

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO BIOSSORVENTE

4.1.1. CULTIVO E CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO

A cepa de *Rhodococcus opacus* empregada nos experimentos, como bioissorvente e eventual biosurfatante, foi fornecida pela Fundação André Toselo (São Paulo – Brasil). É uma bactéria referenciada como DSM 43250. A bactéria foi subcultivada no laboratório usando meio de cultura “YMA” mostrado na seguinte tabela 3.

Tabela 3. Meio de Cultura YMA para o *Rhodococcus opacus*.

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO (g.L ⁻¹)
Extrato de Malte	3
Extrato de Levedura	3
Peptona	5
Glicose	10
Carbonato de Cálcio (CaCO ₃)	2
Agar – Agar	20

Primeiro a bactéria foi cultivada em um meio sólido que é mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Meio de cultivo sólido para o *Rhodococcus opacus*.

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO (g.L ⁻¹)
Extrato de Malte	10
Extrato de Levedura	4
Glicose	4
Carbonato de Cálcio (CaCO ₃)	2
Agar - Agar	12

O meio de cultura foi ajustado a um pH 7,2 e posteriormente esterilizado numa autoclave a 1atm de pressão, por um lapso de 20 minutos, durante 48 horas, depois disso foram identificadas as colônias da cepa bacteriana *Rhodococcus opacus*. Para realizar os crescimentos e obter as células concentradas do *Rhodococcus opacus*, a bactéria foi cultivada em um meio líquido especificado na tabela 5.

Tabela 5. Meio de cultivo líquido para o *Rhodococcus opacus*.

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO (g.L ⁻¹)
Extrato de Malte	3
Extrato de Levedura	3
Peptona	5
Glicose	10

O meio de cultura foi ajustado a um pH 7,2 e posteriormente esterilizado numa autoclave a 1atm de pressão, por um lapso de 20 minutos. A suspensão foi levada a um agitador tipo rotatório CIENTEC CT-712 a uma temperatura de 28°C por 48 horas. Após o crescimento, a suspensão celular foi centrifugada a uma velocidade de 2000rpm por 15 minutos, o precipitado da centrifugação, constituído pelas células do *Rhodococcus opacus*, foi lavado três vezes com água deionizada, e re-suspenso numa solução de 1mM de NaCl, posteriormente a suspensão será colocada na autoclave a 1atm de pressão por um lapso de 20 minutos, obtendo-se o biossorvente para realizar os ensaios.

A densidade óptica das suspensões da bactéria foram determinadas, em um espectrofotômetro (Biospectro SP-220), a comprimentos de onda específica para o *Rhodococcus opacus* ($\lambda = 620\text{nm}$). Calibração do peso seco da biomassa contra a densidade óptica das suspensões foi realizada nesse comprimento de onda. O peso seco da biomassa foi determinado gravimetricamente a diferentes concentrações após um secado a 60°C por 24 horas.

4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE NÍQUEL E ALUMÍNIO

Os sais de Níquel e Alumínio empregados para o preparo das soluções foram $\text{NiCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, fornecidos pela VETEC.

As soluções metálicas foram preparadas através da dissolução desses sais em água deionizada, a fim de se obter as diversas concentrações iniciais, empregadas ao longo deste trabalho.

A água deionizada empregada para realizar as diluições dos sais foi testada para se quantificar a concentração de Níquel e Alumínio existente, através da técnica de absorção atômica de chama.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO *R. opacus* ANTES E APÓS INTERAÇÃO

4.3.1. POTENCIAL ZETA

Os valores dos potenciais Zeta do *Rhodococcus opacus* sem a interação com os metais e após a interação com o níquel e o alumínio foram determinados empregando um equipamento denominado Zeta Meter System 3.0 da Zeta-Meter Inc. para os diferentes valores de pH. Este equipamento mede a velocidade eletroforética das partículas, e mediante um programa no qual ele tem inserido a equação de Smoluchowski, faz a transformação direta em potencial Zeta.

