são utilizados quando a cinética de adsorção de íons é controlada por difusão externa e o de Weber e Morris (1962) aplica-se para a cinética controlada por difusão intra-partícula.

1.5. Modelagem matemática do processo

Os mecanismos que regem a ligação de metais nos sítios de biossorção são de difícil interpretação, devido à complexidade dos sistemas biológicos (PALMIERI, 2001). Entretanto, os mecanismos de adsorção e troca-iônica são os predominantes no processo biossortivo, de forma que os cátions presentes nos sítios de ligação são trocados pelos íons metálicos em solução. Após esta rápida troca-iônica, os metais podem ser complexados, adsorvidos ou precipitados sob a parede celular da biomassa (OLIVEIRA, 2007).

Uma isoterma de adsorção mostra a quantidade que um determinado soluto está adsorvido em uma superfície adsorvente, em função da concentração de equilíbrio do soluto (VEGLIÓ *et al.*, 2002; DURSUN, 2006). Para a obtenção da isoterma, faz-se necessário o contato da solução contendo o componente a ser adsorvido, a diferentes concentrações iniciais e temperatura constante, até que se atinja o equilíbrio, podendo assim determinar a quantidade de material adsorvido (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

As isotermas podem apresentar diferentes comportamentos gráficos, os quais fornecem informações importantes sobre o mecanismo de adsorção. Modelos físico-químicos são utilizados na construção das isotermas, as quais permitem quantificar a capacidade de adsorção e a força que os metais se ligam ao adsorvente. De acordo com o tipo de adsorção, as forças predominantes, as características físico-químicas do adsorbato, as propriedades do sistema (como pH, temperatura) e, principalmente, o tipo do adsorvente, a isoterma pode assumir uma determinada forma (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

A Figura 3 mostra as formas mais comuns, conforme descrito por McCabe *et al.* 2001, onde a isoterma linear passa pela origem e a quantidade adsorvida é proporcional à concentração do adsorbato no fluido. As isotermas convexas são favoráveis, pois grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de soluto, quando estas são muito favoráveis apresentam-se como uma função constante e são consideradas irreversíveis. As isotermas côncavas são desfavoráveis, pois altas

concentrações de fluido são necessárias para baixas concentrações de adsorvato no sólido.

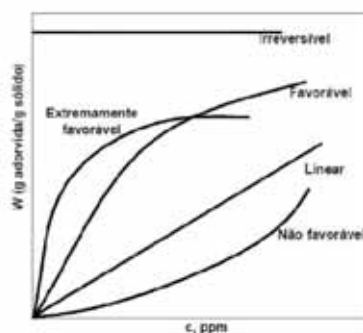


Figura 3. Isothermas de adsorção. Fonte: McCabe, 2001.

A modelagem matemática da biossorção não elucidou os mecanismos envolvidos na ligação de metal pela biomassa, devido à complexidade química de sua superfície celular, contudo, fornecem os parâmetros necessários para a avaliação tanto do rendimento do biossorvente, como a capacidade máxima de adsorção do metal pela biomassa e a afinidade existente entre os íons metálicos e os sítios de ligação (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

Os modelos que comumente representam o comportamento das isothermas de adsorção foram classificados por Brunauer, Deming, Deming e Teller, conforme ilustrado na Figura 4. O que os diferencia são a quantidade de camadas adsorvidas, a possibilidade da utilização das constantes de equilíbrio entre as fases líquida e sólida e as interações existentes entre o metal e os sítios de ligação, podendo estas serem da seguinte forma: adsorvente-adsorbato, adsorbato-adsorbato e adsorvente-adsorvente (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

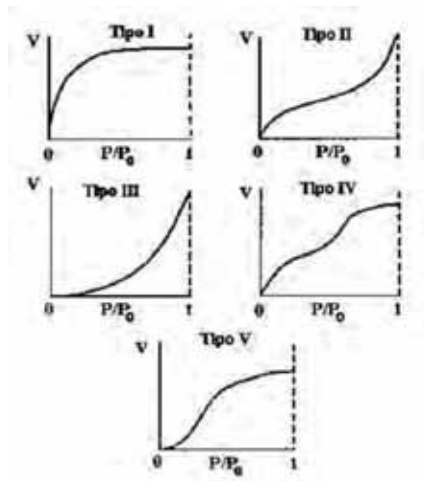


Figura 4. Tipos de isothermas de adsorção na classificação BDDT. Fonte: Oliveira, 2007

A isoterma do tipo I é característica da isoterma de Langmuir, onde a adsorção ocorre apenas em monocamadas. É encontrado em sistemas onde ocorre a quimissorção e o adsorvente é microporoso. Na isoterma do tipo II ocorre adsorção em multicamada, sendo conhecida como isoterma BET e é observada em sistemas com sólidos não porosos. A isoterma tipo III também indica adsorção em multicamadas em sólidos não porosos. As isothermas do tipo IV e V são observadas em sistemas de sólidos porosos (HINES; MADDOX, 1985).

Os modelos descritos na literatura para representar os dados de equilíbrio de adsorção estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Modelos físico-químicos de adsorção. Fonte: HINES; MADDOX, 1985

Isoterma	Equação	Vantagens	Desvantagens
Langmuir	$q = \frac{q_{max} b C_{LQ}}{1 + b C_{LQ}}$	Parâmetros interpretáveis	Não é estruturada; Monocamada de adsorção
Freundlich	$q = K C_{LQ}^{1/n}$	Expressão simples	Não é estruturada; Não ajustável
Combinação Langmuir-Freundlich	$q = \frac{q_{max} b C_{LQ}^{1/n}}{1 + b C_{LQ}^{1/n}}$	Combinação das equações acima	Desnecessariamente complicada
Radke-Prausnitz	$\frac{1}{q} = \frac{1}{a C_{LQ}} + \frac{1}{b C_{LQ}^2}$	Expressão simples	Empírica, utiliza três parâmetros
Redlich-Peterson	$q = \frac{a C_{LQ}}{1 + b C_{LQ}^c}$	Aproximação de Freundlich para altas concentrações	Sem vantagens especiais
Brunauer-Emmet-Teller (BET)	$q = \frac{B C_i}{(C_i - C_i)(1 + (B-1)C_i/C_i)}$	Adsorção multicamadas; Ponto de inflexão	Sem equivalente para capacidade total de acúmulo

Fonte: VOLESKY, 2006 [4].

No entanto, na maioria dos processos de bioadsorção mono-componente utilizam-se os modelos de Langmuir e Freundlich.

1.5.1. Isoterma de Langmuir

A teoria de Langmuir assume a existência de uma monocamada de distribuição homogênea dos sítios e energias de adsorção, não havendo interações entre as moléculas adsorvidas. Sendo assim, este modelo, que é descrito pela equação 1, assume que todas as forças que atuam no processo adsorptivo são similares em natureza às aquelas que envolvem uma reação química e que a adsorção se resume a uma única camada de moléculas da substância sobre a superfície das partículas sólidas, sendo de curta duração as forças atrativas entre o sorvente e o sorvido.

Desta forma, a isoterma de Langmuir é considerada como o modelo mais simples entre as demais isotermas de adsorção (que representa isotermas do tipo 1 e 2), assumindo que: as moléculas são adsorvidas nos sítios de adsorção da superfície, as espécies adsorvidas interagem com um único tipo de sítio, a quantidade máxima de adsorção é a que corresponde a monocamada e a energia de uma espécie adsorvida é a mesma em qualquer ponto da superfície.

$$q_e = \frac{q_{\text{máx}} \cdot b \cdot C_{\text{eq}}}{1 + b \cdot C_{\text{eq}}} \quad (1)$$

Onde, q_e é a capacidade de bioadsorção da biomassa no equilíbrio ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), a qual representa a quantidade de metal acumulado por unidade de biomassa; $q_{\text{máx}}$ é a capacidade máxima de bioadsorção da biomassa ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), alcançada quando seus sítios ligantes estão saturados pelo metal; b é a constante relacionada com a energia de adsorção, que representa a afinidade entre a biomassa e o metal ($\text{L} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) e, C_{eq} é a concentração de metal após atingir o equilíbrio ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

As constantes provenientes da isoterma de Langmuir apresentam significado físico, tal como o b que representa a razão entre a taxa de adsorção

e dessorção, sendo que elevados valores deste parâmetro evidenciam uma forte afinidade do íon pelos sítios do material. Já o $q_{\text{máx}}$ representa o número total de sítios disponíveis no adsorvente. Assim, ambos parâmetros estão relacionados com a natureza do material adsorvente e podem ser utilizados na comparação da eficiência de bioadsorção.

As hipóteses de Langmuir apresentam algumas limitações, porém, sua equação ajusta-se razoavelmente bem aos dados experimentais de muitos sistemas (LO *et al.*, 1999).

1.5.2. Isoterma de Freundlich

A isoterma de Freundlich sugere que ocorram múltiplas camadas com uma distribuição exponencial de calor na monocamada de adsorção, onde se encontram as interações entre as moléculas adjacentes que estão adsorvidas (SELATNIA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007). A distribuição heterogênea da energia dos sítios de adsorção é decorrente da diversidade dos grupos de ligação e da natureza dos íons metálicos adsorvidos, livres em solução ou em espécies hidrolisadas (SELATNIA *et al.*, 2004).

Os sistemas reais são bem representados por este modelo matemático (FERREIRA *et al.*, 2007) expresso na equação 2.

$$q_e = K_F C_{eq}^{1/n} \quad (2)$$

Onde, q_e é a capacidade de bioadsorção da biomassa no equilíbrio ($\mu\text{mol.g}^{-1}$), a qual representa a quantidade de metal acumulado por unidade de biomassa; C_{eq} é a concentração de metal após atingir o equilíbrio ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), K_F é uma constante de equilíbrio a bioadsorção, representativo da capacidade de sorção e n é uma constante indicativa da intensidade de bioadsorção (FERREIRA *et al.*, 2007).

1.6. Imobilização

Para evitar perdas na capacidade bioassortiva da biomassa durante o processo industrial é importante a utilização de bioassorventes na forma imobilizada ou de “pellets”, uma vez que as células livres fornecem informações valiosas somente em escala laboratorial. Em escalas superiores seu uso torna-se inadequado, pois as formulações livres apresentam uma baixa força mecânica, tamanho reduzido, além da excessiva pressão hidrostática requerida para gerar o fluxo apropriado, o que causa a desintegração da biomassa.

Já os sistemas celulares imobilizados, além de solucionar os entraves acima mencionados, exibem ainda uma série de vantagens adicionais, como: a melhor reutilização do bioassorvente após a etapa de dessorção do metal, alta capacidade de bioassorção, além de converter a biomassa a uma forma particulada, possibilitando seu uso como um adsorvente convencional, por ter um tamanho apropriado, alta porosidade e melhor desempenho físico-químico (ROME; GADD, 1991; GUPTA; KRISHNAMURTHY, 1992; FOMINA; GADD, 2002; TEXIER *et al.*, 2002; ANDRÈS *et al.*, 2003; BAYRAMOGLU *et al.*, 2003).

O uso de células microbianas imobilizadas também apresenta algumas desvantagens, porém estas são compensadas pelas vantagens que o método proporciona. O processo de imobilização nem sempre é econômico e as limitações na transferência de massa afetam a fisiologia e cinética do crescimento microbiano. Além disso, a matriz utilizada pode romper-se devido a densidade celular e evolução dos gases (WANG *et al.*, 2005). Assim, para que a imobilização apresente sucesso, faz-se necessário escolher adequadamente a metodologia a ser aplicada.

Na década passada houve um intenso aumento nas pesquisas referente a imobilização de enzimas, organelas e células inteiras de micro-organismos, sendo que, a primeira utilização industrial desta tecnologia foi na produção contínua de ácido L-aspártico. Atualmente, os processos de imobilização têm aplicações analíticas em biotransformação e na área médica em geral (CHIBATA *et al.*, 1974).

A imobilização microbiana trata-se de qualquer técnica que promova o confinamento físico ou a localização de células intactas em uma determinada região do espaço, com a preservação das atividades catalíticas desejáveis em

processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando a reutilização das mesmas. Enfim, pode ser definida como uma metodologia que limite a migração livre das células (RODRIGUES, 2010).

A imobilização de um material biológico é interessante, uma vez que substitui a utilização de sua forma solúvel, evitando com isso a necessidade de removê-lo do meio da reação para posterior aplicação. Assim, o emprego de células imobilizadas oferece redução nos custos, aumento na rapidez de transformação e exatidão do processo (RODRIGUES, 2010).

A tecnologia de imobilização celular se restringe ao emprego do micro-organismo como biocatalizador ou na produção de seus metabólitos extracelulares (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; PRASAD *et al.*, 2005), como observado na Tabela 6.

Quando imobilizadas em uma matriz, as células encontram-se protegidas das condições adversas que possam estar presentes em solução, tais como, pH, temperatura e substâncias nocivas, dando a elas condições de sobrevivência em meios de cultivos mais tóxicos, como os que são encontrados no tratamento de águas residuais contaminadas com fenóis e seus derivados (JUNTER; JOUENNE, 2004; WANG *et al.*, 2005).

Algumas características são desejáveis a matriz de imobilização, sendo estas: seguridade, preço acessível, estabilidade, ser reutilizável, reter altas concentrações celulares e limitações mínimas de transferência de massa (VERBELEN *et al.*, 2006).

Quando os suportes empregados são inertes e apresentam alta resistência mecânica, estes possibilitam a reutilização das células imobilizadas. Como exemplo pode ser citado a produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* imobilizado em esponja de náilon (COUTO *et al.*, 2000; DEVI; SRIDHAR, 2000).

A classificação das técnicas de imobilização celular pode ser realizada de duas maneiras: (a) naturais, que consiste na formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais, e (b) artificiais, que trata da encapsulação dos micro-organismos em matrizes, fazendo ou não o uso de agentes ligantes. A imobilização natural se dá espontaneamente por meio de interações eletrostáticas; já na forma artificial,

as células se ligam às matrizes por ligações covalentes (COVIZZI *et al.*, 2007). A Figura 5 ilustra os diferentes tipos de imobilização.

Tabela 6. Aplicações de micro-organismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos. Fonte: COVIZZI, 2007.

Processo	Microorganismo	Suporte utilizado	Referencia
Produção de pigmentos	<i>M. purpurea</i>	alginato, PUF, carvão, perlita	FENGGE <i>et al.</i> , 2000
	<i>G. fujikuroi</i>	alginato	GARIBAYO <i>et al.</i> , 2003
Produção de proteínas	<i>S. cerevisiae</i>	PVA	BARASCANDOLA, BRANDIARDI, ALTIERI, 2006
	<i>L. rhamnosus</i>	silicone	BERDMAN, CHAMPAGNE, LACROIX, 2005
Produção de exopolissacarídeos	<i>Beijerinckia</i> sp.	maltodextrina	BOEA, COSTA, SCARPAENI, 2004
	<i>A. pullulans</i>	agar, alginato	WEST, STEINFELD, 2001
Produção de enzimas	<i>N. frumidus</i>	PUF	EDGALSKI <i>et al.</i> , 2005
	<i>H. lutea</i>	PVA-MAA/PEG; PVA-MAA/ alginato de cálcio	ALBUQUEVA, FERREIRA, KONSTANTINOV, 1998; SLOKORA <i>et al.</i> , 1999
	<i>Aspergillus</i> sp.	CrioPAG*	LUSTA <i>et al.</i> , 2000
	<i>P. chrysosporium</i>	PUF, aço inoxidável, cerâmica, náilon, poliestireno	GERIN, ASTIER, ROUXHET, 1997; COUTO <i>et al.</i> , 2000; SHIM, KAWAMOTO, 2002
	<i>A. niger</i>	PUF	KALUSKAR <i>et al.</i> , 1999
	<i>A. niger</i>	alginato	ANGULOVA, SHEDMETEVA, LEROV, 1995
	<i>F. oxysporum</i>	PUF	FRASAD <i>et al.</i> , 2005
Biotransformação	<i>T. terreus</i>	alginato	RESHAJ, 2003
	<i>R. minuta</i>	agar, clara de ovo, li de vidro/PEI	VELANKAR, HEBLE, 2003
	<i>T. versicolor</i>	náilon	SEBASTI <i>et al.</i> , 2003
Biodegradação	<i>Rhodococcus</i> sp.	alginato	GUO <i>et al.</i> , 2006
	<i>Bacillus</i> sp.	alginato, PUF	FAZE <i>et al.</i> , 2006
	<i>F. trogl</i>	alginato	FAZE <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. zizterii</i>	alginato, areia, carvão	VIGGANI <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i>	auto-imobilização	TASUDA <i>et al.</i> , 2003
	<i>P. chrysosporium</i>	PUF, cerâmica, serragem	SIBBE, KAWAMOTO, 2002
Redução de sulfatos	<i>Rhodococcus</i> sp.	alginato, carvão	FAU <i>et al.</i> , 2005
	<i>Bacteria</i>	PUF, PE, Al ₂ O ₃	SEVA <i>et al.</i> , 2006
Fermentação de mostos de uvas	<i>S. cerevisiae</i>	maçã	KOURKOUTAS <i>et al.</i> , 2004
Produção de vinhos doces	<i>K. marxianus</i>	maçã	KOURKOUTAS <i>et al.</i> , 2004
Produção de leite fermentado	<i>L. casei</i>	alginato, maçã	KOURKOUTAS <i>et al.</i> , 2004
Produção de ácido láctico	<i>L. casei</i>	bucha vegetal	KOURKOUTAS <i>et al.</i> , 2004
Produção de sorbitol	<i>Z. mobilis</i>	bucha vegetal	VIGNOLI, CELLIGOT, SILVA, 2006
Produção de etanol	<i>S. cerevisiae</i>	bucha vegetal	OGIBONIA, MASUDA, TANAKA, 2001
Produção de antibióticos	<i>S. clavuligerus</i>	alginato, náilon	DEVI, SREERAG, 2000
Descoloração de melanoidinas	<i>C. litorea</i>	PUF	FUJITA <i>et al.</i> , 2000
	<i>G. candidum</i>	PUF	RE, SUGIDA, 1999
Solubilização de fosfatos	<i>A. niger</i>	PUF	VASHIYEV, VASILEVA, AZDOL, 1997
Produção de peptídeos para controle de pragas	<i>Chlorella</i> spp. - <i>C.A. limicola</i>	auto-imobilização	BERSANDEZ DE BARROS, BASHAR, 2006
Produção de auxina e ácido abscísico	<i>M. azuopinus</i>	auto-imobilização	FENO <i>et al.</i> , 2003
	<i>P. chrysosporium</i>	PUF	USAYAR, UNAYAR, UBAL, 2000

PVA: álcool polivinílico; PUF: fibra de poliuretano; MAA: N-metileno acrilamida; PEG: polietilenoglicol; CrioPAG: espuma de poliestireno não-trançada; PEI: polietilenoimina; PE: polietileno

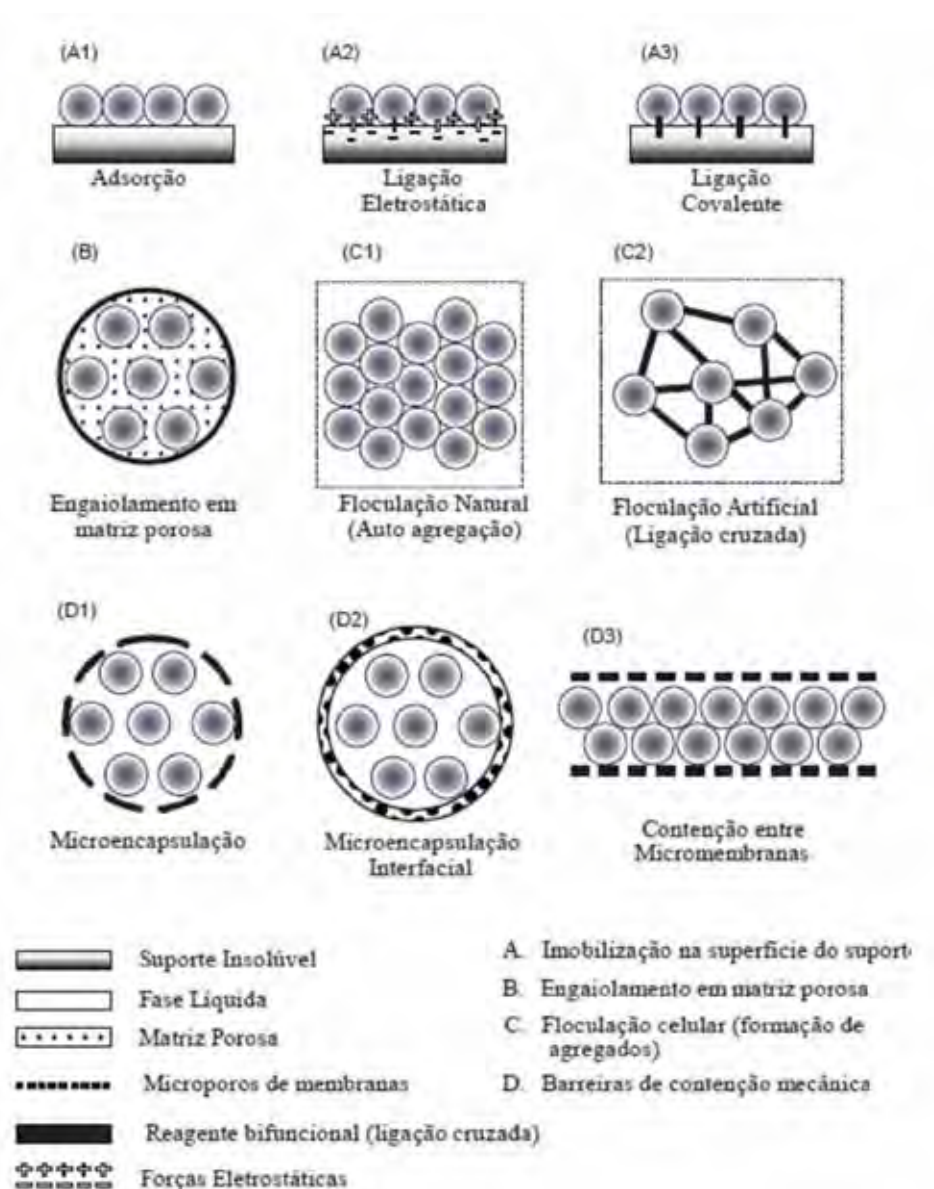


Figura 5. Diferentes métodos de imobilização celular de micro-organismos. Fonte: adaptado de PILKINGTON *et al.*, 1998.

