

4 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados, os materiais, reagentes e equipamentos utilizados no estudo do processo de biossorção/flotação para a remoção de Pb(II), Cu(II) e Cr(III) usando *R. opacus*, bem como a metodologia experimental desenvolvida para o estudo em questão. Inicialmente é descrito o procedimento para preparação da biomassa. Em seguida são descritas a metodologia empregada nas medições eletrocinéticas, a metodologia e as condições operacionais do estudo da influência de algumas variáveis na capacidade de remoção de Pb(II), Cu(II) e Cr(III). São apresentados os procedimentos analíticos para a determinação quantitativa e assim como os procedimentos empregados na caracterização do biosorvente antes e após a biossorção. Finalmente é descrita a metodologia experimental desenvolvida para o estudo de flotação por ar disperso.

4.1. Procedência e preparo da biomassa

A cepa do microorganismo *R. opacus* foi fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello-São Paulo. A bactéria *R. opacus* referenciada como DSM 43250 foi subcultivada no laboratório usando o meio de cultura YMA composto por: glicose: 10g.l⁻¹, peptona: 5g.l⁻¹, extrato de malta: 3 g/l; extrato de levedura: 3 g.l⁻¹; CaCO₃: 2 g/l e agar: 20 g.l⁻¹. O meio de cultura foi ajustado em pH 7,2 e posteriormente esterilizado em autoclave com 1 atm de pressão, durante 20 min.

A bactéria foi cultivada durante 48 horas no meio sólido e foram identificadas as colônias características do *R. opacus*, posteriormente a bactéria foi subcultivada em tubos de preservação para manter um estoque suficiente para realizar os ensaios.

Para realizar os crescimentos e obter as células concentradas de *R. opacus*, a bactéria foi cultivada num meio líquido e utilizando a mesma composição do meio sólido descrita anteriormente sem a presença de agar-agar e de CaCO₃.

O crescimento do microorganismo *R. opacus* foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500ml por um período de 24 horas a temperatura de 28 °C em um agitador rotatório operando a 150 rpm. Após o crescimento a cultura foi separada por centrifugação a uma velocidade de 2000 rpm por 12 minutos. O precipitado obtido da centrifugação foi lavado com água deionizada e suspenso em solução de NaCl 0,1 mM (Mesquita, 2000) sendo posteriormente esterilizado em autoclave a 1 atm de pressão durante 20 min e mantido em refrigeração.

A determinação da concentração celular foi realizada pelo método de peso seco. No anexo encontrase a curva de calibração de peso seco.

4.2.

Preparo das soluções estoques dos diferentes íons metálicos

As soluções foram preparadas com água deionizada a partir dos sais de $PbCl_2$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ e $Cl_3Cr \cdot 6(H_2O)$. As soluções teste foram preparadas a partir de soluções estoque de $1000 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ adicionando os volumes necessários da solução estoque para a obtenção das concentrações iniciais desejadas. O pH foi ajustado para os valores desejados com HCl 0.1M e NaOH 0.1 M.

4.2.1.

Caracterização do Material Biosorvente

4.2.1.1.

Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Carl Zeiss - DSM 960) foi utilizado para avaliar a morfologia da biomassa antes e após a sorção das diferentes espécies metálicas e assim, analisar qualitativamente o processo de biosorção. O MEV tem uma capacidade única para analisar superfícies. A incidência do feixe de elétrons sobre a superfície da amostra promove a emissão de elétrons secundários retroespalhados e absorvidos assim como de raios X característicos. Estes elétrons são utilizados para a formação da imagem. Os elétrons têm muito mais curto comprimento de onda que os fótons luminosos, e mais curtos comprimentos de onda são capazes de gerar informação de alta resolução. Realçada resolução permite maiores magnificações sem perda de detalhes. As micrografias do MEV podem manter a aparência tridimensional da textura das superfícies (Gabriel, 1985). A combinação de alta resolução acima de 4nm, extensiva faixa de magnificação (10 a 2×10^5 vezes), e alta profundidade

de campo (voltagem de 0.2 a 40 Kv) faz que o MEV seja adequado para o estudo da superfície da biomassa microbiana.

O MEV está equipado com um sistema EDS (Energy Dispersive System) o qual é capaz de detectar raios-X emitidos por as espécies durante a excitação de um feixe de elétrons, sendo o limite de detecção da ordem de 0,5%. Estes raios X carregam uma energia e comprimento de onda característicos, cuja medida determinará a composição qualitativa e semi- qualitativa das amostras.

