

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA**

LUCAS SILVA ABRANTES REIS

**BLENDAS À BASE DE QUITOSANA E EXOPOLISSACARÍDEOS: SÍNTESE E
APLICAÇÃO NA TECNOLOGIA DE INOCULANTES**

SÃO LUÍS – MA

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA**

**BLENDAS À BASE DE QUITOSANA E EXOPOLISSACARÍDEOS: SÍNTESE E
APLICAÇÃO NA TECNOLOGIA DE INOCULANTES**

Lucas Silva Abrantes Reis

Orientador: Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química.

SÃO LUÍS – MA

2020

Abrantes Reis, Lucas Silva.

Blendas à base de quitosana e exopolissacarídeos:
síntese e aplicação na tecnologia de inoculantes / Lucas
Silva Abrantes Reis. - 2020.

82 p.

Orientador(a): Cícero Wellington Brito Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
2020.

1. Agricultura sustentável. 2. Blenda de polímeros.
3. Inoculantes bacterianos. 4. Polissacarídeos. I.
Brito Bezerra, Cícero Wellington. II. Título.

LUCAS SILVA ABRANTES REIS

**BLENDAS À BASE DE QUITOSANA E EXOPOLISSACARÍDEOS: SÍNTESE E
APLICAÇÃO NA TECNOLOGIA DE INOCULANTES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Química da Universidade Federal do Maranhão para
a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em 12/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra. (Orientador – UFMA)

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. Edmar Pereira Marques (UFMA)

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof^ª Dr^ª Adriana Barbosa Araújo (IFMA)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, inteligência e força para ingressar na pós-graduação e conseguir superar as dificuldades.

À minha mãe, Olga Vieira, por todo amor e suporte que me deu, nunca deixando de orar por mim.

À minha futura esposa, Mydia Lays, que sempre me incentivou e me ajudou com sua paciência e sabedoria.

Ao meu orientador, professor Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra, pela pessoa e profissional que é, sempre disponível para me orientar da melhor maneira possível.

Ao doutor Thiago Palhares, por ter me instruído e me ajudado em muitos experimentos, como, na extração do EPS e nas aplicações dos materiais produzidos.

Ao meu irmão, Gabriel Reis, pela parceria e companheirismo, sempre me dando suporte nas horas mais difíceis.

Ao meu amigo, Tyron Martins, que sempre me ajudou no que precisei, principalmente no ambiente da pesquisa.

À Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade de ingressar na pós-graduação e ambiente criativo e amigável que me proporcionou.

Ao professor Dr. Thiago Venâncio da UFSCar – SP, pelas análises ^{15}N -NMR.

Ao professor Dr. Francisco Moura da UNIFEI – MG, pelas análises TG/DTA.

Aos meus amigos do Laboratório de Química de Interfaces e Materiais da UFMA: Liane Miranda, Rayan Cutrim, Mauro Góes, Letícia Nascimento, José Lucas, Artur Coelho, Bruna Duailibe e Suringo Falcão.

As minhas amigas do Laboratório de Solos do IFMA – Campus Maracaná: Vanessa Macedo, Narjara e Luciene.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi preparar uma blenda entre biopolímeros a partir da quitosana extraída da casca de camarão e do exopolissacarídeo extraído da bactéria *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 e avaliar a influência no crescimento das bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium tropici* CIAT 899), fornecendo nutrientes, protegendo-as de estressores ambientais como os altos níveis de metais pesados e servindo como fonte de carbono. A quitosana preparada (%GD = 93,2) reagiu com diferentes quantidades de exopolissacarídeo bacteriano (50:50; 67:33; 33:67 m/m), e as misturas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR), solubilidade, termogravimetria (TGA/DTA), ¹⁵N-RMN, grau de intumescimento e pH_{ZPC}. A partir dos espectros de FTIR, foi possível caracterizar os vários grupos funcionais presentes nos biopolímeros, bem como atribuir a formação das blendas pela interação entre o grupo amino da quitosana e o grupo carboxílico do EPS (–NH₃⁺OOC–). A blenda obtida mostrou maior interação com a água do que a quitosana, menor solubilidade em meio ácido do que a quitosana e foi capaz de adsorver e dessorver micronutrientes como o Cu(II) e Zn(II). Nos ensaios com a bactéria fixadora de nitrogênio, a blenda QE1:2 foi capaz de adsorver uma parte dos micronutrientes que estavam em excesso, favorecendo o crescimento bacteriano. No ensaio com as blendas QE1:2-Cu(II) e QE1:2-Zn(II), ambas foram capazes de dessorver os micronutrientes conforme a necessidade dos microrganismos, aumentando o número de unidades formadoras de colônias, mas não a um valor mais elevado do que o experimento realizado nas condições padrões.

Palavras-chave: blenda de polímeros; polissacarídeos; inoculantes bacterianos; agricultura sustentável.

ABSTRACT

The aim of this work was to prepare biopolymers blends from chitosan (CT) and exopolysaccharide (EPS) extracted from *Rhizobium tropici* UFLA 05-16, and to evaluate them as potential carrier materials for nitrogen-fixing bacteria inoculants, providing nutrients and protecting the latter from environmental stressors, such as the high levels of heavy metals. Freshly CT (% DD = 93,2) was blended with different EPS amounts (50:50; 7:33 and 33:67 w/w), and the obtained blends were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), solubility, thermogravimetry (TGA / DTA), ¹⁵N-NMR, degree of swelling and pH_{ZPC}. From the FTIR spectra, it was possible to characterize the various functional groups present in biopolymers, as well as to attribute the formation of blends by the interaction between the amino group of chitosan and the carboxylic group of EPS ($-\text{NH}_3^+\text{OOC}-$). The blend obtained showed greater interaction with water than chitosan, less solubility in acid medium than chitosan and was able to adsorb and desorb micronutrients with Cu(II) and Zn(II). In tests with nitrogen-fixing bacteria, the QE1:2 blend was able to adsorb part of the micronutrients that were in excess, favoring bacterial growth. In the assay with blends QE1:2-Cu(II) and QE1:2-Zn(II), both were able to desorb the micronutrients according to the need of the microorganisms, increasing the colony forming units, but not to a much higher value elevated to the experiment carried out without the presence of these blends.

Keywords: polymer blend; polysaccharide; bacterial inoculants; sustainable agriculture

LISTA DE ABREVIações

(-NH ₃ ⁺ OOC-)	Interação entre o grupo amino da QTS e o grupo carboxílico do EPS.
CIAT 899	Estirpe da bactéria <i>Rhizobium tropici</i> utilizada na inoculação de plantas.
DP	Grau de polimerização.
EPS	Exopolissacarídeo.
FBN	Fixação biológica de nitrogênio.
INPM	Grau.
k ₁	Constante de velocidade da equação de pseudo-primeira ordem.
k ₂	Constante de velocidade da equação de segunda ordem.
k _d	Constante de difusão intrapartícula.
K _F	Constante de Freundlich.
K _L	Constante de Langmuir.
K _S	Constante de Sips.
m	Massa de adsorvente utilizado.
m _{ads}	Massa de adsorvente após a adsorção.
m _{des}	Massa de adsorvente após a dessorção.
n	Parâmetro de adsorção do modelo de Freundlich.
n _S	Fator de heterogeneidade de Sips.
PGPB	Bactérias promotoras de crescimento bacteriano.
QE	Blenda à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano.
QE1:1	Blenda à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano na proporção 1 para 1 de volume entre eles, respectivamente.
QE1:2	Blenda à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano na proporção 1 para 2 de volume entre eles, respectivamente.

QE2:1	Blenda à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano na proporção 2 para 1 de volume entre eles, respectivamente.
QE1:2-M(II)	Blenda de biopolímeros à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano com metal divalente adsorvido.
.QE1:2-Cu(II)	Blenda de biopolímeros à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano com Cu (II) adsorvido.
QE1:2-Zn(II)	Blenda de biopolímeros à base de quitosana e exopolissacarídeo bacteriano com Zn (II) adsorvido.
q_e	Quantidade de metal adsorvida pelo adsorvente.
q_{eq}	Quantidade de metal adsorvida pelo adsorvente no equilíbrio.
q_{exp}	Quantidade de metal adsorvida pelo adsorvente obtida de forma experimental.
q_t	Quantidade de metal adsorvida pelo adsorvente no tempo t .
$q_{teórico}$	Quantidade de metal adsorvida pelo adsorvente e obtida pelos ajustes dos modelos cinéticos e isotérmicos.
QTS	Quitosana <i>in natura</i> .
R^2	Coefficiente de determinação.
RPM	Rotação por minuto.
R_L	Constante adimensional de Langmuir.
UFLA 05-16	Estirpe da bactéria <i>Rhizobium tropici</i> utilizada na extração de EPS.
YM	Meio de cultura bacteriano à base de manitol.
YMA	Meio de cultura bacteriano à base de manitol e ágar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da quitosana.....	2
Figura 2. Desmineralização das cascas de camarão com ácido clorídrico 0,25 molL ⁻¹ na proporção de 40 mLg ⁻¹	20
Figura 3. Desproteínização das cascas de camarão com hidróxido de sódio 1 molL ⁻¹ , na proporção de 20 mLg ⁻¹	21
Figura 4. Quitina extraída das cascas de camarão.....	21
Figura 5. A desacetilação da quitina com hidróxido de sódio 50%, na proporção de 20 mLg ⁻¹ sob refluxo.....	22
Figura 6. Quitosana obtida a partir da desacetilação da quitina.....	22
Figura 7. Meio de cultura à base de Manitol (YM).....	23
Figura 8. Extração do EPS da <i>Rhizobium tropici</i> UFLA 05-16 utilizando álcool etílico 92,8 INPM a -4°C.....	24
Figura 9. Filtração do EPS da <i>Rhizobium tropici</i> UFLA 05-16.....	24
Figura 10. EPS extraído da <i>Rhizobium tropici</i> UFLA 05-16.....	25
Figura 11. Blenda entre quitosana e exopolissacarídeo.....	26
Figura 12. Espectro do infravermelho da QTS (quitosana in natura), EPS (exopolissacarídeo) e das blendas QE2:1, QE1:2 e QE1:1.....	33
Figura 13. Ilustração da interação entre o grupo amino da quitosana com o grupo carboxílico do EPS que originou a blenda QE.....	35

Figura 14. Espectros de ¹⁵ N-RMN das amostras de quitosana (QTS) e das blendas entre quitosana e exopolissacarídeo (QE1:2 e QE2:1).....	37
Figura 15. Curvas TGA – DTA simultâneas para QTS e as blendas QE1:1, QE1:2 e QE2:1. Taxa de aquecimento igual a 10 °C/min e uma atmosfera de nitrogênio com uma vazão de 50 mLmin ⁻¹	38
Figura 16. Percentagem do grau de intumescimento da quitosana in natura (QTS) e das suas modificações (QE1:1, QE1:2 e QE2:1). Massa de adsorvente = 25 mg; volume de água = 5 mL; T = 25°C.....	40
Figura 17. Potencial de carga zero (pH _i – pH _f) da quitosana e das blendas. [KCl] = 0,1 molL ⁻¹ ; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; T = 25°C; rotação = 150 rpm; t = 24 h.....	42
Figura 18. Efeito do pH na remoção de íons Cu(II)) a partir de soluções aquosas na presença dos biopolímeros quitosana (QTS) e as blendas modificadas com EPS (QE1:1, QE1:2 e QE2:1). [Cu(II)] = 100 mgL ⁻¹ ; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; T = 25°C; rotação = 150 rpm; t = 24 h.....	43
Figura 19. Efeito do pH na remoção de íons Zn(II)) a partir de soluções aquosas na presença dos biopolímeros quitosana (QTS) e as blendas modificadas com EPS (QE21, QE12 e QE12). [Zn(II)] = 100 mgL ⁻¹ ; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; T = 25°C; rotação = 150 rpm; t = 24 h.....	43
Figura 20. Espectros do infravermelho da blenda escolhida para a aplicação QE1:2 antes e depois dos ensaios de adsorção de Cu(II) e Zn(II).....	45
Figura 21. Estudo cinético da adsorção dos íons Cu (II) e Zn (II) pela blenda QE12. ([Cu(II)] = [Zn(II)] = 50 mgL ⁻¹ ; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH para o Cu(II) = 6,0; pH para o Zn(II) = 5,0; T = 25°C; rotação = 150 rpm).....	47

Figura 22. Gráficos cinéticos de pseudo-primeira ordem $[\ln(q_{eq} - q_t) \times t]$ para os processos de remoção de íons Cu(II) e Zn(II).....	47
Figura 23. Gráficos cinéticos de segunda ordem $[(t/q_t) \times t]$ para os processos de remoção de íons Cu(II) e Zn(II).....	48
Figura 24. Gráficos cinéticos da difusão intra-partícula $(q_t \times t^{1/2})$ para os processos de remoção de íons Cu(II) e Zn(II).....	49
Figura 25. Isoterma de adsorção dos íons Cu(II). ($[Cu(II)] = 10 - 300 \text{ mgL}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH para o Cu(II) = 5,0; T = 25°C; rotação = 150 rpm).....	51
Figura 26. Isoterma de adsorção dos íons Zn(II). ($[Zn(II)] = 10 - 300 \text{ mgL}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH para o Zn(II) = 5,0; T = 25°C; rotação = 150 rpm).....	52
Figura 27. Influência do crescimento bacteriano pelo aumento da concentração de micronutrientes após 48h de crescimento.....	55
Figura 28. Influência do crescimento bacteriano em função do tempo pelo aumento da concentração de micronutrientes e adição da blenda QE1:2. ($[Cu(II) \text{ e } Zn(II)] = 1 \text{ e } 8 \text{ mL}^{-1}$; volume de meio YM = 100 mL; massa da blenda QE1:2 = 20 mg; T = 25°C; rotação = 110 rpm).....	57
Figura 29. Influência do crescimento bacteriano em função do tempo em diferentes meio de concentração de micronutrientes e adição das blenda QE1:2-Cu(II) e QE1:2-Zn(II). (volume de meio YM = 100 mL; massa da blenda QE1:2-Cu(II) = 0,134 mg; massa da blenda QE1:2-Zn(II) = 0,272 mg; T = 25°C; rotação = 110 rpm).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Transições vibracionais e respectivas atribuições para os biopolímeros.....	30
Tabela 2. Solubilidade da quitosana (QTS), EPS e das blendas.....	31
Tabela 3. Grau de Intumescimento para EPS produzido por diversas bactérias.....	36
Tabela 4. Quantidade removida de íons Cu(II) e Zn(II) simultaneamente. [Cu(II) + Zn(II)] = 50 mgL ⁻¹ ; volume = 30 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH = 5,0; t = 480 min.; T = 25°C; rotação = 150 rpm.....	41
Tabela 5. Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo de pseudo-primeira ordem e segunda ordem na adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) em solução aquosa.....	43
Tabela 6. Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo de difusão intrapartícula na adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) em solução aquosa.....	45
Tabela 7. Parâmetros das isotermas de adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) obtidos pelos ajustes aos modelos linearizados e não linearizados de Langmuir e Freundlich e Sips..	47
Tabela 8. Percentagem de dessorção dos íons Cu(II) e Zn(II) da blenda QE1:2-M(II). Volume de eluente = 50 mL; massa de adsorvente = 20 mg; t = 180 min; T = 25°C; rotação = 150 rpm.....	64
Tabela 9. Crescimento bacteriano no ensaio com a inoculação convencional (E1) e os ensaios com a adição das blendas QE1:2-Cu(II) e QE1:2-Zn(II).....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Inoculantes.....	4
2.2 Quitina e Quitosana.....	6
2.3 Exopolissacarídeos.....	8
2.4 Quitosana e exopolissacarídeos.....	9
2.5 Micronutrientes essenciais: cobre e zinco.....	11
2.6 Adsorção.....	13
2.6.1 Cinética.....	13
2.6.2 Isoterma.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Geral.....	18
3.2 Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Materiais.....	19
4.2 Obtenção dos biopolímeros.....	19
4.2.1 Obtenção da quitosana (QTS).....	19
4.2.2 Obtenção do exopolissacarídeos (EPS).....	25
4.2.3 Síntese da Quitosana-Exopolissacarídeo (QE).....	25
4.3 Caracterizações.....	26
4.3.1 Determinação do grau de desacetilação (%GD) por titulação condutométrica.....	26
4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	27
4.3.3 Solubilidade.....	27
4.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio (RMN- ¹⁵ N).....	27
4.3.5 Termogravimetria (TGA/DTA).....	27
4.3.6 Grau de Intumescimento (%GI).....	28
4.3.7 Determinação do ponto zero de carga (pH _{ZPC}).....	28
4.4 Ensaio de Adsorção.....	28
4.4.1 Cinética de adsorção.....	29