As técnicas de imobilização celular podem ainda serem divididas em quatro categorias, de acordo com o mecanismo físico operante, recebendo as seguintes denominações: adsorção na superfície de um suporte sólido, agregação celular, contenção física dentro de uma barreira, aprisionamento no interior de um suporte poroso (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; VEBERLEN *et al.*, 2006).

1.6.1. Imobilização por adsorção na superfície de um suporte sólido

O surgimento das pesquisas sobre imobilização foi a partir de observações sobre a capacidade que alguns micro-organismos apresentavam de se fixarem naturalmente à superfície de diversos ambientes. Esta formação de biofilme trata-se de uma colonização estratégica universal dos micro-organismos para a sua sobrevivência (JUNTER; JOUENNE, 2004).

A imobilização de células em um suporte sólido dá-se pelo mecanismo de adsorção física, o qual ocorre por atrações eletrostáticas, podendo haver também, ligações covalentes entre o suporte e a membrana celular do micro-organismo (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Agentes como óxidos metálicos, glutaraldeído ou aminossilanos promovem a indução do fenômeno de adsorção. Entretanto, em alguns tipos de produções, tais como de alimentos e bebidas, é preferível a adesão natural em substituição ao uso de indutores tóxicos ou instáveis (VEBERLEN *et al.*, 2006).

A técnica de imobilização natural é tida como simples e suas condições operacionais são suaves. O desligamento e religamento das células ao suporte se fazem possível, uma vez que não há barreiras entre estas e a solução, estabelecendo um equilíbrio entre células adsorvidas e as que estão livres em suspensão (VEBERLEN *et al.*, 2006).

Este método de imobilização é amplamente empregado devido a sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes disponíveis. De acordo com o crescimento microbiano e a densidade de células na matriz, pode ocorrer um potencial de equilíbrio entre as células adsorvidas e as que estão livres em solução (COVIZZI *et al.*, 2007), estando este representado na Figura 6.

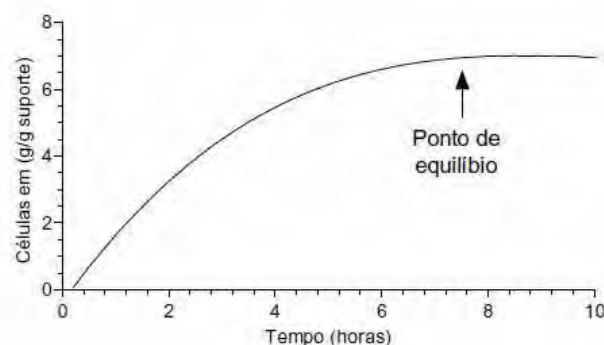


Figura 6. Cinética de células immobilizadas no suporte pelo princípio de adsorção. Fonte: COVIZZI, 2007.

Diferentes suportes vêm sendo empregados na atualidade, estando estes divididos em dois tipos de materiais componentes: os celulósicos (madeira, serragem e bagaço de cana-de-açúcar) e inorgânicos (porcelana porosa, rochas e vidro poroso) (KOURKOUTAS *et al.*, 2004). Pode ainda ser encontrada na literatura a utilização de materiais alternativos, tais como, pedaços de maçã na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em processos de vinificação, uma vez que se trata de uma alternativa de baixo custo e compatível com o aroma e o sabor dos vinhos (KOURKOUTAS *et al.*, 2001).

Uma desvantagem relacionada a esta técnica de imobilização é o acúmulo de biofilmes sobre a superfície do suporte, dificultando a absorção de nutrientes pela biomassa, o que acarreta em condições não-homogêneas ao desenvolvimento microbiano; bem como, os produtos liberados ao meio extracelular têm sua difusão comprometida e a troca gasosa torna-se limitada (XAVIER *et al.*, 2003).

1.6.2. Agregação celular (floculação)

A capacidade natural que as células apresentam de se agregarem para formar uma grande unidade, tem sido chamada de floculação (VEBERLEN *et al.*, 2006). Esta denominação também pode ser utilizada quando se designa uma propriedade das células em suspensão, a qual se trata

da aderência e conseqüente sedimentação das mesmas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Normalmente fungos, leveduras e células vegetais apresentam a habilidade de formar agregados, porém, nas células que não são naturalmente floculantes, podem ser adicionados agentes que promovem a indução de sua agregação (VEBERLEN *et al.*, 2006).

A floculação é uma das técnicas mais promissoras de imobilização a ser empregada em escala industrial, devido ao grande potencial na formação de agregados celulares dentro dos reatores de leito fixo ou tanques com agitação (FREEMAN; LILLY, 1998). Um exemplo da utilização desta metodologia é nas indústrias de bebidas, uma vez que a floculação das células de *Saccharomyces cerevisiae* promove uma diminuição no tempo da fermentação e a remoção das mesmas se dá mais facilmente, aumentando com isso, a qualidade da cerveja (COVIZZI *et al.*, 2007).

1.6.3. Contenção física dentro de uma barreira

A utilização de membranas microporosas promove a contenção das células dentro de uma matriz, sendo que, estas também podem ficar retidas no interior de microcápsulas ou contidas em membranas filtrantes (JEN *et al.*, 1996).

Utiliza-se esta técnica de imobilização quando se requer o produto das células em sua forma livre, transferência mínima de compostos e também na separação de produtos com alta massa molecular a partir de efluentes. As desvantagens apresentadas são: limitações causadas pela transferência de massa, saturação da membrana devido ao crescimento celular, resistência à passagem do fluido e um aumento do intumescimento no interior da membrana (LEBEAU *et al.*, 1998).

Esta metodologia é mais empregada na produção de vinhos e em fermentações contínuas, as quais requerem a reciclagem de células (KARGUPTA *et al.*, 1998).

1.6.4. Aprisionamento no interior de um suporte poroso

Os métodos de aprisionamento são baseados na inclusão e retenção das células dentro de uma rede rígida, interstícios das fibras ou poros do suporte, tendo como objetivo, impedir a difusão das células no meio sem o impedimento da transferência de nutriente e metabólitos (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

A diferença existente entre este método e o anteriormente apresentado consiste que, neste último, as células ficam apenas envoltas por uma membrana e não tendo uma malha entre as células por ela envolvidas (CHAMPAGNE *et al.*, 1994; KRISHNAN *et al.*, 2001).

Esta encapsulação do micro-organismo, que também pode ser denominada como imobilização em partículas, é um processo pelo qual as células são retidas dentro de esferas poliméricas semi-permeáveis e permanecem uniformemente distribuídas dentro delas (KNAEBEL *et al.*, 1997).

Os polímeros usualmente empregados são: o alginato, goma gelana, carragenana, agarose, poliuretano, poliacrilamida e metacrilato (KNAEBEL *et al.*, 1997). O tamanho das partículas formadas pode variar de muito pequenas (aproximadamente 2 a 10 μm de diâmetro) a muito grandes (aproximadamente 3 mm), sendo este fator dependente do polímero, da velocidade de fluxo, da densidade da solução polimérica e da concentração da solução iônica (KNAEBEL *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2005). O polímero escolhido e o tamanho da partícula que este formará influenciam na atividade celular, retenção, difusão de nutrientes e na sua estabilidade (WANG *et al.*, 2005).

A utilização de células encapsuladas ao invés das formulações feitas com células livres é mais vantajosa para sua aplicação no meio ambiente, uma vez que promove a proteção do estresse biótico (predação por protozoários e bacteriófagos) e abiótico (efeito inibitório dos compostos tóxicos). Além disso, garante a sobrevivência dos micro-organismos, promove sua atividade fisiológica, aumenta a densidade e o crescimento celular preferencial nas zonas aeróbias e anaeróbias do gel encapsulado (PASSOS, 2006).

O alginato é um dos suportes mais empregados na imobilização de células microbianas inteiras por se tratar de uma metodologia simples e acessível, além de ser considerada uma técnica reprodutível que requer condições suaves durante o processo de imobilização (KAWAGUTI; SATO, 2008). Como exemplos podem ser citados as produções de carotenóides pelo fungo filamentoso *Giberella fujikuroi* (GARBAYO *et al.*, 2003) e de ácido láctico por *Lactobacillus casei* (YOO *et al.*, 1996).

Este suporte é formado por heteropolímeros lineares de ácidos carboxílicos (Figura 7), sendo estes compostos de subunidades monoméricas de β -D-ácido manurônico (M) e α -L-ácido glurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas (KAWAGUTI; SATO, 2008).

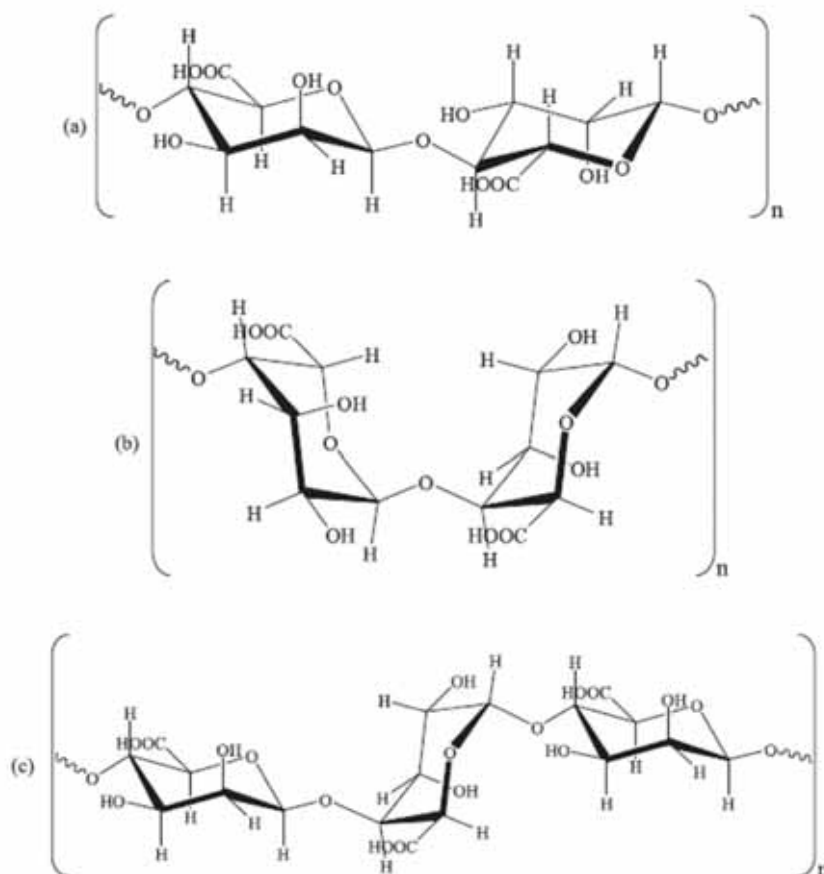


Figura 7. Composição de alginatos: (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (b) cadeia de resíduos de ácidos glurônicos; (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos glurônicos alternados. Fonte: adaptado de KAWAGUTI; SATO, 2008.

Para que ocorra a formação de um gel firme por este mecanismo clássico de imobilização, a suspensão do micro-organismo é misturada a uma solução formada por um composto polimérico de cargas negativas, como o alginato de sódio. Esta mistura é submetida à extrusão com o auxílio de mangueiras e bomba peristáltica, sendo posteriormente, gotejada em solução que apresente sais de íons bivalentes, como o cloreto de cálcio, havendo assim, a formação dos grânulos. Após a gelificação, os micro-organismos se apresentam retidos ou aprisionados dentro do gel (WANG *et al.*, 2005), conforme ilustrado na Figura 8.

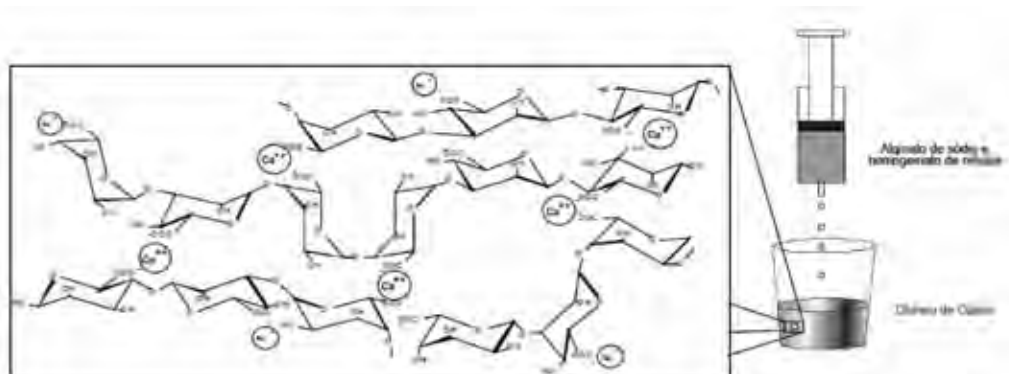


Figura 8. Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento. Fonte: COVIZZI, 2007.

Os íons cálcio são transportados para o centro da esfera durante a permanência dos grânulos na solução salina, e este mecanismo ocorre até que o estado de equilíbrio seja atingido, podendo demorar de 15 minutos a 12 horas (HULST; TRAMPER, 1989). A duração dependerá das condições experimentais empregadas, tais como: temperatura, concentração do sal, diâmetro da esfera, tipo e concentração do alginato e da suspensão celular. No processo de maturação da esfera seu volume pode ser aumentado em até 40% do tamanho original (OGBONNA *et al.*, 1989).

Alguns aspectos são de suma importância neste processo de imobilização, devendo assim ser observados, os quais são: estabilidade mecânica, que pode ser diminuída com o tempo devido à baixa concentração de alginato ou à grande quantidade de células na suspensão; limitações difusionais, dependendo do tipo e concentração do gel (BAHULEKAR *et al.*, 1991).

Uma causa freqüente do rompimento e até mesmo dissolvimento dos grânulos de alginato trata-se da quelação dos íons cálcio a outros compostos do meio, principalmente íons fosfato e citrato; fato que pode ser minimizado ao adicionar uma maior quantidade de íons Ca^{2+} na solução ou por um tratamento feito com quitosana (YOO *et al.*, 1996).

A atividade apresentada pelas células imobilizadas é influenciada por algumas características do suporte, podendo enumerar: tamanho da superfície das esferas, porosidade do gel e hidroflicidade. A polietilenoimina é uma amina polimérica alifática que atua como agente de reticulação, sendo empregada nas técnicas de imobilização para garantir a hidroflicidade e uma maior força mecânica ao processo. Na formação das esferas de alginato de cálcio, o glutaraldeído constitui-se como agente de ligação, recebendo a denominação de aditivo (BAHULEKAR *et al.*, 1991).

Preetha e Viruthagiri (2005) com a finalidade de estudar a biossorção de íons zinco (II), presentes em solução, por *Rhizopus arrhizus*, imobilizaram a biomassa do fungo, utilizando como suporte o alginato de cálcio. Concluíram que existe uma relação diretamente proporcional entre a capacidade biossortiva e a quantidade de biossorvente empregada.

Jamai *et al.* (2001) compararam a produção de etanol das células livres e imobilizadas de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando para as duas espécies suas taxas de respiração aeróbia e de crescimento, imobilização e tolerância ao etanol, durante o processo fermentativo. Concluíram que a concentração de etanol no fim do ciclo da fermentação é similar para células livres e imobilizadas de *Candida tropicalis*, mas o tempo requerido para alcançar esses valores é maior para células imobilizadas, enquanto que *Saccharomyces cerevisiae*, livres e imobilizadas alcançaram a fermentação completa no mesmo tempo. As *Candida tropicalis* imobilizadas requereram 2-3 h a mais que as células livres de *Candida tropicalis* para o processo completo da fermentação.

Gillet *et al.* (2000), com o objetivo de produzir Scopolin, imobilizaram *Nicotiana tabacum* em esferas de alginato de cálcio, visto que a suspensão de células livres acumulava Scopolin no interior citoplasmático e para a recuperação era necessário seu rompimento celular. As células de *N. tabacum* imobilizadas produziram mais Scopolin que a suspensão de células

livres, sendo que uma grande fração do produto pode ser recuperada sem o rompimento celular, obtendo 3,8 mg/g de biomassa no meio de cultura para 0,2 mg/g de biomassa intracelular. Diante disso, chegaram a conclusão de que a imobilização de *N.tabacum* oferece perspectivas para a produção do Scopolin ou a melhora da produção de outros metabólitos secundários da planta, em nível industrial.

1.7. Modificação da superfície química do bioissorvente

A investigação referente à bioissorção originou-se nos anos 80 (VOLESKY, 2001), sendo que o potencial bioissorativo dos materiais biológicos foi estabelecido somente na década passada (VOLESKY; HOLAN, 1995). Os estudos sobre aplicações de micro-organismos na recuperação ambiental anteriores a esta época centravam-se apenas na degradação de compostos de origem orgânica, dada à habilidade dos mesmos em oxidar matéria a CO₂, ao passo que são apenas capazes de modificar a especiação dos metais presentes em solução (LOVLEY; COATES, 1997).

A partir de então, verificou-se um intenso esforço na caracterização das propriedades de ligação dos metais a diversos tipos de biomassas, quando as espécies metálicas estão contidas em soluções diluídas (DAVIS *et al.*, 2003; VIEIRA; VOLESKY, 2000).

O conhecimento acerca das formas com que o metal se liga a biomassa, ou seja, a compreensão dos mecanismos pelos quais os micro-organismos acumulam metais pesados é de suma importância no desenvolvimento e maximização do potencial de processos microbianos na concentração, remoção e recuperação de metais contidos em soluções aquosas, bem como, para definir a estratégia de regeneração e reutilização do bioissorvente em múltiplos ciclos de bioissorção/dessorção (AHLUWALIA; GOYAL, 2007; KEFALA *et al.*, 1999; VOLESKY, 2001).

Elucidar estes mecanismos também pode contribuir para o desenvolvimento de materiais sorventes análogos, em eficiência, as resinas de troca-iônica, com a vantagem de serem economicamente mais atrativos, além de tornar mais focalizada a procura de bioissorventes a serem utilizados no processo, permitindo o uso de biomateriais que apresente alta atividade ligante (VOLESKY, 2001).

Acredita-se que a remoção de íons metálicos pela biomassa ocorra por diversas interações entre os cátions presentes em solução e os grupos ligantes que constituem a parede celular do microrganismo. Estes grupamentos fazem parte da estrutura de suas biomoléculas, como, proteínas, lipídios e carboidratos (CRIST *et al.*, 1981). Os mecanismos responsáveis por estas interações metal/micro-organismos estão relacionados a três fenômenos, os

quais são: sorção, transformação e mineralização das espécies metálicas (BARKAY; SCHAEFER, 2001), estando inclusos a estes as ligações iônicas e a formação de complexos entre os cátions metálicos e seus ligantes (FOUREST; ROUX, 1992).

O termo sorção refere-se à ligação de um cátion metálico aos sítios de ligação que estão livres, por oposição à ligação a sítios previamente ocupados por outros cátions (DAVIS *et al.*, 2003). A sorção desempenha um papel fundamental para todos os tipos de interações metal-biomassa, podendo potencializar ou inibir o transporte dos metais e, conseqüentemente, a sua transformação e biomineralização (BARKAY; SCHAEFER, 2001).

As denominações dadas aos mecanismos ocorrentes para a acumulação de metais são as seguintes: i) quimiossorção por troca iônica, complexação, coordenação e quelação; ii) adsorção física envolvendo forças eletrostáticas; e iii) microprecipitação (VOLESKY, 2001). Existe ainda a possibilidade de ocorrer reações de oxidação-redução no biossorvente (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998) e dos íons serem aprisionados em seus capilares e no espaço contido na rede estrutural dos polissacarídeos (AHLUWALIA; GOYAL, 2007; DAVIS *et al.*, 2000; VOLESKY; HOLAN, 1995).

A estrutura do biossorvente é tida como complexa, podendo ser representada como uma rede extensiva de sítios heterogêneos que apresentam diferentes afinidades, forças e mecanismos de ligação (KOGES; PAVKO, 2001). Estes grupamentos são diferenciados de acordo com a natureza do biossorvente em que estão inseridos, dos quais se destacam os grupos: carboxil (-COOH), amino (-NH₂), tiol (-SH), fosfato (-PO₄³⁻), sulfato (-SO₄²⁻) e hidroxil (-OH) (GINISTY *et al.*, 1998; GOKSUNGUR *et al.*, 2005; SAG; AKTAY, 2002).

Vários estudos demonstram a importância dos grupos carboxílicos na biossorção de metais (DAVIS *et al.*, 2000; KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998; PALMIERI *et al.*, 2002; SAWALHA *et al.*, 2007). Também Davis *et al.* (2003) concluíram que a capacidade de adsorção das algas marrons está diretamente relacionada com a presença dos grupos carboxílicos. Estes são geralmente os grupos funcionais ácidos mais abundantes nestas algas, constituindo a maior percentagem de sítios tituláveis na biomassa desidratada (tipicamente superior a 70 %), verificando-se ainda, que a maior parte dos metais pesados estudados

apresenta sua capacidade de remoção máxima no pH próximo da constante de dissociação dos ácidos carboxílicos (pKa perto de 5).

Os grupamentos fosfatos contidos na camada lipídica da membrana celular (cabeça polar) também atuam como sítios de troca-iônica para os metais, contribuindo, desta forma, para o processo biossortivo. Estes sítios ligantes são encontrados principalmente nas glicoproteínas e, acredita-se que têm um papel importante na biossorção por terem carga negativa em $\text{pH} > 3$ (PALMIERI *et al.*, 2002).

Nas células fúngicas, os íons metálicos podem ligar-se aos grupamentos amino presentes na quitina ($\text{R}_2\text{-NH}$) e na quitosana (R-NH_2), sendo que, a quitina possui várias proteínas associadas, as quais contêm uma grande quantidade de grupos carboxílicos e aminos. O glutamato e a cisteína também apresentam um papel significativo na quelação de metais (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998; SAG; AKTAY, 2002).

No entanto, pouco se sabe sobre a real estrutura tecidual e a composição dos diferentes organismos utilizados como biossorbentes, sendo as características mencionadas dependentes das condições de cultivo empregadas, da escala de aplicação (industrial ou laboratorial), bem como a origem da coleta da espécie (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

Enquanto as propriedades das biomassas forem desconhecidas, suas chances de serem utilizadas como produtos competitivos em substituição as bem conhecidas resinas de troca-iônica ficam reduzidas, mesmo os seus custos deverão ser significativamente menores (FOUREST; ROUX, 1992).

