

## 4 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados, os materiais, reagentes e equipamentos utilizados no estudo de bioissorção para a remoção de Co(II) e Ni(II) usando a biomassa bacteriana *R. ruber*, bem como a metodologia experimental utilizada. A primeira parte discorre sobre o estabelecimento das melhores condições experimentais para crescimento da biomassa. Na segunda serão descritas as metodologias empregadas no estudo da interação entre a biomassa e os metais. Na terceira parte, são apresentados os procedimentos analíticos para a determinação quantitativa e assim como as técnicas empregadas na caracterização da biomassa antes e após bioissorção.

### 4.1. Soluções Estoque

A partir de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  com grau de pureza 98 %, ambos fornecidos pela VETEC foram preparadas soluções estoques  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para proceder posteriores diluições para obtenção das concentrações desejadas a serem utilizadas nos ensaios de bioissorção.

### 4.2. Soluções de Íons Metálicos para Bioissorção

Nos experimentos de bioissorção utilizaram-se soluções metálicas de  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Co(II) e Ni(II). Durante o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas também soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M para ajuste do pH das soluções.

### 4.3. Microorganismo Utilizado

A cepa do microorganismo *R. ruber* utilizada é proveniente da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello - Campinas, São Paulo, registrada pelo centro sob o número 1879.

#### 4.3.1. Influência/Efeito do Meio de Cultivo no Crescimento de *R. ruber*

Foram testados três diferentes tipos de meios de cultura comumente utilizados para crescimento de células bacterianas. Os meios de cultura utilizados foram o YMB (*Yeast Malte Broth*) sendo composto de: glicose 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 5 g.L<sup>-1</sup>, extrato de malte 3 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 3 g.L<sup>-1</sup>; o meio GYM (*Glicose Yeast Malte*) sendo composto de glicose 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de malte 4 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 4 g.L<sup>-1</sup> e o meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) fabricante Himedia®, composto de 15 g.L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g.L<sup>-1</sup> enzima digestora do farelo de soja e 5 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio.

Todos os meios de cultura foram ajustados a pH 7,0 e posteriormente esterilizados em autoclave a 1 atm, 121 °C por um período de 20 minutos.

Vale salientar que todos meios de cultura utilizados durante a fase experimental deste trabalho foram de natureza líquida.

Inicialmente o pré-inóculo foi preparado nos três meios de cultura testados, a partir da cepa do microorganismo *R. ruber*. Com auxílio de uma alça de platina foi retirada uma pequena quantidade de células e transferida para cada tipo de meio de cultura líquido distribuído em erlemmeyers de 250 mL contendo cada um 100 mL de meio de cada meio de cultura testado. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Os erlemmeyers foram acondicionados em shaker (Cientec® Modelo CT-712) a 28 ± 2 °C com agitação de 125 rpm e as culturas encubadas por um período mínimo de 12 horas. Após o crescimento, o meio líquido foi centrifugado usando uma centrífuga a 5000 rpm por 6 minutos. Para em seguida serem ressuspensas em 15 mL de água destilada e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido e as células acondicionadas em cadinhos.

Para determinação da concentração celular foi utilizada a metodologia do *Standard Methods* para Peso Seco de Sólidos Solúveis. O material foi levado à estufa a 103-105 °C por um período de 24 h, para ser pesado e o peso seco determinado por diferença de massa.

#### 4.3.2.

#### **Manutenção, Cultivo e Quantificação de *R. ruber***

O mesmo procedimento descrito no item 4.3.1 foi adotado para manutenção e cultivo de *R. ruber*. Após a obtenção do peso seco em estufa, foi estimado o valor do concentrado em g.L<sup>-1</sup>. O concentrado bacteriano obtido seguiu para autoclave (PRISMATEC® Vertical CS) novamente para inativação das bactérias, que ocorre da mesma forma citada para autoclavagem do meio de cultura, a 121 °C, por 20 minutos. Esta etapa tem como objetivo matar as células, uma vez que no processo de biossorção, o estado de vida do organismo não influencia o processo, tornando esse procedimento ecologicamente correto para o posterior descarte.