Empregou-se como eletrólito indiferente 1mM de NaCl para manter a força iônica constante. Inicialmente se condicionou 50mL de *Rhodococcus opacus* antes e depois da interação com os metais com uma agitação mecânica durante 1 minuto, ao final do condicionamento mediu-se o pH da solução, atingindo aos valores desejados com 0.1M de HCl e 0.1M de NaCl. Após ter estabelecido o valor do pH desejado esta solução coloca-se dentro da célula eletroforética, evitando a formação de bolhas de ar dentro da célula, colocam-se os eletrodos nos terminais da célula. Os eletrodos serão conectados ao sistema de medição onde se liga a lâmpada e se aplica uma diferença de potencial entre os dois eletrodos fazendo com que as partículas percorram uma determinada distância em um determinado tempo. A câmara do sistema encarrega-se de medir e transformar a velocidade eletroforética em potencial Zeta.

4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IVTF)

Os espectros de infravermelho foram usados para comparar os grupos funcionais presentes na superfície do *Rhodococcus opacus* antes e após interação com os íons metálicos.

As suspensões do *Rhodococcus opacus* antes e após interação com os íons níquel e alumínio, provenientes dos ensaios de bioabsorção, foram filtradas e

secadas numa estufa a uma temperatura de 60°C. O pó resultante da secagem de cada amostra foi apropriadamente misturado com uma matriz de brometo de potássio (KBr) numa relação de 1/50. Os espectros da bactéria e da bactéria com os íons metálicos foram obtidos num espectrofotômetro Nicolet FTIR 2000 pertencente ao Departamento da Química da PUC-Rio. Foi empregado um detector do tipo DTGS (deuterted triglycine sulphate). Os dados foram obtidos em modo de transmissão. Os espectros foram coletados numa resolução de 4cm⁻¹ após de 120 varreduras.

4.4. ENSAIOS DE BIOSSORÇÃO

4.4.1. INFLUÊNCIA DO pH

Foram realizados ensaios para avaliar a influência do pH no processo de bioissorção e determinar em que pH ótimo o bioissorvente apresenta a maior capacidade de captação, já que o pH do meio não só afeta a solubilidade dos íons metálicos, mas também consegue ativar os grupos funcionais na parede celular do bioissorvente; o efeito desta variável será avaliada na faixa de 3 – 6 devido a que a pH menores que 3 encontram-se concentrações elevadas de prótons (H⁺) os quais minimizam a bioissorção do metal e não trabalha-se acima de um pH 6 já que a precipitação dos metais é favorecida. Um volume de 100mL de solução com a presença dos íons metálicos foi mantido em contato com o bioissorvente por 8 horas a uma velocidade de rotação de 175rpm em um agitador rotatório horizontal (CIENTEC CT – 712) e a uma temperatura de 25°C. O pH do meio foi medido e ajustado para a faixa desejada. Este ajuste foi feito com soluções de 0,1M de HCl e 0,1M de NaOH. Após de atingir-se o tempo de equilíbrio as amostras são submetidas à centrifugação a 2000rpm por 10 minutos para remover o bioissorvente carregado com os íons metálicos. As amostras foram acidificadas com uma solução de 1,0M HCl para sua preservação e posterior análise da concentração residual do metal pelo método de espectrofotometria de absorção atômica a chama. Na tabela 6 são apresentadas às condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 6. Condições de trabalho para determinar a influência do pH no processo.