Embora não haja dúvidas a respeito de que a parede celular microbiana é a principal estrutura responsável por seu comportamento biossortivo de metais (VOLESKY; HOLAN, 1995; WANG *et al.*, 2005), existe ainda uma gama de biomoléculas e organelas intracelulares que contribuem para a enorme diversidade de potenciais sítios de ligação a metais. A composição, estrutura e carga da parede, assim como a presença de materiais poliméricos extracelulares são fatores que devem ser considerados (BLACKWELL *et al.*, 1995).

Inerente a complexidade apresentada por estes biomateriais, é possível que vários destes mecanismos ocorram simultaneamente em graus que

dependerão do bioissorvente em questão e das condições ambientais da solução (VOLESKY, 2001).

O conhecimento acerca da estruturação química do bioissorvente é essencial para modelar e prever o seu desempenho na remoção de metais nos sistemas de purificação de água. A eficácia global de retenção destes íons pela biomassa também depende da faixa de concentração do metal empregada, o pH da solução, o tempo de reação, desenho do equipamento de sorção e a composição do efluente tratado (FOUREST; ROUX, 1992).

Quando o intuito é maximizar a eficiência bioissorviva da biomassa, torna-se imprescindível a identificação de seus grupos funcionais que apresentam capacidade de ligação (sítios de ligação) a metais, assim como, o mecanismo operante no processo deve ser elucidado, sendo estes pré-requisitos para a modelação da bioissorção (YUN; VOLESKY, 2003).

Algumas técnicas instrumentais sensíveis, como a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infra-vermelho, e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX), têm sido empregadas com o objetivo de investigar a ligação de metais a grupos funcionais específicos (PETHKAR *et al.*, 2001).

Apesar dos esforços dos investigadores não foi possível identificar o papel de um grupo funcional específico na ligação a metais, tal fato pode ser atribuído ao envolvimento de vários mecanismos de remoção em um mesmo microrganismo. Na maior parte das situações, a biomassa liga-se de uma forma não específica a diferentes metais, o que dificulta o estabelecimento do papel dos grupos funcionais (PETHKAR *et al.*, 2001).

Modificações na superfície química da biomassa podem originar variações na sua capacidade e afinidade de ligação a metais pesados. A inserção de grupos carboxil e etilenodiamino adicionais a parede celular do *Aspergillus niger*, resultou no incremento da capacidade bioissorviva do níquel de 70 mmol.kg⁻¹ para 1060 mmol.kg⁻¹ (GADD, 2000).

Apresentar elevada capacidade de remoção para os metais é um requisito exigido ao bioissorvente, podendo este ser alcançado pela manipulação das condições de cultura e aplicação de pré-tratamentos a este (SZE *et al.*, 1996). Os bioissorventes são preparados a partir de biomassas naturais e/ou que sejam residuais de algas, musgo, fungos ou bactérias. Estes,

posteriormente serão inativados e pré-tratados por lavagem com soluções ácidas e/ou básicas antes da aplicação (FIGUEIRA *et al.*, 2000).

Alguns tipos de biomassa têm que ser imobilizadas numa matriz de polímeros sintéticos e/ou inserida num material de suporte inorgânico como a sílica, de forma a produzir partículas com as propriedades mecânicas adequadas para poderem ser empacotadas em colunas de bioissorção, sendo esta a forma mais eficaz na remoção contínua de metais (FIGUEIRA *et al.*, 2000).

O tratamento com HClO_4 promove a dissolução dos polissacarídeos presentes na camada exterior da parede celular dos fungos, promovendo nestes novos grupamentos amina (YETIS *et al.*, 2000). Já quando, a biomassa é submetida ao tratamento com NaOH , ou outros reagentes alcalinos, apresenta um aumento na sua capacidade de adsorção para alguns metais, uma vez que os tratamentos cáusticos promovem a destruição de enzimas autolíticas, que levam a deterioração da biomassa, removendo assim, compostos que mascaravam os sítios reativos (VIANNA *et al.*, 2000).

Goksungur *et al.* (2005) compararam a capacidade de sorção de Cd^{2+} e Pb^{2+} por *Saccharomyces cerevisiae* desidratada, submetida a três pré-tratamentos: térmico, caustico e com etanol. Pode-se verificar em todos eles um aumento na capacidade de sorção aos metais, e dentre os tratamentos aplicados, aquele que fazia uso de etanol foi o proporcionou melhores resultados, o que pode ser explicado pelo aumento da disponibilidade de sítios de ligação.

Kapoor e Viraraghavan (1995) submeteram o fungo *Aspergillus niger* a diferentes tratamentos químicos para modificar os grupos funcionais responsáveis pela retenção de íons metálicos, os quais foram caracterizados por espectrometria de infra-vermelho. Grupos funcionais como carboxil, fosfato e amino foram considerados responsáveis pelo processo de bioissorção.

Em síntese, buscar um tratamento no bioissorvente que maximize sua eficiência bioissorvente, e a identificação dos grupos funcionais responsáveis por estas ligações com os metais, são duas etapas de suma importância no desenvolvimento de um processo bioissorvente. Uma vez que, as informações obtidas a partir destas determinações permitirão alterar a biomassa, com o propósito de aumentar sua capacidade de sorção e promover ligações seletivas

com certos metais de interesse. A identificação dos grupos funcionais permite, ainda, determinar os mecanismos envolvidos na ligação metal-biomassa (DRAKE *et al.*, 1996).

Neste contexto, o estudo da bio sorção de TRs utilizando a biomassa melanizada da linhagem MEL 1 do fungo *Aspergillus nidulans* apresenta um grande interesse biotecnológico, pois representa uma alternativa promissora que combina as vantagens de um processo eficiente para baixas concentrações de metal e com custo operacional menor do que os processos comumente utilizados para a recuperação/separação destes elementos que apresentam alto valor agregado e tecnológico.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de utilização da biomassa melanizada do fungo *Aspergillus nidulans*, na forma livre e imobilizada, no processo de bioissorção dos metais terras-raras neodímio, lantânio e cério. Para atingir o objetivo proposto fez-se necessário:

- a) Estabelecer as condições ótimas de cultivo da linhagem MEL 1 do fungo *Aspergillus nidulans*, visando à produção máxima de biomassa melanizada.
- b) Caracterizar a superfície química do bioissorvente a fim de determinar a importância de cada grupo ligante na sua capacidade bioisortiva.
- c) Construir, a partir de experimentos realizados em frascos agitados, as cinéticas de bioissorção para determinar o tempo de saturação dos sítios ligantes e as isotermas de equilíbrio para obter as capacidades máximas de bioissorção ($Q_{máx}$), bem como a afinidade da biomassa pelos metais Nd, La e Ce em soluções monometálicas.
- d) Determinar a capacidade de acúmulo das terras-raras acima mencionadas utilizando a biomassa melanizada imobilizada, comparando com a capacidade de sua forma livre.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Fungo

Neste trabalho utilizou-se uma linhagem melanizada (MEL 1) do fungo filamentososo *Aspergillus nidulans*, a qual se encontra estocada no Laboratório de Fungos Filamentosos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara (UNESP). O genótipo da linhagem MEL 1 é inoB2 melC1 e, os fenótipos de suas mutações, bem como os grupos de ligação, estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7. Mutações presentes na linhagem do *A. nidulans* utilizada neste trabalho.

Símbolo gênico	Grupo de ligação	Fenótipo
<i>inoB2</i>	IV	Auxotrofia para inositol
<i>melC1</i>	VII	Produção excessiva de pigmento melanina

3.1.2. Meio de cultura

O meio utilizado para o crescimento da linhagem MEL 1 do *A. nidulans* foi descrito por Cove (1966), sendo este denominado “Meio Mínimo”, o qual contém a seguinte composição:

Solução de Sais (descrita abaixo).....	10mL
Solução de Elementos Traços (descrita abaixo).....	1mL
Água destilada.....	1000mL

Após autoclavagem a 121,1°C (1kgf.cm⁻²), por 20 minutos, adicionava-se ao meio Inositol (0,02g/L), que se trata do requerimento nutricional específico para a linhagem utilizada, além de glicose (10g/L) e nitrato de sódio (6g/L), respectivamente, como fontes de carbono e nitrogênio. Para a preparação do Meio Mínimo sólido manteve-se a mesma composição já descrita, adicionando-se 1,5g de ágar a cada 100mL de meio, antes da autoclavagem.

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

Fosfato de potássio monobásico.....	14g
Fosfato de potássio bibásico.....	6,86g
Cloreto de potássio.....	1g
Sulfato de magnésio.....	1g
Água destilada até completar 100mL.	

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

Borato de sódio decahidratado.....	40mg
Sulfato de cobre pentahidratado.....	400mg
Sulfato de ferro heptahidratado.....	532mg
Sulfato de manganês monohidratado.....	292mg
Molibdato de sódio bihidratado.....	800mg
Sulfato de zinco heptahidratado.....	8mg
Água destilada até completar 100mL.	

3.1.3. Solução de metais

As soluções estoque de lantânio, neodímio e cério, na concentração de $0,80\text{g.L}^{-1}$, foram preparadas pela dissolução de seus cloretos hidratados (marca SIGMA).

Nos experimentos de biossorção, as soluções estoque foram diluídas para atingir as concentrações de $0,150\text{g.L}^{-1}$, $0,175\text{g.L}^{-1}$, $0,200\text{g.L}^{-1}$, $0,250\text{g.L}^{-1}$ e $0,300\text{g.L}^{-1}$, sendo o ajuste do pH em 5,70 feito pela adição de NaOH ou HCl, conforme necessário. O valor de pH utilizado nos ensaios foi determinado em estudos realizados preliminarmente em nosso laboratório.

3.2. Métodos

3.2.1. Estoque do fungo

Após crescimento em placas de Petri contendo “Meio Mínimo”, o fungo foi estocado à 4°C.

3.2.2. Preparo da suspensão de conídios para experimentos que não apresentavam hifas

Os conídios obtidos após o crescimento da linhagem em placas de Petri contendo “Meio Mínimo” foram coletados e acondicionados em solução salina – NaCl (0,85%), sendo em seguida filtrados em lã de vidro. O número de conídios por mililitro foi estimado utilizando-se contagem em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, conforme a equação (3).

$$\text{Nº conídios / mL} = n \times 5 \times \text{dil} \times 10^4 \quad (3)$$

Onde, **n** corresponde ao número de conídios contados em um campo contendo 16 divisões; **5** é o total de campos de contagem; **dil** é a diluição utilizada para realizar a contagem e **10⁴** corresponde ao volume da câmara, expressa em cm³.

3.2.3. Preparo da suspensão de conídios para experimentos que continham hifas

A obtenção desta suspensão de conídios foi análoga ao preparo anteriormente descrito (item 3.2.2), sendo que a única diferença foi a não realização da etapa de filtração em lã de vidro.

3.2.4. Crescimento da linhagem MEL 1 em frascos agitados

Independente do tratamento aplicado, o cultivo do fungo ocorreu em Meio Mínimo, pH 6,8 (contendo fontes de carbono e nitrogênio, assim como

o requerimento nutricional específico para a linhagem), sob agitação de 250rpm.

3.2.4.1. Tempo de cultivo

Com o propósito de estudar o tempo de crescimento necessário para a máxima produção de biomassa melanizada, a linhagem cresceu a temperatura de 37°C, variando de 3 a 7 dias, sendo este experimento realizado em Erlenmeyers com capacidade para 500mL, os quais continham 200mL de meio líquido, inoculados com 1.10^5 conídios/mL.

O prazo máximo de crescimento da linhagem (7 dias) baseou-se em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório, os quais mostraram que em um tempo maior de cultivo a cultura de células se encontrava em processo de autólise.

3.2.4.2. Composição do inoculo

Para determinar se a presença de conídios e conídios + hifas influenciavam a produção de biomassa melanizada, procedeu-se um experimento utilizando Erlenmeyers de 500mL, havendo nestes 200mL de Meio Mínimo líquido, os quais permaneceram por 7 dias, sob agitação. O inoculo utilizado em um dos tratamentos aplicados foi oriundo da suspensão resultante do item 3.2.2; já o outro contou com a suspensão proveniente do item 3.2.3.

3.2.4.3. Inoculação de micélios

Em 100mL de meio líquido inoculou-se o fungo pela adição de 5 quadrados de meio sólido, os quais continham micélios em suas superfícies e apresentavam uma dimensão de 5mm^2 . Foram utilizados neste tratamento Erlenmeyers com capacidade para 500mL, os quais permaneceram sob agitação, por 7 dias, a 37°C.

3.2.4.4. Inoculação de hifas e conídios

O fungo foi crescido em tubos de ensaios ao invés das placas de Petri comumente utilizadas. Após 7 dias adicionou-se solução salina aos tubos e, em seguida, estes foram agitados no Vortex. A solução resultante foi vertida em Erlenmeyers de 500mL contendo 200mL de Meio Mínimo líquido e, cada tubo de ensaio originou um frasco, cuja suspensão de conídios não foi filtrada. Estes permaneceram 7 dias sob agitação, a 37°C.

Para determinar a quantidade ideal de conídios a ser inoculada no meio líquido de cultura, visando obter a produtividade máxima de biomassa melanizada, foram investigadas as concentrações de 1.10^5 e 1.10^6 conídios/mL. Os conídios foram adicionados em 200mL de meio de cultura, os quais se encontravam em Erlenmeyers de 500mL, sendo que estes foram mantidos sob agitação, por 7 dias, a 37°C.

3.2.4.5. Volume do meio de cultura

Com o intuito de verificar qual volume de meio proporcionaria uma maior quantidade de biomassa melanizada, cultivou-se 1.10^6 conídios/mL da linhagem MEL 1 em 200mL, 400mL e 800mL de meio líquido de cultura, estando estes contidos, respectivamente, em Erlenmeyers com capacidades para 500mL, 1000mL e 2000mL. Estes permaneceram em agitação por 7 dias, a temperatura de 37°C.

3.2.4.6. Temperatura de crescimento

A influência da temperatura fornecida ao crescimento do fungo, frente à produtividade de sua biomassa pigmentada, foi estudada pela realização de experimentos em que se procedeu a inoculação de 1.10^6 conídios/mL em 200mL de meio líquido de cultura. Os sete dias de permanência dos frascos sob agitação foram à temperatura ambiente (~ 28°C) ou a 37°C.

3.2.4.7. Suplementação do meio com água de maceração de milho

A água de maceração de milho (AMM) se trata de um subproduto obtido da moagem do milho, que possui grandes quantidades de nitrogênio e sais minerais e, a utilizada neste trabalho foi cedida pela indústria Corn Products Brazil – Ingredientes Industriais LTDA, situada na cidade de Balsa Nova, Paraná.

A AMM foi previamente filtrada em bomba de vácuo para a remoção de resíduos, esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121,1°C e adicionada, nas concentrações de 2mL/L e/ou 20mL/L, em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L).

3.2.4.8. Diferentes formas de cultivo do fungo

Para verificar se a forma de cultivo do fungo influenciava na quantidade obtida de biomassa pigmentada, procedeu-se um novo planejamento experimental, estando os tratamentos efetuados sumarizados a seguir:

37°C: Neste tratamento não se utilizou AMM na suplementação do meio. Em Erlenmeyers de 500mL, contendo 200mL de meio líquido de cultura, foram inoculados com 1.10^6 conídios/mL e permaneceram sob agitação por 7 dias a temperatura de 37°C.

0,2% de AMM, 28°C: Em Erlenmeyer de 500mL, contendo 200mL de Meio Mínimo líquido de cultura, o qual teve AMM na concentração de 2mL/L (0,2%) como adicional a suplementação básica para o desenvolvimento da linhagem estudada, houve a inoculação de 1.10^6 conídios/mL. Os frascos resultantes deste tratamento foram mantidos em agitação por um período de 7 dias à temperatura ambiente (~ 28°C).

0,2% de AMM, 37°C: Este tratamento foi efetuado de maneira idêntica ao anterior, com exceção da temperatura de incubação, a qual foi mantida a 37°C.

Pré-cultura: Nesta forma de cultivo, o fungo foi crescido, por três dias sob agitação, em 200mL de Meio Mínimo líquido de cultura que fora suplementado da seguinte forma: 10g/L de glicose, 6g/L de nitrato de sódio, 0,02g/L de Inositol e 20mL/L de AMM. A massa micelial obtida foi separada do meio por centrifugação, lavada três vezes com água destilada e, em uma segunda estância, inoculada em 200mL de Meio Mínimo líquido, com a seguinte suplementação: 1,3g/L de glicose, 1,5g/L de nitrato de sódio, 0,02g/L de Inositol e 2mL/L de AMM, permanecendo por mais 4 dias, em agitação. A temperatura de incubação foi de 37°C em todo o experimento.

3.2.5. Avaliação do crescimento

A avaliação do crescimento do fungo foi realizada pela determinação de sua massa seca, a qual foi obtida após a secagem da biomassa celular em estufa, a 70°C, até que seu peso se mantivesse constante.

A experimentação foi cega, de modo que as pesagens da biomassa e do pigmento obtido, pelos diferentes tratamentos, foram procedidas sem que o pesquisador soubesse de qual tratamento provinha.

3.2.6. Quantificação do pigmento melanina

Para quantificar a produção de pigmento fez-se necessário promover sua extração total da biomassa. Com este fim, utilizou-se o método descrito por Suryanarayanan *et al.* (2004), em que houve a adição de NaOH 1 mol.L⁻¹, seguida de autoclavagem a 121,1°C, por 20 minutos. Este procedimento foi repetido até que não fosse mais observada a coloração escura na massa micelial.

A quantidade de pigmento extraído foi expressa em grama (g) de pigmento por grama (g) de biomassa.

3.2.7. Avaliação da capacidade bioSORTIVA da biomassa

Os experimentos de bioSORÇÃO foram desenvolvidos em Erlenmeyers com capacidade para 500mL; nestes continham 0,4g de biomassa inativa e 100mL de soluções monometálicas das TRs, na concentração de 0,80g.L⁻¹, sob agitação de 250rpm, por 90 minutos, à temperatura de 37°C.

Em seguida, procedeu-se a filtração das massas miceliais e a quantidade de metal remanescente na solução era determinada por titulação complexométrica com solução padrão de EDTA 0,01mol.L⁻¹ (Imbralab®). Esta quantificação foi realizada com a adição de 25mL de tampão acetato/ácido acético 0,1mol.L⁻¹ (pH 5,70) e 3 gotas do indicador alaranjado de xilenol em 5mL da amostra.

3.2.8. Análise de variância

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), para avaliar se houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados.

Adotou-se o nível de significância $p \leq 0,05$.

3.2.9. Estudo da superfície química do bioSORVENTE

Em uma primeira instância foram realizados ensaios de bioSORÇÃO para as três TRs sob análise, sendo estes denominados controles, uma vez que o bioSORVENTE empregado não havia recebido nenhum tratamento.

As soluções resultantes dos tratamentos efetuados (descritos nos subitens abaixo) foram filtradas em bomba de vácuo e as biomassas remanescentes foram deixadas em estufa por 8 horas, a 70°C, para que as mesmas fossem secas e inativadas. Posteriormente, os experimentos de bioSORÇÃO para Nd, La e Ce foram procedidos, utilizando como bioSORVENTE as biomassas provenientes destes ensaios.

3.2.9.1. Metilação dos grupos aminas

O procedimento foi realizado como descrito por KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1997: Em um grama (1g) do biossorvente seco foi adicionado 20mL de formaldeído e 40mL de ácido fórmico, estando este sistema contido em um Erlenmeyer de 500mL. Este foi deixado no agitador rotacional por 5 horas, a 37°C, em uma velocidade de 150rpm.

3.2.9.2. Esterificação dos grupos carboxílicos

O procedimento foi realizado como descrito por DRAKE *et al.*, 1996: Um grama (1g) da biomassa seca foi suspensa em 65mL de etanol e 0,6mL de ácido hidrocloreídrico. A mistura resultante estava contida em um Erlenmeyer de 500mL, o qual permaneceu agitando por 5 horas, a temperatura de 37°C, em um agitador rotacional a 150rpm.

3.2.9.3. Extração de lipídios

O procedimento foi realizado como descrito por KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1997: Adicionou-se um grama (1g) da biomassa seca em 75mL de benzeno e esta mistura permaneceu em condição de refluxo por 6 horas.

3.2.10. Concentração de biomassa para o processo biossortivo

Utilizou-se 0,1g, 0,2g, 0,3g e 0,4g da biomassa (melanizada e inativa) da linhagem MEL 1, as quais foram incubadas em 100mL da solução de neodímio, na concentração de 0,80g.L⁻¹, sob agitação de 250rpm. Após 90 minutos, tempo necessário para que o sistema atingisse o equilíbrio, o qual foi determinado nos ensaios de cinética de biossorção, uma alíquota foi coletada, filtrada e a concentração residual de metal foi determinada por titulação complexométrica com EDTA padronizado.

3.2.11. Cinética do processo biossorbitivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa da linhagem MEL 1 do *A. nidulans* na sua forma livre

Estes experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 200mL, contendo 0,4g de biomassa melanizada inativa e 100mL da solução de neodímio, lantânio ou cério (na concentração de 0,80g.L⁻¹, pH 5,70) incubados a 37°C, sob agitação (250rpm) em uma mesa agitadora orbital refrigerada, modelo MA 830, MARCONI.

Nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, retiravam-se alíquotas de 5mL da solução, as quais eram provenientes de diferentes frascos, sendo posteriormente filtradas para a determinação da concentração residual de metal na fase líquida por titulação complexométrica com EDTA (GUENTHER, 1972). Neste procedimento, a alíquota do filtrado foi adicionada a 25mL de tampão acetato/ácido acético 0,1mol.L⁻¹, pH 5,70 e 3 gotas do indicador alaranjado de xilenol; em seguida, iniciou-se a titulação com uma solução padronizada de EDTA 0,01mol.L⁻¹. Paralelamente, foram realizados dois ensaios controle nas mesmas condições acima, sendo um contendo metal, sem biomassa e o outro contendo biomassa, exceto metal. Cada experimento foi realizado em triplicata.

A capacidade de biossorção (**Q**) é calculada pela equação 4:

$$Q = \frac{(C_o - C_f) \cdot V}{m} \quad (4)$$

Onde, **C_o** é a concentração inicial do metal (g.L⁻¹); **C_f** é a concentração final do metal no tempo da coleta (g.L⁻¹); **V** é o volume da solução (L) e **m** é a massa do biossorvente (g). O valor de **Q** é expresso em miligrama de metal/grama de biomassa (mg.g⁻¹).