Para a quantificação da biomassa por absorbância, alíquotas de 1 mL de pré-inóculo foi depositado em erlenmeyers com capacidade de 2 L, contendo meio TSB estéril no volume de 1 L. Este erlenmeyer com o meio de cultivo e pré-inóculo foi incubado em shaker de bancada a temperatura 28 ± 2 °C, a 125 rpm. Alíquotas de 10 mL com três repetições foram retiradas para cada tempo de leitura, em câmara microbiológica de fluxo laminar de maneira asséptica. Em experimentos anteriormente realizados, chegou-se ao conhecimento de que a bactéria *R. ruber* atinge a sua fase estacionária a partir de 12 horas de sua incubação (28 ± 2 °C e 125 rpm).

O meio de cultivo TSB, tido como o melhor para os crescimento de *R. ruber*, experimento descrito no item 4.3, apresenta cor amarela e absorve melhor luz em número de onda diferente da água deionizada. Para estabelecer a correlação entre o número de células x absorbância medida diretamente a partir de meio TSB, alíquotas de 5 mL foram retiradas da cultura a partir de 12 horas de incubação em três repetições e realizadas diluições sucessivas (1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 100 e 1/200) e cada diluição foi lida em espectrofotômetro a 600 nm e em câmara de Neubauer.

Na quantificação através do número de células bacterianas por densidade óptica da suspensão o método utilizado corriqueiramente é simples e de fácil

leitura. Mas não existe uma correlação direta entre absorvância e número de células vivas no meio de cultura. Quando se deseja determinar o número de células em uma amostra, utiliza-se a técnica de espectrofotometria, daí por diante, se estabelecer uma correlação entre o valor obtido por densidade óptica por absorvância e o número de células de uma suspensão determinada por uma metodologia em que possamos realizar a contagem das células, onde a técnica mais adequada e utilizada é a câmara de Neubauer.

A diluição de 1/100, em termos geral, é considerada a ideal para realização da leitura de células bacterianas de maneira confortável a visão humana em Câmara de Neubauer.

Através dos dados obtidos nas leituras foram confeccionadas curvas, onde foi realizada a correlação linear entre os dois parâmetros, para que as leituras das amostras entrassem no limite de confiança, em que a Lei de Beer-Lambert é considerada válida.

#### **4.3.3.**

#### **Curva de Correlação entre Número de Células x Absorvância**

Foram traçadas curvas de correlação linear entre o número de células bacterianas de *R. ruber* e a leitura da absorvância obtida em diluições. Essa correlação permite determinar mais rapidamente, o número de células de uma amostra através da avaliação espectrofotométrica.

#### **4.3.4.**

#### **Curva de Crescimento de *R. ruber***

A curva de crescimento da bactéria *R. ruber* foi determinada com o intenção de conhecer a cinética de crescimento da biomassa utilizada. Nos ensaios foram determinadas as concentrações de células bacterianas em função do tempo de incubação. Para tal, uma alíquota de 1 mL de pré-inóculo foi transferida para um erlenmeyer contendo 1 L do meio TSB. Este erlenmeyer foi incubado em shaker a  $28 \pm 2$  °C e a 125 rpm. Alíquotas de 10 mL com três repetições foram retiradas para cada tempo de leitura, em câmara microbiológica de fluxo laminar de maneira asséptica, para análise em espectrofotômetro SPEC®.

Os tempos de leitura foram 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 e 60 h, onde o  $T_0$  as alíquotas foram retiradas tão logo o pré-inóculo foi transferido para o meio de cultura. Foi utilizado o meio de cultura TSB estéril como branco. Todas as leituras foram realizadas no número de onda de 600 nm.

A temperatura em que os testes foram realizados  $30 \pm 2^\circ \text{C}$ , seguindo as indicações da literatura reportada por Sánchez *et al.* (2004).

#### **4.4. Caracterização da Biomassa de *R. ruber***

##### **4.4.1. Cálculo da Estimativa da Área Superficial Externa da Biomassa**

Em matemática, um elipsóide (AO 1990: elipsóide) é um sólido que resulta da rotação de uma elipse em torno de um dos seus eixos.

Para estimar a área superficial da bactéria não tratada e tratada com NaOH, realizamos a medida de cem células em campos de imagens de microscopia eletrônica de varredura com escala de  $2 \mu\text{m}$  onde foram obtidas as dimensões da elipsóide.

A diferença entre a bactéria não tratada e tratada com NaOH foi estimada levando-se em consideração o desvio padrão e partir daí realizada um correlação entre os resultados.