4.4.2	Isotermas de adsorção.....	30
4.4.3	Ensaio de dessorção.....	30
4.5	Aplicação das blendas como inoculante.....	30
4.5.1	Meio de cultura.....	30
4.5.2	Soluções de micronutrientes.....	30
4.5.3	Influência da concentração de micronutrientes no crescimento bacteriano.....	31
4.5.4	Influência da blenda QE1:2-M(II) no crescimento bacteriano.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		33
5.1	Caracterizações.....	33
5.1.1	Determinação do grau de desacetilação (%GD) por titulação condutométrica.....	33
5.1.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	33
5.1.3	Solubilidade.....	36
5.1.4	Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio (RMN- ¹⁵ N).....	36
5.1.5	Termogravimetria (TGA/DTA).....	38
5.1.6	Grau de Intumescimento (%GI).....	39
5.1.7	Potencial de carga zero (pH _{zpc}).....	41
5.2	Ensaio de adsorção.....	42
5.2.1	Efeito do pH.....	42
5.2.2	Estudos de competição dos íons Cu (II) e Zn (II).....	46
5.2.3	Cinética de adsorção.....	46
5.2.4	Isotermas de adsorção.....	51
5.2.5	Ensaio de dessorção.....	54
5.2.6	Aplicação das blendas como transportador de inoculante.....	54
5.2.6.1	<i>Influência da concentração de micronutrientes no crescimento bacteriano.....</i>	<i>54</i>
5.2.6.2	<i>Influência da blenda QE1:2-M(II) no crescimento bacteriano.....</i>	<i>56</i>
6. CONCLUSÃO.....		60
REFERÊNCIAS.....		61

1. INTRODUÇÃO

Com o grande aumento populacional, chegando aproximadamente em 8 bilhões em 2020, considera-se necessário um aumento na produção de alimentos com menores impactos ambientais, minimizando o uso de fertilizantes químicos, herbicidas, fungicidas e inseticidas.¹ O uso de inoculantes eficientes pode ser considerado uma estratégia importante para a gestão sustentável da agricultura e para redução de problemas ambientais. A *Rhizobium tropici* CIAT 899 é um dos simbiontes mais adequados para nodular diversas plantas mesmo sob estresse abiótico, elevada condição de acidez ou alta concentração de sal².

Por ser uma tecnologia capaz de promover o crescimento das plantas através da melhoria do desenvolvimento radicular, os inoculantes favorecem, por exemplo, a diminuição da quantidade de fertilizantes químicos, o alívio do estresse salino e de tensões abióticas, e eleva o nível de proteção contra doenças.³⁻⁵

Por representar uma fonte segura de bactérias que sobrevivam aos rigores do solo, contribuem para aumentar a capacidade de fixação de N₂ e, conseqüentemente, o rendimento em leguminosas, principalmente em situações em que há pouca ou nenhuma população de rizóbios no solo.^{6,7}

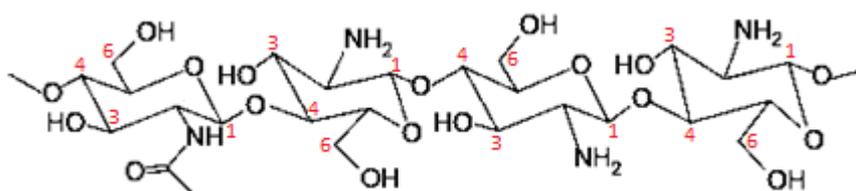
De acordo com Catroux et al⁶ um inoculante ideal deve ter máxima eficácia no campo e ser compatível com as práticas do agricultor, resistindo a desinfecção de sementes e ao uso de pesticidas, por exemplo. Ademais, deve ser de fácil uso e passível de aplicação pelo processador de sementes, concorrendo para a economia do tempo na atividade agrícola, conter o maior número possível de rizóbia, nodular plantas sob várias condições de campo e apresentar, em condições de armazenamento, elevado prazo de validade. Para Bashan et al⁸, como a população de microrganismos no solo, sem um carreador adequado, diminui rapidamente para a grande maioria das espécies de bactérias promotoras de crescimento das plantas, o desenvolvimento de inoculantes eficazes requer estratégias que possam prolongar a vida útil das formulações tanto em prateleira, quanto pós armazenamento.

Um carreador ideal, portanto, é capaz de propiciar condições favoráveis para a sobrevivência e bom funcionamento das células inoculantes. A sua superfície, atóxica e não poluente, atua como meio protetor e nutritivo, capaz de labilizar, de modo constante, nutrientes previamente adsorvidos, bem como remover espécies presentes em quantidades estressantes para o crescimento dos vegetais.⁹

Vários materiais sintéticos têm sido empregados como inoculantes.⁷ Dentre eles se destacam, por suas peculiaridades (baixo custo, renovável, biodegradável, abundância, atoxicidade, etc) os polissacarídeos, a exemplo da quitosana e do exopolissacarídeos. Recentemente, as indústrias têm demonstrado uma demanda por polímeros ambientalmente amigáveis, com boas propriedades reológicas e mecânicas. essa demanda motivou os pesquisadores a procurar polímeros biodegradáveis com características não tóxicas e recicláveis. Tais polímeros estão sendo procurados a partir de recursos renováveis e a baixo custo.

A quitosana, extensamente estudada como biomaterial e adsorvente, é a forma desacetilada da quitina.^{10,11} Com as vantagens da disponibilidade, atoxicidade, versatilidade química e física, os estudos sobre a quitosana têm permitido o desenvolvimento e a aplicação em larga escala de produtos à base deste biopolímero nos campos: biomédico, farmacológico, estético e ambiental.¹²⁻¹⁴ A quitosana também pode ser submetida a modificações químicas, o que pode potencializar ou inibir determinadas propriedades, de acordo com a especificidade que se deseja. O grupo amino apresenta-se como o mais reativo, seguido das hidroxilas C-6 e C-3, como mostra a Figura 1. Assim, a modificação química da quitosana pode ser feita a partir desses grupos pendentes.¹⁵

Figura 1. Estrutura da quitosana



Fonte: Mourya e Nazma¹⁶.

Os exopolissacarídeos (EPS's) são biopolímeros resultantes de bactérias pelas atividades de secreção, onde há derramamento de material na superfície celular, materiais de quebra celular e da adsorção de orgânicos do meio ambiente.¹⁷ Eles são compostos de uma variedade de substâncias orgânicas: os carboidratos e proteínas são os principais constituintes. Substâncias húmicas, ácidos urônicos e ácidos nucleicos estão em menores quantidades.¹⁸ Eles podem auxiliar no desenvolvimento e sobrevivência do vegetal em várias situações de estresses ambientais, tais como:

estresse salino, hídrico, presença de metais pesados, variações de temperatura, entre outros. Em função da aderência destes produtos às superfícies sólidas, sementes, por exemplo, há a possibilidade deles tanto acumularem nutrientes, quanto evitarem a bioissorção por metais pesados, além de evitar o ressecamento.¹⁹⁻²¹

Alguns estudos já têm sido relatados sobre a utilização da quitosana e do exopolissacarídeo na tecnologia de inoculantes inoculantes, a exemplo da atividade antifúngica da quitosana (*in vitro*) junto com um fertilizante e bioprotetor (*C. elegans*-NPKB) em plantas de feijão-caupi inoculadas com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Traqueifilo*²²; a melhora da composição química, qualidade microbiológica e da estabilidade aeróbica da silagem da cana-de-açúcar utilizando quitosana^{23,24}; a ensilagem de soja utilizando quitosana e uma mistura de *L. plantarum* e *P. acidipropionici*²⁵; biorremediação de água do mar poluída por petróleo por uma cepa bacteriana imobilizada em quitina e quitosana⁹; a liberação de bactérias promotoras de crescimento de plantas utilizando um hidrogel de quitosana-amido²⁶; o controle biológico de *Pythium aphanidermatum* em pepino aplicando *Lysobacter enzymogenes* estirpe 3.1T8 e quitosana²⁷; a fitorremediação de solo poluído com cádmio por *Chlorophytum laxum*, combinado com bactérias resistentes ao cádmio imobilizada com quitosana²⁸; síntese de macromoléculas de biocontrole derivadas de quitosana com surfactina e avaliação antifúngica²⁹, e a agregação celular da *Azospirillum brasilense* utilizando EPS^{3,30}.

Assim, neste trabalho, desenvolveu-se uma rota de síntese para blenda de quitosana extraídas de cascas de camarão e EPS extraídos da *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 e se avaliou a capacidade desses novos materiais produzidos adsorverem e dessorverem ions Cu(II) e Zn(II) e atuarem na tecnologia de inoculantes para aumentar a produção da *Rhizobium tropici* CIAT 899, que é o simbionte mais adequado para o *Phaseolus vulgaris*, podendo nodular mesmo sob estresse abiótico, elevada condição de acidez ou alta concentração de sal².

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inoculantes

A inoculação de bactérias simbiotes com leguminosas, as denominadas promotoras do crescimento das plantas (PGPB), tem se constituído uma prática indispensável na agricultura contemporânea, mas cuja origem não se pode precisar. Desde a descoberta da rizóbia em 1886³¹ e por cerca de 120 anos, os inoculantes de *Rhizobium* foram produzidos comercialmente em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos^{6,32}. Para a grande maioria dos países em desenvolvimento, a tecnologia de inoculantes, especialmente com PGPB, tem pouco ou nenhum impacto na produtividade das fazendas familiares, porque ou são utilizados inoculantes comerciais de baixa qualidade, ou são caseiros⁷.

O controle das relações entre bactérias, solo e planta emergiu como uma ferramenta poderosa, tendo em vista o potencial biotecnológico dessas interações, para o aumento da produtividade das culturas, redução dos custos de produção minimizando o volume de fertilizantes aplicados e uma melhor conservação dos recursos ambientais⁴.

A inoculação contribuiu para o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), responsável por cerca de 140 toneladas de nitrogênio fixado por ano, só nos ecossistemas terrestres. Ao lado da fotossíntese e da decomposição da matéria orgânica, a FBN destaca-se com um dos processos responsáveis pela manutenção da vida no planeta³³.

Inoculantes microbianos desempenham um papel vital para o alívio do estresse salino, favorecendo o desenvolvimento vegetativo das culturas. Bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) pertencem a um grupo benéfico e heterogêneo de microrganismos encontrados na rizosfera e são capazes de melhorar o crescimento das plantas protegendo-as de doenças, aliviando as tensões abióticas e atendendo às demandas por nutrientes da planta⁵.

A rizosfera pode ser definida como a região do solo onde processos mediados por microrganismos são especificamente influenciados pelo sistema radicular. Esta área inclui o solo conectado às raízes das plantas e frequentemente se estende alguns milímetros fora da superfície da raiz, sendo um ambiente importante para as interações entre plantas e microrganismos, porque as raízes das plantas liberam uma ampla gama de compostos envolvidos para atrair organismos que possam ser benéficos, neutros ou prejudiciais para as plantas⁴.

O favorecimento do crescimento das plantas pelas bactérias simbiotes pode ocorrer por vias indireta ou direta. O crescimento indireto de plantas acontece quando essas bactérias diminuem ou impedem efeitos deletérios de um patógeno (geralmente um fungo), seja por produção de enzimas, antibióticos, sideróforos, geração de cianeto de hidrogênio ou por competição de nutrientes^{1,34}.

A promoção direta do crescimento de plantas geralmente implica facilitar a aquisição de recursos nutricionais do ambiente, como, a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis para disponibilizar o fósforo à planta e melhorar o metabolismo e a produção de hormônios vegetais, como auxina, citocinina, giberelina e etileno, que podem aumentar o número de pêlos radiculares e a quantidade de flavonóides produzidos pela raiz^{1,34}.

Em geral, sem um transportador adequado, a população de bactérias inoculadas no solo diminui rapidamente para a maioria das espécies de PGPB. Esse fenômeno, combinado com a baixa produção de biomassa bacteriana, dificulta a manutenção da atividade na rizosfera⁸.

Os inoculantes para uso em escala de campo devem ser projetados para fornecer uma fonte confiável de bactérias que sobrevivem em solo e tornam-se disponíveis para as culturas, quando necessário⁷. Muitos inoculantes não fazem isso, mas isso é o principal objetivo da formulação de inoculantes.

Para projetar comercialmente um inoculante, devem-se considerar os interesses dos produtores e do fabricante, que são complementares: custo, praticidade e rendimento. Para Bashan⁸ e Catroux⁶, as principais características práticas dos inoculantes da perspectiva do produtor rural são: a compatibilidade com práticas de rotina do campo, a exemplo da desinfecção de sementes, e tolerância a pesticidas. Secundariamente, outras características importantes dos inoculantes são: facilidade de uso, compatibilidade com o equipamento de semeadura, resistência ao armazenamento, tolerância à diversidade de condições de campo e tipos de solo e durabilidade. Sob a ótica dos fabricantes, interessa igualmente: o prazo de validade (que dure, por exemplo, mais de uma temporada), resultados reproduzíveis em campo e segurança (humana, animal e vegetal), dispensando o uso de materiais perigosos.

Para Date³¹, as três características fundamentais e essenciais a todos os inoculantes são: apoiar o crescimento de microrganismos pretendidos, apoiar o número de células microbianas simbólicas em boas condições fisiológicas por um período de

tempo aceitável e fornecer microrganismos suficientes para obter uma resposta da planta, ou seja, o inoculante deve conter bactérias após o processo de formulação.