3.2.12. Isotermas de bioissorção para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa da linhagem MEL 1 do *A. nidulans* na sua forma livre

Os ensaios realizados para a confecção das isotermas de bioissorção ocorreram em Erlenmeyers de 200mL contendo 0,4g de biomassa melanizada inativa e 100mL da solução de neodímio, lantânio ou cério, nas seguintes concentrações iniciais: 0,150g.L⁻¹, 0,175g.L⁻¹, 0,200g.L⁻¹, 0,250g.L⁻¹ e 0,300g.L⁻¹, com pH ajustado em 5,70. Após 90 minutos sob agitação, tempo este necessário para atingir a saturação, conforme previamente determinado pelas cinéticas de bioissorção, uma alíquota de 5mL foi coletada, filtrada e determinada à concentração de metal por titulação complexométrica com EDTA (GUENTHER, 1972).

Neste procedimento, em uma alíquota de 5mL do filtrado foi adicionada 25mL de tampão acetato/ácido acético 0,1mol.L⁻¹, pH 5,70 e 3 gotas do indicador alaranjado de xilenol e, em seguida, iniciou-se a titulação com uma solução padronizada de EDTA 0,01mol.L⁻¹. Paralelamente foram realizados dois ensaios controles nas mesmas condições acima: um contendo metal, sem biomassa e, o outro, contendo biomassa, exceto metal. Cada experimento foi realizado em triplicata.

As isotermas foram construídas pela representação gráfica da concentração de metal no equilíbrio (C_{eq}) versus os valores da capacidade de bioissorção no equilíbrio (Q_{eq}). Pela análise da regressão linear das isotermas foi possível determinar a capacidade máxima de adsorção do metal pela biomassa ($Q_{máx}$) e a afinidade entre os sítios de ligação presentes na biomassa e o íon metálico (b), de acordo com o modelo de Langmuir (equação 5):

$$Q_{eq} = \frac{Q_{máx} \cdot b \cdot C_{eq}}{1 + b \cdot C_{eq}} \quad (5)$$

Onde, Q_{eq} é a capacidade bioissorçiva da biomassa no equilíbrio ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), a qual representa a quantidade de metal acumulado por unidade de biomassa; $Q_{máx}$ é a capacidade máxima de bioissorção da biomassa ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), alcançada quando seus sítios ligantes estão saturados pelo metal; b é a

constante que representa a afinidade entre a biomassa e o metal ($L.g^{-1}$) e, C_{eq} é a concentração de metal após atingir o equilíbrio ($g.L^{-1}$).

3.2.13. Imobilização da biomassa melanizada da linhagem MEL 1

O suporte escolhido para os ensaios de bio sorção utilizando-se a biomassa imobilizada foi o polímero alginato de cálcio. Para proceder a imobilização, macerou-se 1g de biomassa seca até que um pó fino fosse obtido (Figura 9).



Figura 9. Aspecto da biomassa melanizada da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans*, após inativação em estufa a 70°C e maceração.

Em seguida, a biomassa foi homogeneizada em 30mL de solução de alginato de sódio 2,5%, sendo esta mistura então gotejada, com pipeta Pasteur, em uma solução de $CaCl_2$ 0,25mol.L⁻¹, a qual era mantida sob suave agitação, para que os pellets fossem formados (Figura 10).

Os pellets foram mantidos em $CaCl_2$ 0,25mol.L⁻¹ por aproximadamente 1 hora, para que ficassem mais rígidos e, tornando-se assim, mais resistentes. Após a cura dos pellets, estes foram filtrados e lavados 3 vezes com água esterilizada.

O armazenamento foi feito a 4°C em água esterilizada contendo antibiótico, para evitar o ressecamento e uma possível contaminação.



Figura 10. Aspecto dos pellets de biomassa melanizada da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans*, imobilizada em alginato de cálcio.

O procedimento de imobilização anteriormente descrito (item 3.2.11) foi realizado, porém, sem a presença de biomassa melanizada, para que houvesse a formação dos pellets de controle (Figura 11). Tal ação possibilitou a determinação da contribuição deste polímero na capacidade biossortiva apresentada pela biomassa imobilizada.

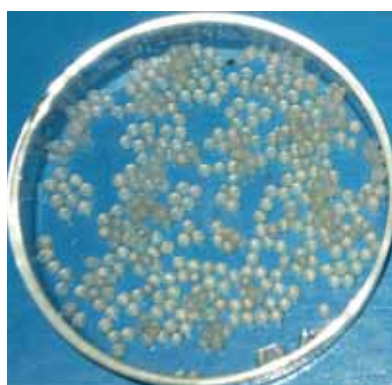


Figura 11. Aspecto da matriz de imobilização (alginato de cálcio)

3.2.14. Obtenção do peso das esferas de alginato de cálcio contendo biomassa imobilizada e o peso das células livres da referida linhagem

As medidas de peso foram realizadas para se verificar o quanto de biomassa se encontrava imobilizada em cada esfera de alginato de cálcio e assim, correlacionar os pesos das células livres com o número de esferas contendo a quantidade de biomassa imobilizada equivalente, possibilitando

com isso, a realização de comparativos de remoção dos metais por células livres e por células imobilizadas.

3.2.15. Cinética do processo biossorbitivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa imobilizada da linhagem MEL 1 do *A. nidulans*

Estes experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 200mL, contendo a quantidade de pellets correspondente a 0,4g de biomassa melanizada inativa e 100mL da solução de neodímio, lantânio ou cério (na concentração de $0,80\text{g.L}^{-1}$, pH 5,70), incubados a 37°C , sob agitação de 250rpm em uma mesa agitadora orbital refrigerada, modelo MA 830, MARCONI.

Nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos retiravam-se alíquotas da solução, as quais foram filtradas para a determinação da concentração residual de metal na fase líquida por titulação complexométrica com EDTA (GUENTHER, 1972). Neste procedimento, em uma alíquota de 5mL do filtrado foi adicionado 25mL de tampão acetato/ácido acético $0,1\text{mol.L}^{-1}$ pH 5,70 e 3 gotas do indicador alaranjado de xilenol e, em seguida, iniciou-se a titulação com uma solução padronizada de EDTA $0,01\text{mol.L}^{-1}$. Paralelamente, foram realizados dois ensaios controle nas mesmas condições acima: um contendo metal, sem biomassa imobilizada e, o outro, contendo o suporte com metal. Cada experimento foi realizado em triplicata.

A capacidade de biossorção (Q) foi calculada pela equação 4.

3.2.16. Isotermas de biossorção para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa imobilizada da linhagem MEL 1 do *A. nidulans*

Os ensaios para a construção das isothermas de biossorção foram realizados em Erlenmeyers de 200mL, contendo a quantidade de pellets correspondente a 0,4g de biomassa melanizada inativa e 100mL da solução de neodímio, lantânio ou cério, nas seguintes concentrações iniciais: $0,150\text{g.L}^{-1}$, $0,175\text{g.L}^{-1}$, $0,200\text{g.L}^{-1}$, $0,250\text{g.L}^{-1}$ e $0,300\text{g.L}^{-1}$, com pH ajustado em 5,70. Após

90 minutos sob agitação (tempo necessário para atingir a saturação dos sítios), uma alíquota de 5mL foi coletada, filtrada e determinada à concentração de metal por titulação complexométrica com EDTA (GUENTHER, 1972). Neste procedimento, em 5mL do filtrado foi adicionado 25mL de tampão acetato/ácido acético $0,1\text{mol.L}^{-1}$ pH 5,70 e 3 gotas do indicador alaranjado de xilenol e, em seguida, iniciou-se a titulação com uma solução padrão de EDTA $0,01\text{mol.L}^{-1}$. Paralelamente foram realizados dois ensaios controles nas mesmas condições acima: um contendo metal, sem biomassa imobilizada e, o outro, contendo suporte com o metal. Cada experimento foi realizado em triplicata.

As isotermas foram construídas pela representação gráfica da concentração de metal no equilíbrio (C_{eq}) versus os valores da capacidade de biossorção no equilíbrio (Q_{eq}). Pela análise da regressão linear das isotermas foi possível determinar a capacidade máxima de adsorção do metal pela biomassa ($Q_{m\acute{a}x}$) e a afinidade entre os sítios de ligação presentes na biomassa e o íon metálico (b), de acordo com o modelo de Langmuir, já apresentado anteriormente (Equação 5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise das capacidades bioassortivas de diferentes espécies de fungos para Nd e La

A eficiência do processo bioassortivo pode variar consideravelmente entre as espécies de fungos, uma vez que a capacidade de adsorver metais depende diretamente dos grupos funcionais presentes na superfície celular do microorganismo e, também, das diferentes afinidades existentes entre estes grupamentos e os diversos íons metálicos (MURALEEDHARAN *et al.*, 1991).

Desta forma, pôde-se determinar qual o fungo que apresenta maior potencial de remoção das TRs presentes em solução aquosa. Para isto, se realizou ensaios de bioassorção, usando a biomassa melanizada (inativa) da linhagem MEL 1 do fungo *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), a fim de determinar suas capacidades bioassortivas para os metais TRs acima mencionados. Pelos resultados obtidos foi possível realizar uma comparação com os dados referentes a um estudo preliminar realizado em nosso laboratório, que utilizou como bioassorventes as espécies dos fungos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus*, *Chrysosporium* sp., *Cladosporium* sp. e *Rhizopus* sp. (CAPORALIN *et al.*, 2007). Os resultados estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8. Capacidades bioassortivas (Q) de diferentes espécies fúngicas para La e Nd (concentração inicial 0,80g.L⁻¹), em pH 5,70 a 37°C.

Espécie de fungo	Q (mg.g ⁻¹)	
	La	Nd
<i>A. alternata</i>	42	38
<i>A. versicolor</i>	52	44
<i>A. terreus</i>	37	43
<i>Chrysosporium</i> sp.	55	37
<i>Cladosporium</i> sp.	31	31
<i>Rhizopus</i> sp.	41	33
<i>A. nidulans</i> (MEL 1)	59	52

Como se pode notar, os resultados acima corroboram o anteriormente descrito, uma vez que se obtiveram diferentes capacidades de bioassorção tanto para os metais, considerando uma mesma espécie, quanto entre os diferentes fungos analisados. Esta constatação é bastante evidente quando se comparam

os resultados obtidos para as três diferentes espécies do gênero *Aspergillus* estudadas, sendo que, as maiores capacidades de ligação das TRs foram com a linhagem mutante MEL 1 do *A. nidulans*.

A produção expressiva de pigmento do tipo melanina pela linhagem MEL 1, resultante da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos, pode explicar sua maior capacidade bioassortiva frente às demais espécies analisadas, uma vez que a biomassa melanizada tem uma maior quantidade de sítios ligantes aos metais, os quais são, principalmente, os grupos: carboxilas, fenólicos, hidroxilas e aminas, presentes na estrutura do pigmento, potencializando, desta forma, a capacidade de ligação metal-biomassa (FORGATY; TOBIN, 1996).

Na literatura encontram-se alguns trabalhos que reafirmam a importância de pigmentos, tais como a melanina, para uma maior interação da biomassa com metais. Siegel *et al.*, 1990, observaram que a capacidade bioassortiva do fungo *Cladosporium cladosporoides* para Ni, Cu, Zn, Cd e Pb foi 2,5 a 4 vezes maior que no 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), que não está pigmentada, apresenta apenas 34% da taxa de adsorção de Cd observada para a biomassa melanizada, obtida após 4 dias de crescimento.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, para a linhagem melanizada inativa de *A. nidulans*, mostraram que a bioassorção de Nd e La variou em função do estágio de crescimento do fungo, sendo que a biomassa de 72 horas apresentou um aumento significativo na capacidade de bioassorção (em torno de 75%) comparado com a biomassa de 48 horas. Este resultado deve-se à produção de pigmento ocorrer 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).

Portanto, em função dos resultados obtidos, a linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans* foi selecionada para estudos posteriores.

4.2. Otimização das condições de cultivo do fungo *A. nidulans* para a produção de biomassa melanizada

A compreensão minuciosa de como os fungos crescem e os diversos fatores que afetam seu metabolismo, é de suma importância, não apenas quando considerados os aspectos industriais, mas também, para os estudos de regulação do metabolismo e mecanismos de expressão gênica (PRETTI, 2009).

Diversos estudos têm evidenciado que a produção de pigmento pelos micro-organismos é afetada por suas condições de cultivo, podendo ser estas: a composição do meio de cultura, concentração hidrogênionica, quantidade de nutrientes e outros parâmetros, como por exemplo: agitação, taxa de diluição e temperatura (GRIFFIN, 1994).

Assim sendo, um dos objetivos deste trabalho foi estudar a influência das condições fornecidas para o cultivo da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans*, com relação às produtividades de biomassa e do pigmento melanina. Para isto, se realizou experimentos em que diversos fatores foram testados, sendo estes: tempo de crescimento, composição do inóculo, concentração de conídios, volume do meio de cultura, temperatura de incubação e, por fim, a utilização de resíduo agroindustrial como fonte de nutrientes.

4.2.1 Tempo de cultivo

O estágio em que o micro-organismo se encontra dentro do seu ciclo de vida é um fator que influencia na produção do pigmento melanina. Quando o fungo está na fase de crescimento exponencial, este apresenta um aumento de sua massa micelial, deixando o meio de cultura mais viscoso o que impede que ocorra uma aeração satisfatória no mesmo. Conforme o micro-organismo passa para a fase estacionária, esta viscosidade diminui, acarretando em uma maior aeração, e conseqüentemente aumenta a produção de pigmento. Já, quando o fungo entra na fase de declínio, nas células passam há ocorrer o processo de autólise, o qual libera as melaninas intracelulares para o meio (SINHA *et al.*, 2001).

Com o propósito de estudar a influência do tempo de crescimento do *A. nidulans* frente a sua capacidade biossorbitiva para neodímio, se procedeu experimentos em que o fungo permaneceu sob agitação de 3 a 7 dias, visando, desta forma, otimizar o tempo de cultivo em que a biomassa apresentasse uma maior quantidade de sítios ligantes disponíveis em sua superfície, para a ligação com o metal. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Capacidades biossorbitivas (Q) para Nd (concentração inicial 0,80g.L⁻¹) das biomassas obtidas ao variar o tempo de incubação de 3 a 7 dias, havendo o cultivo de 1.10⁵conídios/mL em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), em pH 5,70 a 37°C.

Tempo de incubação (dias)	Q (mg.g ⁻¹)
3	36,06
4	43,30
5	43,30
6	50,50
7	52,30

Como pôde ser observado, a biomassa com 7 dias de incubação apresentou a maior capacidade de biossorção para Nd, pois como já dito anteriormente, à produção do pigmento ocorre em função do tempo de cultivo do micro-organismo, sendo assim, a massa micelial que permaneceu sob agitação por um longo período, provavelmente, apresentou uma pigmentação mais intensa, proporcionando a esta a maior capacidade biossorbitiva.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos preliminares realizados em nosso laboratório, em que a biomassa com 10 dias de cultivo, que estava em processo de autólise, apresentou uma produção de pigmento superior àquela de 5 dias, devido, provavelmente, a este processo promover a liberação de substâncias intracelulares ao meio, incluindo compostos fenólicos ou indólicos, os quais atuam como precursores na síntese do pigmento melanina. Porém, a produção de biomassa é afetada negativamente pelo tempo de incubação, havendo, com o passar do tempo, uma diminuição no tamanho dos pellets formados, tendo um comportamento inverso a de sua pigmentação (PRETTI, 2009).

Sendo assim, o prazo de incubação foi determinado como 7 dias, uma vez que esta condição proporcionou uma melanização mais intensa na biomassa.

Na literatura encontram-se outros trabalhos que relatam a influência do tempo de cultivo do micro-organismo sobre a produção de seus metabólitos secundários. Sinha *et al.* (2001), observaram que os pellets do fungo *Paecilomyces japonica* entraram em autólise após sete dias de cultivo, o que teria facilitado a secreção de exopolímeros ao meio, aumentando, assim, sua produção ao final da fase estacionária.

Mudanças na composição da parede celular em função do crescimento do micro-organismo, também é um fator que pode explicar o resultado anteriormente apresentado (ANDRÈS *et al.*, 2000). De modo que, a biomassa obtida após sete dias de cultivo, provavelmente apresentou uma maior quantidade de grupamentos funcionais em sua estrutura, fato este que teria potencializado sua capacidade de remover metais.

4.2.2. Composição do inoculo

Após determinar o tempo de cultivo como 7 dias (item 4.2.1), o próximo fator que foi investigado está relacionado com a composição do inoculo que deveria ser utilizado no cultivo da linhagem MEL 1 do *A. nidulans*, visando, desta forma, selecionar a condição ideal da suspensão de conídios (com ou sem hifas) que proporcionaria uma maior produção de biomassa melanizada.

Com este propósito, se verificou a necessidade da suspensão passar pela etapa de filtração em lã de vidro, antes de ser inoculada no meio de cultura. Possibilitando observar, se a presença de hifas, as quais são removidas por filtração, interfere nas produções de biomassa e do pigmento formado (Figura 12).

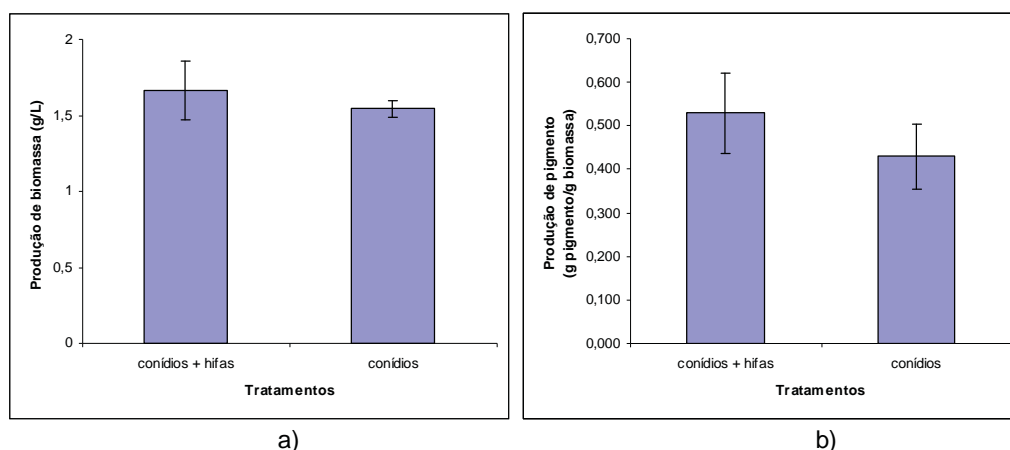


Figura 12. Efeito da composição do inoculo nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), sob agitação por 7 dias, a 37°C.

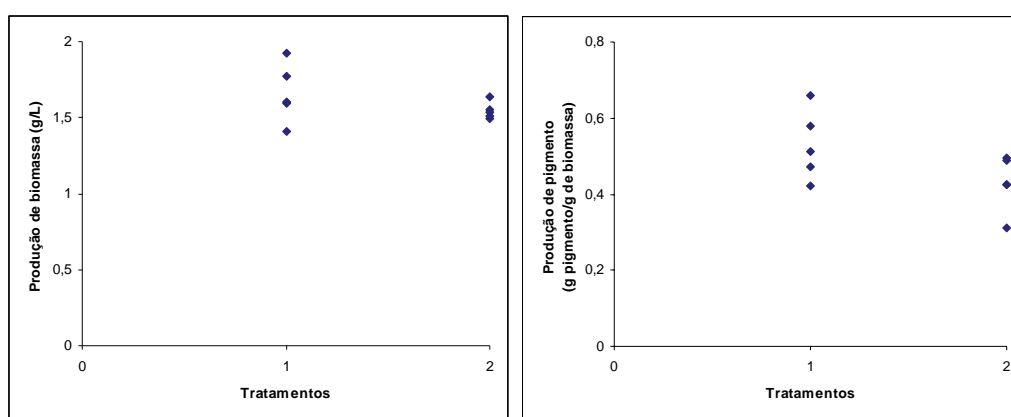
Pela análise da figura apresentada pôde-se notar que, aparentemente, quando o fungo foi inoculado a partir de uma suspensão contendo conídios e hifas em sua composição, este apresentou um maior crescimento de sua massa micelial, assim como uma maior pigmentação.

O resultado da análise de variância (ANEXO 1) mostrou que, em relação à produção de biomassa, a constatação anteriormente obtida estava equivocada, já que o p-valor encontrado (0,23335) é maior que o nível de significância do teste estatístico aplicado (0,05). Aceitando-se a hipótese de nulidade existente entre as médias dos diferentes tratamentos experimentados. Então, com 95% de confiabilidade, se pode afirmar que a produção de biomassa pela linhagem MEL 1, independe se sua suspensão passou ou não pela etapa de filtração, antes de ser inoculada no meio de cultura. Levando-nos a concluir que a presença de hifas não interfere nesta produção.

Porém, quanto à formação de pigmento, a análise de variância (ANEXO 2) comprovou que a conclusão retirada da Figura 12 estava correta, uma vez que o p-valor calculado (0,02441) é inferior ao nível de significância do teste (0,05). Levando-nos a concluir que ao não proceder à filtração da suspensão, antes desta ser inoculada em meio líquido, ocorre um aumento na quantidade produzida de pigmento. Sendo assim, a presença de hifas na

suspensão de conídios influência positivamente na taxa de pigmentação obtida pela biomassa.

Para visualizar como todos os dados se comportavam nas diferentes formas do inoculo, foram feitos os gráficos de produções das variáveis sob análise em função dos tratamentos aplicados (Figura 13). Com eles foi possível perceber que o tratamento em que a suspensão continha hifas juntamente com os conídios apresentou uma maior variabilidade em seus dados com relação à média (desvio padrão).



Nota. Tratamento 1: conídios + hifas, Tratamento 2: conídios

a)

b)

Figura 13. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou à composição do inoculo.

Com o intuito de verificar a eficiência na remoção metálica das biomassas produzidas nas diferentes condições foram determinadas as capacidades biossorbitivas de ambas para Nd (Tabela 10). Os resultados obtidos são coerentes, uma vez que o biossorbente que apresentou a maior capacidade biossorbitiva foi aquele com maior pigmentação em sua parede celular, sugerindo que havia mais grupamentos químicos disponíveis para a ligação com o metal.