Parâmetro	Ni ²⁺	Al ³⁺
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	40	40
Concentração do bioissorvente (g.L ⁻¹)	2	2
Agitação (rpm)	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2
pH	3; 4; 5; 5,5; 6; 6,5	3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6,5
Tempo (horas)	8	8

4.4.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO BIOSSORVENTE

O efeito da dosagem de bioissorvente na bioissorção do Ni²⁺ e Al³⁺ de solução aquosa, foi avaliado empregando seis diferentes concentrações de bioissorvente, já que é outra variável importante na captação dos metais. O grau de bioissorção é proporcional para a área específica. A área específica será definida como a proporção de área total, parede celular, do bioissorvente disponível para a bioissorção. Ensaios foram realizados para avaliar a dosagem do *Rhodococcus opacus* na faixa de 1g.L⁻¹ até 5g.L⁻¹. O efeito da concentração do bioissorvente foi avaliada a um pH 5, onde apresenta-se a máxima captação, e uma concentração inicial de 40mg.L⁻¹ para ambos íons metálicos. Na tabela 7 são apresentadas às condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 7. Condições de trabalho para determinar a influência da concentração do bioissorvente no processo.

Parâmetro	Ni ²⁺	Al ³⁺
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	40	40
pH	5	5
Agitação (rpm)	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2
Concentração do bioissorvente (g.L ⁻¹)	2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5	2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5
Tempo (horas)	8	8

4.4.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DO ÍON METÁLICO

A taxa de bioadsorção é uma função da concentração inicial dos íons metálicos o qual faz desta uma variável importante que deve ser considerada para realizar uma bioadsorção eficaz. Os ensaios de bioadsorção foram realizados a concentrações de Níquel na faixa de 5 para 50 mg.L⁻¹, a valores de pH e concentração do bioadsorvente ótimos e mantida até o tempo de equilíbrio previamente estabelecido (8 horas). O efeito do alumínio foi avaliado na faixa de 15 para 80 mg.L⁻¹ a valores de pH e concentração do bioadsorvente ótima e mantida até o tempo de equilíbrio previamente estabelecido (8 horas). Ao final de cada ensaio a mistura foi centrifugada a 2000rpm por 10 minutos para separar o bioadsorvente carregado com o íon metálico e a concentração remanescente do íon metálico na fase líquida será avaliada mediante a técnica de absorção atômica de chama. Na tabela 8 são apresentadas às condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 8. Condições de trabalho para determinar a influência da concentração inicial do íon metálico.

Parâmetro	Ni ²⁺	Al ³⁺
Concentração de bioadsorvente (g.L ⁻¹)	3	2
pH	5	5
Agitação (rpm)	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	5; 10; 15; 20; 30; 40; 50	15; 30; 40; 50; 60; 70; 80
Tempo (horas)	8	8

4.4.4. CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO E TEMPO DE EQUILÍBRIO

A distribuição do adsorvato entre o bioadsorvente e a solução, é influenciada pelo tempo de equilíbrio. A taxa na qual, os íons metálicos são removidos da solução pelo adsorvente é uma variável significativa para o emprego em um processo de tratamento de efluentes. Os dados no efeito do tempo de contato são interpretados sob: I) O estudo da taxa constante; II) O estudo da difusão intrapartícula. Porém foram realizados ensaios para determinar o efeito do tempo de contato na bioadsorção do Níquel e Alumínio sobre o *Rhodococcus opacus*, para atingir o equilíbrio. Um volume de 100mL de solução metálica com concentrações de 5mg.L⁻¹ de níquel com uma

concentração de biossorvente de 3g.L^{-1} e 50mg.L^{-1} de alumínio com uma concentração de biossorvente de 2g.L^{-1} , sendo mantido a ma velocidade de rotação de 175rpm em uma plataforma de agitação horizontal (CIENTEC CT-712) e a uma temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

O valor do pH empregado para a determinação do tempo de equilíbrio foi obtido do ensaio apresentado 4.4.1. Este foi medido e ajustado empregando soluções de 0,1M de NaOH e 0,1M de HCl. Para diferentes tempos de contato foram coletadas amostras, ao final de cada ensaio a mistura foi centrifugada a 2000rpm por 10 minutos para separar o biossorvente carregado com o íon metálico e a concentração remanescente do íon metálico na fase líquida será avaliada mediante a técnica de absorção atômica de chama, para verificar se foi atingido o equilíbrio. Na tabela 9 estão apresentadas às condições experimentais empregadas.

Tabela 9. Condições de trabalho para determinar a influência do tempo de equilíbrio no processo.