##### **4.4.2. Preparo e Análise de Amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura**

Todas as amostradas preparadas foram submetidas ao protocolo de fixação para amostras biológicas, onde foi utilizado o fixador Karnovsky modificado que é composto por gluteraldeído 2,5 %, formaldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,05 M e pH 7,2  $\text{CaCl}_2$  0,001 M. O volume do fixador foi cerca de 10 vezes o da amostra.

Em seguida as amostras foram lavadas em aldeído com três passagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato 0,05 M e imersão em uma solução de

tetraóxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1 % em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 por uma hora, procedimento realizado em capela na temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C.

As amostras fixadas em  $\text{OsO}_4$  foram lavadas com água destilada e submetidas a soluções concentradas crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo por 10 minutos em cada uma, Na solução a 100 % as amostras foram passadas por três vezes. As amostras também foram acondicionadas em gaiolas individuais, devidamente identificadas para secagem ao ponto crítico, procedimento descrito por Kitajima & Leite (1999).

Todas as amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram enviadas para o Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas pela Bióloga Mônica Lanzoni Rossi, sob a coordenação da Dra. Neusa de Lima Nogueira, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, onde foram realizados os procedimentos citados acima. O equipamento utilizado para análises de microscopia de varredura foi o LEO 435 VP, sendo as amostras analisadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa /Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, sob a coordenação do Professor Dr. Elliott Watanabe Kitajima.

O microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP) foi utilizado para avaliar a morfologia da biomassa antes e após a sorção das diferentes espécies metálicas em questão 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. A combinação de alta resolução acima de 4 nm, extensiva faixa de magnificação (10 a  $2 \times 10^5$  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.

### 4.4.3. Preparo e Análises de Amostras em Microscopia Eletrônica de Transmissão

A suspensão de *R. ruber* bem como a interação *R. ruber* mais metais (Co e Ni), foram fixadas em solução de Karnovsky modificado: glutaraldeído 2 %, paraformaldeído 2 %, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,05 M PH 7,2 por 24 horas, lavados em tampão cacodilato 0,1 M, pós fixados por 1 hora com tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente foram feitas rápidas lavagens com solução salina 0,9 %. A cada troca de solução houve a necessidade de fazer uma centrifugação a 500 rpm durante 10 minutos para que as bactérias precipitassem. Na fase seguinte, foram coradas “em bloco” com acetato de uranila 2,5 % em água overnight. A desidratação foi feita com séries crescentes de acetona em água (25 %, 50 % e 75 %) por 5 minutos , seguidas por 2 tratamentos de 10 minutos cada com acetona 90 % e 3 tratamentos de 20 minutos com acetona 100 %, sempre centrifugando.

Após a infiltração as amostras foram incluídas em resina Spurr dentro do próprio ependorff. Os cortes ultrafinos (60-90 nm) foram depositados em telas de cobre recobertas com colodion, contrastados com acetato de uranila 2,5 % e citrato de chumbo (Reynolds, 1963).

As secções foram examinadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM-900 e as imagens digitalizadas.

### 4.4.4. Espectrometria por Infravermelho

A espectrometria de Infravermelho foi utilizada para analisar e comparar os grupamentos funcionais presentes na superfície de *R. ruber* antes e após o tratamento com NaOH e antes e após o contato com os íons metálicos. Os espectros foram coletados numa resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  usando 120 scans.

As soluções de biossorção com concentração inicial de metal de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  e concentração de biomassa de  $3 \text{ g.L}^{-1}$  foram preparadas tanto para o caso de bactéria não tratada e tratada com NaOH. Todos os volumes das amostras preparadas para o infravermelho foram de 100 mL, para garantia massa de amostra suficiente para análise, incluindo o caso das amostras só contendo a bactéria não tratada e tratada com NaOH, o volume foi complementado com

água deionizada. Todas as amostras foram centrifugadas após o tempo de contato estabelecido em 30 minutos, com velocidade de 5000 rpm por um período de 6 minutos, os volumes foram re-suspensos em alíquotas de água deionizada e postos para secagem em estufa, sendo o Standard Methods para Sólidos Solúveis Suspensos descrito no item 4.2. Após 24 horas o material seco foi macerado e enviado para análise em forma de pó. As amostras foram homogeneizadas com 500 mg de brometo de potássio (KBr) e em seguidas foram analisadas.