As condições do solo (composição, pH, temperatura, umidade, microflora, etc) podem representar o principal obstáculo para o desenvolvimento das bactérias introduzidas. Elas devem, além de resistir aos fatores abióticos, competir com a microflora nativa, frequentemente melhor adaptada às condições do meio. Conseqüentemente, um papel importante na formulação de inoculantes é o de proporcionar um microambiente mais adequado, combinado com proteção física por um período prolongado, evitando declínio das bactérias introduzidas^{4,8}.

O interesse no uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio aumentou porque os fertilizantes nitrogenados são caros e podem danificar o meio ambiente pela contaminação da água com nitratos, acidificação de solos e emissões de gases de efeito estufa⁴.

2.2 Quitina e Quitosana

A quitina é um polissacarídeo natural abundante, ocorrendo principalmente em carapaças de animais, conchas de crustáceos, exoesqueleto de camarão, caranguejos e lagostas, em insetos (como besouros), em osso de choco, fungos (cogumelos), etc. Estruturalmente, a quitina é um polissacarídeo linear com 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glucosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-D-glucosamina. A quitosana, extensamente estudada como biomaterial e adsorvente, é a forma desacetilada da quitina¹⁴.

O exoesqueleto de camarão há muito atrai a atenção como fonte de matéria-prima para a produção de quitina, pois os exoesqueletos secos dos artrópodes contêm de 20% a 50% de quitina. Este biopolímero é produzido comercialmente a partir de exoesqueletos de caranguejo e camarão por tratamento com solução diluída de NaOH para desproteinização, seguida por tratamento com solução diluída de HCl para desmineralização. A quitosana, o derivado desacetilado da quitina, tem inúmeras aplicações, que atraem interesses científicos e industriais⁹. A quitosana é um biossorvente barato e de ocorrência natural, obtido da desacetilação de extratos de quitina de crustáceos²⁹.

O grau de desacetilação (% GD) e o peso molecular da quitosana variam de 40% a 98%, e de 5×10^4 a 2×10^6 Da, respectivamente. O grau de desacetilação e o grau de polimerização (DP), que por sua vez decide o peso molecular do polímero pela

repetição das unidades químicas que são unidas por ligações covalentes, possuindo alta massa molar proveniente destas repetições de unidades que são comumente chamadas de meros, são dois importantes parâmetros que determinam o uso de quitosanas para várias aplicações¹⁶.

A quitina, juntamente com a celulose, formam os biopolímeros mais abundantes na natureza. Embora a quitina tenha muitas especialidades funcionais em diversas áreas, a baixa solubilidade em água e o desempenho insatisfatório da biodegradação restringem suas aplicações^{35,36}.

Com as vantagens de abundância, baixa toxicidade, boa reatividade química, versatilidade química e física, as características da quitosana permitiram os estudos e o desenvolvimento das suas aplicações em larga escala, como nos campos biomédico, farmacológico e ambiental¹⁴. Imprimindo mais eficiência nas aplicações, ela pode ser modificada, prolongando, inclusive a sua integridade dimensional e características funcionais³⁷. Além disso, foi comprovado que a quitosana inibe vários patógenos vegetais fúngica *in vitro* e em plantas hospedeiras. Este polímero demonstra capacidade de induzir mudanças morfológicas marcadas, alterações estruturais e desorganização molecular das células fúngicas²².

A quitosana é carregada positivamente, permitindo aderir à superfície carregada negativamente. É solúvel em diversos ácidos e capaz de interagir com poliânions para formar complexos e géis³⁸. Particularmente, os derivados de quitosana têm sido amplamente aplicados remover metais de vários ambientes aquáticos, com base na grande número de grupos amino ($-NH_2$) e hidroxila ($-OH$)³⁹.

Comparado com a quitina, a quitosana exhibe uma melhor solubilidade, menos cristalinidade e facilidade de modificações químicas por causa da presença de uma quantidade maior de grupos livres de amina e pela presença de grupos hidroxilas³⁷. Uma vez que a quitosana tem grupos amino livres pode atuar como um melhor agente quelante que a quitina.

Atualmente, existe uma preocupação pública com a presença de resíduos de fungicidas nos alimentos e no ambiente, devido ao uso generalizado destes sintéticos na agricultura. A quitosana possui atividade antimicrobiana contra fungos patogênicos, além de reconhecida capacidade de induzir mecanismos de defesa de plantas, sendo alternativa segura para controle de fungos fitopatogênicos durante ambos os processos de pré e pós-colheita⁴⁰.

Por outro lado, esse biopolímero exibe atividade indireta quando induz mecanismos de defesa nas plantas, estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, inibe a ação das proteinases, altera o metabolismo das fitoalexinas, promove a lignificação, induz a formação de compostos fenólicos, estimula a acumulação de proteínas relacionadas à patogênese, como quitinase, β -1,3-glucanase e ativa a peroxidase, superóxido dismutase e catalase enzimas²².

2.3 Exopolissacarídeos

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de alto peso molecular secretado por microrganismos no ambiente circundante. Essas macromoléculas podem ser encontradas no material capsular ou como lodo disperso sem associação a qualquer célula particular, e eles agem como uma adesina favorecendo interações e associações celulares entre microrganismos¹⁷.

Nos últimos anos, os exopolissacarídeos têm atraído considerável atenção dos pesquisadores por causa de sua ampla distribuição na natureza e os conhecidos benefícios para a saúde. Essas macromoléculas são homopolímeros ou heteropolímeros de açúcares neutros⁴¹. E o isolamento do EPS em quantidades suficientes para realizar experimentos de adsorção de metais é difícil⁴².

Os homopolissacarídeos são compostos de um único tipo de monossacarídeo, como dextrano ou levano. Os heteropolissacarídeos são compostos de vários tipos de monossacarídeos como xantanos ou gelanos, e geralmente são sintetizados dentro da célula na forma de unidades repetidas. Os heteropolissacarídeos compõem a maioria dos EPSs bacterianos. A biossíntese do EPS pode ser dividida em três etapas principais: I) assimilação de um substrato de carbono; II) síntese intracelular dos polissacarídeos e III) exsudação de EPS para fora da célula⁴³.

Eles são derivados de uma ampla variedade de fontes: bacterianas, fúngicas, algas e vegetais. Apesar das muitas fontes polissacarídicas, o mercado mundial é dominado por polissacarídeos de algas e plantas superiores. Esses biopolímeros são obtidos por extração a partir de biomassa e pode ser submetido à hidrólise ou fermentação química para obter as menores moléculas polimerizadas⁴³.

Essas estruturas de carboidratos poliméricos são importantes constituintes de plantas, animais e microrganismos como componente estrutural ou como moléculas de armazenamento⁴⁴. A maioria dos EPS é de natureza polianiónica e pode se ligar a moléculas carregadas positivamente via complexação de polieletrólito ou gelificação

ionotrófica. Por isso, eles são amplamente utilizados para aplicações nanotecnológicas, incluindo a síntese de nanopartículas e microesferas para fins de liberação de drogas ⁴⁴.

Outro papel importante diz respeito à função de proteção eles fornecem contra alta ou baixa temperatura e salinidade ou contra possíveis predadores⁴⁵. Geralmente, a bioatividade de polissacarídeos está intimamente relacionada com o seu peso molecular, grupos funcionais e grau de substituição⁴⁶.

Apesar da alta diversidade de EPS's bacterianos e suas propriedades físicoquímicas, apenas algumas delas foram realmente usadas até agora na indústria, por exemplo, xantana de *Xanthomonas campestris*, goma gelana de *Pseudomonas elodea*, e alginato de *Pseudomonas aeruginosa* usado como um espessante e estabilizador na indústria alimentar⁴³.

EPS bacterianos também são usados como transportadores de drogas, biofloculantes, biossorbentes, e eliminadores de metais pesados⁴⁷. Sua capacidade ligar metais pesados foi aplicado com sucesso em o processo de biorremediação, particularmente no metal e indústria mineira⁴⁸. As funções mais importantes do EPS são a adesão a superfícies, agregação de células bacterianas em flocos, estabilização de estrutura do floco, formação de uma barreira protetora que fornece resistência a biocidas ou outros efeitos nocivos como incluir temperatura, intensidade da luz ou pH⁴³, retenção de água, sorção de compostos orgânicos exógenos para o acúmulo de nutrientes do meio ambiente, e acúmulo de atividades enzimáticas, como digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutrientes, auxiliando as células a absorver nutrientes metálicos¹⁸.

2.4 Quitosana e exopolissacarídeos

A quitosana, por suas qualidades amplamente conhecidas e divulgadas, considerada a “fibra do futuro”, pode ser facilmente obtida a partir principalmente de rejeitos da indústria pesqueira. Em adição, os exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio⁴⁹, são produtos naturais de grande importância comercial, em função de várias aplicações biotecnológicas⁵⁰.

Ao misturar dois biopolímeros em solução, é possível exibir um dos três comportamentos a seguir: miscibilidade, incompatibilidade termodinâmica e formação complexa. Em soluções diluídas, onde as atrações inter-biopoliméricas são inibidas, o

sistema é estável, uma vez que a entropia da mistura domina e biopolímeros são miscíveis^{51,52}.

Com o aumento da concentração de biopolímeros e exceder uma concentração crítica, estes podem se tornar parcialmente miscível. A baixa entropia e a entalpia insignificante da mistura das macromoléculas são responsáveis por sua incompatibilidade em um solvente comum⁵². As forças de repulsão líquida entre as duas espécies em solução no nível molecular causam separação espontânea do sistema em duas fases distintas. Esse fenômeno é conhecido como incompatibilidade termodinâmica, geralmente exibido em soluções semi-diluídas ou concentradas de biopolímeros, especialmente quando os polímeros têm uma alta massa molar^{53,54}.

Interações atraentes entre dois biopolímeros podem se tornar evidente de várias maneiras: I) formação de pequeno complexo solúvel, manifestando-se em soluções turvas; II) formação de um gel fraco homogêneo, se as interações forem fracas e III) precipitação de ambos os biopolímeros, se as interações forem fortes⁵⁴. Em Neste último caso, a neutralização mútua de cadeias com cargas opostas diminui a carga líquida e a hidrofobicidade da formação zonas de junção e promove uma conformação compacta do complexo com as zonas de junção ocultas em seu interior hidrofóbico. A neutralização das cargas de um polissacarídeo aniônico também pode reduzir a rigidez das cadeias da coluna vertebral devido a uma diminuição na interação repulsiva de grupos com carga semelhante⁵⁵.

Vários estudos sobre a relação entre a quitosana e os exopolissacarídeos têm sido desenvolvidos, como o uso de quitosana modificada com antibiótico para tratar infecções causadas pela bactéria *S. aureus* que causa mastite bovina⁵⁶; a utilização de carboximetilquitosana para inibir a produção de biofilme de fungos e bactérias em silicones que são utilizados em materiais médicos⁵⁷ e o uso de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato como agente antimicrobiano em microrganismos resistentes aos antibióticos⁵⁸.

Outras utilizações são a de grânulos de quitosana-alginato para imobilizar células do fungo *Aureobasidium pullulans* para sintetizar exopolissacarídeos⁵⁹; a de filmes de bicamadas compostas por dois biopolímeros, o FucoPol (produzido pela bactéria *Enterobacter A47*) e a quitosana, como materiais de barreiras para que o oxigênio não entre em contato com os grãos de nozes, evitando a sua oxidação e estendendo seu prazo de validade⁶⁰ e o desenvolvimento de complexos polieletrólitos à base de quitosana com polissacarídeos, dentre eles a xantana juntamente com nanoargila

(montmorilonita sódica), que aumenta sua resistência mecânica para atuar na liberação de fármacos⁶¹.

Outros estudos já têm sido relatados sobre a utilização da quitosana e do exopolissacarídeo como inoculantes, a exemplo da atividade antifúngica da quitosana (*in vitro*) junto com um fertilizante e bioprotetor (*C. elegans*-NPKB) em plantas de feijão-caupi inoculadas com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Traqueifilo*²²; a melhora da composição química, qualidade microbiológica e da estabilidade aeróbica da silagem da cana-de-açúcar utilizando quitosana^{23,24}; a ensilagem de soja utilizando quitosana e uma mistura de *L. plantarum* e *P. acidipropionici*²⁵; biorremediação de água do mar poluída por petróleo por uma cepa bacteriana imobilizada em quitina e quitosana⁹; a liberação de bactérias promotoras de crescimento de plantas utilizando um hidrogel de quitosana-amido²⁶; o controle biológico de *Pythium aphanidermatum* em pepino aplicando *Lysobacter enzymogenes* estirpe 3.1T8 e quitosana²⁷; a fitorremediação de solo poluído com cádmio por *Chlorophytum laxum*, combinado com bactérias resistentes ao cádmio imobilizada com quitosana²⁸; síntese de macromoléculas de biocontrole derivadas de quitosana com surfactina e avaliação antifúngica²⁹, e a agregação celular da *Azospirillum brasilense* utilizando EPS^{3,30}.

2.5 Micronutrientes essenciais: cobre e zinco.

Os íons metálicos desempenham um papel essencial nos processos vitais dos microrganismos. Tais como, cálcio, cobalto, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, níquel e zinco são nutrientes necessários e essenciais. Outros não têm papel biológico (prata, alumínio, cádmio, ouro, chumbo e mercúrio) e não são essenciais.

Os metais essenciais funcionam como catalisadores de reações bioquímicas, estabilizadores de estruturas proteicas e paredes celulares bacterianas, e contribuem na manutenção do equilíbrio osmótico. Os de transição como ferro, cobre e níquel estão envolvidos em processos redox. Ainda outros metais essenciais, como magnésio e zinco, estabilizam várias enzimas e DNA através de forças eletrostáticas. Ferro, magnésio, níquel e cobalto são partes de moléculas complexas com uma ampla variedade de funções; e potássio e sódio são necessários para a regulação da pressão osmótica intracelular⁶².

Metais em alta concentração são tóxicos para microrganismos. A toxicidade ocorre através do deslocamento de metais de seus locais de ligação nativos ou através de

ligantes interações. Metais não essenciais se ligam a uma quantidade maior grupos tiol e locais de oxigênio que os metais essenciais⁶².

Os plasmídeos bacterianos mostraram-se críticos na tolerância bacteriana ao cobre e são altamente móveis entre as cepas que crescem em solos poluídos por metais⁶³.

O cobre tornou-se biodisponível há cerca de um bilhão de anos atrás, quando o aumento de O₂ causou uma perda de ferro solúvel e um aumento de cobre solúvel (Cu(II)). Desde então, os organismos desenvolveram uma diversidade de mecanismos para lidar com flutuações nas concentrações de cobre em seus ambientes⁶³.

O cobre é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos que sintetizam cuproenzimas, mas é altamente tóxico quando os seus níveis intracelulares superam os limites. O cobre excessivo desestabiliza os aglomerados de Fe-S, compete com outros metais pelos locais de ligação nas proteínas e pode catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio⁶³.

Algumas bactérias apresentam também maior ou menor resistência a íons cobre. Na verdade, muitas formulações de pesticidas são baseadas neste íon e empregadas nos campos de cultivo, o que pode comprometer a microflora do solo⁶³. A tecnologia de inoculantes deve assegurar um ambiente propício para o desenvolvimento das bactérias fixadoras de nitrogênio, protegendo-as tanto dos riscos de contaminação por excessos deste íon, quanto lhes suprindo as carências.