As amostras que não são condutoras de corrente elétrica para serem analisadas no MEV/EDS devem ser previamente metalizadas. A metalização consiste na precipitação a vácuo de uma película micrométrica de um material condutor (ouro ou prata) sobre a superfície da amostra, possibilitando a condução da corrente elétrica.

Preparação da Amostra para o MEV

Para observar como a sorção dos íons metálicos na superfície celular poderia alterar a morfologia do *R. opacus* e também para confirmar a identidade dos íons metálicos na massa celular, análises de MEV/EDS foram empregadas neste estudo. As amostras do microrganismo foram colocadas sobre uma lâmina de vidro. As mesmas foram analisadas antes e após o contato com os respectivos metais pesados numa concentração inicial de 100 mg.l⁻¹ de Pb(II), Cr(III) e Cu(II). Posteriormente as amostras foram secadas durante 24h a uma temperatura de 50 °C e finalmente metalizadas.

A metalização foi realizada com Au por deposição a vácuo para fazer um filme delgado condutor antes de serem introduzidas as amostras para análises no MEV/EDS.

4.2.1.2.

Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho

Espectros no Infravermelho do *R. opacus* e da biomassa carregada com os íons metálicos foram usados para comparar os grupos funcionais presentes na superfície do *R. opacus* antes e após interação com as soluções contendo as espécies metálicas. As análises foram realizadas no espectrofotômetro FTIR Nicolet 2000 pertencente ao Departamento da Química da PUC-Rio. Os espectros foram coletados numa resolução de 4 cm⁻¹ usando 120 scans.

As suspensões de biomassa carregada com as espécies metálicas provenientes dos testes de sorção com uma concentração inicial de metal de 100 mg.l^{-1} foram filtradas e secadas numa estufa à temperatura de 75°C . 10 mg da amostra resultante da secagem foi finamente homogeneizada com 500 mg de brometo de potássio (KBr) para preparar uma amostra translúcida.

4.2.1.3. Medições de Potencial Zeta

Medições de potencial zeta das células de *R. opacus* antes e após o contato com os íons metálicos foram realizadas usando o aparato de microelectroforesis Zeta Meter (Zeta Meter System 3.0⁺) visando estudar o possível mecanismo de biossorção e a influência das espécies metálicas nas propriedades de superfície do microorganismo.

Na determinação do Ponto Isoelétrico (PIE) das células de *R. opacus*, diferentes medidas de potencial zeta foram realizadas, empregando-se como eletrólito indiferente soluções de NaCl de diferentes concentrações: 1mM, 0,1mM e 0,01 mM. Em cada caso, as amostras foram condicionadas por 5 minutos, após ajuste dos valores de pH. A seguir, a suspensão foi mantida em repouso por 2 minutos, sendo o sobrenadante utilizado nas medidas.

Seguidamente, foram realizados ensaios onde se buscou avaliar a influência da interação entre as células de *R. opacus* e as espécies metálicas (Pb, Cu e Cr). Nesse caso, foi efetuado um pré-condicionamento das soluções metálicas com uma suspensão celular de concentração 0,2 g/L, durante 30 minutos. Após este período, o sobrenadante foi utilizado nas medidas. Nesse ensaio foram avaliados diferentes valores de pH de pré-condicionamento, sendo empregado como eletrólito uma solução de NaCl 10^{-3} M, em todas as etapas.

Os resultados de potencial zeta apresentados representam uma média de 10 valores medidos pelo aparelho.

4.3. Experimentos de Biossorção em Batelada

Os fatores que afetam a taxa de adsorção e a capacidade de captação do biossorvente foram examinados em escala de bancada. Todos os ensaios foram

realizados a temperatura ambiente com a suspensão celular em frascos erlenmeyer sob agitação constante de 175 rpm, para elucidar as condições adequadas (pH, concentração de biosorvente, tempo de contato e concentração inicial de ion metálico).

4.3.1. Efeito do pH

O efeito do pH na capacidade de captação dos íons Pb(II), Cu(II) e Cr(III) por *R. opacus* foi determinada preparando um volume de 50 ml de solução metálica para valores de pH na faixa desejada.

