

## 4

### **Materiais e Métodos**

Neste capítulo são apresentados os materiais, reagentes e equipamentos utilizados no estudo do processo de bioissorção dos íons metálicos  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando a biomassa microbiana *Rodococcus opacus*, bem como a metodologia experimental desenvolvida para o estudo em questão. Inicialmente é descrito o procedimento para preparação da biomassa, em seguida é descrita a metodologia de análise.

#### **4.1.**

##### **Procedência e preparo da biomassa**

A cepa do microorganismo *Rodococcus opacus* foi fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello São Paulo. A bactéria foi cultivada durante 48 horas em meio YMA, foram identificadas as colônias características do *R. opacus*, posteriormente a bactéria foi replicada em tubos de preservação para manter um estoque suficiente para realizar os ensaios.

Para realizar o crescimento e obter a biomassa de *R. opacus*, a bactéria foi cultivada no meio de cultura YMA composto por: glicose:  $10\text{g.L}^{-1}$ , peptona:  $5\text{g.L}^{-1}$ , extrato de malta:  $3\text{g.L}^{-1}$ ; extrato de levedura:  $3\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{CaCO}_3$ :  $2\text{g.L}^{-1}$  e agar:  $20\text{g.L}^{-1}$ . O meio de cultura foi ajustado em valor de pH 7,2 usando NaOH a uma concentração de 0,1M.

Para realizar o crescimento e obter a biomassa de *R. opacus*, a bactéria foi cultivada num meio líquido e utilizando a mesma composição do meio sólido descrito anteriormente sem a presença de agar-agar e de  $\text{CaCO}_3$ , logo após o meio de cultura foi esterilizado em autoclave de marca primatec com 1 atm de pressão, durante 20 min. Para determinar a concentração da biomassa foi utilizado o método do peso seco.

## 4.2.

### Pré tratamento da biomassa

Segundo Hughes e Poole (2000), a biossorção, representa a soma de todas as interações passivas da parede celular com íons metálicos. Estes formam as reações de adsorção, as reações de troca iônica com grupos funcionais na superfície da célula na superfície e de reações de complexação.

Métodos físicos de pré-tratamento são utilizados tais como aquecimento, autoclave, liofilização e destilação e pré-tratamento químico utilizando ácidos, bases e produtos químicos orgânicos no qual apresentaram aumento ou redução na capacidade de adsorção do metal, dependendo das cepas de fungos e procedimentos utilizados. (Huang *et al.*, 1988; Kuyucak e Volesky.,1988; Paknikar *et al.*, 1993; Kapoor e Viraraghavan., 1998).

Para o caso da cepa *R opacus* cultivada como descrita no item 4.1 o pré tratamento em questão foi a adição de 30 mL de NaOH com uma concentração de 0,1M em 100mL de biomassa concentrada. Essa mistura foi submetida à agitação por 180 minutos com uma incubadora com uma rotação de 120 rpm. Logo em seguida a mistura foi centrifugada e lavada por 3 vezes com água deionizada onde se obteve uma nova concentração de biomassa pré tratada. Essa concentração apresenta um pH, elevado pela adição de NaOH, assim sendo adicionou-se HCl a 0,1M até o valor do pH desejado para realizar os testes experimentais.

As variáveis analisadas com a biomassa pré - tratada foram: Variação de pH, Concentração de Biomassa e Concentração de íon metálico.

## 4.3.

### Experimentos de Biossorção em Batelada

As soluções metálicas foram preparadas utilizando sais de sulfato de cobalto e sulfato de cobre fornecido pela VETEC.

Fatores importantes que afetam a capacidade de captação do biosorvente foram examinados em escala de bancada. Todos os ensaios foram realizados com a suspensão celular em frascos de erlenmeyer sob agitação constante de 125 rpm, para elucidar as condições adequadas como: pH, concentração de biosorvente, tempo de contato, concentração inicial de íon metálico e temperatura de adsorção.

#### 4.4.

#### Análise Quantitativa da Concentração dos Metais

A determinação das concentrações após o período de adsorção dos metais  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  pela biomassa *R. opacus* foi quantificada através de análise no aparelho espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) localizado no Departamento de Química/PUC-Rio.

O comprimento de onda usado foi de 324,752nm para o  $\text{Cu}^{2+}$  e 238,892 para o  $\text{Co}^{2+}$ .

#### 4.5.

#### Efeito do pH

Foram realizados ensaios para a determinação do efeito do pH na adsorção do  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  pela biomassa *R. opacus*.

Sabendo-se que ocorrem diferenças nos grupos funcionais da biomassa de acordo com o valor do pH do meio, a faixa de pH testada foi avaliada de 3 a 10, pelo motivo de valores de pH menores que 3 encontram-se concentrações elevadas de prótons ( $\text{H}^+$ ) os quais minimizam a biossorção do metal enquanto valores de pH 6 para o  $\text{Cu}^{2+}$  e 8 para o  $\text{Co}^{2+}$  ocorre a precipitação dos metais. Um volume de 50 mL de solução com a presença dos íons metálicos foi mantido em contato com o biossorvente por 3 horas a uma velocidade de rotação de 125rpm em um agitador rotatório horizontal (CIENTEC CT – 712) e a uma temperatura de 25°C. Nas Tabelas 16 e 17 são apresentadas às condições experimentais empregadas para avaliação do pH.