Entre os tratamentos aplicados, o que se mostrou mais eficiente foi aquele que continha hifas juntamente com a suspensão de conídios, já que este proporcionou uma pigmentação mais intensa em sua biomassa, acarretando a esta uma maior capacidade de se ligar a metais presentes em

solução aquosa. Porém, um inconveniente deste tratamento é que ele não tem uma boa reprodutibilidade, já que se teve uma grande dispersão entre seus dados obtidos (Figura 13).

Tabela 10. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção (Q) para Nd (concentração inicial de $0,80\text{g.L}^{-1}$) obtidas pelos tratamentos em que se variou a composição do inoculo.

Composição do inoculo	Produção de pigmento (g pigmento/g biomassa)	Q (mg.g^{-1})
conídios + hifas	$0,529\pm 0,092$	39,70
conídios	$0,429\pm 0,074$	29,75

4.2.3. Inoculação de micélios

Como observado anteriormente (4.2.2) que a presença de hifas poderia acarretar em uma maior taxa de pigmentação na biomassa obtida, foi delineado este tratamento que propunha facilitar o processo de inoculação, tornando este mais dinâmico. O mesmo seria realizado pela adição de quadrados de micélio ao meio líquido de cultura, evitando assim, a necessidade de preparar a suspensão inoculante. Porém, este método foi ineficiente para o crescimento da linhagem MEL 1, uma vez que não houve desenvolvimento de biomassa, mesmo depois dos sete dias de agitação.

4.2.4. Influência de hifas

O novo tratamento proposto foi realizado por meio da inoculação por fungo crescido em tubo de ensaio, tendo por objetivo confirmar a influência de conídios + hifas na produção de biomassa mais melanizada e que esta apresentasse certa constância, sendo assim, um método reprodutível.

O delineamento desta metodologia foi uma tentativa de adequar um protocolo que facilitaria a inoculação da linhagem MEL 1, no que diz respeito aos aspectos industriais, uma vez que não seria procedida a contagem dos esporos, nem a etapa de filtração da suspensão de conídios em lâ de vidro, tornando este processo mais barato e dinâmico.

O intuito deste experimento foi comprovar que a presença de hifas, como já visto anteriormente, assim como a concentração de conídios no meio de cultivo, são dois parâmetros que interferem na produção de biomassa melanizada. Para isto, as suspensões de esporos e hifas, que originaram cada frasco, tiveram suas concentrações quantificadas pela Câmara de Neubauer. Os resultados de suas contagens, produções de biomassa e do pigmento melanina estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração de conídios, crescimento de biomassa e produção do pigmento melanina obtidos pelo tratamento em que a inoculação do fungo se deu em tubos de ensaio.

Tubos de ensaio	Concentração de conídios/mL	Crescimento de biomassa (g.L ⁻¹)	Produção de melanina (g pigmento/g biomassa)
1	1,500.10 ^b	0,675	0,200
2	4,500.10 ^b	0,765	0,205
3	5,100.10 ^b	0,830	0,270
4	1,125.10 ^f	0,695	0,355
5	1,200.10 ^f	1,155	0,465

As biomassas obtidas foram removidas dos meios que as continham para possibilitar a extração e quantificação da melanina extracelular formada pelas diferentes concentrações de esporos e hifas inoculadas (Figura 14).

Como pode ser observado na Figura 14, os frascos que continham maiores concentrações de esporos e hifas, os quais eram provenientes dos tubos 4 e 5, visualmente apresentaram uma pigmentação mais intensa nos seus meios. Assim sendo, os resultados por hora obtidos, demonstraram que possivelmente há uma relação diretamente proporcional entre a concentração de conídios inoculada e a pigmentação obtida por sua biomassa, e também que a presença das hifas proporcionou um efeito positivo na melanização dos meios.

Para se obter a covalidação destas conclusões previamente observadas, os resultados originados a partir da inoculação por fungo crescido em tubo de ensaio foram confrontados com os dados provenientes do tratamento em que a suspensão continha somente conídios em sua composição, que já fora apresentado anteriormente (item 4.2.2).



Figura 14. Melanizações obtidas nos meios pelas diferentes concentrações de conídios + hifas inoculadas.

A análise dos gráficos de coluna das médias dos tratamentos efetuados (Figura 15) mostrou que a inoculação por fungo crescido em tubo de ensaio proporcionou uma produção inferior tanto de biomassa, quanto de pigmento. Levando-nos a concluir o inverso do que havia sido proposto no item 4.2.2, de forma que a presença de hifas, aparentemente, provocou um efeito negativo na quantidade obtida de biomassa melanizada.

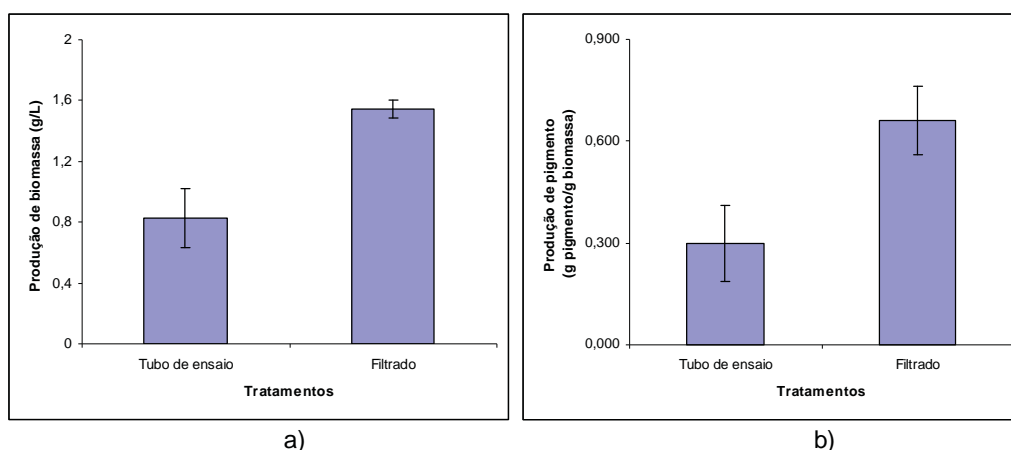


Figura 15. Efeito da forma de inoculação nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), sob agitação por 7 dias, a 37°C.

As análises de variância dos dados obtidos (ANEXOS 3 e 4), de ambas as produções em questão, confirmaram o que havia sido notado anteriormente. Nos dois casos, como os p-valores encontrados foram inferiores ao nível de significância do teste, se pode afirmar que a produção de biomassa melanizada é afetada quando empregada a metodologia de inoculação por fungo crescido em tubo de ensaio.

As conclusões que puderam ser retiradas dos gráficos de produção em função dos tratamentos aplicados foram: 1) a inoculação por fungo crescido em tubo de ensaio além de proporcionar uma produção de massa micelial inferior em relação ao tratamento que o fungo era proveniente de uma suspensão contendo somente conídios, seus dados ainda continuaram apresentando uma menor reprodutibilidade (Figura 16a); 2) sobre a produção do pigmento, os dois tratamentos efetuados apresentaram uma grande dispersão entre seus dados, porém aquele em que a suspensão foi filtrada antes da inoculação se mostrou mais vantajoso, devido a maior quantidade de pigmento formado (Figura 16b).

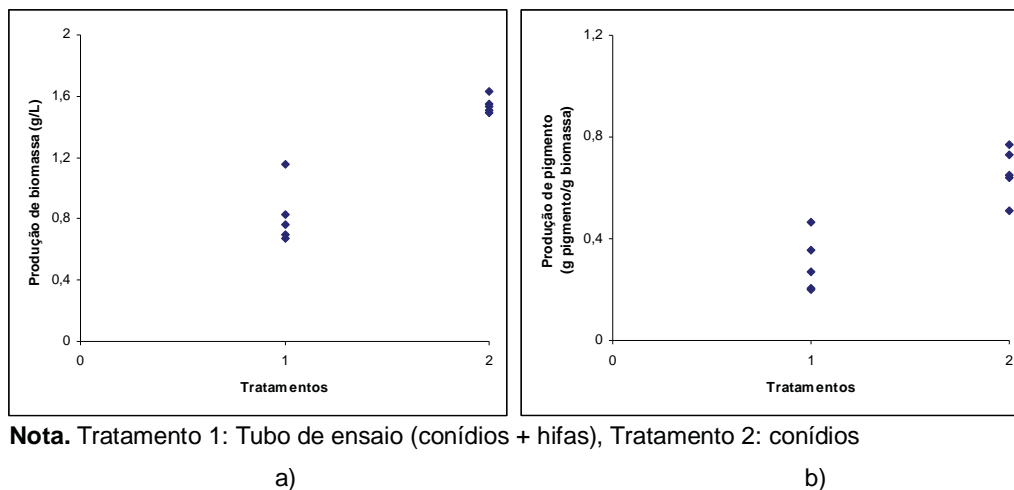


Figura 16. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou à forma de inoculação.

Na Tabela 12 estão inseridas as capacidades de bio sorção para Nd das biomassas provenientes das experimentações realizadas. Pode-se observar uma relação diretamente proporcional entre esta variável calculada e

a quantidade de pigmento obtida. De maneira que, a massa fúngica proveniente da suspensão de esporos apresentou uma maior capacidade biossortiva, uma vez que esta continha uma pigmentação mais intensa em sua parede celular.

Com base nos estudos realizados, referentes à influência da presença de hifas na produção de biomassa melanizada, se pode concluir que a melhor condição da suspensão de conídios, a ser utilizada na inoculação da linhagem MEL 1 do *A. nidulans*, é aquela em que a etapa de filtração foi realizada, uma vez que seus resultados apresentaram uma maior constância, sendo assim, um método mais reprodutível.

Tabela 12. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção (Q) para Nd (concentração inicial de $0,80\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) obtidas pelos tratamentos em que se variou à forma de inoculação.

Composição do inoculo	Produção de pigmento (g pigmento/g biomassa)	Q ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
tubo de ensaio	$0,370\pm 0,137$	10,85
conídios	$0,429\pm 0,074$	29,75

4.2.5. Concentração de conídios

Os resultados anteriores parecem indicar que a concentração de conídios também é um parâmetro importante na obtenção da biomassa melanizada. Assim, os próximos experimentos realizados foram para determinar se a quantidade de conídios, presentes no meio líquido de cultura, interfere na produção de biomassa e pigmento. As concentrações investigadas foram as seguintes: $1\cdot 10^5$ e $1\cdot 10^6$ conídios/mL, e seus gráficos de coluna obtidos estão mostrados na Figura 17.

Quase não se notou diferença nas produções obtidas, tanto de massa micelial, quanto de pigmento, pelos tratamentos realizados. Sendo assim, aparentemente, as concentrações de conídios testadas não afetaram a quantidade de biomassa melanizada obtida, fato que pode ser observado na Figura 17.

Os resultados obtidos pelas análises de variância (ANEXOS 5 e 6), de ambas produtividades em questão, vieram a confirmar o que havia sido presumido anteriormente pelos gráficos de coluna. Já que, se tratando da produção de biomassa melanizada, pode-se afirmar, com 95% de confiabilidade, que seus crescimentos independem da concentração de conídios presentes no meio. Tal constatação pôde ser feita, uma vez que os p-valores (0,674951 e 0,671799, respectivamente para as produções de biomassa e pigmento) encontrados pelas análises são superiores ao nível de significância do teste (0,05).

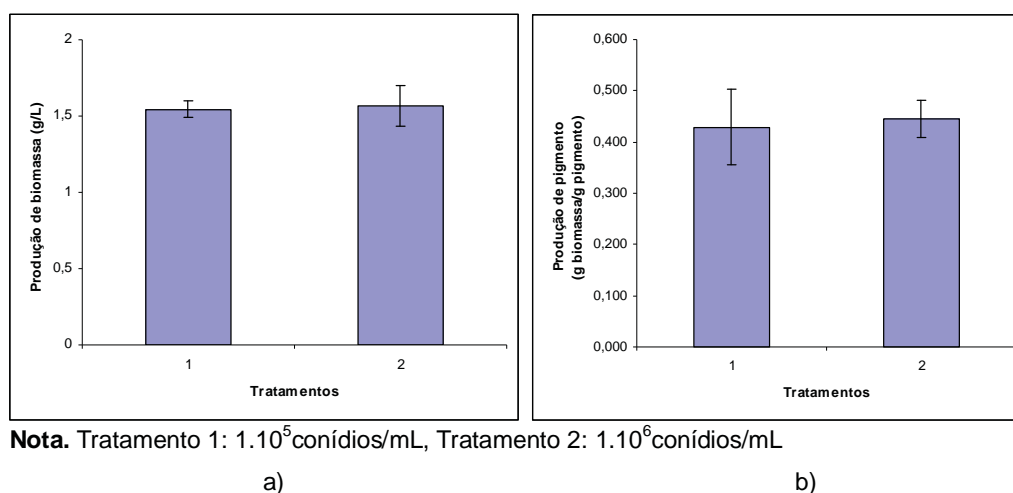


Figura 17. Efeito da concentração de conídios nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), sob agitação por 7 dias, a 37°C.

Os resultados obtidos podem ser explicados da seguinte maneira: quando o meio apresenta uma alta concentração de conídios, a competição dos esporos por nutrientes torna-se intensa, ocasionando a exaustão destes em um menor tempo de cultivo. A condição resultante levará o fungo para sua fase estacionária de crescimento, onde ocorre a estimulação da produção do pigmento melanina pelo *A. nidulans*, uma vez que este se trata do seu metabólito secundário. E como pode ser encontrado na literatura, a formação deste polímero é intensificada durante esta fase do seu ciclo de vida, a qual se

caracteriza por uma taxa de crescimento constante em função da limitação de nutrientes (FORGATY; TOBIN, 1996).

O experimento em que foi utilizada a concentração de 1.10^5 conídios/mL, não se mostrou reprodutível em relação a produção do pigmento melanina, pois seus dados apresentaram uma grande dispersão em torno de sua média, como visualizado na Figura 18.

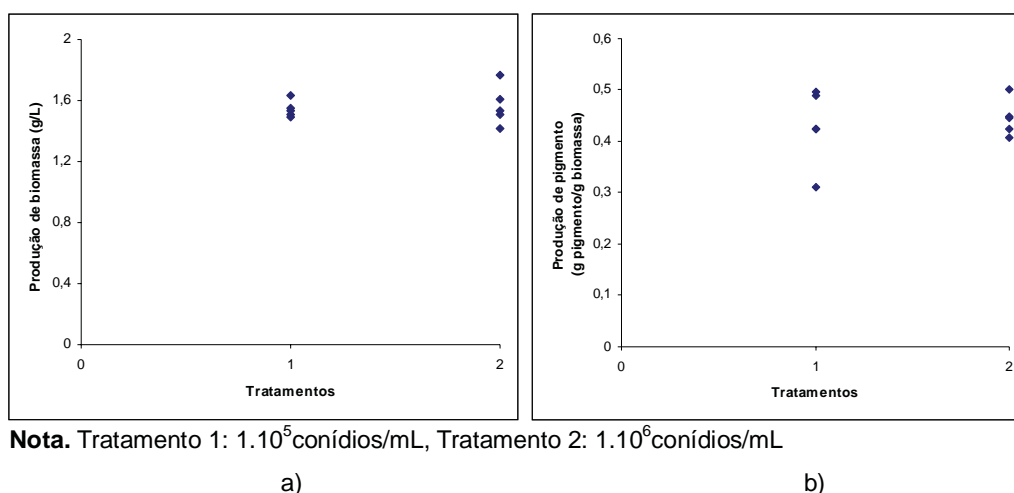


Figura 18. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou à concentração de conídios.

Tabela 13. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção (Q) para Nd (concentração inicial de $0,80\text{g.L}^{-1}$) obtidas pelos tratamentos em que se variou à concentração de conídios.

Concentração de conídios/mL	Produção de pigmento (g pigmento/g biomassa)	Q (mg.g^{-1})
1,00E+05	$0,429 \pm 0,074$	29,75
1,00E+06	$0,445 \pm 0,036$	50,50

Os resultados obtidos dos experimentos executados permitem concluir que o tratamento em que a concentração de conídios de 1.10^6 conídios/mL foi utilizada é mais vantajoso na produção de biomassa melanizada da linhagem MEL 1, quando a finalidade é a sua utilização em processos biossotivos. Uma vez que sua massa fúngica além de ter

apresentado uma maior capacidade biossortiva, como indicado na Tabela 13, esta se manteve constante quanto a sua taxa de pigmentação.

4.2.6. Volume do meio de cultura

O volume empregado do meio de cultura, também pode ser considerado como um fator relevante no cultivo dos micro-organismos, uma vez que o micro-ambiente contido no frasco, em que este está inserido, determina a concentração de oxigênio que estará disponível, sendo assim, responsável pela variabilidade no comportamento das culturas (PRETTI, 2009).

Visto que o volume do meio afeta a composição gasosa do frasco, ele pode prejudicar o crescimento de micro-organismos aeróbicos e, conseqüentemente, a produção de seus metabólitos secundários, proporcionando um crescimento mais lento quando a oxigenação é limitada (LEE *et al.*, 1995).

Tendo em vista esta problemática, delineou-se um novo planejamento experimental, com o objetivo de verificar a influência do volume de meio de cultura na produção de biomassa melanizada pela linhagem MEL 1 do *A. nidulans*, havendo a inoculação de 1.10^6 conídios/mL em 200mL, 400mL e 800mL de meio.

Como pôde ser observado na Figura 19, os resultados obtidos, referentes aos volumes de 200mL e 400mL, evidenciam uma relação diretamente proporcional entre a quantidade utilizada do meio de cultura e a produção resultante de biomassa. Ao se tratar do volume de 800mL, este exibe uma eficácia inferior no crescimento da massa fúngica, em relação à de 400mL, sendo esta próxima da obtida por 200mL.

As conclusões, que puderam ser retiradas da Figura 19a, foram confirmadas pela análise de variância procedida em seus dados constituintes (ANEXO 7). Sendo assim, pode-se afirmar que o volume do meio de cultivo empregado interfere na produção de biomassa, uma vez que o p-valor ($2,34.10^{-6}$) encontrado é menor que o nível de significância do teste (0,05).

Já, a respeito das médias obtidas na formação de pigmento, estas apresentam uma relação inversamente proporcional com os três volumes empregados de meio de cultura. Sendo assim, quanto menor a quantidade de

meio presente no frasco, maior foi à taxa de pigmentação obtida pela massa micelial. Tal comportamento também pode ser confirmado pela análise de variância de seus dados (ANEXO 8), já que seu p-valor ($1,13 \cdot 10^{-10}$) é inferior ao nível de significância do teste estatístico adotado (0,05).

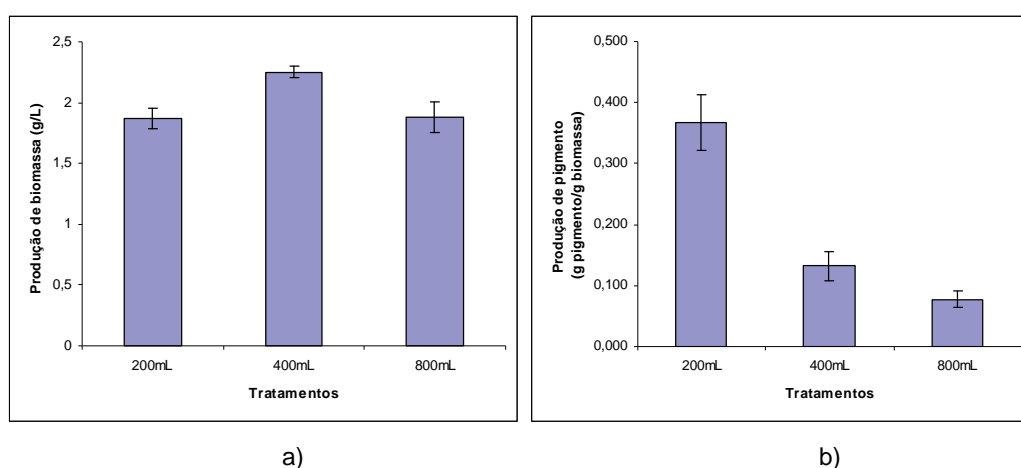


Figura 19. Efeito do volume do meio de cultura nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo de $1 \cdot 10^6$ conídios/mL do fungo em Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), sob agitação por 7 dias, a 37°C.

O gráfico da produção de biomassa em função dos tratamentos aplicados (Figura 20a) evidencia uma constância nos seus dados apresentados. Já quanto à produção de pigmento (Figura 20b), os dados obtidos tiveram uma maior dispersão entre si, dentro dos três tratamentos empregados, portanto, nenhum destes se mostrou reproduzível na produção da variável sob análise. Fato anteriormente previsto, uma vez que os valores de seus desvios-padrão correspondem, em média, a 15% da produção total do pigmento, enquanto o valor foi de 4,5% quando se tratava da biomassa. Portanto, ao utilizar quaisquer dos três volumes investigados, a produção de massa fúngica irá ter uma boa reprodutibilidade.

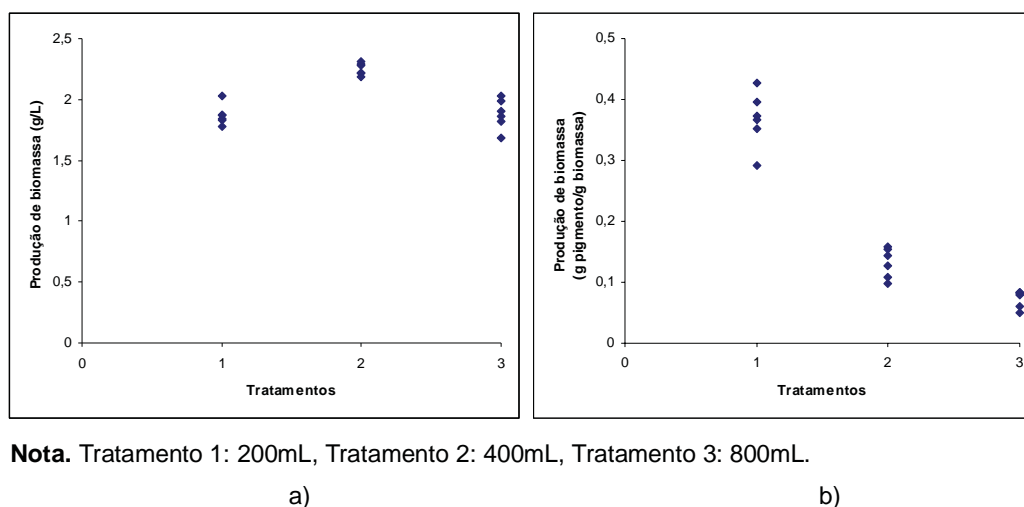


Figura 20. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou o volume do meio de cultura.