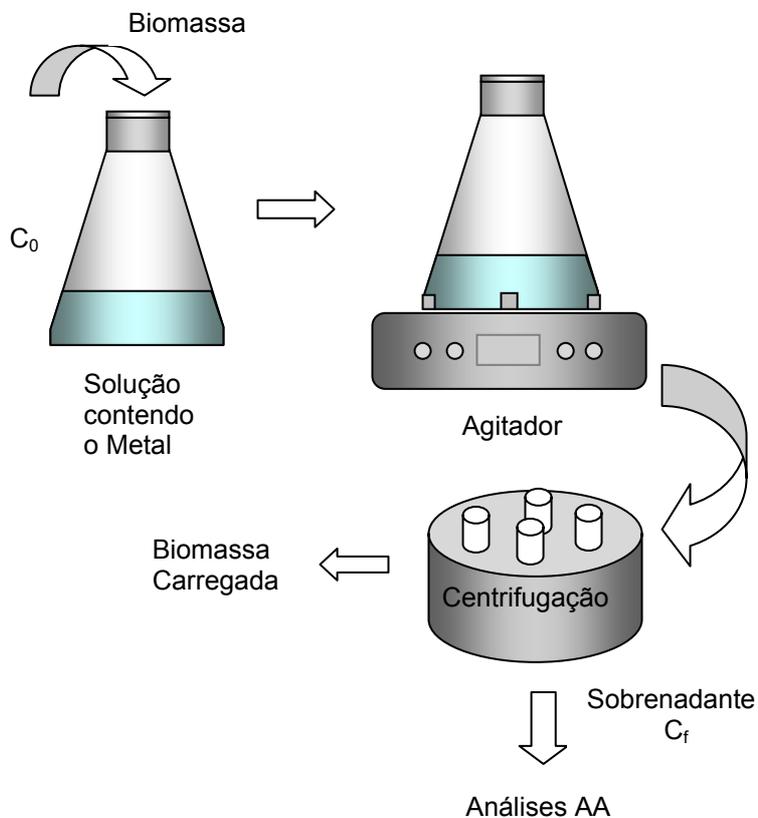


Figura 8 - Esquema dos experimentos de biossorção em batelada.

O ajuste do pH foi feito empregando-se soluções de NaOH 1M e/ou HCl 0,1M. Posteriormente foi adicionada a suspensão celular e as amostras foram mantidas em contato por 4 h a uma velocidade de rotação de 175 rpm em uma plataforma de rotação horizontal (Nova técnica CT 712) e à temperatura de 25 °C. Após atingido o equilíbrio as amostras foram retiradas e centrifugadas durante 10 minutos. O esquema dos experimentos de biossorção em batelada é apresentado na Figura 8.

As amostras foram acidificadas com uma solução de HCl 0,1M para sua preservação e posterior análise da concentração residual do metal pelo método de espectrofotometria de absorção atômica.

Na Tabela 9 são apresentadas as condições experimentais empregadas nos testes.

Tabela 9 – Condições empregadas para a determinação da influencia do pH no processo de bioissorção.

Parâmetro	Pb(II)	Cr(III)	Cu(II)
Vol. Solução metal (ml)	50	50	50
Conc. inicial metal (mg.l ⁻¹)	20	20	20
Conc. biomassa (g.l ⁻¹)	1	1	1
Veloc. Agitação (rpm)	175	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2	25±2
pH	2;3;4;5;6; 7 e 8	2;3;4;5;6;7e 8	2;3;4;5;6;7e 8
Tempo (h)	4	4	4

Foram utilizados como controle dos ensaios, brancos contendo somente água e biomassa, com o objetivo de reduzir o efeito de possíveis desvios de leituras causados pela presença de material orgânico liberado pela biomassa.

4.3.2. Efeito da Concentração de Biomassa

O efeito da concentração de biomassa foi estudado para conhecer a concentração adequada de *R. opacus* para obter a máxima bioissorção dos íons metálicos. Para isso foram realizados os ensaios com diferentes concentrações de biosorvente, empregando os valores de pH obtidos do ensaio apresentado na secção 4.3.1. Os ensaios foram realizados em forma similar aos do item 4.3.1.

Na Tabela 10 estão apresentadas as condições experimentais empregadas.

Tabela 10 – Valores experimentais dos parâmetros.

Parâmetro	Pb(II)	Cr(III)	Cu(II)
Vol. Solução metal (ml)	50	50	50
Conc. inicial metal (mg.l ⁻¹)	20	20	20
Conc. biomassa (g.l ⁻¹)	0,5; 1,0; 1,5 2,0 e 2,5	0,5; 1,0; 1,5 2,0 e 2,5.	0,5; 1,0; 1,5 2,0 e 2,5.
Veloc. Agitação (rpm)	175	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2	25±2
pH	5,0± 0.2	6,0± 0.2	6,0± 0.2
Tempo (h)	4	4	4

4.3.3.