#### **4.4.5. Potencial Zeta**

O aparelho utilizado para realização das leituras de potencial zeta foi o Zeta Meter System 4.0<sup>+</sup>. Foram avaliadas amostras com células bacterianas de *R. ruber* antes e após o contato com os metais Co(II) e Ni(II), levando em consideração que as amostras foram preparadas com bactérias sem tratamento e tratadas com NaOH. As leituras de potencial zeta visam detectar algum possível mecanismo de bioissorção e a interferência do metais em estudo com a superfície da membrana da bactéria.

As soluções são preparadas com o chamado eletrólito indiferente a partir do sal NaCl com concentração de 0,01 M. O NaCl tem função de carregamento físico das partículas no canal dos eletrodos, não interferindo no processo de bioissorção ou na carga das partículas a serem visualizadas. A concentração de biomassa em solução foi de 1 g.L<sup>-1</sup> e as soluções metálicas foram de 30 mg.L<sup>-1</sup>. Após o contato por cinco minutos das bactérias com o meio, as amostras foram ajustadas em pH variando de 2,0 a 8,0; sendo o sobrenadante o objeto da leitura.

Já as soluções contendo biomassa e os metais Co(II) ou Ni(II) foram deixadas em contato por 30 minutos, a temperatura de 28 ± 2 °C e agitação de 125 rpm. Após esse período as amostras foram ajustadas em pH que variou de 2 a 8 sendo acondicionadas em aparato para análise do potencial zeta, descansando por dois minutos, onde o sobrenadante foi analisado.

Os resultados de potencial zeta foram obtidos com a média de vinte leituras para cada amostra analisada.

## 4.5.

### Preparo das Soluções para Testes de Biossorção

As soluções metálicas foram preparadas a partir de soluções estoques com  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  para soluções finais contendo  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de Co(II) e Ni(II), em um volume final de solução de 50 mL. Para o parâmetro pH, foi adicionado o concentrado de biomassa obtido de *R. ruber* com concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  e, no caso do parâmetro Concentração da Biomassa, as mesmas concentrações de finais de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  das soluções de Co(II) e Ni(II) foram preparadas com a variação do concentrado de biomassa obtidos a partir de culturas de *R. ruber*. Para o parâmetro pH, foram preparadas soluções a partir 2 até o 9 de Co(II). No caso do Ni(II), foram só preparadas soluções do pH 4 ao 7, levando-se em consideração que em pH abaixo de 4 as células bacterianas colapsam por osmose e em pH acima de 7 o Ni precipita e não podermos afirmar com certeza se o metal foi removido pela bactéria ou simplesmente precipitou em solução. Para o parâmetro concentração de biomassa, todas as soluções metálicas foram preparadas com as concentrações de 1,0; 2,0; 3,0;4,0; 4,5 e 5,0  $\text{g.L}^{-1}$  de *R. ruber*, já com os respectivos pH obtidos no item respectivo. As amostras ficaram acondicionadas em shaker após a mistura de solução e concentrado de biomassa por um tempo de contato de 3 horas, na temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e agitação de 125 rpm. Vale ressaltar que foram preparadas soluções chamadas brancas com  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  do metal em questão para ser utilizada como referência nas análises.

Os fatores que afetam a taxa de adsorção e a capacidade de captação do biosorvente foram examinados em escala de bancada. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  com a suspensão celular em frascos erlenmeyer sob agitação constante de 125 rpm, para elucidar as condições adequadas (pH, concentração da biomassa, concentração metálica, tempo de contato e temperatura).

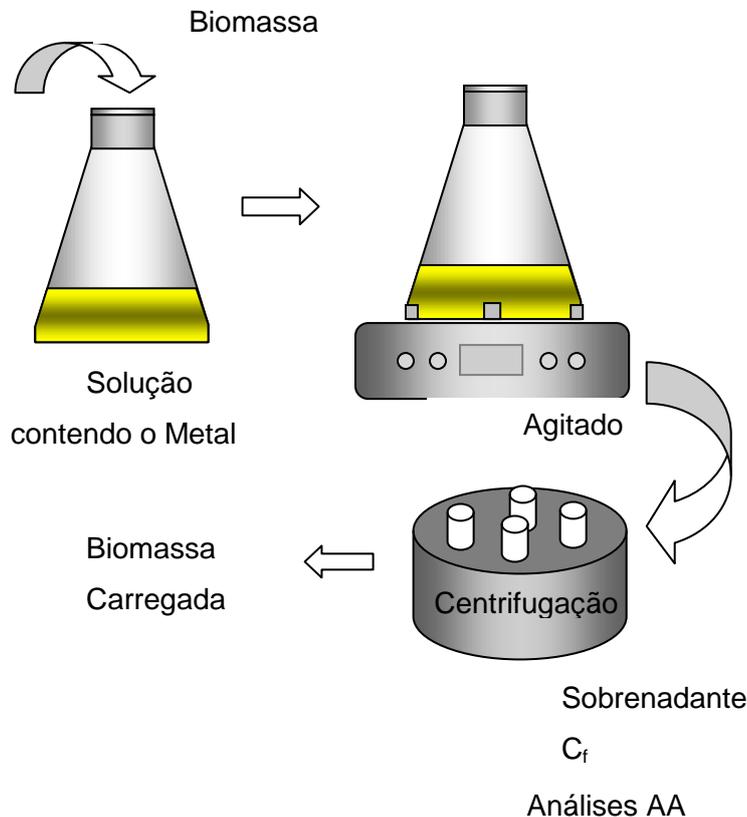
#### 4.5.1.