Tabela 14. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção (Q) para Nd (concentração inicial de $0,80\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) obtidas pelos tratamentos em que se variou o volume do meio de cultura.

Volume do meio (mL)	Produção de pigmento (g pigmento/g biomassa)	Q ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
200	$0,367\pm 0,042$	52,30
400	$0,132\pm 0,025$	43,30
800	$0,073\pm 0,014$	28,85

Com base nestes estudos realizados, pode-se concluir que, o melhor volume de meio líquido a ser utilizado no cultivo do *A. nidulans* é de 200mL, pois, embora haja um menor crescimento de biomassa, em relação ao volume de 400mL, esta se apresenta fortemente pigmentada, proporcionando uma maior capacidade biossorbitiva, como mostrado da Tabela 14.

A conclusão obtida está de acordo com estudos preliminares realizados em nosso laboratório, em que foi investigada a influência dos volumes de 100mL e 200mL de meio de cultura, na produção de biomassa melanizada pelo *A. nidulans*. Na ocasião, o tratamento que utilizou 200mL de meio proporcionou um maior crescimento de biomassa, a qual também se

encontrava altamente pigmentada. Tal fato pode ser atribuído ao diâmetro dos pellets que são formados por esta condição, os quais apresentam tamanhos mais reduzidos, porém se encontram intensamente melanizados (PRETTI, 2009).

Na literatura podem ser encontrados vários estudos de fermentação submersa, os quais mostram a influência da morfologia do fungo sobre a produção de seus metabólitos secundários. Feng *et al.*, (2004) testaram diversos volumes de meio de cultura (100mL, 150mL, 200mL, 250mL ou 300mL) para o cultivo de *Metarhizium anisopliae*, no intuito de obter uma maior produção de destruxina B. Os resultados também mostraram que se teve o maior rendimento da substância no volume de 200mL.

Segundo Jiménez-Tobon *et al.*, (1997) a síntese de peroxidases em função do tamanho apresentado pelos pellets, se deve ao nível de oxigenação contido em seu centro, o qual fica reduzido quando os pellets contêm grandes diâmetros. Afetando assim, o metabolismo celular e, conseqüentemente, a produção de metabólitos.

Uma outra explicação que pode ser dada para o resultado obtido, baseia-se na velocidade de agitação proporcionada ao meio, a qual está diretamente relacionada com as dimensões dos frascos utilizados nos diferentes volumes testados (ANEXO 9). A caracterização dos Erlenmeyers nos permitiu concluir que: quanto menor o volume do meio de cultura utilizado, maior é a aeração e sua velocidade de agitação, o que determina em uma maior pigmentação do fungo.

Desta forma, quando utilizado o volume de 200mL de meio, tanto o tamanho apresentado pelos pellets, assim como a velocidade de aeração resultante, propiciaram maiores níveis de oxigênio. Havendo assim, um estímulo na oxidação de compostos fenólicos ou indólicos, que resultou em uma maior produção de melanina.

4.2.7. Temperatura de crescimento

A temperatura de incubação fornecida aos micro-organismos é um dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento do seu ciclo de vida (IGNOFFO *et al.*, 1976). Na literatura são encontrados diversos estudos

que demonstram que os conídios podem germinar sob uma ampla faixa de temperatura (COLE; HOCH, 1991).

Com o intuito de determinar se este parâmetro analisado influencia na produção de biomassa melanizada pela linhagem MEL 1, delineou-se um experimento em que foram testadas duas temperaturas (~ 28°C e 37°C), e os gráficos de colunas obtidos estão apresentados na Figura 21.

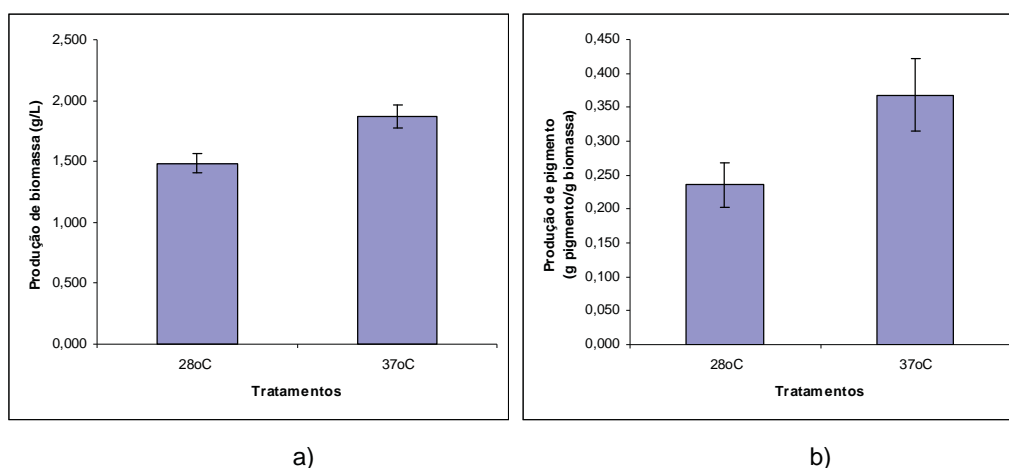


Figura 21. Efeito da temperatura de incubação nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo de 1.10^6 conídios/mL do fungo em 200mL de Meio Mínimo suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), sob agitação por 7 dias, a 37°C.

Pela observação da Figura 21, se pode concluir que a temperatura de 37°C é mais propícia à linhagem do *A. nidulans* estudada, uma vez que foi obtida uma produção superior tanto de biomassa, como do pigmento melanina, por esta condição.

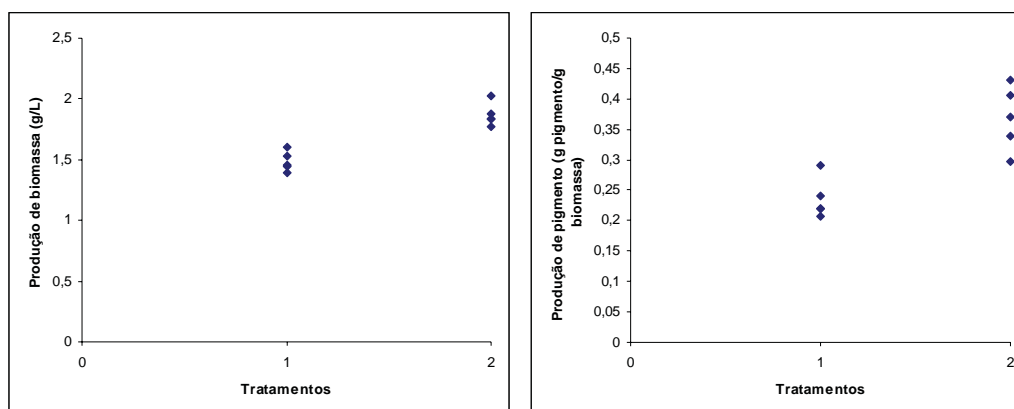
As análises de variância (ANEXOS 10 e 11) vieram a confirmar tal afirmação, de modo que, com 95% de confiabilidade, conclui-se que a temperatura fornecida ao crescimento do fungo se trata de um parâmetro interferente na sua produtividade de biomassa melanizada.

O efeito benéfico provocado pela temperatura de 37°C sobre a produção de biomassa melanizada, acarretou a esta uma maior capacidade de bioadsorção, como confirmado pela Tabela 15.

Tabela 15. Produção do pigmento melanina e a capacidade de biossorção (Q) para Nd (concentração inicial de $0,80\text{g.L}^{-1}$) obtidas pelos tratamentos em que se variou à temperatura de incubação.

Temperatura de cultivo (°C)	Produção de pigmento (g pigmento/g biomassa)	Q (mg.g^{-1})
28	$0,235\pm 0,033$	14,42
37	$0,368\pm 0,053$	67,09

Os gráficos de produção das variáveis sob análise (Figura 22) foram plotados com o intuito de analisar se os tratamentos aplicados eram reprodutíveis. E com eles se pode perceber que, embora, o tratamento que utilizou a temperatura de 37°C proporcionou maiores rendimentos nas produtividades, em contrapartida este acarreta em uma maior dispersão dos seus dados, porém esta se encontra em um nível aceitável.



Nota. Temperaturas de incubação: Tratamento 1: 28°C , Tratamento 2: 37°C

a)

b)

Figura 22. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se variou a temperatura de incubação.

Pelos resultados apresentados, conclui-se que: as características químicas e estruturais apresentadas pela biomassa, quando utilizada a temperatura de incubação como 37°C , fazem com que esta seja mais eficiente em sua utilização como biossorvente para o processo biossortivo.

Outros estudos também demonstraram que a temperatura de cultivo interfere na formação de metabólitos secundários. Faria (2004) também observaram que há um estímulo na produção do pigmento melanina por *Lentinula boryana*, quando a temperatura fornecida ao seu crescimento é elevada acima de 28°C, havendo o aparecimento da coloração escura em seu meio, já os micélios e os meios de cultivos resultantes das temperaturas de 20°C, 22°C e 25°C apresentavam aspectos normais, ou seja, o micélio continha cor branca e seu meio era claro.

4.2.8. Utilização de resíduo agroindustrial como fonte de nutrientes

O próximo fator a ser investigado foi com relação à suplementação do meio de cultivo com AMM, podendo assim, depois de todos os estudos realizados, estabelecer a condição ótima de cultivo da linhagem MEL 1 do *A. nidulans*, visando a obtenção de biomassa altamente pigmentada com baixo custo.

A escolha deste resíduo foi realizada pelos seguintes critérios: por se tratar de um requerimento rico em nutrientes (40,8% de proteína, 16% de ácido láctico, 12,8% de açúcares redutores e 30,4% de compostos diversos) e, também, com base em estudos desenvolvidos em nosso laboratório, os quais demonstraram que o uso desta fonte suplementar de nitrogênio, interfere na produção obtida do pigmento melanina (LIGGETT; KOFFLER, 1948).

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório evidenciaram que ao adicionar 20mL/L de AMM à suplementação básica, para o desenvolvimento da linhagem MEL 1, resultava em uma condição a qual proporcionou um grande crescimento de massa ($3,430 \pm 0,100 \text{g.L}^{-1}$), porém pouco pigmentada ($0,550 \pm 0,200 \text{g.L}^{-1}$). Já quando colocado ao meio 2mL/L de AMM, ocorria o inverso, havendo uma baixa produção de biomassa ($1,760 \pm 0,100 \text{g.L}^{-1}$) mas esta se apresentava altamente pigmentada ($1,120 \pm 0,400 \text{g.L}^{-1}$) (PRETTI, 2009). De forma que o tratamento denominado efeito da pré-cultura foi delineado de tal maneira (item 3.2.4.8 dos Materiais e Métodos) que se obtivesse um efeito sinérgico dos resultados referentes a estes estudos anteriormente desenvolvidos.

Foi utilizada a concentração de 2mL/L de AMM (0,2%), uma vez que é demonstrado na literatura que o emprego desta fonte nutricional em quantidades superiores, promove a diminuição da produção de metabólitos secundários pelos micro-organismos (LIU *et al.*, 2002).

Um novo planejamento experimental foi definido, de forma a comparar os resultados obtidos, quanto à suplementação ou não do meio líquido de cultivo com AMM, e de que modo esta deveria ser realizada. Com este intuito, foram executados quatro diferentes tratamentos, e suas condições estão sumarizadas no item 3.2.4.8 dos Materiais e Métodos, e os resultados por estes apresentados se encontram na Figura 23.

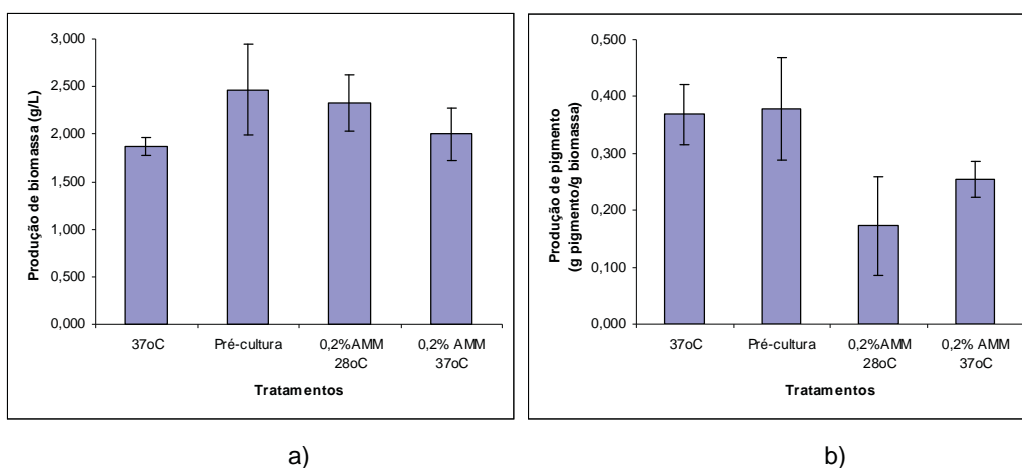


Figura 23. Efeito das diferentes formas de cultivo nas produções de: a) biomassa, b) pigmento melanina, após cultivo de 1.10^6 conídios/mL do fungo em 200mL de Meio Mínimo, sob agitação por 7 dias, a 37°C.

A observação da Figura 23 nos revela que o tratamento denominado efeito da pré-cultura, proporciona uma maior produção de biomassa pigmentada, sendo seguido pelo tratamento em que não há a adição de AMM (37°C). Já, os tratamentos que continham 2mL/L de AMM, independentemente da temperatura fornecida, proporcionaram um bom crescimento de massa micelial, porém se mostraram inadequados quanto à pigmentação.

Os resultados referentes às análises de variância dos dados obtidos, os quais estão sumarizados nos ANEXOS 12 e 13, mostram que a

suplementação do meio com AMM e a forma com que esta é efetuada, interfere na produção dos dois parâmetros analisados. Portanto, a adição desta fonte nutricional, que proporciona uma maior quantidade de compostos nitrogenados ao meio, aumenta significativamente a quantidade de biomassa melanizada obtida. Então, com 95% de confiabilidade, pode-se afirmar que o tratamento em que é procedida a pré-cultura é o mais vantajoso na produção, tanto de biomassa, quanto de melanina.

Em relação à dispersão dos dados, pôde-se observar certa similaridade entre os tratamentos, para ambos os parâmetros mensurados, não podendo ser esta uma análise decisória na escolha do tratamento mais eficaz. Tais comportamentos foram constatados com o auxílio da Figura 24.

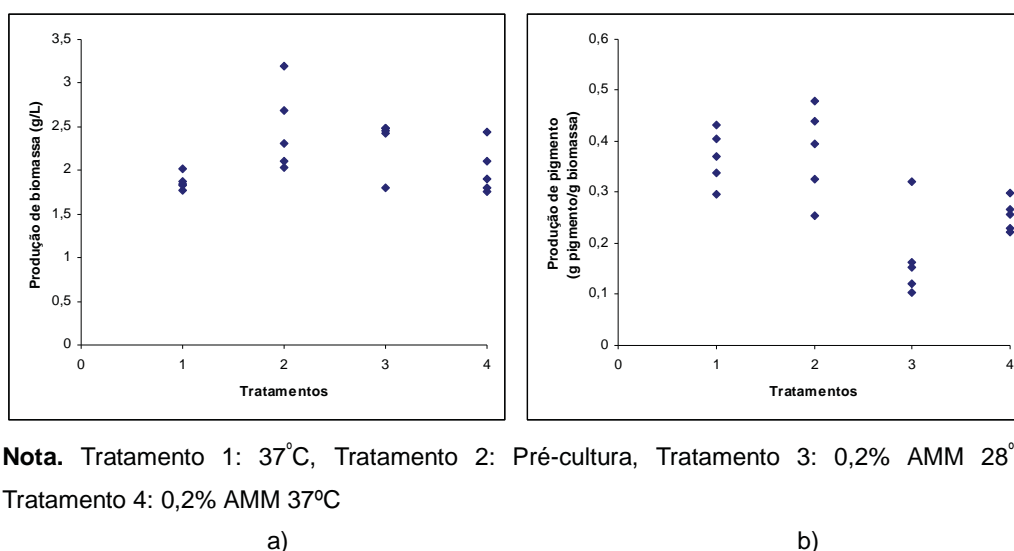


Figura 24. Crescimento de biomassa (a) e produção do pigmento melanina (b) obtidos pelos tratamentos em que se testaram diferentes formas de cultivo da linhagem MEL 1.

A massa micelial proveniente do tratamento denominado efeito da pré-cultura, também se mostrou mais vantajosa na sua utilização em processos biossorbitivos, uma vez que, como pode ser visualizada pela Tabela 16, esta biomassa apresentou a maior capacidade biossorbitiva, sendo seguida pelo tratamento em que não havia a presença de AMM. Já quando esta fonte adicional de nutrientes estava presente em baixas concentrações, as biomassas produzidas não obtiveram uma boa capacidade de remoção de

metais em solução. Estes resultados podem ser explicados em função da produção de pigmento apresentada pelos tratamentos.

Tabela 16. Produção do pigmento melanina e a capacidade de bioadsorção (Q) para Nd (concentração inicial de $0,80\text{g.L}^{-1}$) obtidas pelos tratamentos em que se testaram diferentes formas de cultivo da linhagem MEL 1.

Tratamentos	Produção de pigmento (g pigmento/g biomassa)	Q (mg.g ⁻¹)
37°C	0,368±0,053	50,50
Pré-cultura	0,378±0,089	79,40
0,2% de AMM 28°C	0,173±0,087	12,70
0,2% de AMM 37°C	0,255±0,031	25,90

Tais resultados estão de acordo com o que havia sido anteriormente observado em nosso laboratório, em que a AMM foi considerada como uma substância indutora na síntese de melanina. Conclusões semelhantes a estas podem ser encontradas na literatura. Nascimento e Martins (2007) também verificaram um aumento na produção de protease, a qual se trata de um metabólito do *Bacillus* sp., quando seu meio de cultivo fora suplementado com AMM. Hamamo e Kilikian (2006) também analisaram o efeito da AMM no cultivo de *Monascus ruber* e mostraram que este resíduo se trata de uma fonte de nitrogênio adequada para a produção de seu pigmento vermelho.

Com base em todas as análises que foram procedidas e que estão descritas anteriormente, pode-se concluir que, para a obtenção de uma maior produção de biomassa melanizada, a inoculação do fungo deve ser realizada da seguinte maneira:

Os conídios obtidos, após o crescimento das linhagens em placas de Petri contendo “Meio Mínimo”, suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L) e Inositol (0,02g/L), devem ser coletados em solução salina (NaCl) 0,85%, em seguida filtrados em lã de vidro e posteriormente, efetuar a inoculação de 1.10^6 conídios/mL de meio de cultura.

Nos primeiros três dias sob agitação, o fungo deverá ser crescido em 200mL de Meio Mínimo líquido de cultura, suplementado na seguinte forma:

10g/L de glicose, 6g/L de nitrato de sódio, 0,02g/L de Inositol e 20mL/L de AMM. A massa micelial obtida será separada de seu meio por centrifugação, sendo esta, em uma segunda estância, inoculada em 200mL de um novo meio líquido, com a seguinte suplementação: 1,3g/L de glicose, 1,5g/L de nitrato de sódio, 0,02g/L de Inositol e 2mL/L de AMM, permanecendo por mais 4 dias, em agitação (250rpm). A temperatura de incubação deverá ser mantida a 37°C em todo o experimento.

Sendo assim, consideramos que a otimização das condições de cultivo do mutante MEL 1 de *A. nidulans*, possibilitou a obtenção de biomassa para ser utilizada como adsorvente no processo biossortivo, uma vez que esta se apresenta em grande quantidade e altamente pigmentada, proporcionando-lhe uma alta capacidade de bioissorção dos TRs.

4.3. Estudo da superfície química do bioissorvente

Acredita-se que a remoção de íons metálicos por biomateriais ocorra pelas diversas interações entre os cátions, presentes em solução, e os grupos ligantes que constituem a parede celular do micro-organismo. Estes grupamentos fazem parte da estrutura de suas biomoléculas, tais como: proteínas, lipídios e carboidratos (DRAKE *et al.*, 1996).

Buscar um tratamento no bioissorvente que maximize sua eficiência bioissorviva e, a identificação dos grupos funcionais responsáveis por estas ligações com os metais, são duas etapas de suma importância no desenvolvimento deste projeto. Uma vez que, as informações obtidas a partir destas determinações permitirão alterar a biomassa, com o propósito de aumentar sua capacidade de sorção e, ainda, promover ligações seletivas com certos metais de interesse (FOUREST; VOLESKY, 1996).

Dentro deste contexto, a próxima etapa constituiu-se em estudar a superfície química do bioissorvente, a fim de determinar, qualitativamente e quantitativamente, a contribuição de três grupos ligantes potenciais para a realização do processo bioissorvivo de Nd, La e Ce, pela biomassa da linhagem MEL1 do fungo *A. nidulans*.

Em uma primeira instância, foram realizados ensaios de bioissorção com as três TRs sob análise, os quais foram denominados controles, uma vez que o bioissorvente utilizado não havia passado por nenhuma modificação. As capacidades de bioissorção assim obtidas serviram de referência, já que possibilitaram a comparação com os valores obtidos depois que a biomassa foi alterada quimicamente pelos tratamentos aplicados. Possibilitando com isso, determinar o percentual de contribuição de cada grupo funcional, em estudo, frente ao processo bioissorvivo dos metais TRs.

O primeiro tratamento em que a biomassa foi submetida tratava-se da metilação de seus grupos amina, o qual foi realizado pela adição de formaldeído (HCHO) e ácido fórmico (HCOOH), promovendo o seguinte mecanismo reacional:



A biomassa proveniente do tratamento acima mencionado foi empregada como bioissorvente nos experimentos de bioissorção para Nd, La e Ce, e os resultados obtidos de suas capacidades bioissortivas estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Capacidades de bioissorção da biomassa sem tratamento ($Q_{\text{Padrão}}$) e após a metilação dos seus grupamentos amina (Q_{Ensaio}) e seu efeito no processo bioissortivo para Nd, La e Ce.

