

4 Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentados os materiais, reagentes e equipamentos, assim como as metodologias experimentais utilizadas na realização deste trabalho.

4.1.

Obtenção e preparo da biomassa

Neste trabalho, a bactéria *Rhodococcus opacus* foi utilizada como bioissorvente. Ela foi obtida da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas/São Paulo.

A bactéria *R. opacus* foi cultivada em meio sólido, por 72 horas. O meio de cultura sólido foi obtido utilizando glicose 10 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹, extrato de malte 3 g.L⁻¹, extrato de levedura 3 g.L⁻¹ e agar-agar 20 g.L⁻¹.

Para obtenção da biomassa utilizada nos experimentos, foram realizados inóculos em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 ml de meio de cultura líquida, ajustando o pH para 7,2 com NaOH a 0,1 mol.L⁻¹ ou HCl a 0,1 mol.L⁻¹. O meio de cultura líquido foi obtido da mesma maneira que o meio de cultura sólida, exceto pela ausência do agente gelificante, o agar-agar.

Em seguida, os frascos foram fechados com rodilhão de algodão e gases e, tampados com papel Kraft para então serem esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Em uma cabine de segurança biológica (Filterflux Classe II A2) previamente esterilizada, foram coletadas porções da cultura sólida e transferidas para os meios de cultura líquidos. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de uma alça de platina flambada. Em seguida, os frascos foram mantidos em uma incubadora com plataforma de rotação horizontal, sob agitação constante (125 rpm) e a 28°C por 48 horas. Após o crescimento, a suspensão celular foi centrifugada a uma velocidade de 3500 rpm por 10 minutos e o material precipitado foi submetido à lavagem com água deionizada por três vezes. Assim, a

biomassa obtida foi concentrada em um erlenmeyer e autoclavada para inativação da bactéria.

4.1.1.

Tratamento da biomassa com NaOH

Após inativação, a biomassa foi tratada com NaOH. Para este procedimento, foram adicionados 30 ml de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ para cada 100 mL de biomassa concentrada. Em seguida, a suspensão foi mantida sob agitação em plataforma de rotação horizontal a 125 rpm, 25°C por 3 horas. Após este tempo de contato, a biomassa foi lavada três vezes com água deionizada e seu pH foi ajustado em torno de 7 com HCl a 0,1 mol.L⁻¹.

4.1.2.

Determinação da concentração da biomassa

A concentração da biomassa em g.L⁻¹ foi determinada utilizando o método de sólidos suspensos totais (SST) de acordo com *Standard Methods*, citado na literatura como sendo o método utilizado em trabalhos científicos para determinar a concentração de biomassas. Neste procedimento, a concentração celular é determinada através do peso seco de uma amostra retirada do concentrado celular.

Para tal, uma alíquota de 4 mL do concentrado foi pipetado e foi filtrado a vácuo através de uma membrana de acetato de celulose de 0,45 micrometros. Em seguida, a amostra do sólido retido na membrana foi seco a 103-105 °C por aproximadamente 1 hora (ou pelo tempo necessário para manter o peso constante em balança de precisão). A Figura 13 mostra esquematicamente o procedimento para o preparo da biomassa a partir da cepa até obtenção da concentrado final.