##### Efeito do pH

Para o parâmetro pH, foram preparadas soluções a partir 2,0 até o 9,0 de Co(II). No caso do Ni(II), foram só preparadas soluções do pH 4,0 ao 7,0; levando-se em consideração que em pH abaixo de 4 as células bacterianas colapsam por osmose e em pH acima de 7 o Ni precipita e não podermos afirmar

com certeza se o metal foi removido pela bactéria ou simplesmente precipitou em solução.

A remoção dos íons metálicos Co(II) e Ni(II) e *R. ruber* foram preparadas em volume de 50 ml de solução metálica para valores de pH na faixa desejada.



Fonte: Bueno (2007).

Figura 3 - Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados em testes de bio-sorção em batelada.

O ajuste do pH foi feito empregando-se soluções de NaOH 1 M e/ou HCl 0,1 M. Posteriormente foi adicionada a suspensão bacteriana e as amostras foram mantidas em contato por três horas a uma velocidade de rotação de 125 rpm em shaker de incubação e à temperatura de 28 °C. Depois de atingido o equilíbrio as amostras foram retiradas e centrifugadas durante 6 minutos a 5000 rpm. O esquema dos experimentos de bio-sorção em batelada é apresentado na Figura 3.

As amostras foram congeladas em freezer para sua preservação e posterior análise da concentração residual do metal pelo método de espectrofotometria de absorção atômica em período inferior a sete dias.

Na Tabela 4 são apresentadas as condições experimentais empregadas nos testes.

Tabela 4 - Condições empregadas para a determinação da influência do pH no processo de biossorção.

Parâmetro	Co(II)	Ni(II)
Vol. Solução metal (mL)	50	50
Conc. Inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> )	50	50
Conc. biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	1	1
Veloc. Agitação (RPM)	125	125
Temperatura (°C)	28± 2	28± 2
pH	2 ;3; 4; 5; 6; 7; 8 e 9	4; 5; 6 e 7
Tempo (h)	3	3

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

#### 4.5.2. 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 biossorção 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 5 estão apresentadas as condições experimentais empregadas.

Tabela 5 - Condições empregadas para a determinação da influência da Concentração da Biomassa no processo de biossorção.

Parâmetro	Co(II)	Ni(II)
Vol. Solução metal (mL)	50	50
Conc. inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> )	50	50
Conc. Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	1,0; 2,0; 3,0; 4; 4,5 e 5,0	1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 4,5 e 5,0
Veloc. Agitação (RPM)	125	125
Temperatura (°C)	28 ±2	28 ±2
pH	6,0 ± 0.2	6,0 ± 0.2
Tempo (h)	3	3

#### 4.5.3. Determinação do Tempo de Equilíbrio

O tempo de contato entre a biomassa e a solução contendo a espécie metálica foi estudado com o intuito de determinar o tempo de residência necessário para a máxima biossorção dos metais por *R. ruber*. Portanto foram coletadas amostras com diferentes intervalos de tempo para verificar o atingido o equilíbrio. O valor de pH empregado para a determinação do tempo de equilíbrio foi obtido do ensaio apresentado na seção 4.3.1.

Na Tabela 6 estão apresentadas as condições experimentais empregadas.

Tabela 6 - Condições empregadas na determinação do tempo de equilíbrio.