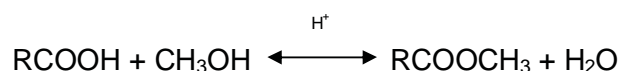
Metal	$Q_{\text{Padrão}}$ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Q_{Ensaio} ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Efeito negativo na capacidade bioissortiva (%)
Nd	86,54	70,79	18,2
La	57,64	49,46	14,2
Ce	63,05	50,25	20,3

A análise da Tabela 17 comprovou a participação do grupamento amina como um dos sítios ligantes ativos na biomassa, para o processo bioissortivo das TRs. Uma vez que, após proceder sua metilação este se encontrava bloqueado, o que resultou em uma diminuição na capacidade de sorção dos metais pelo fungo. Esta redução variou de 14 a 20%, denotando uma significativa participação deste grupo funcional no mecanismo de bioissorção das TRs estudadas.

Jianlong (2002) obteve um resultado semelhante em termos de porcentagem de redução bioissortiva de cobre com a utilização de *S. cerevisiae*, reportando uma diminuição na capacidade bioissortiva de cobre quando os grupamentos amins de sua biomassa se encontravam metilados. Uma outra conclusão que pôde ser retirada dos resultados apresentados é que o grupamento amina, provavelmente, não proporciona ligações seletivas com os metais TRs, já que foram semelhantes os efeitos negativos provocados em suas capacidades de bioissorção, quando este grupo estava inativo.

Posteriormente, se procedeu a esterificação dos grupos carboxílicos presentes na superfície da biomassa da linhagem MEL 1, para determinar a importância deste grupo ligante frente ao processo bioissortivo para Nd, La e Ce.

A representação do mecanismo químico que rege este tratamento, o qual contou com a utilização de ácido hidroclorídrico e etanol, se encontra a seguir:



Com esta biomassa que não apresentava os grupos carboxílicos livres, foram realizados ensaios de bioissorção, para determinar as capacidades bioissorativas para Nd, La e Ce, e assim, permitir a comparação com os resultados obtidos quando a mesma continha todos seus grupamentos disponíveis (Tabela 18).

Tabela 18. Capacidades de bioissorção da biomassa sem tratamento ($Q_{\text{Padrão}}$) e após a esterificação dos seus grupamentos carboxílicos (Q_{Ensaio}) e seu efeito no processo bioissorativo para Nd, La e Ce

Metal	$Q_{\text{Padrão}}$ (mg.g^{-1})	Q_{Ensaio} (mg.g^{-1})	Efeito negativo na capacidade bioissorativa (%)
Nd	86,544	64,91	25,0
La	57,64	21,1	63,4
Ce	63,05	25,85	59,0

A esterificação nos grupamentos carboxílicos também teve como consequência uma redução nas capacidades de bioissorção da linhagem para os três metais averiguados. Fato que comprova a atuação deste grupo como sítio ligante às TRs, no processo bioissorativo, ao se utilizar a massa fúngica da linhagem MEL 1 do *A. nidulans* como bioissorvente.

Ainda ao se observar a Tabela 18, pôde-se perceber que, para os metais La e Ce, a redução na eficiência de suas capacidades de bioissorção foi mais acentuada, demonstrando com isso, que este grupamento funcional apresenta uma maior afinidade por ambos metais. Levando-nos a concluir que, pode ser realizada a esterificação do bioissorvente como um primeiro passo para separar, em uma solução multimetálica de TRs, o Nd do La e Ce. Esta conclusão é muito proveitosa, uma vez que esta série de metais, por apresentarem características físico-químicas muito semelhantes, é de difícil

separação, ficando dependente de métodos caros e que ainda apresentam uma baixa eficácia.

Beveridge e Murray (1980) mostraram que o bloqueamento dos grupos carboxílicos, os quais estavam presentes na biomassa do *Bacillus subtilis*, provocou uma diminuição na taxa bioassortiva de cobre.

A parede celular fúngica se trata de uma estrutura microfibrilar multilaminada constituída por duas fases, sendo uma interna e outra externa. A primeira é revestida por glicanas, mananas ou galactanas e, a segunda é microfibrilar, com um arranjo paralelo de quitina e, algumas vezes, celulose. Existe ainda, uma transição contínua entre estas duas fases, a qual é ligada por proteínas, lipídeos e polissacarídeos (VOLESKY, 1990).

Assim sendo, promoveu-se a extração destes lipídios, presentes na superfície da biomassa, com o intuito de determinar sua influência na capacidade de remover metais.

Foram determinadas as capacidades de bioassorção da biomassa para Nd, La e Ce, quando esta não continha lipídios em sua parede celular. Possibilitando, assim, promover a comparação com os resultados provenientes dos experimentos controles (sem tratamento), a qual se encontra na Tabela 19.

Tabela 19. Capacidades bioassortivas da biomassa, sem tratamento ($Q_{\text{Padrão}}$) e após a extração dos lipídios (Q_{Ensaio}) e seu efeito no processo bioassortivo para Nd, La e Ce

Metal	$Q_{\text{Padrão}}$ (mg.g^{-1})	Q_{Ensaio} (mg.g^{-1})	Efeito negativo na capacidade bioassortiva (%)
Nd	86,544	40,5	53,2
La	57,64	27,78	51,8
Ce	63,05	30,96	50,9

Analisando a Tabela 19, pôde-se concluir que os lipídios, que promovem a ligação entre as duas fases que constituem a parede celular do *A. nidulans*, possuem uma participação ativa como sítios ligantes as TRs no processo bioassortivo. Já que, ao promover a remoção dos mesmos tratando a biomassa com benzeno, esta exibiu um efeito negativo de 52%, em média, na bioassorção destes metais.

Kapoor e Viraraghavan (1997) observaram uma diminuição na taxa biossorbitiva de cádmio e cobre quando os lipídeos foram extraídos do *Aspergillus niger*.

Baseando-se nos resultados apresentados pelos tratamentos que foram procedidos na biomassa, a fim de caracterizar sua superfície química, pode-se constatar que todos os grupamentos investigados participam como sítios ligantes aos metais, tendo assim, uma contribuição ativa no processo biossorbitivo de Nd, La e Ce pela biomassa da linhagem MEL 1.

4.4. Efeito da concentração de biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 de *A. nidulans* no processo biossorbitivo de Nd, La e Ce

Experimentos referentes à influência da concentração do biossorbente foram desenvolvidos com o propósito de observar o efeito deste parâmetro sobre a capacidade biossorbitiva da série metálica estudada, uma vez que é sabido que a biossorção depende de certas variáveis, tais como: concentração do íon, quantidade de biomassa e temperatura. Para esse fim, escolheu-se um elemento representativo das TRs (neodímio), estando os resultados sumarizados na Tabela 20.

Tabela 20. O efeito da concentração de biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans* frente a capacidade biossorbitiva de neodímio (Concentração inicial $0,80\text{g.L}^{-1}$) e sua eficiência.

Concentração de biomassa (g.100mL^{-1})	Q (mg.g^{-1})	Eficiência (%)
0,1	72,1	10,6
0,2	43,3	12,8
0,3	40,9	18,1
0,4	57,7	26,7

Analisando a tabela anteriormente apresentada se pode constatar a existência de uma tendência à proporcionalidade entre a concentração de biomassa e capacidade de biossorção de neodímio. Porém, ao observar a eficiência da remoção metálica, a qual leva em consideração apenas a quantidade de metal subtraído da solução, se conclui que o processo biossorbitivo foi mais eficaz com o aumento da concentração de biomassa. Tal comportamento pode ser atribuído ao incremento da área superficial do adsorbente e a maior disponibilidade de sítios livres para adsorção.

Diante da constatação acima se estabeleceu para os estudos subseqüentes a utilização de 0,4g de biomassa para 100mL de solução de metal, já que esta proporcionou maior eficiência ao processo biossorbitivo. Notou-se ainda que tal resultado encontrava-se de acordo com o já descrito na literatura, visto que podem ser observados diversos trabalhos que relatam um incremento na remoção de metais quando são empregadas maiores

concentrações de massa fúngica no processo biossortivo, tal como, Ferreira *et al.*, (2007), que observaram um efeito similar da concentração de biomassa sobre a biossorção de Cr(III) e Pb(II) por *Rhodococcus opacus*, onde a máxima concentração de biomassa estudada (1g.L^{-1}) proporcionou a maior remoção metálica (78mg.g^{-1} e 75mg.g^{-1} , respectivamente para Cr e Pb).

Pelos estudos realizados se pode concluir que a quantidade de biomassa utilizada no processo de biossorção trata-se de um parâmetro relevante que deve ser considerado para o delineamento do processo, uma vez que se constatou que esta afeta a eficiência de remoção dos íons metálicos.

4.5. Cinética do processo biossorbitivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa inativa da linhagem MEL 1 na sua forma livre

Nos processos biossorbitivos em que há predominância do mecanismo de troca-iônica para a ligação dos íons metálicos à superfície celular do micro-organismo, fatores relacionados à difusão do metal no sistema reacional, o tipo de biomassa empregada, assim como a natureza química do metal a ser adsorvido, são imprescindíveis para a determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio, uma vez que as reações ocorrentes são extremamente rápidas (PALMIERI, 2001).

Com o propósito de determinar o tempo mínimo necessário para que seja atingida a capacidade máxima de biossorção no equilíbrio (saturação) das TRs acima mencionadas, realizaram-se ensaios de biossorção com a biomassa inativa da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans*, nos seguintes tempos de residência: 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, como mostrado na Figura 25.

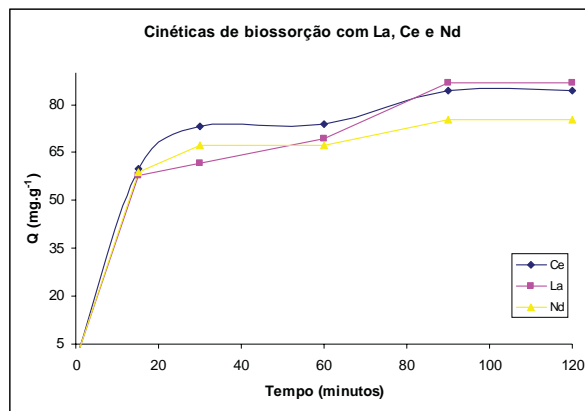


Figura 25. Cinética de biossorção de Nd, La e Ce para a biomassa inativa da linhagem MEL 1, do fungo *A. nidulans*. Concentração inicial dos metais de $0,80\text{g.L}^{-1}$

Na Figura 25 se pode verificar que por volta de 15 minutos depois de iniciada a biossorção houve um acúmulo dos três metais estudados na massa fúngica, atingindo um patamar de 72%, em média, da capacidade biossorbitiva total do processo. Passado este período, a adsorção se deu de uma forma mais lenta, até que o equilíbrio fosse estabelecido. Desta forma, conclui-se que

as cinéticas de bioissorção destas TRs podem ser divididas em duas fases distintas, sendo a primeira rápida, a qual contribuiu para a capacidade máxima de bioissorção e uma segunda mais lenta, onde equilíbrio é alcançado.

Observou-se também que foi necessário transcorrer 90 minutos do início do processo bioissorativo para que seu equilíbrio fosse atingido, sendo que este pode ser considerado pequeno quando comparado a relatos da literatura que explicitam a necessidade de haver o contato metal-biomassa variando entre uma hora (AKSU; KUTSAL, 1991) a mais de dez dias (NOURBAKHSI *et al.*, 1994), conferindo, portanto, a esta linhagem de fungo, potencial para sua utilização como bioissorvente em processos industriais.

Notou-se ainda uma diferenciação na cinética de bioissorção de La quando comparada a dos outros dois metais, uma vez que esta se caracterizou por um acúmulo temporário de íons metálicos, seguido de uma nova ascendência de sua capacidade bioissorativa, até que seu equilíbrio definitivo fosse alcançado. Kazy *et al.* (2006) explicaram que este padrão de cinética é um indício da ocorrência de, no mínimo, dois diferentes sítios ligantes presentes na biomassa, para o metal em questão.

4.6. Cinética do processo bioissorvivo para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa inativa da linhagem MEL 1 na sua forma imobilizada

Como já é bastante evidenciado na literatura, diferentes condições experimentais, como por exemplo, a forma do bioissorvente empregado (ativo, inativo, livre, imobilizado) podem alterar o tempo mínimo necessário para que seja atingido o equilíbrio do binômio metal-biomassa e, com este propósito, realizaram-se ensaios de bioissorção utilizando o bioissorvente (biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1) em sua forma imobilizada. Os resultados obtidos para os tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos estão apresentados na Figura 26.

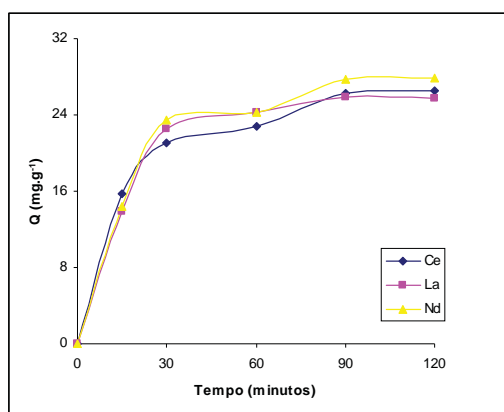


Figura 26. Cinética de bioissorção para Nd, La e Ce utilizando a biomassa inativa da linhagem MEL 1, do fungo *A. nidulans*, na sua forma imobilizada. Concentração inicial dos metais de $0,80\text{g.L}^{-1}$

Analisando a figura acima e, comparando-a com a cinética bioissorviva da biomassa livre em solução (Figura 25), se pode notar que a bioissorção obtida após 15 minutos do início do processo foi 17% menor para a forma imobilizada em comparação com a observada para a forma livre, sendo que o máximo de metal acumulado para o bioissorvente imobilizado foi 55% do total de metal em solução, contra 72% quando a biomassa se encontrava livre no meio reacional.

Portanto, apesar da forma livre apresentar uma maior capacidade de bioadsorção, a biomassa imobilizada apresenta importantes vantagens no processo, pois permite a sua reutilização durante alguns ciclos de bioadsorção, apresenta maior resistência mecânica e melhor transferência de oxigênio (para diâmetros reduzidos).

Notou-se um comportamento semelhante de cinética de bioadsorção para o bioadsorvente tanto em sua forma livre quanto na imobilizada para os três metais em estudo, o qual se caracterizou por uma rápida adsorção inicial seguida de uma etapa mais lenta até o estabelecimento do equilíbrio, sendo que a duração requerida para a finalização deste processo fora de 90 minutos para ambas as condições da biomassa.

Observou-se ainda que os perfis apresentados para as cinéticas de bioadsorção de Nd e Ce quando utilizada a biomassa imobilizada foram semelhantes ao descrito para La quando usada à biomassa livre, ou seja, um acúmulo temporário de metal seguido de uma ascensão da capacidade bioadsorvente até o estabelecimento do equilíbrio, fato este que pode ser explicado pela ocorrência de, no mínimo, dois diferentes sítios ligantes presentes na biomassa. Fenômeno semelhante foi descrito por Kazy *et al.* (2006) ao analisar a bioadsorção de lantânio por *Pseudomonas sp.*

4.7. Isotermas de biossorção para os elementos neodímio, lantânio e cério, utilizando a biomassa da linhagem MEL1 do *A. nidulans* nas formas livre e imobilizada.

A construção das isotermas de biossorção utilizando a biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1, nas formas livre e imobilizada, foram feitas nas seguintes concentrações de neodímio, lantânio e cério: 0,150g.L⁻¹, 0,175g.L⁻¹, 0,200g.L⁻¹, 0,250g.L⁻¹ e 0,300g.L⁻¹. A partir da análise da regressão linear das isotermas e, utilizando o modelo físico-químico proposto por Langmuir, determinou-se as constantes de afinidade do biossorvente pelos metais (b) e as capacidades máximas de biossorção (Q_{máx}) (Tabelas 21 e 22), sendo estes parâmetros importantes para determinar a eficiência biossortiva da massa fúngica pelos metais.

Tabela 21. Valores das capacidades máximas de biossorção (Q_{máx}) e as constantes de afinidade (b) da biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans* na sua forma livre.

Metal	Q _{máx} (μmol.g ⁻¹)	b (L.g ⁻¹)
Nd	425,0	543,3
La	480,2	750,0
Ce	277,6	642,5

Tabela 22. Valores das capacidades máximas de biossorção (Q_{máx}) e as constantes de afinidade (b) da biomassa melanizada inativa da linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans* na sua forma imobilizada.

Metal	Q _{máx} (μmol.g ⁻¹)	b (L.g ⁻¹)
Nd	285,0	347,0
La	192,0	187,5
Ce	278,0	642,0

O que se pode notar foi que para a biossorção de lantânio, a capacidade máxima de biossorção (Q_{máx}) fora de 480,2 μmol.g⁻¹ para a biomassa livre e

192 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ para a imobilizada. Diante disso, notou-se uma redução de, aproximadamente, 60% da capacidade biossortiva para a forma imobilizada de *A. nidulans*, fato este que pode ser atribuído a menor área de superfície de biomassa fúngica disponível em solução para a ligação do referido metal, já que alguns sítios da biomassa podem ter se tornado indisponíveis na etapa de conversão da forma livre para a imobilizada. Já com relação à afinidade da biomassa por lantânio (b), observou-se que o biossorvente livre apresentou 750 L.g^{-1} e já quando imobilizado fora de 187,5 L.g^{-1} , o que demonstra que a ligação do referido íon a superfície de *A. nidulans* ocorre com maior intensidade quando utilizada a biomassa em sua forma livre.

Com relação a neodímio, o que se notou foi que o valor de $Q_{\text{máx}}$ fora de 425 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ para a biomassa livre e 285 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ para a imobilizada, ou seja, uma redução de, aproximadamente, 33% da capacidade biossortiva para a forma imobilizada de *A. nidulans*, fato este que novamente pode ser atribuído a menor área de superfície de biomassa fúngica disponível em solução para a ligação de neodímio; com relação à afinidade da biomassa por neodímio (b), observou-se que o biossorvente livre apresentou 543,3 L.g^{-1} e já quando imobilizado fora de 347 L.g^{-1} , o que demonstra que a ligação do referido íon a superfície de *A. nidulans* ocorre com maior intensidade quando utilizada a biomassa em sua forma livre.

Para cério, o que se observou foi que os valores de $Q_{\text{máx}}$ foram de 277,6 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ para a biomassa livre e 278 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ para a imobilizada, ou seja, houve uma manutenção da capacidade biossortiva de *A. nidulans* mesmo após sua imobilização; com relação à afinidade da biomassa por Ce (b), observou-se que o biossorvente livre apresentou 642,5 L.g^{-1} e já quando imobilizado fora de 642 L.g^{-1} , o que demonstra que a ligação do referido íon a superfície de *A. nidulans* ocorre com a mesma intensidade tanto quando utilizada a biomassa em sua forma livre quanto a forma imobilizada.

Diante disso, o que se pode afirmar é que com relação à $Q_{\text{máx}}$ é que a forma livre da biomassa de *A. nidulans* foi a que demonstrou as maiores eficiências de biossorção para La e Nd; para cério, ambas as formas se mostram igualmente eficientes. Já quando se considerou a afinidade de ligação da biomassa pelos metais em estudo, o que se pode afirmar é que a forma livre

da biomassa é a que liga mais intensamente os íons La e Nd; novamente para Ce, as intensidades de ligação se mantêm iguais para ambas as formas de apresentação da biomassa fúngica utilizada neste estudo.

Portanto, diante da análise dos parâmetros acima, se pode concluir que a biossorção de La por *A. nidulans* na forma livre se mostra vantajosa devido à evidência da maior capacidade de adsorção deste íon combinada com a maior intensidade de ligação observada, fato este que demonstra uma grande capacidade de remoção de La presente em solução em conjunto com uma maior energia de ligação metal-biomassa, o que possibilita uma remoção mais efetiva do metal presente em solução. Porém, com o intuito aplicação prática da técnica de biossorção, a utilização da biomassa imobilizada de *A. nidulans* na biossorção de cério demonstra ser ímpar, uma vez que a capacidade biossorbitiva manteve-se inalterada quando da conversão da forma livre para a imobilizada, assim como a energia requerida para a ligação do íon ao biossorvente, o que capacita à utilização da forma imobilizada e traz com isso, a vantagem de poder ser utilizada em vários ciclos de adsorção de metal.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível estabelecer a condição ótima de cultivo para a linhagem MEL 1 do fungo *A. nidulans* que proporcionou uma grande quantidade de biomassa altamente melanizada, a qual apresentou uma maior capacidade de bioissorção das TRs. Para tal condição, a massa micelial obtida após o crescimento do fungo por três dias, sob agitação à 37°C, em meio mínimo líquido suplementado com glicose (10g/L), nitrato de sódio (6g/L), Inositol (0,02g/L) e AMM (20mL/L), foi transferida para um outro frasco contendo meio mínimo líquido com a seguinte suplementação: glicose (1,3g/L), nitrato de sódio (1,5g/L), Inositol (0,02g/L) e AMM (2mL/L) e incubada por mais 4 dias à 37°C sob agitação. A análise da superfície química desta biomassa revelou que os grupos amina e carboxílico como também os lipídios participam como sítio ligante de metal, em função da redução da capacidade bioissorativa observada após a modificação química destes grupos. Também foi possível verificar que o grupamento carboxílico apresentou uma maior afinidade por La e Ce, devido a redução mais acentuada (em torno de 60%) na suas capacidades bioissorativas, o que pode ser indicativo de seletividade para estes metais. Os resultados referentes à cinética de bioissorção revelaram que há variação da capacidade bioissorativa das TRs entre as diferentes formas da biomassa (livre e imobilizada) e também em relação aos metais estudados, mas que 90 minutos é o tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido para ambas formas de biomassa utilizadas. A capacidade máxima de bioissorção ($Q_{m\acute{a}x}$) foi menor para a biomassa imobilizada comparada com a forma livre, sendo que esta redução foi de 60 e 33%, respectivamente, para lantânio e neodímio, enquanto que para o Ce foram obtidos valores de $Q_{m\acute{a}x}$ semelhantes para ambas biomassas (livre e imobilizada). Em relação à afinidade da biomassa pelos metais, observou-se que o lantânio apresentou um maior valor comparado com neodímio e cério, sendo que esta diferença torna-se mais evidente na biomassa imobilizada, sugerindo que esta forma exibe afinidades diferentes entre as terras-raras estudadas. Assim, com este estudo foi possível demonstrar que a biomassa altamente melanizada do fungo *A. nidulans* (MEL 1) apresenta potencial biotecnológico para ser utilizada como bioissorvente, sendo que a forma imobilizada poderia ser aplicada no processo de separação das terras-raras.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, A. **Química e tecnologia das terras-raras: tecnologia mineral**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, 1994.
- AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2243-2257, 2007.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n.3-4, p. 997-1026, 2005.
- AKSU, Z.; KUTSAL, T. A bioseparation process for removing lead (II) ions from waste water by using *C. vulgaris*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, p. 109-118, 1991.
- 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.
- ANDRÈS, Y.; THOUAND, G.; BOUALAM, M.; MERGEAY, M. Factors influencing the biosorption of gadolinium by micro-organisms and its mobilisation from sand. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 262-267, 2000.
- BAHULEKAR, R.; AYYANGAR, N. R.; PONRATHNAM, S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 11, p. 858-868, 1991.
- BAKKALOGLU, I.; BUTTER, T. J.; EVISON, L. M.; HOLLAND, F. S.; HANCOCK, I. C. Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 269-277, 1998.
- BARKAY, T.; SCHAEFER, J. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 318-323, 2001.
- BAYRAMOGLU, G.; BEKTAS, S.; ARICA, M. Y. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. B101, p. 285-300, 2003.
- BLACKWELL, K. J.; SINGLETON, I.; TOBIN, J. M. Metal cation uptake by yeast: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 579-584, 1995.
- BLOIS, M. S. The melanins: their synthesis and structure. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 3, p. 115-134, 1978.
- CAPORALIN, J. B. **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.
- 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 UNESP, 19., 2007, Botucatu. **Anais...** São Paulo: UNESP, 2007.
- CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C.; SODINI-GALLOT, I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 109-134, 1994.
- CHEPCANOFF, V. **Desenvolvimento de uma metodologia para a separação de samário e európio a partir de óxidos de terras raras por redução eletroquímica/precipitação**. 2006. 90 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Immobilized aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 878-884, 1974.