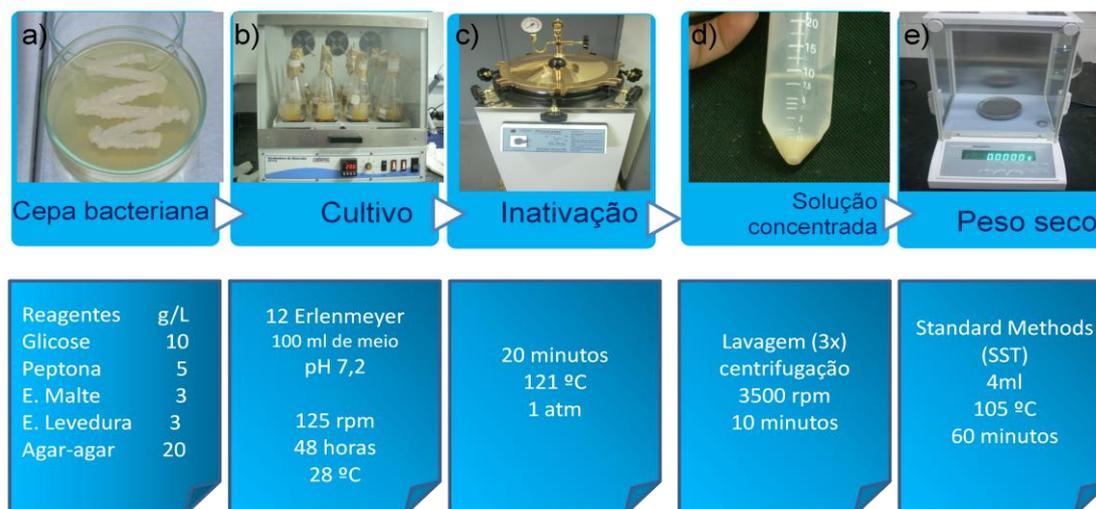


Figura 13. Obtenção da biomassa. a) Colônia bacteriana *Rhodococcus opacus* em meio sólido; b) Cultivo em meio líquido em incubadora com plataforma de rotação horizontal; c) Inativação da bactéria em autoclave; d) Concentrado de biomassa obtido após a centrifugação a pH 7; e) Determinação da concentração da biomassa através do peso seco.

4.2.

Preparo da solução estoque dos íons Co(II) e Mn(II)

Foram preparadas soluções estoques de 500 mg.L^{-1} de íon metálico utilizando água deionizada. A solução estoque de íon Co(II) foi preparada a partir do $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ com 98% de pureza. Para a solução estoque de Mn(II) foi utilizado o $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com 98,01% de pureza. As soluções utilizadas nos ensaios de adsorção foram preparadas a partir da solução estoque para obtenção das concentrações desejadas.

4.3.

Caracterização da superfície da *R. opacus*

Para caracterização da biomassa antes e após os experimentos de biossorção para remoção de Co(II) e Mn(II) de soluções aquosas, foram realizados ensaios em microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho e potencial zeta.

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

O MEV foi utilizado para avaliar a morfologia da biomassa antes e após os ensaios. As amostras foram previamente secas a vácuo e em seguida metalizadas com ouro para obtenção das micrografias.

Esta técnica é capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície das amostras. As imagens obtidas proporcionam uma observação tridimensional detalhada das características morfológicas e são úteis para avaliar a estrutura superficial da biomassa proporcionando uma análise qualitativa da superfície bacteriana.

Neste trabalho foi utilizado o MEV equipado com o sistema EDS (Energy Dispersive System). Este sistema é utilizado como uma técnica analítica para quantificação dos elementos em fração mássica e caracterização química pontual, fornecendo uma estimativa da composição da amostra.

4.3.2. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da biomassa *R. opacus* foi realizada para comparar os grupos funcionais presentes no microorganismo antes e após os ensaios de biossorção. Para cada amostra, uma alíquota de 1mg de biomassa, seca e macerada, foi homogeneizada com 100 mg de brometo de potássio (KBr) e prensada a fim de preparar uma amostra de pastilhas translúcidas.

O espectro obtido no infravermelho fornece um agregado muito rico de bandas de absorção. A análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornecem, através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula. Tanto o comprimento de onda quanto o número de onda (cm^{-1}) são usados para medir a posição de uma determinada absorção no infravermelho. A radiação infravermelha corresponde à parte situada entre as regiões do visível e das microondas. A região do infravermelho que utiliza-se normalmente para análise é chamado infravermelho médio e consiste do intervalo de 400 a 4000cm^{-1} . Assim, este equipamento permite investigar a composição de uma

amostra e de identificar os grupos funcionais presentes na parede celular da biomassa.