Parâmetro	Co(II)	Ni(II)
Vol. Solução metal (ml)	50	50
Conc. inicial metal (mg.l <sup>-1</sup> )	30	30
Conc. biomassa (g.l <sup>-1</sup> )	3	3
Veloc. Agitação (RPM)	125	125
Temperatura (°C)	28 ±2	28 ±2
pH	6,0 ±0.2	6,0± 0.2
Tempo (minutos)	5,10,15,30,60,90, 120,150 e 180	5,10,15,30,60,90, 120,150 e 180

#### 4.5.4. Efeito da Concentração Inicial de Metal

O efeito da concentração de metal na capacidade de captação dos íons Co(II) e Ni(II) por *R. ruber* foi avaliada na faixa de 5 a 75 mg.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados com pH de 6,0 ± 0,2 para Co(II) e Ni(II) 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 7 são apresentados os valores experimentais adotados para cada um dos parâmetros.

Tabela 7 - Condições empregadas para a determinação da influência da Concentração Inicial de Metal no processo de biossorção.

Parâmetro	Co(II)	Ni(II)
Vol. Solução metal (mL)	50	50
Conc. inicial metal (mg.L <sup>-1</sup> )	5, 10,15,30, 50 e 75	5, 10, 15,30, 50 e 75
Conc. biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	3	3
Veloc. Agitação (RPM)	125	125
Temperatura (°C)	28 ±2	28 ±2
pH	6,0± 0,2	6,0± 0,2
Tempo (h)	3	3

#### 4.5.5. Tratamento da Biomassa

Tratamento de biomassas já foi utilizado por diversos autores em trabalhos sobre biossorção (Huang *et al.*, 1988; Kuyucak & Volesky,1998; Paknikar *et al.*, 1993; Kapoor & Viraraghavan, 1998). Dentre os métodos físicos pode-se citar o aquecimento por autoclave, liofilização e destilação; enquanto no tratamento químico utilizam-se ácidos, bases e produtos químicos orgânicos. Em geral, estes tratamentos aumentam ou reduzem a capacidade de adsorção de metais através de biossorventes.

A bactéria *R. ruber* cultivada como descrita no item 4.4 e tratada quimicamente utilizando 20 mL de NaOH (aproximadamente 20 % do volume

total do concentrado bacteriano obtido. Com uma concentração de 0,01 M em 200 mL de biomassa concentrada. Essa mistura foi submetida à agitação por 2 h a 125 rpm. Em seguida a mistura foi centrifugada e lavada por duas vezes com água deionizada. O pH da biomassa foi ajustado com HCl 0,1 M até o valor do pH 7,0 para realizar os testes de biossorção. O tratamento da biomassa foi utilizado quando todos os parâmetros da bactéria não tratada foram estabelecidos para confrontar os resultados.

#### **4.5.6. Efeito da Presença de Co(II) e Ni(II) na mesma Solução**

A biossorção competitiva entre o Co(II) e Ni(II) foi investigada. Para a determinação das características da biossorção competitiva entre o Co(II) e o Ni(II) a concentração inicial dos metais foi de 50 mg.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.8.4, por exemplo, passando apenas o volume total da solução a ser de 100 mL.

#### **4.6. Análise Quantitativa da Concentração dos Metais**

As concentrações residuais das espécies metálicas Co(II) e Ni(II) obtidas ao final dos experimentos foram determinadas por espectrofotômetro de absorção atômica (ContraACHA 300) realizadas no Laboratório de Análise Química do Departamento de Química da PUC-Rio.

O percentual de remoção foi calculado a partir da equação abaixo:

$$\text{Re}(\text{Me}\%) = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (17)$$

onde Re (Me%) é a porcentagem de metal removido; C<sub>i</sub> é a concentração inicial de metal (mg.L<sup>-1</sup>); e C<sub>f</sub> é a concentração final de metal (mg.L<sup>-1</sup>) após o contato com o biossorvente.

A capacidade de captação de Ni(II) e Co(II) pela biomassa *R. ruber* foi determinada usando a equação 18:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{M} \quad (18)$$

onde  $q_e$  é a quantidade de íon metálico captado pela biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) no equilíbrio;  $C_0$  é a concentração inicial do íon metálico ( $\text{mg.L}^{-1}$ );  $C_e$  é a concentração do íon metálico final ou no equilíbrio ( $\text{mg.L}^{-1}$ );  $V$  é o volume da solução do íon metálico (L); e  $M$  é a massa do biosorvente (g).

Todos os experimentos de bioadsorção foram realizados a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C).