Determinação do Tempo de Equilíbrio

O tempo de contato entre a biomassa e a solução contendo a espécie metálica foi estudado a fim de conhecer o tempo de residência necessário para a máxima bioadsorção dos metais por *R. opacus*. Para isso foram coletadas amostras para diferentes intervalos de tempo para verificar se foi atingido o equilíbrio. O valor de pH empregado para a determinação do tempo de equilíbrio foi obtido do ensaio apresentado na secção 4.3.1.

Na Tabela 11 estão apresentadas as condições experimentais empregadas.

Tabela 11 - Condições empregadas na determinação do tempo de equilíbrio

Parâmetro	Pb(II)	Cr(III)	Cu(II)
Vol. Solução metal (ml)	50	50	50
Conc. inicial metal (mg.l ⁻¹)	20	20	20
Conc. biomassa (g.l ⁻¹)	1	1	2
Veloc. Agitação (rpm)	175	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2	25±2
pH	5,0± 0.2	6,0± 0.2	6,0± 0.2
Tempo (h)	5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 180, 240	5, 10, 15, 20, 30, 45, 90, 180, 240	5, 10, 15, 20, 30, 45, 90, 180, 240

4.3.4. Efeito da Concentração inicial de Metal

O efeito da concentração de metal na capacidade de captação dos íons Pb(II), Cu(II) e Cr(III) por *R. opacus* foi avaliada na faixa de 15 a 200 mg.l⁻¹. Os experimentos foram realizados com pH de 5.0 ± 0.2 para Pb(II) e 6.0 ± 0.2 para o Cu(II) e o Cr(III) ajustado com HCl ou NaOH, e com a concentração de biomassa previamente determinada. Os ensaios foram realizados em forma similar aos do item 4.3.1.

Os resultados obtidos nestes testes foram empregados para a construção das isotermas.

Na Tabela 12 são apresentados os valores experimentais adotados para cada um dos parâmetros.

Tabela 12- Valores experimentais dos parâmetros.

Parâmetro	Pb(II)	Cr(III)	Cu(II)
Vol. Solução metal (ml)	50	50	50
Conc. inicial metal (mg.l ⁻¹)	15,30,45,60,90,100,150,200,250	15,30,45,60,90,100,150,200,250	15,30,45,60,90,100,150,200,250
Conc. biomassa (g.l ⁻¹)	1	1	2
Veloc. Agitação (rpm)	175	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2	25±2
pH	5,0± 0.2	6,0± 0.2	6,0± 0.2
Tempo (h)	4	4	4

4.3.5. Efeito da Presença de outros metais

A biossorção competitiva de Pb(II) com Cu(II) e Cr(III) foi investigada. Para a determinação das características da biossorção do Pb(II), em presença de Cu(II) e Cr(III), a concentração inicial do metal dominante Pb(II) foi variada entre 15 e 200 mg.l⁻¹, sendo mantida constante as concentrações de Cu(II) e Cr(III): 30 mg.l⁻¹. Os ensaios foram realizados seguindo o mesmo procedimento descrito para os experimentos de biossorção de uma espécie simples.

Em um segundo estágio a concentração de metal dominante foi também de 15 a 200 mg.l⁻¹, no entanto que a concentração inicial das outras espécies metálicas foi variada: 25, 50 e 100 mg.l⁻¹ para um valor de pH igual a 5,0. Foram construídas isotermas não linearizadas para a captação dos íons Pb(II) na ausência e na presença de incrementadas concentrações de íons Cr(III) e de íons Cu(II).

Na terceira parte dos estudos de biossorção competitiva, a captação dos íons Cr(III) na presença de incrementadas concentrações de Pb(II) foi investigada para valores iniciais de pH igual a 6,0. A concentração inicial dos íons Cr(III) foi variada de 15 a 200 mg.l⁻¹, mantendo a concentração inicial dos íons Pb(II) constante para 25, 50 e 100 mg.l⁻¹. Foram construídas isotermas não linearizadas para a captação dos íons Cr(III) na ausência e na presença de incrementadas concentrações de íons Pb(II).

4.4. Análise Quantitativa da Concentração dos Metais

O valor das concentrações residuais das espécies metálicas Pb(II), Cu(II) e Cr(III) obtidas nos experimentos foi determinado por espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer 1100B) pelo Laboratório de Análise Química, Departamento de Química/PUC-Rio.