4.3.3. Potencial Zeta

Ensaio de potencial zeta foram realizados em Zeta Meter System 4.0 para determinar a carga elétrica superficial do microorganismo em diferentes valores de pH. Quase todas as partículas adquirem carga elétrica em contato com um líquido. As cargas na superfície estão relacionadas aos fenômenos de superfície. Desta forma, o potencial zeta é uma função da carga superficial da partícula e da natureza e composição do meio líquido que o circunda

As amostras foram preparadas utilizando-se como eletrólito suporte uma solução de NaCl $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ com concentração de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Os valores de pH foram corrigidos utilizando-se soluções de HCl e NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. A medida de potencial zeta foi obtida por meio da aplicação de um potencial elétrico constante em toda a suspensão e pela determinação da taxa na qual as partículas migram para a célula (mobilidade eletroforética).

4.4. Ensaio de bioadsorção

Os ensaios de bioadsorção foram realizados em batelada utilizando erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução experimental total. Os frascos com as soluções experimentais foram mantidos sob agitação constante em uma plataforma de rotação horizontal.

As variáveis estudadas, objetivando determinar as condições experimentais adequadas para máxima bioadsorção de Co(II) e Mn(II) por *R. opacus* e consideradas relevantes ao processo foram: pH, concentração de biomassa, concentração inicial de metal, tempo de contato e temperatura conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Condições experimentais utilizadas no processo de biossorção

Condições experimentais		
	Co	Mn
Volume da solução (ml)	50	50
Velocidade de agitação (rpm)	125	125
pH	4 a 9	3 a 7
Concentração da biomassa (g.L ⁻¹)	1 a 5	1 a 5
Concentração inicial do metal (mg.L ⁻¹)	5 a 120	5 a 120
Tempo de contato (minutos)	10 a 180	10 a 180
Temperatura °C	25 ; 35 ; 45	25 ; 35 ; 45

Foram aplicados os dados sobre os melhores valores de cada condição experimental para os testes seguintes.

Para avaliar o pH foram fixados os seguintes parâmetros: concentração da biomassa de 1 g.L⁻¹, concentração inicial do metal a 50 mg.L⁻¹, 180 minutos de tempo de contato e 25°C. Para o experimento com variação da concentração da biomassa utilizou-se o pH definido no experimento anterior, a concentração inicial do metal a 50 mg.L⁻¹, 180 minutos de tempo de contato e temperatura de 25°C. Para analisar a influência da concentração inicial do metal foram utilizados os melhores resultados obtidos nos ensaios de pH e concentração da biomassa, a temperatura utilizada foi de 25°C e tempo de contato de 180 minutos. Para a determinação do tempo de contato foi utilizado 25°C de temperatura e os melhores valores dos parâmetros avaliados anteriormente. Assim, o mesmo procedimento foi utilizado para avaliação da temperatura.

Após a realização de cada experimento, a biomassa foi removida da solução por centrifugação e a solução sobrenadante com metal residual foi separado para análise, e a concentração determinada como mostra a Figura 14.