Tabela 16 – Condições empregadas para a determinação da influência do pH no processo de biossorção.

| Parâmetro                                        | Co(II)                  | Cu(II)                  |
|--------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Volume de solução (ml)                           | 50                      | 50                      |
| Concentração inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> ) | 23                      | 21                      |
| Concentração da biomassa (g.L <sup>-1</sup> )    | 1                       | 1                       |
| Velocidade. Agitação (rpm)                       | 125                     | 125                     |
| Temperatura (oC)                                 | 25±2                    | 25±2                    |
| pH                                               | 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 | 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 |
| Tempo (h)                                        | 3                       | 3                       |

Para a determinação do pH de melhor adsorção da biomassa pré tratada foi avaliada a faixa de pH 5 a 8, para o  $\text{Co}^{2+}$  e 4 a 6 para o  $\text{Cu}^{2+}$  tendo o motivo de valores de pHs menores encontram-se concentrações elevadas de prótons ( $\text{H}^+$ ) e não trabalha-se acima de um pH 6 para o  $\text{Cu}^{2+}$  e 8 para o  $\text{Co}^{2+}$  já que a precipitação dos metais é favorecida.

Tabela 17 – Condições empregadas para a determinação da influencia do pH no processo de bioadsorção (utilizando biomassa pré tratada com NaOH).

| Parâmetro                                 | Co (II) | Cu (II) |
|-------------------------------------------|---------|---------|
| Volume da Solução metálica (ml)           | 50      | 50      |
| Conc. Inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> ) | 15      | 15      |
| Conc. biomassa (g.L <sup>-1</sup> )       | 3       | 3       |
| Veloc. Agitação (rpm)                     | 125     | 125     |
| Temperatura (°C)                          | 25±2    | 25±2    |
| pH                                        | 5;6;7   | 4;5;6;  |
| Tempo (h)                                 | 3       | 3       |

O ajuste do pH foi feito empregando-se soluções de NaOH 0,1M ou HCl 0,1M. Posteriormente foi adicionada a suspensão celular e as amostras foram mantidas em contato por 3h a uma velocidade de rotação constante de 125 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 sobrenadante foi levado para realizar as análises no aparelho ICP-OES e a biomassa contendo os íons metálicos foi separada para posterior caracterização.

#### 4.5.1.

##### Efeito da Concentração de Biomassa

A concentração de bioadsorvente influencia na capacidade de bioadsorção. Em muitos casos, concentração mais baixa de bioadsorvente pode provocar um menor rendimento de remoção.

Um aumento na concentração de biomassa em geral, aumenta a quantidade de soluto bioadsorvido, devido ao aumento da área superficial do bioadsorvente, o que aumenta o número de ligação nos sítios (Esposito *et al.*, 2001).

Inversamente, a quantidade de soluto bioissorvido por unidade de bioissorvente pode diminuir com o aumento de dosagens do bioissorvente podendo ser devido à complexa interação de vários fatores como a quantidade demasiada de sítios de ligações disponíveis.

A concentração de biomassa *R. opacus* foi estudada com o objetivo de conhecer a concentração adequada para obter a máxima bioissorção dos íons metálicos.

Foram realizados ensaios com diferentes concentrações de bioissorvente, empregando os melhores valores de pH obtidos do ensaio apresentado na secção 4.4.1 Os ensaios foram realizados em forma similar aos do item 4.4. Nas Tabelas 18 e 19 são apresentadas às condições experimentais empregadas para avaliação da concentração de biomassa em solução.

Tabela 18 – Condições empregadas para a determinação da influencia da concentração de biomassa no processo de bioissorção

| Parâmetro                                 | Co(II)                              | Cu(II)                               |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Volume da Solução metálica (ml)           | 50                                  | 50                                   |
| Conc. inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> ) | 5                                   | 15                                   |
| Conc. biomassa (g.L <sup>-1</sup> )       | 0,5; 1,0; 1,5 2,0; 2,5;<br>3,0; 3,5 | 0,5; 1,0; 1,5 2,0; 2,5;<br>3,0; 3,5. |
| Veloc. Agitação (rpm)                     | 125                                 | 125                                  |
| Temperatura (oC)                          | 25±2                                | 25±2                                 |
| pH                                        | 7,0± 0.2                            | 6,0± 0.2                             |
| Tempo (h)                                 | 3                                   | 3                                    |

Tabela 19 – Condições empregadas para a determinação da influencia da concentração de Biomassa (utilizando biomassa pré-tratada com NaOH).

| Parâmetro                                | Co(II)   | Cu(II)   |
|------------------------------------------|----------|----------|
| Volume da Solução metálica (ml)          | 50       | 50       |
| Conc. inicial metal(mg.L <sup>-1</sup> ) | 5        | 15       |
| Conc. biomassa (g.L <sup>-1</sup> )      | 3        | 3        |
| Veloc. Agitação (rpm)                    | 125      | 125      |
| Temperatura (°C)                         | 25±2     | 25±2     |
| pH                                       | 7,0± 0.2 | 6,0± 0.2 |
| Tempo (h)                                | 3        | 3        |

#### 4.5.2.

##### Efeito da Concentração inicial de Metal

Ensaio foram realizados com pH de  $6.0 \pm 0.2$  para  $\text{Cu}^{2+}$  e  $7.0 \pm 0.2$  para o  $\text{Co}^{2+}$  ajustado com HCl ou NaOH, ambos a 0,1M e com a concentração de biomassa previamente determinada em  $3\text{g.L}^{-1}$ . Os ensaios foram realizados de forma similar aos do item 4.4.