Parâmetro	Ni^{2+}	Al^{3+}
Concentração inicial do metal (mg.L^{-1})	5	50
Concentração de biossorvente (g.L^{-1})	3	2
Agitação (rpm)	175	175
pH	5	5
Tempo (min)	5; 10; 15; 20; 30; 60; 120; 180	5; 10; 20; 30; 60; 120; 180
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	25 ± 2	25 ± 2

4.4.5. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A temperatura possui um efeito pronunciado na biossorção. Os ensaios para a avaliação da temperatura foram semelhantes aos da realização da cinética de biossorção. Ao final de cada ensaio a mistura foi centrifugada a 2000rpm por 10 minutos para separar o biossorvente carregado com o íon metálico e a concentração remanescente do íon metálico na fase líquida será avaliada mediante a técnica de absorção atômica de chama. Na tabela 10 são apresentadas às condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 10. Condições de trabalho para determinar a influência da temperatura no processo

Parâmetro	Ni ²⁺	Al ³⁺
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	5	50
Concentração de biossorvente (g.L ⁻¹)	3	2
Agitação (rpm)	175	175
pH	5	5
Tempo (min)	5; 10; 15; 20; 30; 60; 120; 180	5; 10; 20; 30; 60; 120; 180
Temperatura (°C)	25; 35; 45±2	25; 35; 45±2

4.4.6. INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA

A natureza química dos eletrólitos, algumas vezes afeta as propriedades da superfície do biossorvente e a química da solução, fazendo com que se tenha uma mudança nas propriedades de captação do biossorvente. A biossorção do níquel e alumínio sobre o *Rhodococcus opacus* foi estudado na presença de eletrólitos como NaCl a diversas concentrações. O efeito da força iônica na capacidade do *Rhodococcus opacus* para remoção do níquel e alumínio de solução aquosa foi determinado por estabelecer isotermas de adsorção. Ao final de cada ensaio a mistura foi centrifugada a 2000rpm por 10 minutos para separar o biossorvente carregado com o íon metálico e a concentração remanescente do íon metálico na fase líquida será avaliada mediante a técnica de absorção atômica de chama. Na tabela 11 são apresentadas às condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 11. Condições de trabalho para determinar a influência da força iônica no processo

Parâmetro	Ni ²⁺	Al ³⁺
Concentração de biossorvente (g.L ⁻¹)	3	2
pH	5	5
Agitação (rpm)	175	175
Temperatura (°C)	25; 35; 45 ± 2	25; 35; 45 ± 2
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	5; 10; 15; 20; 30; 40; 50	15; 30; 40; 50; 60; 70; 80
Força Iônica	0; 0,001; 0,01	0; 0,001; 0,01
Tempo (horas)	8	8

4.5. ENSAIOS DE FLOTAÇÃO BIOSORTIVA

Os ensaios de flotação biossortiva foram realizados em um tubo de Hallimond modificado. Antes de realizar os ensaios flotação o rotâmetro foi calibrado para garantir uma vazão de ar entre 25 e 100 mL.min⁻¹. O ar empregado para a flotação foi obtido mediante um compressor.

Foram realizados ensaios para se determinar o tempo no qual se atinge a máxima porcentagem de remoção fixando as propriedades aquosas obtidas nos ensaios de biossorção, as condições experimentais encontram-se na tabela 12.

Tabela 12. Condições de trabalho para determinar a influência do tempo e da vazão de ar no processo

Parâmetro	Ni ²⁺	Al ³⁺
Concentração de biossorvente (g.L ⁻¹)	3	2
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	5	50
pH	5	5
Temperatura (°C)	25±2	25±2
Tempo (min)	5; 10; 15; 20	5; 10; 15; 20
Vazão de ar (mL.min ⁻¹)	50; 100; 150	50; 100; 150
Vol. Solução do metal (mL)	70	70

O sistema de flotação foi montado no laboratório de concentração física do DCMM da PUC-Rio.