O zinco também é um micronutriente essencial para bactérias, embora tenha toxicidade significativa em altas concentrações. No entanto, a base molecular da toxicidade do zinco permanece pouco conhecida⁶⁴.

O zinco é um micronutriente essencial para todos os organismos vivos e desempenha uma grande variedade de papéis catalíticos, regulatórios e estruturais na biologia. O zinco é incorporado em cerca de 10% de todas as proteínas humanas e sabe-se que mais de 300 enzimas requerem Zn(II) para funções catalíticas ou estruturais. A porcentagem de proteínas bacterianas ligadas ao zinco é menor (cerca de 5 a 6%). O zinco nas bactérias é usado principalmente como cofator de metaloenzima com uma concentração total na faixa de 0,1–1,0 mM⁶⁵.

O zinco e outros íons de metais de transição apresentam um paradoxo químico interessante para as células vivas. Embora o excesso de Zn(II) possa ter toxicidade significativa e atuar como um potente desregulador dos sistemas biológicos, também é um micronutriente essencial que desempenha papéis importantes em vários processos

fisiológicos, pois serve como cofator em membros das seis principais classes funcionais de enzimas e é especialmente importante na manutenção da estrutura proteica. O zinco ocorre naturalmente como o cátion divalente (Zn(II)) e não possui atividade redox em condições fisiológicas⁶⁶.

2.6 Estudos de Adsorção

A adsorção tornou-se uma técnica de separação bem-estabelecida, útil para remover poluentes, bem como para regenerar, recuperar e reciclar materiais. As características do comportamento de adsorção são geralmente inferidas em termos de cinética de adsorção e equilíbrio isotérmica. Eles também são uma ferramenta importante para entender o mecanismo da reação e interpretação teórica de parâmetros termodinâmicos⁶⁷.

A adsorção é frequentemente estudada como uma ferramenta potencial para purificação de água e efluentes industriais. Em geral, trabalhos neste campo relatam resultados experimentais sobre a capacidade de adsorção de solutos em equilíbrio e sobre a cinética de adsorção⁶⁸.

A sorção pode ser física ou química, dependendo do tipo de interação que ocorre entre a superfície adsorvente e a espécie adsorvida. Na sorção física ocorrem atrações intermoleculares entre sítios de energias favoráveis, independente das propriedades eletrônicas das moléculas envolvidas. A espécie adsorvida, chamada de adsorvato é mantida na superfície do adsorvente por interações de van der Waals, e podem se formar camadas múltiplas.

A sorção química pode envolver uma troca ou um compartilhamento de elétrons entre sítios específicos de superfície e moléculas do soluto, resultando na formação de uma ligação química. A quimissorção é caracterizada por energias de interação comparáveis às interações de ligações químicas, conseqüentemente, a sorção química é mais intensa e estável do que a sorção física e é formada apenas uma camada de sorção¹⁵.

2.6.1 Cinética de Adsorção

Para investigar o mecanismo de adsorção e as etapas de controle de taxa que incluem transporte de massa e produtos químicos, processos de reação, modelos cinéticos são empregados para analisar os dados experimentais. Além disso, informações sobre a cinética são necessárias para a identificação do tempo de equilíbrio

e definição das condições ideais para o emprego da adsorção. Vários modelos cinéticos como pseudo-primeira ordem, segunda ordem e modelo de difusão intra-partículas estão disponíveis para os estudos de modelagem⁶⁹.

O modelo de pseudo-primeira ordem, também conhecida como o modelo de Lagergren (Equação 1), assume que a velocidade de remoção do adsorvato em relação ao tempo é diretamente proporcional à diferença na concentração de saturação e ao número de sítios ativos do adsorvente, de tal forma que a equação integrada que expressa esse modelo é a seguinte:

$$\ln[q_e - q_t] = \ln q_e - k_1 \cdot t \quad \text{Eq. 1}$$

Onde q_e e q_t são as quantidades de metais adsorvidos (mg g^{-1}) no equilíbrio e no tempo t (min), respectivamente; k_1 é a constante de velocidade de adsorção (min^{-1}).

O modelo cinético de segunda ordem geralmente é usado para descrever a quimissorção envolvendo interações de valência por meio do compartilhamento ou troca de elétrons entre o adsorvato e o adsorvente. Nesse modelo, a velocidade da reação depende da quantidade do soluto adsorvido e da quantidade adsorvida no equilíbrio, conforme a Equação 2.

$$\frac{t}{q(t)} = \frac{1}{k_2 q_e^2} - \frac{t}{q_e} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde q_e e q_t são as quantidades de metais adsorvidos (mg g^{-1}) no equilíbrio e no tempo t (min) e k_2 é a constante de velocidade de segunda-ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

A Equação 3 apresenta a expressão matemática para o modelo de difusão intrapartícula (ou modelo de Weber e Moris), casos em que a difusão é fator limitante no processo de adsorção.

$$qt = K_d t^{\frac{1}{2}} + C \quad \text{Eq. 3}$$

Onde C é a interceptação e K_d é a taxa de difusão intrapartículas constante ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{1/2}$).

2.6.2 Isotermas de Adsorção

A eficiência do processo de sorção geralmente é medida através das isotermas, também chamadas curvas de sorção, que são gráficos que relacionam o equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes, a uma determinada temperatura. Parâmetros como o pH, temperatura, tempo de contato, área e natureza do adsorvente, concentração (pressão, em caso de gases) e solubilidade do adsorvato, influenciam consideravelmente nos perfis das curvas de sorção¹⁵.

Estudos isotérmicos de adsorção são importantes para estabelecer a eficiência da adsorção. Vários modelos empíricos de isotermas, originalmente desenvolvidos para adsorção de gases por sólidos, estão disponíveis e podem ser empregados para modelagem de equilíbrios em outros sistemas, como por exemplo, de fases líquidas por sólidos.

Os modelos mais comumente empregados são Freundlich, Langmuir, Temkin, Equação de Redlich–Paterson e Sips. O que distingue um modelo do outro, além da maior ou menor influência das fases envolvidas (sistemas homogêneos, heterogêneos) e natureza das interações adsorvente/adsorvato, é o número de parâmetros que podem ser modelados. No presente estudo, os modelos de Langmuir, Freundlich e Sips foram utilizados para modelagem dos resultados obtidos⁶⁹.

O modelo de Langmuir assume que as espécies adsorvidas aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos e homogêneos e que a quantidade máxima de adsorção corresponde à saturação da monocamada da superfície do adsorvente, sem que haja interação lateral entre as espécies envolvidas. Dessa forma, é possível obter um valor teórico de quantidade máxima de adsorção, a qual corresponde à formação da monocamada¹⁵.

Portanto, os pressupostos do modelo de Langmuir podem ser assim resumidos: I) as moléculas devem ser adsorvidas em pontos discretos da superfície, chamados de sítios de adsorção; II) cada sítio deve manter apenas uma molécula adsorvida; III) a quantidade de adsorção máxima possível corresponde à monocamada em superfície homogênea, e IV) a superfície do adsorvente deve ser completamente uniforme do ponto de vista energético. A expressão matemática que pondera estes pressupostos está apresentada na Equação 4:

$$q_e = \frac{K_L C_e q_m}{1 + K_L C_e} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde q_e e C_e são a quantidade adsorvida (mgg^{-1}) e a concentração de adsorvato em solução (mgL^{-1}), respectivamente, ambos em equilíbrio; K_L é a constante de Langmuir (Lmg^{-1}); q_m é a capacidade máxima de adsorção da monocamada formada no adsorvente (mgg^{-1}).

As características essenciais de uma isoterma de Langmuir podem ser expressas em termos de um fator de separação, R_L , constante adimensional definido pela Equação 5:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde K_L (Lmg^{-1}) é a constante de Langmuir e C_0 (mgL^{-1}) é a concentração inicial. Valores de $0 < R_L < 1$ indicam que o processo é favorável, $R_L > 1$ indicam que o processo é desfavorável, $R_L = 1$ indica uma isoterma linear e $R_L = 0$ indica que o processo é irreversível.

A isoterma de Freundlich é uma equação empírica assumindo que o processo de adsorção ocorre em superfícies heterogêneas. Este modelo isotérmico é definido pela Equação 6:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde K_F e n são as constantes isotérmicas de Freundlich indicando a capacidade de adsorção (mgg^{-1}) e intensidade de adsorção (sem unidade).

A equação de Freundlich sugere que a energia de adsorção decresce logaritmicamente, à medida que a superfície vai se tornando coberta pelo soluto, o que a diferencia da equação de Langmuir. O modelo de Freundlich pode ser derivado teoricamente ao se considerar que o decréscimo na energia de adsorção com o aumento da superfície coberta pelo soluto é devido à heterogeneidade da superfície.

A isoterma de Sips é uma junção das isotermas de Langmuir e de Freundlich, por isso ela é conhecida também como isoterma de Langmuir-Freundlich. Esse nome é derivado do comportamento limite da equação. Em concentrações baixas de adsorvato a

isoterma tem um comportamento semelhante ao de uma isoterma de Freundlich. E em altas concentrações de adsorvato, prevê uma capacidade de adsorção em monocamadas, característica da isoterma de Langmuir.

Os parâmetros da equação são essencialmente governados pelas condições de operação, tais como pH, temperatura e concentração de adsorvato. Esse modelo é representado pela Equação 7:

$$q_e = Q_{m\acute{a}x} \frac{K_S C_e^{n_s}}{K_S C_e^{n_s}} \quad \text{Eq. 7}$$

Em que q_e é a capacidade de adsorção no equilíbrio, $Q_{m\acute{a}x}$ é a capacidade máxima de adsorção teórica, C_e é a concentração no equilíbrio, K_S é constante de equilíbrio da reação de adsorção e n_s constante do modelo de Sips.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o desempenho de uma blenda resultante da interação entre os polímeros quitosana e exopolissacarídeo quanto à possibilidade de atuarem na tecnologia de inoculantes para aumentar o número de unidades formadoras de colônias da *Rhizobium tropici* CIAT 899.

3.2 Específicos

- Obter a quitosana a partir de exoesqueletos de camarão e o exopolissacarídeo a partir da *Rhizobium tropici* UFLA 05-16;
- Desenvolver uma rota de síntese entre os biopolímeros: quitosana e exopolissacarídeo;
- Caracterizar as blendas obtidas por FTIR, solubilidade, RMN-¹⁵N, TG/DTA, grau de intumescimento e pH_{zpc};
- Estudar o efeito do pH, obter curvas cinéticas e isotermas para a interação com os íons de metais Cu(II) e Zn(II) e realizar ensaios de dessorção;
- Avaliar a capacidade da blenda atuar na tecnologia de inoculante da *Rhizobium tropici* CIAT 899.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico (Merck ou Aldrich). Os exoesqueletos de camarão foram coletados dos restaurantes e comércios locais. A água empregada no preparo das soluções foi unicamente destilada. Os exopolissacarídeos foram obtidos a partir de culturas da bactéria *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 e as blendas foram aplicadas como inoculantes nas culturas do *Rhizobium tropici* CIAT 899.

4.2 Obtenção dos biopolímeros

4.2.1 Obtenção da quitosana (QTS)

A partir da quitina extraída da carapaça de camarões, a quitosana foi obtida por meio de desacetilação da quitina seguida de purificação^{16,38}. O grau de desacetilação foi obtido por controle do tempo reacional.

O processo de obtenção de quitina seguiu as etapas de: pré-tratamento, desmineralização, desproteinização, e secagem⁷⁸ com algumas adaptações. Realizamos o pré-tratamento das cascas, lavando-as com água corrente, visando à separação da matéria vegetal, porções de tecido e outros materiais que eventualmente possam acompanhar o resíduo do exoesqueleto do camarão que foi utilizado no processo. Após a lavagem, as amostras foram colocadas para secar à temperatura ambiente e logo em seguida foram trituradas e peneiradas em uma peneira Granutest de aberturas de 1,00 mm e 0,177 mm.

Na etapa de desmineralização⁷⁸, com a função de reduzir o teor de cinzas da matéria-prima, tornando-os livres do carbonato de cálcio, o material foi posto em contato, sob agitação e por 3 h, com ácido clorídrico 0,25 molL⁻¹ na proporção de 40 mLg⁻¹. Em seguida, durante a filtração, o material foi lavado até meio neutro e colocado para secar na estufa, à 50 °C por 12 h.



Figura 2. Desmineralização das cascas de camarão com ácido clorídrico $0,25 \text{ molL}^{-1}$ na proporção de 40 mLg^{-1} .

Para a etapa de desproteinização⁷⁸, o objetivo foi reduzir o teor de nitrogênio protéico pela adição de uma solução de hidróxido de sódio 1 molL^{-1} , na proporção de 20 mLg^{-1} , deixado sob agitação e aquecimento a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Esta etapa foi realizada duas vezes para que o material obtido tivesse uma coloração branca e estivesse isento do odor característicos do camarão. Em seguida foi feita a lavagem deste material com água até pH neutro, seguido de lavagem com etanol e secagem em estufa à $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 8 h.



Figura 3. Desproteíntização das cascas de camarão com hidróxido de sódio 1 molL^{-1} , na proporção de 20 mLg^{-1} .

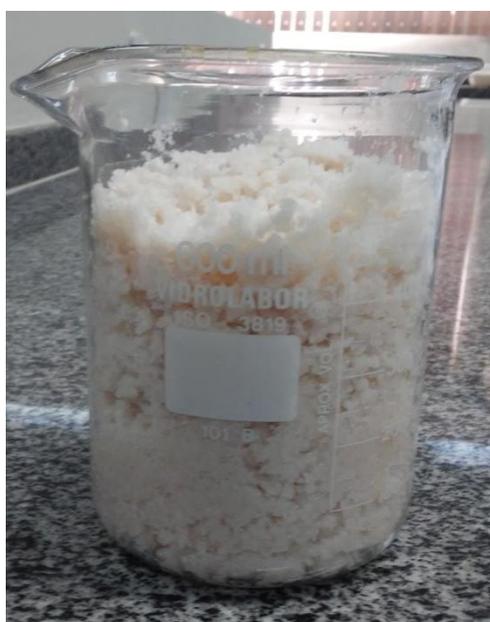


Figura 4. Quitina extraída das cascas de camarão.

A desacetilação da quitina foi realizada empregando-se uma solução de hidróxido de sódio 50 %, na proporção de 20 mLg⁻¹, em condições de refluxo, por 12 h. Em seguida, o material foi lavado até pH neutro e seco em estufa, a 50 °C por 12 h^{16,38}.



Figura 5. A desacetilação da quitina com hidróxido de sódio 50 %, na proporção de 20 mLg⁻¹ sob refluxo.

Todo o sólido preparado foi submetido à dissolução em solução de ácido acético 0,571 molL⁻¹ (pH = 2,5), na proporção de 80 mLg⁻¹, e deixado sob agitação por 24 h. Após filtração e remoção de quitina e outros insolúveis, o filtrado foi precipitado lentamente em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 molL⁻¹, filtrado, lavada até pH 7,0 e seco em estufa à 50°C, por 12 h, com um rendimento de aproximadamente 45%.