A capacidade de captação pela biomassa *R. opacus* para as correspondentes condições de equilíbrio foram determinadas usando a equação (25) de balanço de massa :

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{M} \quad (25)$$

Onde:

q_e : quantidade de íon metálico captado pela biomassa (mg.g⁻¹) no equilíbrio

C_0 : concentração inicial do íon metálico (mg.l⁻¹)

C_e : Concentração do íon metálico final ou no equilíbrio (mg.l⁻¹)

V: volume da solução do íon metálico (l)

M: massa do biosorvente (g)

As características dos cumprimentos de onda usados nas análises para os três metais são listados na Tabela 13.

Tabela 13- Comprimentos de onda característicos usados por AA para os metais estudados

Metal	Comprimento de Onda (nm)
Pb	283,3
Cu	324,8
Cr	357,9

Todos os experimentos de bioadsorção foram realizados a temperatura ambiente (23-25 °C).

4.5. Estudos de Flotação por Ar Disperso

4.5.1. Descrição da Linha Experimental

A linha experimental dos ensaios de flotação sortiva realizados por ar disperso é apresentada na Figura 9.

Os ensaios de flotação sortiva foram realizados em uma coluna de flotação feita em acrílico com as seguintes dimensões: 75 cm de comprimento e diâmetro interno igual a 5,7 cm, constituída de cinco partes desmontáveis. A coluna foi construída de modo a permitir que alíquotas pudessem ser retiradas de qualquer ponto.

Na parte superior da coluna foi adaptado um recipiente, também em acrílico, com o objetivo de suportar melhor a espuma gerada, com adaptação para drenagem da mesma. Em seu segundo flange foi colocada uma torneira de vidro, para que se tornasse possível a drenagem da solução, sem que a coluna precisasse ser aberta.

De acordo com suas dimensões, a coluna de flotação possui um volume interno suficiente para a realização do teste com soluções de um litro, ainda contando com a formação de uma grande coluna de espuma.