A capacidade de captação dos íons  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  por *R. opacus* foi avaliada na faixa de 5 a 200  $\text{mg.L}^{-1}$ . Os resultados obtidos nestes testes foram empregados para a construção das isotermas de adsorção.

Nas Tabelas 21 e 22 são apresentadas às condições experimentais empregadas para avaliação da influencia da concentração inicial de íon metálico no processo de bioadsorção.

Tabela 20 – Condições empregadas para a determinação da influencia da concentração inicial de íon metálico no processo de bioadsorção.

| Parâmetro                                  | Co(II)                                | Cu(II)                                |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Volume da Solução metálica (ml)            | 50                                    | 50                                    |
| Conc. inicial metal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) | 5, 15, 25, 35, 45, 50<br>75, 100, 200 | 5, 15, 25, 35, 45, 50<br>75, 100, 200 |
| Conc. biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )       | 3                                     | 3                                     |
| Veloc. Agitação (rpm)                      | 125                                   | 125                                   |
| Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )         | $25 \pm 2$                            | $25 \pm 2$                            |
| pH                                         | $7.0 \pm 0.2$                         | $6.0 \pm 0.2$                         |
| Tempo (h)                                  | 3                                     | 3                                     |

Tabela 21 – Condições empregadas para a determinação da influência da concentração inicial de íon metálico no processo de bioadsorção (utilizando biomassa pré tratada com NaOH).

| Parâmetro                                     | Co(II)        | Cu(II)        |
|-----------------------------------------------|---------------|---------------|
| Volume da Solução metálica (ml)               | 50            | 50            |
| Conc. inicial metálica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) | 3; 5; 15; 20  | 3; 5; 15;     |
| Conc. biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )          | 3             | 3             |
| Veloc. Agitação (rpm)                         | 125           | 125           |
| Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )            | $25 \pm 2$    | $25 \pm 2$    |
| pH                                            | $7.0 \pm 0.2$ | $6.0 \pm 0.2$ |
| Tempo (h)                                     | 3             | 3             |

### 4.5.3.

#### Determinação do Tempo de Equilíbrio

O tempo de equilíbrio é importante na determinação da ordem cinética da reação. Normalmente, o processo de bioabsorção envolve duas etapas: A absorção inicial muito rápida 30-60 min, seguido de um etapa mais lenta para atingir o equilíbrio entre 2 ou 3 h (Celaya *et al.*, 2000; Choi Yun., 2004, Lu *et al.*, 2006). Na Tabela 22 estão apresentadas às condições experimentais empregadas.

Tabela 22 – Condições empregadas para a determinação da influencia da velocidade de captação no processo de bioabsorção.

| Parâmetro                                 | Co (II)                                | Cu (II)                                |
|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Volume da Solução metálica (ml)           | 50                                     | 50                                     |
| Conc. inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> ) | 15                                     | 15                                     |
| Conc. biomassa (g.L <sup>-1</sup> )       | 3                                      | 3                                      |
| Veloc. Agitação (rpm)                     | 125                                    | 125                                    |
| Temperatura (oC)                          | 25±2                                   | 25±2                                   |
| pH                                        | 7,0± 0.2                               | 6,0± 0.2                               |
| Tempo (h)                                 | 5; 10; 15; 20; 30;<br>60; 90; 180; 240 | 5; 10; 15; 20; 30; 60;<br>90; 180; 240 |

### 4.5.4.

#### Efeito da temperatura no processo de bioabsorção

Temperaturas mais altas geralmente aumentam a eficiência de bioabsorção devido ao aumento da atividade de superfície e energia cinética do soluto (SAG e Kutsal., 2000; Vijayaraghavan e Yun, 2007), no entanto, danos físicos para o bioabsorvente podem ser esperados em altas temperaturas. As temperaturas analisadas foram de 25°C, 35°C e 45°C.

Tabela 23 – Condições empregadas para a determinação da influencia da temperatura no processo de bioabsorção.

| Parâmetro                              | Co (II) | Cu (II)  |
|----------------------------------------|---------|----------|
| Volume da Solução metálica (ml)        | 50      | 50       |
| Conc. de biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) | 3       | 3        |
| Veloc. de agitação (rpm)               | 125     | 125      |
| Temperatura (oC)                       | 35;45   | 35;45    |
| pH                                     | 7,0±0,2 | 7,0 ±0,2 |
| Tempo (h)                              | 3       | 3        |