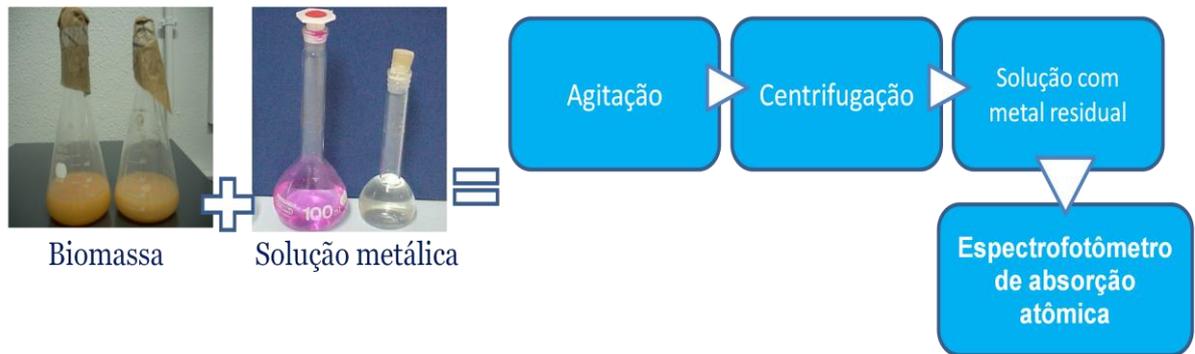


Figura 14. Representação simplificada dos ensaios de biossorção.

As concentrações residuais de íons Co(II) e Mn(II) foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica por chama (EAA) realizadas no Laboratório de Análise Química do Departamento de Química da PUC-Rio utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica modelo 1100B da Perkin Elmer.

Para a leitura das amostras, foram feitas diluições das mesmas para que as concentrações dos metais, Co(II) e Mn(II), nelas contidas ficassem dentro do intervalo de detecção determinado pelo aparelho. A Figura 15 apresenta as curvas de calibração dos íons Co(II) e Mn(II).

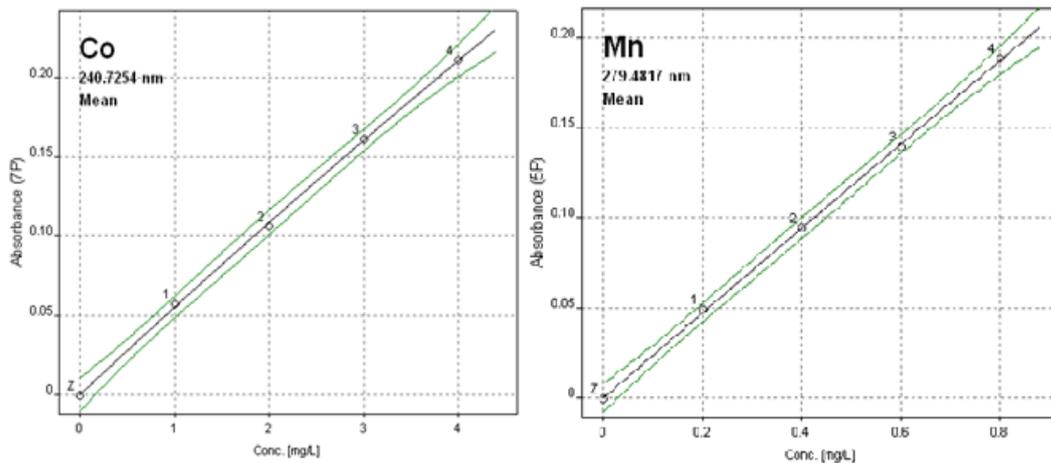


Figura 15. Curva de calibração obtida por espectrofotometria de absorção atômica para o Co(II) e Mn(II).

4.4.1. Análise quantitativa da concentração dos metais

A capacidade de captação e a porcentagem de remoção dos íons de metálicos Co(II) e Mn(II) pela biomassa *R. opacus* para as correspondentes condições de equilíbrio foram determinadas utilizando as equações a seguir:

Para calcular o percentual de remoção do processo foi utilizada a equação 16.

$$\%rem = (C_i - C_f) / C_i \times 100 \quad (16)$$

Onde C_i é a concentração inicial de metal (mg.L^{-1}) na fase aquosa antes do contato com o biossorvente; C_f é a concentração final de metal (mg.L^{-1}) na fase aquosa após o contato com o biossorvente;

A capacidade de captação (q) foi determinada pela equação 17:

$$q(\text{mg.g}^{-1}) = \frac{(C_i - C_f)V}{M} \quad (17)$$

Sendo V o volume da solução em litros e M a quantidade de biomassa em gramas.