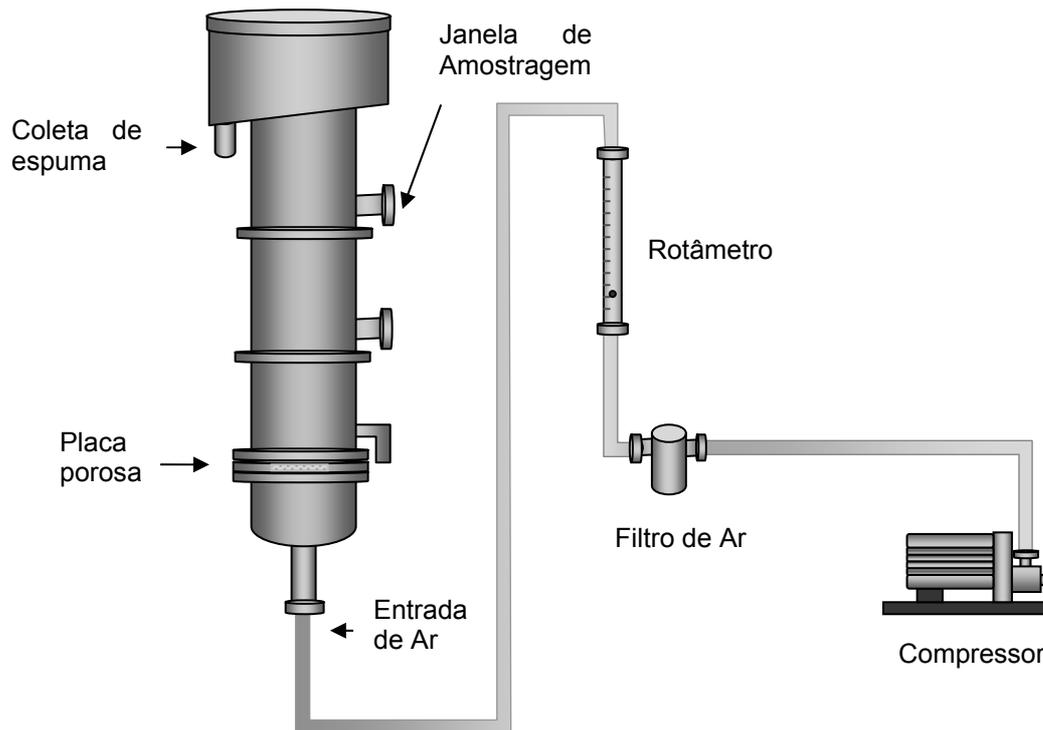


Figura 9- Linha de Montagem da Coluna de Flotação

O ar foi utilizado como fase gasosa e gerado através de um compressor. Para a geração de bolhas foi utilizada uma placa de vidro sinterizado e porosa (porosidade 4/10-15 μm) e a vazão de ar foi controlada por um rotâmetro. A calibração do rotâmetro consistiu no tempo que a bolha levou para deslocar um volume de 60 ml num cilindro graduado (fluxímetro). A curva de calibração encontra-se no anexo.

Depois de cada experimento foi realizada a drenagem da solução teste e lavagem da coluna e da placa porosa com água da torneira para retirar o excesso da solução teste, enxaguadas com uma solução de HCl (10%) de forma a decompor qualquer complexo metal-biomassa aderido à parede e à placa e enxaguados com água destilada e deionizada.

4.5.2. Metodologia Experimental dos Testes de Bioflotação

4.5.2.1. Preparo das Soluções Sintéticas

Foram preparadas soluções estoque de Pb, Cr e Cu (1000 mg/L). Para cada ensaio, a solução teste foi preparada combinando as soluções estoque do

sal do metal, biomassa de acordo com as condições desejadas de cada experimento, e água destilada para fazer um 500 ml de solução. Todas as soluções teste continham 20 mg/L das espécies metálicas (Pb, Cr e Cu). O pH da solução foi ajustado para 5,0 para os testes com Pb(II) e pH de 6,0 para os testes com Cr(III) e Cu(II), e a solução foi condicionada em um agitador magnético (marca-Fisatom) por um período de 4 horas para garantir que o processo de sorção alcance seu equilíbrio.

4.5.2.2. Testes de Bioflotação

A solução foi, então, introduzida na coluna de flotação promovendo imediatamente a passagem de ar pela solução na vazão desejada, tornando-se turva a solução devido à ascensão das bolhas. Ocorreu, então, a formação de uma camada de espuma no topo da solução, criando uma interface bem distinta entre a solução e a espuma.

Inicialmente o tempo de flotação foi de 90 minutos e as alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 5, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos, através da janela de amostragem. O armazenamento das amostras foi feito em frascos de plástico, em pH abaixo de 4, realizando-se a acidificação do meio com ácido nítrico concentrado.

Nos ensaios para se determinar o tempo no qual se atinge a máxima percentagem de remoção foram fixadas as propriedades aquosas obtidas dos ensaios de biossorção, as condições encontram-se na Tabela 14 a seguir.

Tabela 14- Condições para avaliar a velocidade de flotação.

Parâmetro	Pb(II)	Cr(III)	Cu(II)
Vol. Solução metal (ml)	500	500	500
Conc. inicial metal (mg.l ⁻¹)	20	20	20
Conc. biomassa (g.l ⁻¹)	1	1	2
Vazão de ar (cm ³ .s ⁻¹)	2,17	2,17	2,17
Temperatura (°C)	25±2	25±2	25±2
pH	5,0± 0.2	6,0± 0.2	6,0± 0.2
Tempo (h)	5, 10, 15, 20, 30, 60, 90	5, 10, 15, 20, 30, 60, 90	5, 10, 15, 20, 30, 60, 90

A remoção do metal em determinado tempo de flotação foi calculada baseando-se na concentração inicial do íon metálico, isto é:

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C_f}{C_0}\right) \times 100 \quad (26)$$

Onde:

C_f : Concentração final do íon metálico

C_0 : Concentração inicial do íon metálico

$R(\%)$: Remoção da espécie metálica

4.5.3. Caracterização das Amostras

As amostras foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica para verificar a concentração residual dos metais (Pb(II), Cr(III) e Cu(II)) e, por conseguinte, a percentagem de remoção deste metal.

Neste trabalho, o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foi utilizado para investigar a morfologia da biomassa carregada com metal obtida no topo da espuma e a Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X (EDS) foi empregada para analisar qualitativamente sua composição.

A preparação das amostras consistiu em retirar com um bastão de vidro o precipitado formado no topo da espuma, sendo depositado em uma placa de vidro; em seguida a amostra foi secada dentro de um dessecador durante 24h, sob baixo vácuo. Estes substratos foram então submetidos à deposição de ouro e, em seguida, analisados no MEV/EDS.