Figura 6. Quitosana obtida a partir da desacetilação da quitina.

4.2.2 Obtenção do exopolissacarídeos (EPS)

A extração do exopolissacarídeo foi feita pela introdução da *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 em meio YM que foi anteriormente esterilizada a 120°C por 20 minutos em uma autoclave. O meio de cultura YM (meio de manitol) foi composto por: 10 g de Manitol, 1 mL de solução de K₂HPO₄ 10%, 2 mL de solução de MgSO₄.7H₂O 10%, 4 mL de solução de KH₂PO₄ 10%, 1 mL de solução de NaCl 10% e 0,4 g de extrato de leveduras em pó e 5 mL de solução indicadora de azul de bromotimol, corrigindo o pH entre 6,8-7,0.



Figura 7. Meio de cultura à base de Manitol (YM).

Após a inoculação da bactéria no meio de cultura, o sistema ficou sob agitação constante a 150 rpm por 24 h. Em seguida, retirou-se 1 mL desse meio e adicionou-se a 200 mL de um outro meio de cultura YM que posteriormente ficou sob agitação constante por 15 dias a 110 rpm para fermentar.

Após o período de fermentação, foram extraídos os EPS utilizando álcool etílico 92,8 INPM (grau INPM, Instituto Nacional de Pesos e Medidas). Para cada litro de solução fermentada de *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 foram adicionados 3 L de álcool etílico a -4°C.

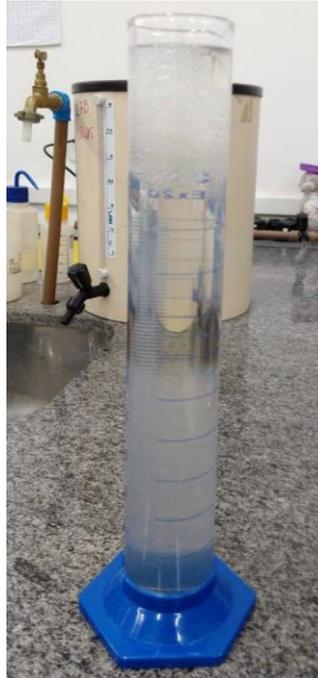


Figura 8. Extração do EPS da *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 utilizando álcool etílico 92,8 INPM a -4°C .

O EPS ficou sobrenadante e foi filtrado e dialisado, onde ficou por três dias e, em seguida, liofilizado por 48 h com um rendimento de aproximado de 3 g de EPS por litro de meio YM.

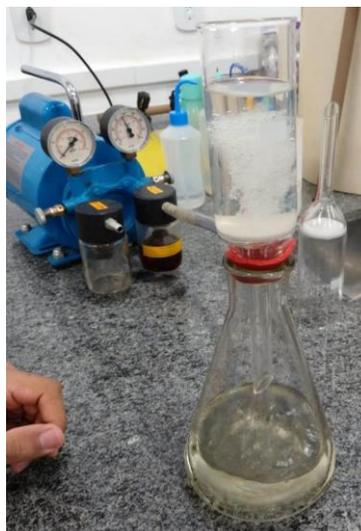


Figura 9. Filtração do EPS da *Rhizobium tropici* UFLA 05-16.



Figura 10. EPS extraído da *Rhizobium tropici* UFLA 05-16.

4.2.3 Síntese da Quitosana-Exopolissacarídeo (QE)

O procedimento de síntese seguiu a descrição de Rodrigues et al⁷⁰ e foi adaptada para a utilização do exopolissacarídeo como poliânion, ao invés do alginato, pois não necessitou da adição de acetona ou cloreto de cálcio na mistura para melhorar alguma propriedade.

Soluções de quitosana 0,5%, em solução de ácido acético 2%, e solução aquosa de EPS 0,5% foram convenientemente preparadas: a primeira em agitação por 24 h, para completa solubilidade da quitosana, e a do EPS sob aquecimento (a 70 °C, por 2 h) e agitação por 24 h.

Para as sínteses das blendas foram estabelecidas as seguintes proporções (v/v) entre quitosana e o EPS: 1:1 (QE1:1); 1:2 (QE1:2); e 2:1 (QE2:1). Considerando estas proporções, com auxílio de uma bureta, a solução de EPS era gotejada lentamente e sob agitação, na solução de quitosana. Apesar da pronta precipitação das blendas, o sistema permanecia sob agitação por 12 h, para permitir o maior contato possível entre eles. Em seguida, os modificados eram filtrados, lavados até pH neutro e liofilizados.

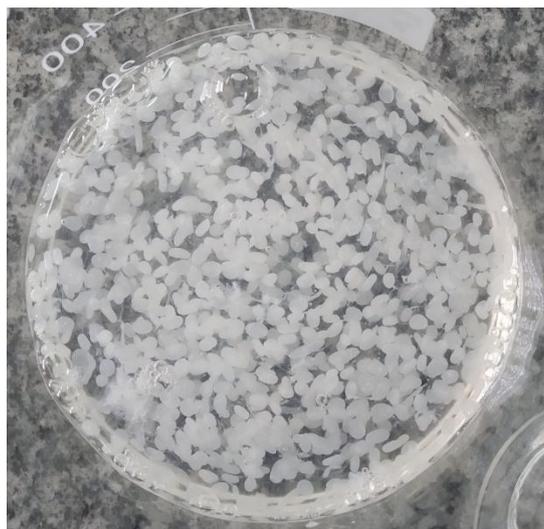


Figura 11. *Blenda entre quitosana e exopolissacarídeo.*

4.3 Caracterizações

Os materiais obtidos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), determinação do ponto de carga zero (pH_{zpc}), grau de intumescimento (% GI) e por ensaios de solubilidade. A quitosana obtida foi caracterizada também pelo grau de desacetilação (% GD).

4.3.1 Determinação do grau de desacetilação (%GD) por titulação condutométrica

Os graus de desacetilação (% GD) das quitosanas foram determinados pelo método de titulação condutométrica,¹⁰ através de titulações com solução padronizada de base (NaOH), acompanhadas por medidas de condutância. Resumidamente: 0,200 g das amostras de quitosana foram solubilizadas em 50 mL de solução de ácido clorídrico $0,05 \text{ molL}^{-1}$ e deixados sob agitação por 24 h. Em seguida, as soluções das quitosanas foram tituladas com solução de hidróxido de sódio ($0,099 \text{ molL}^{-1}$), recém padronizada com biftalato de potássio.

As variações das condutividades foram medidas por um condutivímetro da ANALYSER, modelo 650. O grau de desacetilação da quitosana foi calculado utilizando a Equação 8, em que %GD é o grau de desacetilação; M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH; V_{NaOH} é a diferença entre os volumes de NaOH gastos nos dois pontos de inflexão; MM é a massa molar média da unidade de repetição do polímero (constante igual a $161,16 \text{ gmol}^{-1}$) e m é a massa da quitosana em gramas.

$$\%GD = \frac{MM.V_{NaOH}.M_{NaOH}}{m} \times 100 \quad \text{Eq. 8}$$

4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos materiais obtidos foram realizados empregando-se um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo IR-PRESTIGE-21, método da pastilha de KBr, apodização Happ-Genzel, com varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , número de scans igual a 40 e resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.3 Solubilidade

Para fins comparativos, foram verificadas as solubilidades relativas dos materiais em meio aquoso, em diferentes valores de pH: água destilada, solução aquosa de ácido acético a 2%, e solução de hidróxido de sódio a 0,01 molL^{-1} . Em resumo: 0,200 g de QTS, de EPS, e das blendas QE1:1, QE1:2 e QE2:1 foram pesados e colocados em 50 mL de cada uma das três soluções. Os sistemas ficaram sob agitação por 24 h, a 150 rpm. Em seguida, foram filtrados e verificadas as massas retidas.

4.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio (^{15}N -RMN)

As análises ^{15}N -RMN foram realizadas nas seguintes condições: as amostras, em pó, foram empacotadas em rotores de zircônia com diâmetro externo de 4 mm, e foram tampadas com uma tampa de KEL-F. O equipamento utilizado: Bruker Avance III-400, operando em um campo magnético de 9.4 T, frequência de observação de 40.52 MHz, sonda: MAS - para rotores de 4 mm, sequência de pulsos: cross polarization on magic angle spinning with total sideband suppression (CPTOSS), rotação da amostra: 5 kHz, janela de observação: 1000 ppm (-500 até 500 ppm), número de varreduras: 22000 até 52500, tempo de reciclo: 3 s. Tempo de contato: 2 ms, tempo de aquisição: 34 ms, referência externa de deslocamento químico: glicina (32 ppm).

4.3.5 Termogravimetria (TGA/DTA)

Para o estudo da estabilidade térmica dos materiais, foi utilizada a técnica da termogravimetria, monitorando a perda de massa em função do aumento da temperatura. As condições de análise foram: atmosfera de ar sintético com fluxo de gás

50 mLmin⁻¹; razão de aquecimento de 10°Cmin⁻¹; intervalo de temperatura de 33 a 800°C.

4.3.6 Grau de Intumescimento (%GI)

Para determinarmos o grau de intumescimento da quitosana e das blendas, seguiu-se a metodologia de Motta⁷¹, em que 25 mg das amostras foram imersos em 5 mL de água destilada em tubos falcon por um período de 30 min. Em intervalos de tempo pré-definidos (2, 3, 5, 10, 15, 20, e 30 min.) os tubos foram centrifugados por cinco minutos em uma centrífuga (FANEM 206). Após a centrifugação, o excesso de água foi descartado e o adsorvente foi filtrado para que pudéssemos obter o material intumescido com a finalidade de comparar com o material antes do contato com a água. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo *t* foi calculado pela Equação 9, em que *m* refere-se a massa do sólido intumescido e *m*₀ à massa do material antes do contato com a água.

$$\%GI = \left[\frac{(m - m_0)}{m_0} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 9}$$

4.3.7 Determinação do ponto de carga zero (pH_{zpc})

O valor do pH_{zpc} foi determinado por variações nas medidas de pH de soluções de HCl e NaOH, em cloreto de potássio 0,1 molL⁻¹, antes e após o contato com o material, estabelecido o tempo de equilíbrio de 24 h. Em resumo: 20,0 mg das amostras foram colocados em contato 25 mL de cada solução (pH de 1,0 a 14,0), sob agitação constante (150 rpm). Após o tempo estabelecido, as soluções foram filtradas e o pH final de cada amostra foi determinado por um pHmetro (QUIMIS, Q400AS).⁷²

4.4 Ensaios de Adsorção

Os ensaios de adsorção (efeito do pH, cinética e isothermas) foram conduzidos em batelada, utilizando erlenmeyers de 125 mL, em bandejas com controle de temperatura e de agitação. A capacidade de adsorção (*q*) foi calculada conforme a Equação 10:

$$q = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde C_i é a concentração inicial do metal na fase líquida (mgL^{-1}), C_f é a concentração final do metal na fase líquida (mgL^{-1}), m é a massa de adsorvente utilizada no ensaio (g), e V é o volume da solução (L).

O estudo do efeito do pH na adsorção foi realizado na faixa de pH de 1,0 a 7,0, com as concentrações de íons cobre e zinco de 100 mgL^{-1} e em meio iônico de cloreto de potássio $0,1 \text{ molL}^{-1}$. Os pH's das soluções foram ajustados utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio, ambos a $1,0 \text{ molL}^{-1}$. Em 25 mL de solução dos íons, foram adicionados 20 mg dos materiais (QTS, QE1:1, QE1:2 e QE2:1), isoladamente, e avaliadas as capacidades de adsorção.

O Cu(II) foi determinado pelo espectrofotômetro UV-Vis (KASUAKI, IL-592), por complexação em meio de hidróxido de amônia concentrado, e acompanhamento da variação das absorvâncias em 625 nm .⁷³ O zinco foi determinado por titulação potenciométrica utilizando EDTA a $1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, em tampão básico (pH 10,0), utilizando o negro de Eriocromo T como indicador.⁷⁴

Os ensaios com adsorção simultânea dos íons metálicos foram realizados de modo semelhante aos anteriores: 20,0 mg dos adsorventes foram colocados em contato com 30 mL de uma solução mista de Cu(II) e Zn(II) (15 mL de cada solução, ambas a 50 mgL^{-1}). Após o tempo de contato, os adsorventes foram centrifugados e a concentração final dos íons determinada por titulação potenciométrica. Em resumo, duas alíquotas da solução após o ensaio de adsorção, foram empregadas nas titulações. A primeira para a determinação total dos íons, com solução de EDTA $1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, em tampão básico (pH 10,0), utilizando o negro de Eriocromo T como indicador. Na segunda alíquota o cobre foi mascarado com solução de tiosulfato de sódio $0,1 \text{ molL}^{-1}$, e o zinco foi titulado utilizando-se EDTA a $1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ em tampão básico de pH igual a 10,0, utilizando o negro de Eriocromo T como indicador.⁷⁴

4.4.1 Cinética de adsorção

Os estudos cinéticos foram realizados após a determinação do melhor pH para a remoção dos íons cobre e zinco, em solução. 20,0 mg da blenda mais eficiente foram colocados em contato com 25 mL das soluções isoladas dos íons de metais (50 mgL^{-1}), nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 600 e 720 min, a temperatura e agitação constantes (25°C e 150 rpm). Os resultados obtidos foram

ajustados aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (Equação 1), de segunda ordem (Equação 2) e de difusão intrapartícula (Equação 3) de acordo com Önal⁶⁷.

4.4.2 Isotermas de adsorção

O estudo das isotermas foi realizado de forma semelhante ao estudo cinético, variando apenas as concentrações das soluções de Cu(II) e Zn(II) (10 a 300 mg/L), no tempo determinado pelas cinéticas de adsorção. Os resultados obtidos foram ajustados aos modelos não linearizados de Langmuir (Equação 4) e Freundlich¹³ (Equação 6) e de Sips (Equação 7)⁷⁵.

4.4.3 Ensaios de Dessorção

Os estudos de dessorção foram conduzidos em conformidade com Laus et al.¹³, com algumas modificações. As amostras de adsorventes contendo cada íon metálico foram colocadas em contato com 50,0 mL de soluções de H₂O, HNO₃ e HCl em diferentes concentrações e mantida sob agitação por 3 h. A quantidade de íons metálicos dessorvidos foi determinada por titulação potenciométrica e utilizamos EDTA a 1,0x10⁻⁴ molL⁻¹, em tampão básico (pH 10,0), utilizando o negro de Eriocromo T como indicador. A percentagem de dessorção foi calculada a partir da Equação 11, em que m_{des} é a quantidade de íons de metais dessorvidos e m_{ads} é quantidade de íons de metais adsorvidos.

$$\%D = \frac{m_{des}}{m_{ads}} \times 100 \quad \text{Eq. 11}$$

4.5 Aplicação das blendas na tecnologia de inoculante

4.5.1 Meio de cultura

O meio YMA (meio de ágar e manitol) foi preparado após a adição 16 g de ágar em pó por litro de meio YM, corrigindo o pH entre 6,8-7,0.