- COLE, G. T.; HOCH, H. C. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals.** New York: Plenum Press, 1991. p. 72-93.
- COUTO, S. R.; RIVELA, I.; MUNÓZ, M. R.; SANROMÁN, A. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.
- COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 113, p. 51-56, 1966.
- COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143-160, 2007.
- CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 38-70, 2005.
- CRIST, R. H.; OBERHOLSER, K.; SHANK, N.; NGUYEN, M. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. **Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 10, p. 1212-1217, 1981.
- DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4311-4330, 2003.
- DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R. H. S. F. *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4270-4278, 2000.
- DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 225-231, 2000.
- DINIZ, V.; VOLESKY, B. Biosorption of La, Eu e Yb using *Sargassum* biomass. **Water Research**, v. 39, p. 239-247, 2005a.
- DINIZ, V.; VOLESKY, B. Effect of conerions on lanthanum biosorption by *Sargassum polycystrum*. **Water Research**, v. 39, p. 2229-2236, 2005b.
- DINIZ, V.; VOLESKY, B. Desorption of lanthanum, europium and ytterbium from *Sargassum*. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p. 71-76, 2006.
- DÓNMEZ, G. C.; AKSU, Z.; OZTURK, A.; KUTSAL, T. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 885-892, 1999.
- DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 394-401, 2000.
- DRAKE, L. R.; LIN, S.; RAYSON, G. D.; JACKSON, P. J. Chemical modification and metal binding studies of *Datura innoxia*. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 110-114, 1996.
- DURSUN, A. Y. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper (II) and lead (II) ions onto pretreated *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 187-195, 2006.
- FARIA, R. O. **Avaliação do potencial biotecnológico de *Lentinula boryana***. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FENG, K. C.; ROU, T. M.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M.; CHANG, Y. N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of dextruxin B by *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 22-25, 2004.

FERREIRA, J. M.; HONORATO, F. L.; ALSINA, O. L. S.; OLIVEIRA, L. S. C.; CAVALCANTI, E. B.; GOMES, W. C. Estudo do equilíbrio e cinética da biossorção do Pb^{2+} por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1188-1193, 2007.

FIGUEIRA, M. M.; VOLESKY, B.; AZARIAN, K.; CIMINELLI, V. S. T. Biosorption column performance with a metal mixture. **Environmental Science Technology**, n. 34, p. 4320-4326, 2000.

FILIPOVIC-KOVACEVIC, Z.; SIPOS, L.; BRISKI, F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto Fungal Pellets *Aspergillus niger* 405 from Aqueous Solutions. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 211-216, 2000.

FOGARTY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins 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.

FOUREST, E.; ROUX, J. C. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 399-403, 1992.

FOUREST, E.; VOLESKY, B. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. **Environmental Science & Technology**, v. 30, p. 277-282, 1996.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. C. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 243-247, 2004.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 2, p. 139-145, 2002.

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, p. 834-840, 1990.

GADD, G. M. Potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271-279, 2000.

GADD, G. M.; ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 610-617, 1988.

GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 629-634, 2003.

GARCIA JUNIOR, O. Microrganismos e metais. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. p. 11-42.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 353-357, 2001.

GAVRILESCU, M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 219-232, 2004.

GILLET, F.; ROISIN, C.; FLINIAUX, M. A.; JACQUIN-DUBREUIL, A.; BARBOTIN, J. N.; NAVA-SAUCEDO, J. E. Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for the production of enhanced amounts of scopolin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 229-234, 2000.

GINISTY, P.; BESNAINOU, B.; SAHUT, C.; GUEZENNEC, J. Biosorption of cobalt by *Pseudomonas halodenitrificans*: influence of cell wall treatment by alkali and alkaline-earth metals and ion-exchange mechanisms. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1035-1039, 1998.

GOKSUNGUR, Y.; UREN, S.; GUVENC, U. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 1, p. 103-109, 2005.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2nd ed. New York: Willey-Liss, 1994. p. 266-267.

GSCHNEIDNER, K. A. **Industrial applications of rare-earths elements**. Las Vegas: American Chemical Society, 1980. p. 297.

GUENTHER, W. B. **Química quantitativa medições e equilíbrio**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972. p. 356-359.

GUPTA, C. K.; KRISHNAMURTHY, N. Extractive metallurgy of rare-earths. **International Materials Reviews**, v. 37, n. 5, p. 197-248, 1992.

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. The global rare-earth cycle. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 225, p. 609-618, 1995.

HEDRICK, J. B. Rare earths. **U. S. Geological survey minerals yearbook**. [S.l.: s.n.], 1999. v. 12, p. 1-61.

HEDRICK, J. B. **Rare-earth metals**. Disponível em: <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/rare_earths/740798.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2007a.

HEDRICK, J. B. Rare-earths. **2005 minerals yearbook**. Disponível em: <<http://minerals.usgs.gov/minerals/pub/commodity/rareearths/rareemyb05.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2007b.

HEXEL, G. B.; HEDRICK, J. B.; ORRIS, G. J. **Rare Earth elements – critical resources for high technology**. Disponível em: <<http://pubs.usgs.gov/fs/2002/fs087-02/>>. Acesso em: 18 nov. 2008.

HUANG, C. P.; WESTMAN, D.; HUANG, C.; MOREHART, A. L. The removal of cadmium (II) from dilute aqueous solutions by fungal biosorbent. **Water Science and Technology**, v. 20, p. 369-376, 1988.

HULST, A. C.; TRAMPER, J. Immobilized plant cells: a literature survey. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 9, p. 546-558, 1989.

IGNOFFO, C. M.; MARSTON, N. L.; HOSTETTER, D. L. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia* and velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, p. 259-262, 1976.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 708-717, 2000.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M. A.; McDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 375-379, 2001.

JEN, A. C.; WAKE, M. C.; MIKOS, A. G. Review: hydrogels for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 4, p. 357-364, 1996.

JIANLONG, W. Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 847-850, 2002.

JIMÉNEZ-TOBON, G. A.; PENNINGCKX, M. J.; LEJEUNE, R. The relationship between pellet size and production of Mn (II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 537-542, 1997.

JONES, A. P.; WALL, F.; WILLIAMS, C. T. **Rare Earth minerals chemistry, origin and ore deposits**. New York: Chapman & Hall, 1996.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 3, p. 221-227, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 95-104, 1999.

KARGUPTA, K.; DATTA, S.; SANYAL, S. K. Analysis of the performance of a continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, n. 1, p. 31-37, 1998.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KAZY, S. K.; DAS, S. K.; SAR, P. Lanthanum biosorption by a *Pseudomonas* sp.: equilibrium studies and chemical characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 773-783, 2006.

KEFALA, M. I.; ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A. Biosorption of cadmium ions by *Actinomyces* and separation by flotation. **Environmental Pollution**, v. 104, n. 2, p. 283-293, 1999.

KENTISH, S. E.; STEVENS, G. W. Innovations in separations technology for the recycling and re-use of liquid waste streams. **Chemical Engineering Journal**, v. 84, p. 149-159, 2001.

KNAEBEL, D. B.; STORMO, K. E.; CRAWFORD, R. L. Immobilization of bacteria in acro and microparticles. **Methods in Biotechnology**, v. 2, p. 67-78, 1997.

- KOGEJ, A.; PAVKO, A. Comparison of *Rhizopus nigricans* in a pelleted growth form with some other types of waste microbial biomass as biosorbents for metal ions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 677-685, 2001.
- KOO, K. M.; TING, Y. P. Biosorption of gold by immobilized fungal biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 51-59, 2001.
- KOURKOUTAS, Y.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1417-1425, 2001.
- KOURKOUTAS, Y.; McERLEAN, C.; KANELLAKI, M.; HACK, C. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, n. 1, p. 25-35, 2004.
- KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 291-300, 1998.
- KRISHNAN, A. S.; LALITHA, R. G. A.; MISRA, A. M. C.; KARANTH, N. G. Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum ncim 2084* cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. **Food Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 193-202, 2001.
- LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 309-313, 1998.
- LEE, Y. K.; CHEN, D. C.; CHAUVATCHARIN, S.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Production of Monascus pigment by a solid-liquid state culture method. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 8, p. 516-518, 1995.
- LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriology Review**, v. 12, n. 4, p. 297-311, 1948.
- LIU, Y.; LIU, D.; XIE, D. Improvement of glycerol production by *Candida krusei* in batch and continuous cultures using corn steep liquor. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 19, p. 1539-1542, 2002.
- LO, W.; CHUA, H.; LAM, K. H.; BI, S. P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2723-2736, 1999.
- LOVLEY, D. R.; COATES, J. D. Bioremediation of metal contamination. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 285-289, 1997.
- MAQUIEIRA, A.; ELMAHADI, H.; PUCHADES, R. Preconcentration and determination of some lanthanide elements with immobilized bacteria by flow injection inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Chemosphere**, v. 11, p. 99-106, 1996.
- MARKAI, S.; ANDRÈS, Y.; MONTAVON, G.; GRAMBOW, B. Study of the interaction between europium (III) and *Bacillus subtilis*: fixation sites, biosorption modeling and reversibility. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 262, p. 351-361, 2003.
- MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Rare earths: Industrial and biological applications. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 111-117, 2005.
- MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A biosorption of metals using nonliving biomass - a review. **Mineral and Metallurgical Processing**, v. 12, p. 189-196, 1995.
- MURALEEDHARAN, T. R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Biosorption: an attractive alternative for metal removal and recovery. **Current Science**, v. 61, n. 6, p. 379-385, 1991.

- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 91-96, 2004.
- NOURBAKSH, M.; SAG, Y.; OZER, D.; AKSU, Z.; KUTSAL, T. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters. **Process Biochemistry**, p. 29, n. 1, p. 1-5, 1994.
- OGBONNA, J. C.; AMANO, Y.; NAKAMURA, K. J. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 67, n. 2, p. 92-96, 1989.
- OLIVEIRA, R. C. **Estudo da concentração e recuperação de íons lantânio e neodímio por bioissorção em coluna com a biomassa *Sargassum* sp.** 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- PALMIERI, M. C. **Estudo da utilização de biomassas para bioissorção de terras-raras.** 2001. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
- PALMIERI, M. C.; GARCIA, O.; MELNIKOV, P. Neodymium biosorption from acidic solutions in batch system. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 441-444, 2000.
- PALMIERI, M. C.; VOLESKY, B.; GARCIA, O. Biosorption of lanthanum using *Sargassum fluitans* in batch system. **Hydrometallurgy**, v. 36, n. 1/3, p.31-36, 2002.
- PARVATHI, K.; NAGENDRAN, R.; NARESHKUMAR, R. Lead biosorption onto waste beer yeast by-product, a means to decontaminate effluent generated from battery manufacturing industry. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 92-105, 2007.
- PASSOS, C. T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp.** 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides.** New York: Academic Press, 1967. p. 219-229.
- PETHKAR, A. V.; KULKARNI, S. K.; PAKNIKAR, K. M. Comparative studies on metal biosorption by two strains of *Cladosporium cladosporioides*. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 3, p. 211-215, 2001.
- PHILIP, L.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Biosorption of U, La, Pr, Nd, Eu and Dy by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 2000.
- PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of Institute of Brewing**, v. 104, p. 19-31, 1998.
- PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAJAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 301-307, 2005.
- PREETHA, B.; VIRUTHAGIRI, T. Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus*: equilibrium and kinetic modeling. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 506-508, 2005.

PRETTI, T. S. **Otimização das condições de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais**. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

RAO, T. P.; KALA, R. On-line and off-line preconcentration of trace and ultratrace amounts of lanthanides. **Talanta**, v. 63, p. 949-959, 2004.

REZENDE, M. M.; CARDOSO, V. R. S. **Terras raras**. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriaDocumentos/SumarioMineral2007/terras_raras_SM2007.doc>. Acesso em: 20 mar. 2009.

RIZZO, D. M.; BLANCHETE, R. A.; PALMER, M. A. Biosorption of metal ions by *Armillaria rhizomorpha*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 1515-1520, 1992.

RODRIGUES, H. D. P. **Potencial biossortivo e biodegradativo das células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas em alginato de cálcio na remoção de corantes têxteis**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

ROME, L.; GADD, G. M. Use of pelleted and immobilized yeast and fungal biomass for heavy metal and radionuclide recovery. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 97-104, 1991.

SAG, Y.; AKTAY, Y. Kinetic studies on sorption of Cr(VI) and Cu(II) ions by chitin, chitosan and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 2, p. 143-153, 2002.

SANTOS, S.; MACHADO, R.; CORREIA, M. J. N.; CARVALHO, J. R. Treatment of acid mining waters. **Minerals Engineering**, v. 17, p. 225-232, 2004.

SAWALHA, M. F.; PERALTA-VIDEA, J. R.; SAUPE, G. B.; DOKKEN, K. M.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Using FTIR to corroborate the identity of functional groups involved in the binding of Cd and Cr to saltbush (*Atriplex canescens*) biomass. **Chemosphere**, v. 66, n. 8, p. 1424-1430, 2007.

SELATNIA, A.; BOUKAZOULA, A.; KECHID, N.; BAKHTI, M. Z.; CHERGUI, A.; KERCHICH, Y. Biosorption of lead (II) from aqueous solution by a bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 127-135, 2004.

SERT, S.; KUTAHYALI, C.; INAN, S.; TALIP, Z.; CETINKAYA, B.; ERAL, M. Biosorption of lanthanum and cerium from aqueous solutions by *Platanus orientalis* leaf powder. **Hydrometallurgy**, v. 90, p. 13-18, 2008.

SIEGEL, S. M.; GALUN, M.; KELLER, P.; SIEGEL, B. Z.; GALUN, E. Fungal biosorption: a comparative study of metals uptake by *Penicillium* and *Cladosporium*. In: PATERSON, J. W.; PASSINO, R. (Ed.). Metals speciation, separation and recovery. Chelsea: Lewis, 1987. p. 77-94.

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

SINHA, J.; BAE, J. T.; PARK, J. P.; SONG, C. H.; YUN, J. W. 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, June 2001.

SURYANARAYANAN, T. S.; RAVISHANKAR, J. P.; VENKATESAN, G.; MURALI, T. S. Characterization of the melanin pigment of a Cosmopolitan fungal endophyte. **Mycology Research**, v. 108, n. 8, p. 974-978, 2004.

- SZE, K. F.; LU, Y. J.; WONG, P. K. Removal and recovery of copper ion (Cu^{2+}) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5X. **Resources Conservation and Recycling**, v. 18, p. 175-193, 1996.
- TEXIER, A. C.; ANDRÈS, Y.; FAUR-BRASQUET, C.; LE CLOIREC, P. 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.
- TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 126-130, 1994.
- VEGLIÓ, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hidrometalurgy**, v. 44, p. 301-316, 1997.
- VEGLIÓ, F.; ESPOSITO, A.; REVERBERI, A. P. Copper adsorption on calcium alginate beads: equilibrium pH-related models. **Hidrometallurgy**, v. 69, p. 43-57, 2002.
- VERBELEN, P. J.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1515-1525, 2006.
- VIANNA, L. N. L.; ANDRADE, M. C.; NICOLI, J. R. Screening of waste biomass from *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus lentus* fermentations for removal of Cu, Zn and Cd by biosorption. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 437-440, 2000.
- VIEIRA, E. V.; LINS, F. F. **Concentração de minérios Terras-raras: uma revisão**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPQ, 1997.
- VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution? **International Microbiology**, v. 3, p. 17-24, 2000.
- VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hidrometallurgy**, v. 59, p. 203-216, 2001.
- VOLESKY, B. Biosorption process simulation tools. **Hidrometallurgy**, v. 71, p. 179-190, 2003.
- VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnol. Prog.**, v. 11, n. 3, p. 235-250, 1995.
- VOLESKY, B.; WEBER, J.; PARK, J. M. Continuous-flow metal biosorption in a regenerable *Sargassum* column. **Water Research**, v. 37, p. 297-306, 2003.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 427-451, 2006.
- WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.
- XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. V. Monitoração e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.
- YETIS, U.; DOLEK, A.; DILEK, F. B.; OZCENGİZ, G. The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 34, n. 16, p. 4090-4100, 2000.
- YOO, I. K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 5, p. 428-433, 1996.

YUN, Y. S.; VOLESKY, B. Modeling of lithium interference in cadmium biosorption. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 16, p. 3601-3608, 2003.

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, p. 909-916, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções de biomassa obtidas pelos tratamentos em que se variou à composição do inoculo.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,03364	1	0,03364	1,662055	0,23335	5,317655
Dentro dos grupos	0,16192	8	0,02024			
Total	0,19556	9				

ANEXO 2. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções do pigmento melanina obtidas pelos tratamentos em que se variou à composição do inoculo.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,024784	1	0,024784	3,527392	0,02441	5,317655
Dentro dos grupos	0,05621	8	0,007026			
Total	0,080994	9				

ANEXO 3. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções de biomassa obtidas pelos tratamentos em que se variou à forma de inoculação.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,296	1	1,296	63,06953	4,6E-05	5,317645
Dentro dos grupos	0,16439	8	0,020549			
Total	1,46039	9				

ANEXO 4. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções do pigmento melanina obtidas pelos tratamentos em que se variou à forma de inoculação.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,325803	1	0,325803	28,90562	0,000664	5,317645
Dentro dos grupos	0,09017	8	0,011271			
Total	0,415973	9				

ANEXO 5. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções de biomassa obtidas pelos tratamentos em que se variou à concentração de conídios.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,002403	1	0,002403	0,18936	0,674951	5,317655
Dentro dos grupos	0,1015	8	0,012688			
Total	0,103903	9				

ANEXO 6. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções do pigmento melanina obtidas pelos tratamentos em que se variou à concentração de conídios.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000655	1	0,000655	0,193325	0,671799	5,317655
Dentro dos grupos	0,027111	8	0,003389			
Total	0,027766	9				

ANEXO 7. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções de biomassa obtidas pelos tratamentos em que se variou o volume do meio de cultura.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,571759	2	0,285879	34,74819	2,34E-06	3,68232
Dentro dos grupos	0,123408	15	0,008227			
Total	0,695166	17				

ANEXO 8. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções do pigmento melanina obtidas pelos tratamentos em que se variou o volume do meio de cultura.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,29159	2	0,145795	151,5351	1,13E-10	3,68232
Dentro dos grupos	0,014432	15	0,000962			
Total	0,306022	17				

ANEXO 9. Dimensões dos Erlenmeyers utilizados no tratamento em que se variou o volume do meio de cultura (item 4.2.6 - Resultados e Discussão).

Capacidade frasco (mL)	Volume de meio (mL)	Diâmetro (cm)	Altura (cm)	Altura do líquido (cm)
500	200	10,0	17	3
1000	400	12,5	20	4
2000	800	16,0	26	5

ANEXO 10. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções de biomassa obtidas pelos tratamentos em que se variou à temperatura de incubação.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,369408	1	0,369408	47,24859	0,000128	5,317655
Dentro dos grupos	0,062547	8	0,007818			
Total	0,431956	9				

ANEXO 11. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções do pigmento melanina obtidas pelos tratamentos em que se variou à temperatura de incubação.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,044155	1	0,044155	22,57032	0,001444	5,317655
Dentro dos grupos	0,015651	8	0,001956			
Total	0,059805	9				

ANEXO 12. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções de biomassa obtidas pelos tratamentos em que se testaram diferentes formas de cultivo da linhagem MEL1.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,154084	3	0,384695	3,820015	0,030741	3,238872
Dentro dos grupos	1,61128	16	0,100705			
Total	2,765364	19				

ANEXO 13. Análise estatística dos dados (ANOVA), referente às produções do pigmento melanina obtidas pelos tratamentos em que se testaram diferentes formas de cultivo da linhagem MEL1.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,144556579	3	0,048186	10,00829	0,000592	3,238872
Dentro dos grupos	0,077033007	16	0,004815			
Total	0,221589587	19				

Ácido acético 0,1M

Ácido acético concentrado5,7mL
Água destilada até completar1000mL

Ácido clorídrico 0,1M

Ácido clorídrico concentrado0,83mL
Água destilada até completar100mL

Alaranjado de xilenol

Alaranjado de xilenol0,1g
Solução 50% etanol/água100mL

EDTA 0,01M

EDTA3,724g
Água até completar1000mL

Solução salina

Cloreto de sódio0,85g
Água estéril até completar100mL

Tampão acetato de sódio pH 5,7

Acetato de sódio13,608g
Ácido acético 0,1M até atingir pH 5,7
Água destilada até completar1000mL