4.5.2 Soluções de micronutrientes

A solução de micronutrientes “a” continha (por litro): 2,86 g de H₂BO₃; 2,43 g de MnSO₄.H₂O; 0,22 g de ZnSO₄.7H₂O; 0,08 g de CuSO₄.5H₂O e 0,02 g de H₂MoO₄.H₂O⁷⁶.

A solução de Fe-EDTA continha (por litro): 33,2 g de EDTA; 89,2 mL de NaOH 1 molL^{-1} ; 24,9 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A solução Fe-EDTA ficou sob agitação durante 24 h.

4.5.3 Influência da concentração de micronutrientes no crescimento bacteriano

De acordo com Hoagland & Arnon⁷⁶, 0,1 mL de solução de micronutrientes “a” e 0,1 mL de solução Fe-EDTA em 100 mL de meio de cultura é a concentração ótima para a produção de bactérias. Entretanto, avaliou-se, inicialmente, o crescimento das bactérias em diferentes concentrações de micronutrientes. Em meios com excesso de metais, a blenda livre de Cu(II) e Zn(II) foi aplicada com a intenção de adsorver o excesso de metais e promover o crescimento das colônias bacterianas. A *Rhizobium tropici* CIAT 899 foi inoculada em 100 mL meio de cultura YM, devidamente vedado, sob agitação a 110 rpm e por 48 h, em cinco ensaios diferentes:

- I) 0,0 mL de solução “a” e 0,0 mL de solução Fe-EDTA.
- II) 0,1 mL de solução “a” e 0,1 mL de solução Fe-EDTA.
- III) 0,2 mL de solução “a” e 0,2 mL de solução Fe-EDTA.
- IV) 0,4 mL de solução “a” e 0,4 mL de solução Fe-EDTA.
- V) 0,8 mL de solução “a” e 0,8 mL de solução Fe-EDTA.

Em seguida, foram feitas as diluições seriadas para cada ensaio, retirando 1 mL do meio inoculado e transferindo-o para um tubo de ensaio com 9 mL de solução salina autoclavada, obtendo a concentração $10^{-1} \text{ UFCmL}^{-1}$. 1 mL desta solução era retirado e transferida para um tubo de ensaio com 9 mL de solução salina autoclavada, e obtivemos a concentração 10^{-2} e as diluições aconteceram até obtermos a concentração $10^{-9} \text{ UFCmL}^{-1}$. Transferimos 20 μL de cada uma das nove soluções para as placas de petri em meio YMA. Após o crescimento das colônias foram feitas as contagens em placa, segundo procedimento de Reasoner⁷⁷. Os resultados foram tratados para a obtenção do valor de unidades formadoras de colônia em 1 mL.

4.5.4 Influência da blenda QE1:2-M(II) no crescimento bacteriano

A partir dos ensaios da influência da concentração de metais no crescimento bacteriano, foram realizados mais sete experimentos diferentes que nos permitiram avaliar a capacidade de blenda como inoculante a partir do crescimento desses microrganismos. Em meios com deficiência de micronutrientes, as blendas com metais

adsorvidos foram aplicadas para liberação dos íons metálicos, conforme necessidade das bactérias.

- Inoculação da blenda no meio com concentração em excesso de 0,8 mL de solução “a”.
- Inoculação sem Cu(II) e sem a blenda.
- Inoculação sem Cu(II) e da blenda com cobre adsorvido.
- Inoculação sem Zn(II) e sem a blenda.
- Inoculação sem Zn(II) e da blenda com zinco adsorvido.
- Inoculação sem Cu(II) e Zn(II) e sem a adição da blenda.
- Inoculação sem Cu(II) e Zn(II) e com a adição da blenda com cobre e zinco adsorvido.

A partir da capacidade máxima de adsorção do material, as massas das blendas foram determinadas para que contivessem cobre e zinco de acordo com a quantidade ideal estipulada por Hoagland & Arnon⁷⁶ e de modo experimental, 30 mg da blenda QE1:2 foram adicionados nos ensaios I e II. Todos os biopolímeros utilizados nos experimentos foram esterelizados a seco na autoclave a 120°C por 20 minutos e posteriormente inoculadas ao meio YM juntamente com a bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899. O crescimento bacteriano foi medido através de tempos estipulados, 0, 1, 2, 4, 8, 16, 48 e 72 h. Após o tempo determinado, foram feitas as diluições seriadas, o emplacamento das bactérias e incubação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações

5.1.1 Determinação do grau de desacetilação (%GD) por titulação condutométrica

Para a síntese realizada, na titulação foram gastos um volume médio de 11,6 mL de solução de NaOH, com repetições (n=3), indicando que a quitosana preparada apresentou um grau de desacetilação de 93,2%.

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no FTIR foi utilizada para determinar a estrutura da quitosana *in natura* (QTS), do EPS e das blendas de QE. Os espectros vibracionais na região do infravermelho dos biopolímeros estão apresentados na Figura 12.

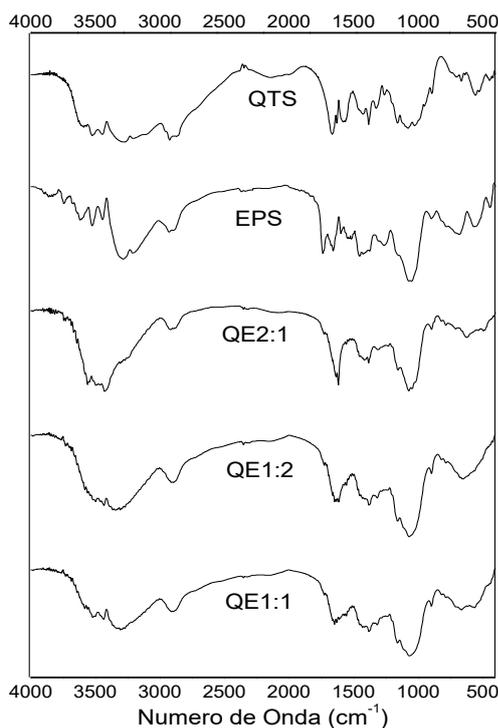


Figura 12. Espectro do infravermelho da QTS (quitosana *in natura*), EPS (exopolissacarídeo) e das blendas QE2:1, QE1:2 e QE1:1.

A quitosana geralmente mostra forte absorvância na região superior a 3000 cm⁻¹, oriunda dos estiramentos O–H, N–H (amida A) e das ligações inter-hidrogênio da estrutura³⁷. As vibrações entre 2924 - 2870 cm⁻¹ correspondem aos estiramentos

simétrico e antissimétrico da ligação C–H¹⁰. A presença do grupamento N-acetil na quitosana (-NH-C(=O)CH₃) é responsável pela presença dos modos vibracionais: amida I (ν C=O), em 1635 cm⁻¹; amida II (δ C-N-H; ν CN), em 1571 cm⁻¹, e amida III, composta pela sobreposição de vários modos vibracionais (ν CO; ν CN; δ CNH; δ OCN), na faixa 1382 - 1315 cm⁻¹.

Em adição, a quitosana apresenta o grupamento amina com o modo vibracional δ (NH₂), em 1627 cm⁻¹, a banda em 1422 cm⁻¹, devido à contribuição conjunta das vibrações –OH e –CH, o alongamento simétrico do C–O–C em 1163 cm⁻¹, e a vibração C–O em 1070 cm⁻¹ e 1020 cm⁻¹ ^{37,55,78}.

O EPS possui, além de açúcares, os ácidos orgânicos galacturônico e glucurônico. Portanto, em seu espectro vibracional é possível observar regiões características dos demais polissacarídeos, estando presentes os modos vibracionais: ν OH e ν NH (3450 - 3200 cm⁻¹), ν CH (2933 cm⁻¹), os da estrutura sacarídica (1194 - 890 cm⁻¹, C-C; C-O-C, etc), além das vibrações relativas ao grupamento carboxílico (ν C=O, 1738 cm⁻¹; ν OCO⁻_{antisym} 1522 cm⁻¹, ν OCO⁻_{sym} 1465 cm⁻¹. O modo vibracional em 1654 cm⁻¹, pode tentativamente ser atribuído a δ H₂O, considerando a capacidade deste material para absorção de água⁷⁹.

Diante das semelhanças entre os espectros dos precursores polissacarídeos, ainda que um apresente grupamentos amida e amina e outro carboxílico, os espectros vibracionais não permitem uma análise conclusiva da interação entre ambos, apesar da formação imediata do precipitado durante o procedimento de síntese. É possível, entretanto, perceber algumas alterações espectrais. De acordo com Horn⁸⁰, a formação das blendas se dá pela reação dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxílicos (1738 cm⁻¹) do EPS. A Figura 13 ilustra simplificada esta interação, indicando a formação do grupamento –NH₃⁺–OOC–.

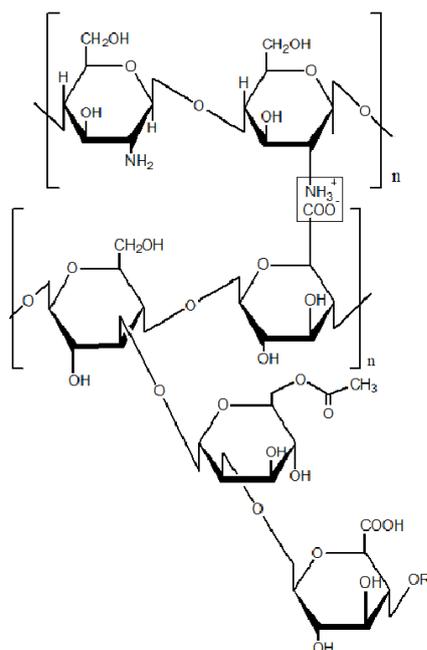


Figura 13. Ilustração da interação entre o grupo amino da quitosana com o grupo carboxílico do EPS que originou a blenda QE.

Com isso, é de se esperar alterações nos modos vibracionais dos grupos funcionais envolvidos. De fato, há uma expressiva diminuição da vibração $\nu\text{C}=\text{O}$ do EPS em 1738 cm^{-1} , o surgimento da banda em $1617\text{-}1645$ (conjugada com a atribuída a $\delta\text{H}_2\text{O}$ em 1654 cm^{-1}), bem como pequenos deslocamentos nos modos $\nu\text{OCO}^-_{\text{antisym}}$ e $\nu\text{OCO}^-_{\text{sym}}$. Os modos vibracionais que aparecem nas blendas, notadamente em 1617 cm^{-1} para a blenda QE2:1, 1627 cm^{-1} para a blenda QE1:2 e 1645 cm^{-1} para a blenda QE1:1, podem ser atribuídas à presença do grupamento amina nas blendas.

As atribuições aos modos vibracionais para a QTS, para o EPS e para as blendas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Transições vibracionais e respectivas atribuições para os biopolímeros

Biopolímero	Número de Onda (cm^{-1})							
	$\nu(\text{OH});$ $\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\text{H}_2\text{O})$	$\delta(\text{NH});$ $\nu(\text{CH})$	$\delta(\text{CH})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$
QTS	3620 – 3070	2924	1664	1627	–	1571	1422	1071
EPS	3450 – 3200	2933	1738	–	1654	1589	1459	1061
QE21	3563 – 3300	2915	1729	1618	–	1553	1378	1071
QE12	3600 – 3300	2895	1729	1627	–	1553	1378	1061
QE11	3590 – 3250	2895	1729	1644	–	1553	1377	1061

5.1.2 Solubilidade

Os resultados de solubilidades dos diferentes biopolímeros estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Solubilidade da quitosana (QTS), EPS e das blendas.

Biopolímero	g/100g		
	Ácido (pH 2,5)	Água (pH = 6,8)	Base (pH = 12,0)
QTS	0,40	0,00	0,00
EPS	0,25	0,38	0,20
QE1:1	<0,04	<0,04	<0,04
QE1:2	<0,04	<0,04	<0,04
QE2:1	<0,04	<0,04	<0,04

A quitosana apresenta-se insolúvel em água, e em meio alcalino¹⁴ devido à sua estrutura molecular e pKa (6,2-7,0). O motivo da solubilidade da quitosana somente em meio ácido é a protonação do grupamento amino, o qual favorece maior interação com o solvente.^{5,15,81}

O EPS é solúvel em água, como um colóide hidrofílico formando uma verdadeira solução,⁸² devido à quantidade de grupos hidrofílicos, como a hidroxila. Uma possível explicação à insolubilidade das blendas de QE é devido ao fato da modificação da quitosana com EPS acontecer pela interação dos grupos amino e carboxílico, indisponibilizando-o para a protonação e interação mais efetiva com o solvente.⁴ Este resultado, portanto, corrobora com a modificação da quitosana e formação das blendas.

5.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio (RMN-¹⁵N)

Para melhor compreender a natureza da interação e os sítios envolvidos na formação das blendas, foram coletados os espectros de ¹⁵N-RMN das amostras de quitosana (QTS) e das suas modificações (blendas QE1:2 e QE2:1). Por não apresentar compostos nitrogenados, o EPS não foi considerado nesta análise.

Os espectros de ¹⁵N-RMN para ambas as amostras estão apresentados na Figura 14.

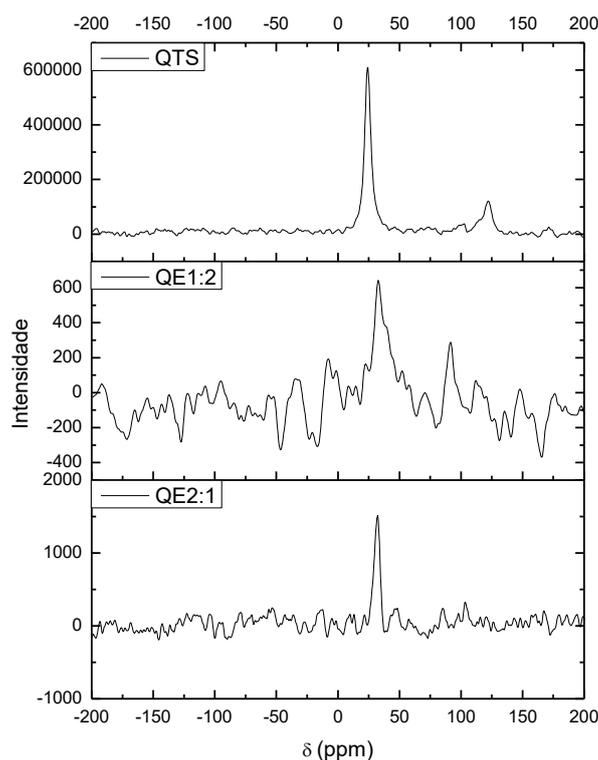


Figura 14. Espectros de ^{15}N -RMN das amostras de quitosana (QTS) e das blendas entre quitosana e exopolissacarídeo (QE1:2 e QE2:1).

É possível destacar para a amostra de QTS os dois picos correspondentes aos grupamentos amina ($-\text{NH}_2$), em $\delta = 24$ ppm, e acetamida ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$), em $\delta = 122$ ppm. Estes valores estão em concordância com outros reportados na literatura⁸³, considerando que são dependentes do ambiente em que se encontram, e que as quitosanas se distinguem não apenas em função do grau de desacetilação, mas também pelo grau de polimerização, de protonação, de distribuição dos grupamentos ao longo da cadeia polimérica, e em função da cristalinidade. Interessante observar também a diferença nas intensidades (áreas) dos picos, em evidência do elevado grau de desacetilação da quitosana.

Para as blendas QE1:2 e QE2:1 há, nitidamente, a redução das intensidades dos picos, confundindo-se com ruídos o pico da acetamida, o que pode ser indicativo do menor teor de quitosana na amostra. Entretanto, o deslocamento químico para o grupamento amina, agora em torno de 33 ppm, expressando ambiente químico diverso, é sugestivo da presença de átomos mais eletronegativos (deslocamento maiores)

desprotegendo o N, o que está em conformidade com a proposta de formação do QTS–NH₃⁺OOC–EPS.

5.1.4 Termogravimetria (TGA/DTA)

A Figura 15 apresenta as curvas de TG e de DTA obtidas para a quitosana e para as blendas.

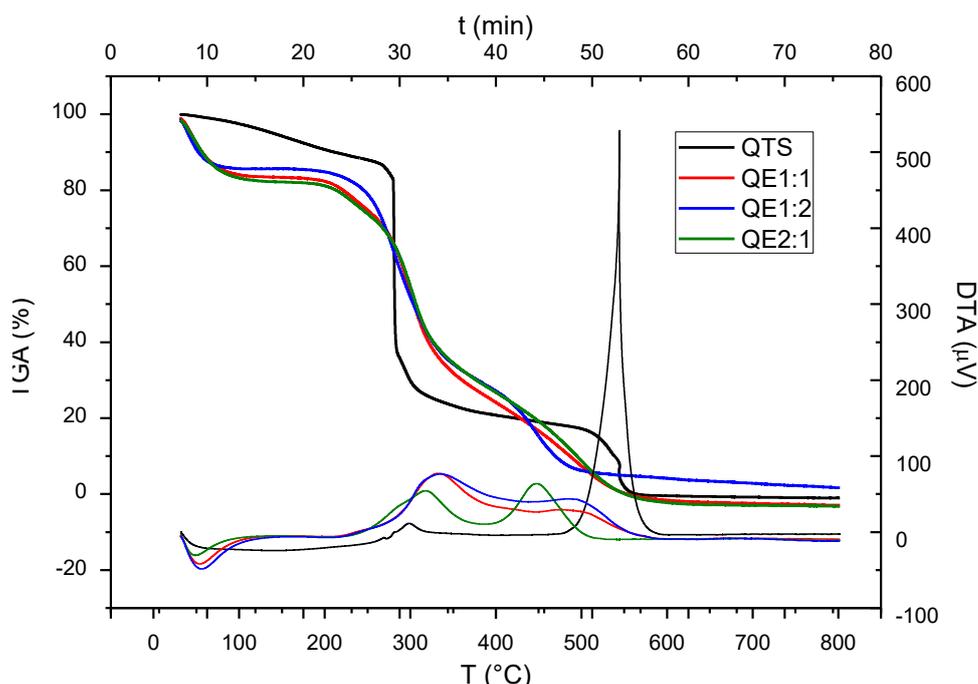


Figura 15. Curvas TGA – DTA simultâneas para QTS e as blendas QE1:1, QE1:2 e QE2:1. Taxa de aquecimento igual a 10 °C/min e uma atmosfera de ar sintético com uma vazão de 50 mL/min.

As curvas termogravimétricas foram obtidas sob condição de ar sintético. Assim é possível observar a queima do material carbonizado até a completeza, já próximo dos 600 °C, principalmente para as blendas.

Três eventos podem ser observados para todas as amostras. O primeiro estágio é correspondente à desidratação dos materiais, processo de natureza endotérmica. A quitosana, por ter menor conteúdo de água, perde menor massa nesta etapa (15 %) e necessita de um maior intervalo de temperatura: 33 – 280 °C. Para as blendas, observa-se que quanto maior a proporção do EPS, maior o conteúdo de água liberado (para todas, acima de 20 %), bem como menor o intervalo de temperatura para a definição deste evento (até 110 °C). EPS com grande quantidade de grupos carboxila é sempre

rico em conteúdo de umidade e a perda de peso nas blendas sugere que elas são ricas em conteúdo de carboxil. Isso ocorre porque quanto maior o conteúdo de carboxila maior a afinidade do polissacarídeo para interação com moléculas de água⁴¹ e também devido à presença de grupos $-OH$ ⁷⁹.

Seguida à desidratação, a próxima etapa é a decomposição dos biopolímeros, com geração de material carbonizado. A quitosana chega a registrar uma perda de massa em torno de 70% (280 – 544 °C), as blendas em torno de 80% (226 – 535 °C). Para esta etapa, a literatura costuma referir-se a processos complexos incluindo degradação dos anéis de sacarídeos e desintegração de cadeias de macromoléculas na amostra¹⁹.

O último estágio refere-se à queima dos materiais carbonizados⁸⁰.

Os resultados são, portanto, condizentes com a modificação da quitosana, indicando que as blendas formadas apresentam maior tendência para acúmulo de moléculas de água, bem como para sua termodisponibilidade, sendo estruturalmente estáveis até temperaturas superiores a 200 °C. Ambos resultados interessam para a aplicação das blendas em tecnologia de inoculantes: a capacidade que as mesmas apresentam para acumular e disponibilizar água, bem como a resistência às temperaturas de esterilização, que não ultrapassam a 150 °C.

5.1.5 Grau de Intumescimento (%GI)

Um dos fatores importantes a serem destacados no grau de intumescimento é a natureza das interações iônicas que ocorrem na formação do material modificado. Os grupos das blendas interagem bem com a água, uma interação maior do que a quitosana *in natura*, pois uma função importante do EPS é a retenção de água.¹⁸ A expansão das cadeias poliméricas das blendas devido à incorporação de água durante os primeiros momentos foi seguida por mudanças nas inclinações das curvas de absorção após os 5 minutos iniciais, chegando ao equilíbrio próximo dos 20 minutos de exposição à água. A Figura 16 apresenta o grau de intumescimento da quitosana *in natura* e das blendas.

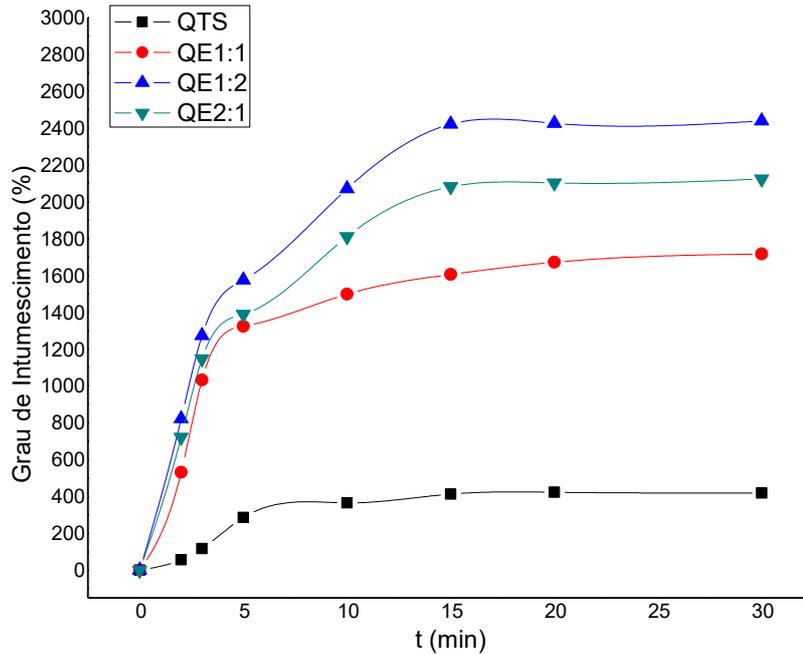


Figura 16. Percentagem do grau de intumescimento da quitosana in natura (QTS) e das suas modificações (QE1:1, QE1:2 e QE2:1). Massa de adsorvente = 25 mg; volume de água = 5 mL; T = 25°C.

O aumento da concentração do EPS promoveu um elevado grau de intumescimento, justificado pelo aumento de grupos hidrofílicos que estão presentes em grande quantidade no EPS, pois, o grau de intumescimento das blendas passou dos 1000%, o que não aconteceu com a quitosana, comprovando uma mudança estrutural em relação aos precursores. Pelas proporções de massa dos modificados, esperava-se que a blenda QE1:1 intumescesse mais que a blenda QE2:1. Veiga et al⁸⁴ afirma que em alguns casos, o EPS pode se dissolver parcialmente. Em todo caso, não se tem a proporção exata dos precursores nas blendas produzidas, não se permitindo uma correlação mais precisa entre a quantidade de EPS no material e o respectivo grau de intumescimento.

A inoculação de uma blenda com alta capacidade de retenção de água pode ser estratégica para aumentar a tolerância à seca, que é um dos principais estresses abióticos, pois a escassez de umidade nas plantas afeta a função estomática, o que reduz a proporção de CO₂/O₂ da folha, inibindo a fotossíntese com redução concomitante da produção de biomassa⁸⁵.

A Tabela 3 apresenta os valores do grau de intumescimento para alguns EPS encontrados na literatura. É observado que existem EPS que interagem muito mais com

água do que outros, portanto, uma modificação da quitosana por EPS pode aumentar ou diminuir a capacidade de uma blenda reter água, dependendo dos grupos funcionais que existem no EPS. Entretanto, contribuirá para sua não dissolução em meio aquoso.

Tabela 3. Grau de Intumescimento para EPS produzido por diversas bactérias

EPS produzido por	%GI (%)
<i>Rhizobium radiobacter</i> CAS	6819 ²
<i>Weissella confusa</i> AJ53	1090 ⁵
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> EPS113	513,6 ⁸
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ZW3	496 ⁷
<i>Pseudomonas putida</i> GAP-P45	37,9 ⁶

5.1.6 Potencial de carga zero (pH_{zpc})

As possíveis interações eletrostáticas e geração de cargas nas superfícies dos biopolímeros foram determinadas na faixa de pH de 1,0 a 14,0. De acordo com a Figura 17, o valor do pH_{zpc} da quitosana foi igual a 6,1 e que as funções do EPS agregados a estrutura da quitosana após a modificação aumentaram esse valor para 6,5 na blenda QE1:1; 6,3 na blenda QE1:2 e 6,6 na blenda QE2:1.

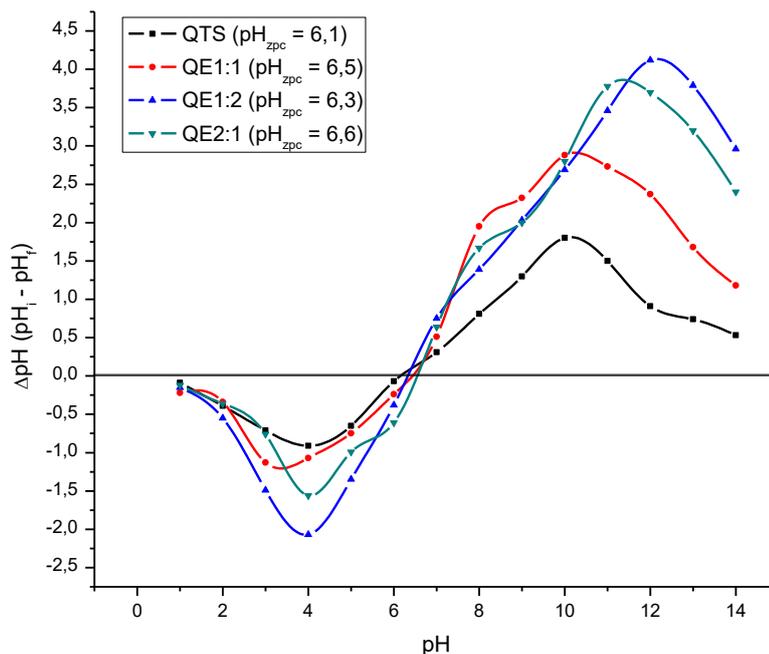


Figura 17. Potencial de carga zero ($pH_i - pH_f$) da quitosana e das blendas. $[KCl] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; $T = 25^\circ\text{C}$; rotação = 150 rpm; $t = 24 \text{ h}$.

Há grupos protonáveis na constituição dos materiais, resultando numa carga de superfície que varia com o pH.²⁶ Em pH's abaixo do valor do pH_{zpc} , as blendas estarão carregadas positivamente, visto que os íons H^+ saem da solução em direção aos sítios ativos das blendas. Entretanto, acima do valor referente ao pH_{zpc} , a carga em suas superfícies é negativa.²⁷ Por exemplo, para a blenda QE1:1 o pH inicial aumentou mais em relação a quitosana *in natura*, que pode ser explicado pelo aumento de grupos funcionais com a modificação pelo EPS.

5.2 Ensaios de adsorção

5.2.1 Efeito do pH

É evidente que o pH, como esperado, desempenha um papel importante na determinação da acumulação de metais; mais especificamente, a acumulação geralmente aumenta com aumento do pH⁸⁶. O efeito do pH na adsorção dos metais Cu(II) e Zn(II) pode ser visualizado a partir dos gráficos das Figuras 18 e 19, respectivamente.

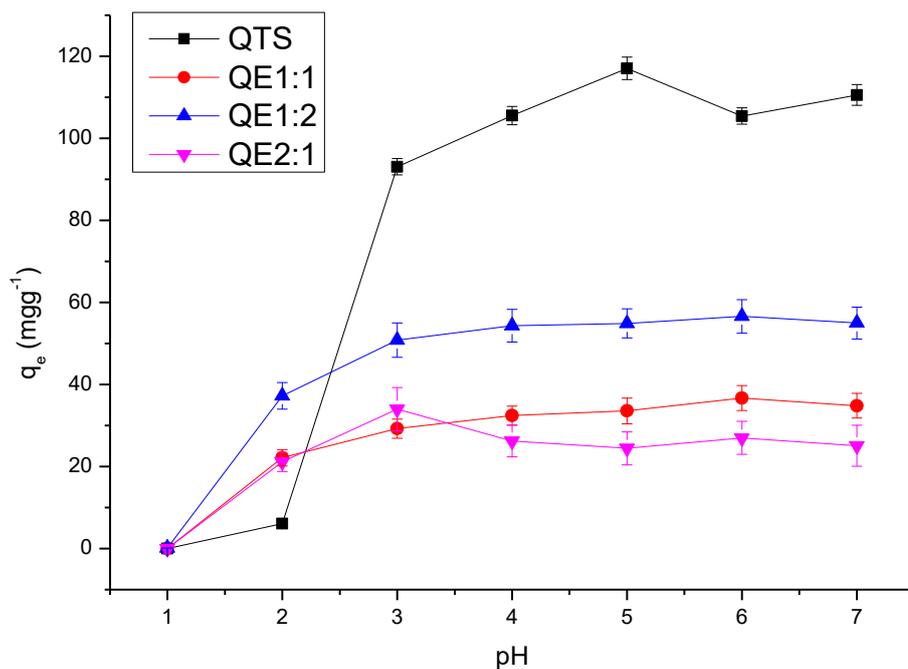


Figura 18. Efeito do pH na remoção de íons Cu(II) a partir de soluções aquosas na presença dos biopolímeros quitosana (QTS) e as blends modificadas com EPS (QE2:1, QE1:2 e QE1:2). [Cu(II)] = 100 mgL⁻¹; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; T = 25°C; rotação = 150 rpm; t = 24 h.

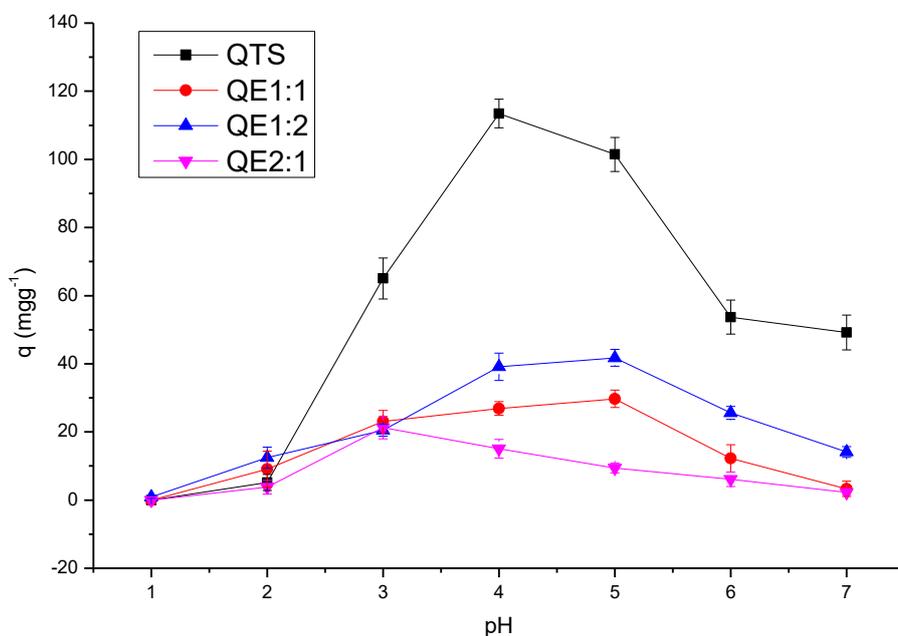


Figura 19. Efeito do pH na remoção de íons Zn(II) a partir de soluções aquosas na presença dos biopolímeros quitosana (QTS) e as blends modificadas com EPS (QE2:1, QE1:2 e QE1:2).

QE1:2 e QE1:2). $[Zn(II)] = 100 \text{ mgL}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; $T = 25^\circ\text{C}$; rotação = 150 rpm; $t = 24 \text{ h}$.

Geralmente em $\text{pH} > 7$ pode haver a formação de hidróxidos desses cátions. Apesar da quitosana ser solúvel em $\text{pH} \leq 5$ houve uma taxa elevada de adsorção dos metais no $\text{pH} = 3$, mesmo que uma parte da massa tenha solubilizado. Observou-se que em pH's mais ácidos, houve as menores taxas de remoção dos metais. Este fato pode ser atribuído a maior competição pelos sítios ativos dos adsorventes, em virtude da grande presença dos íons H^+ .¹²

Tanto na adsorção do Cu(II) quanto do Zn(II) , devido a existência de grupos amino livres, a quitosana obteve as maiores quantidades de metais removidos, seguida pela blenda QE1:2. Entre as blendas, por ser a que mais removeu metais e levando em consideração que o meio do inoculante é ácido ($3,5 < \text{pH} < 4,5$), tendendo a menores valores de pH em função do aumento da produção bacteriana, a quitosana *in natura* não pode ser indicada como participante da tecnologia de inoculante. A blenda QE1:2, portanto, em relação às demais, apresentou maior potencialidade inoculante em relação aos cátions investigados.

Levando em consideração os valores de pH_{zpc} da blenda que foi 6,3, a superfície dos adsorventes encontrava-se carregada positivamente na maior parte dos ensaios de pH, o que dificulta a adsorção de espécies catiônicas, portanto, era preferível trabalhar com esta blenda em meios onde o pH fosse maior que o valor do ponto de carga zero, mas o limite de precipitação do Cu(II) e Zn(II) precisou ser levado em consideração.

Segundo Tourney et al⁸⁷ há duas explicações possíveis para o fraco efeito do EPS na ligação de metais. Primeiro, sabe-se que a produção de EPS induz um grau considerável de células agregadas em suspensão, o que provavelmente reduzirá a área da superfície disponível para adsorção de metais. Segundo, o lançamento de grandes quantidades de carbono orgânico dissolvido da camada de EPS pode complexar o metal na solução, em competição com as paredes celulares.

Para a sorção do Cu(II) pela blenda, os pH's entre 3 e 7 apresentaram valores muito próximos, tendo o $\text{pH} = 6$ pouco superior. Para a sorção de Zn(II) , o efeito do pH foi mais evidente, onde o melhor desempenho foi visto entre os pH's 4 e 5. Portanto, o pH escolhido para os próximos ensaios de adsorção foi pH 5.

É possível observar pequenas alterações nas bandas de absorção dos grupos combinados de $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$, após adsorção de Cu(II) e Zn(II) , como o pico de 3497 a

3330 cm^{-1} da blenda de QE1:2 que mudou para 3525 a 3359 cm^{-1} após a adsorção de Cu(II), para 3516 a 3359 cm^{-1} após a adsorção de Zn(II) e para 3525 a 3350 cm^{-1} após a adsorção de Cu(II) e Zn(II) simultaneamente¹².

Segundo AbdElhady³⁸, o pico fica mais amplo e mais forte por conta da intensa interação entre esses grupos e os metais. Outra mudança importante no espectro é a do pico de $-\text{NH}_2$ que mudou de 1627 cm^{-1} da blenda QE1:2 para 1645 cm^{-1} após a adsorção de Cu(II), 1635 cm^{-1} após a adsorção do Zn(II) e 1654 cm^{-1} após a adsorção simultânea de Cu(II) e Zn(II). Essas mudanças no comprimento de onda mostraram que houve um processo de ligação de metal ocorrendo na superfície dos adsorventes²⁵.

O pico em 645 cm^{-1} da blenda QE1:2 que alonga para aproximadamente 431 cm^{-1} após a adsorção de Cu(II), 625 cm^{-1} após a adsorção do Zn(II) e 551 cm^{-1} após a adsorção simultânea de Cu(II) e Zn(II) porque ocorreu o efeito de carregamento do metal³⁶, ou seja, a fixação do grupo amida e modo de alongamento dos metais, pois há uma forte interação de Cu(II) e Zn(II) aos grupos amida das moléculas de quitosana³⁸. A Figura 20 apresenta o adsorvente QE1:2 após adsorção com íons Cu(II) e Zn(II).

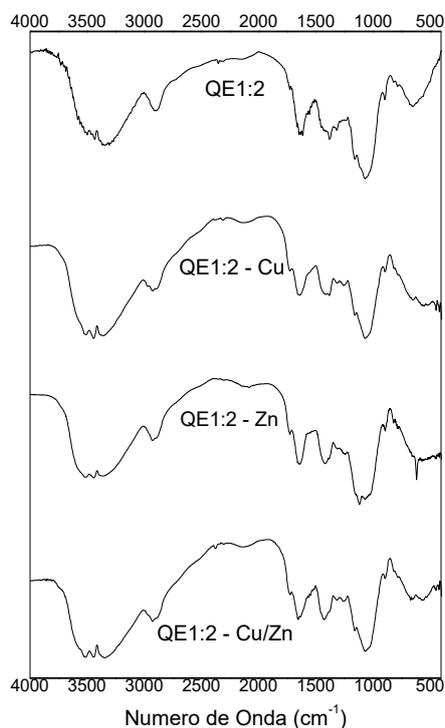


Figura 20. Espectros do infravermelho da blenda escolhida para a aplicação QE1:2 antes e depois dos ensaios de adsorção de Cu(II) e Zn(II).

5.2.2 Estudos de competição dos íons Cu (II) e Zn (II)

Cinco ensaios foram realizados para quantificar a adsorção simultânea dos íons metálicos em solução. A Tabela 3 apresenta as quantidades removidas de Cu(II) e Zn(II) presentes em solução, indicando uma pequena preferência pelos íons Zn(II).

Tabela 4. Quantidade removida de íons Cu(II) e Zn(II) simultaneamente. [Cu(II) + Zn(II)] = 50 mgL⁻¹; volume = 30 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH = 5,0; t = 480 min.; T = 25°C; rotação = 150 rpm

Íon metálico	q (mgg ⁻¹)
Cu(II)	28,93 ± 2,50 (78%)
Zn(II)	31,13 ± 1,02 (83%)

5.2.3 Cinética de adsorção

Os ensaios cinéticos foram realizados com o intuito de determinar o tempo necessário para que todos os sítios ativos disponíveis da blenda fossem saturados pelos metais. Os resultados necessários para determinar o tempo de equilíbrio de adsorção estão descritos na Figura 21.

Observa-se que a absorção do Cu(II) o equilíbrio de adsorção acontece em torno dos 360 min. e para o Zn(II), o equilíbrio se dá próximo de 480 min, como também mostram a aplicação dos modelos linearizados de pseudo-primeira ordem e de segunda ordem, respectivamente.

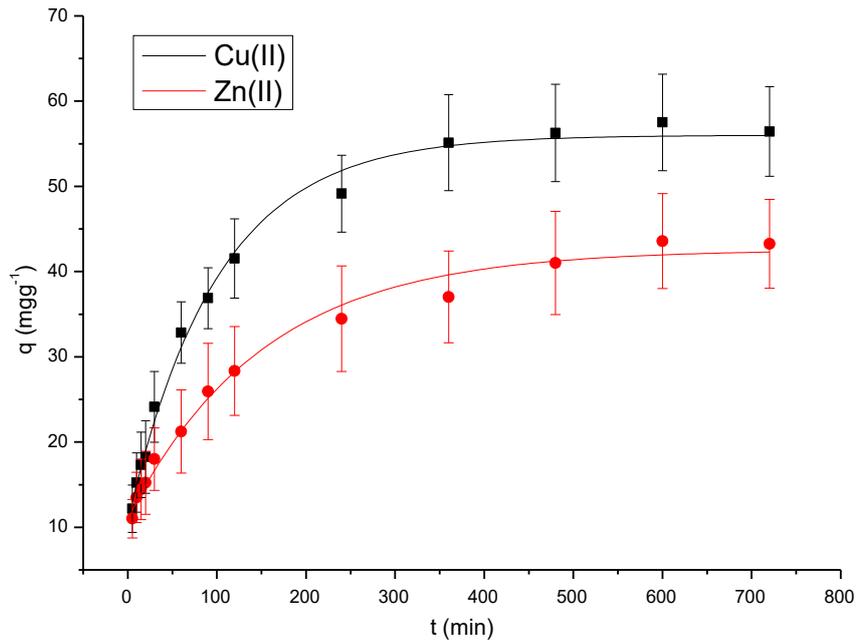


Figura 21. Estudo cinético da adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) pela blenda QE1:2. ($[Cu(II)] = [Zn(II)] = 50 \text{ mgL}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH para o Cu(II) = 6,0; pH para o Zn(II) = 5,0; $T = 25^\circ\text{C}$; rotação = 150 rpm).

As Figuras 22 e 23 apresentam a aplicação dos modelos linearizados de pseudo-primeira ordem e segunda-ordem para os ensaios de adsorção de Cu(II) e Zn(II).

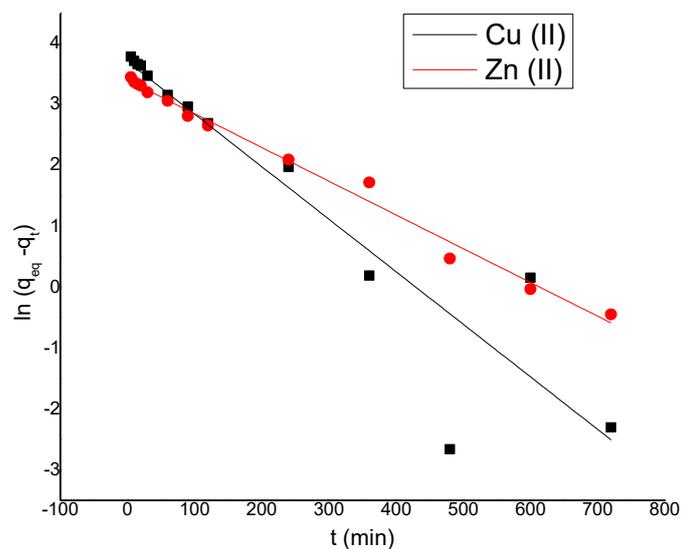


Figura 22. Gráficos cinéticos de pseudo-primeira ordem $[\ln(q_{eq} - q_t) \times t]$ para os processos de remoção de íons Cu(II) e Zn(II).

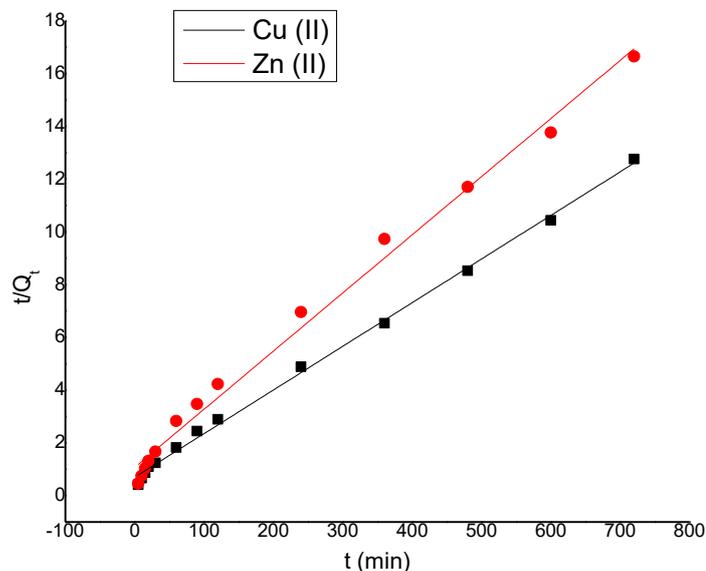


Figura 23. Gráficos cinéticos de segunda ordem $[(t/q_t) \times t]$ para os processos de remoção de íons Cu(II) e Zn(II).

Para investigar o mecanismo de adsorção e suas possíveis etapas de controle de taxa que incluem transporte de massa e processos de reação química, modelos cinéticos foram explorados para analisar os dados experimentais. A Tabela 5 apresenta os parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos, onde os estudos cinéticos revelaram que a equação de segunda-ordem forneceu os melhores ajustes dos dados experimentais.

Tabela 5. Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo de pseudo-primeira ordem e segunda ordem na adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) em solução aquosa

PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM				
Metal	q_{exp} (mgg^{-1})	$q_{teórico}$ (mgg^{-1})	k_1 (min^{-1})	R^2
Cu(II)	56,34	48,59	$8,63 \times 10^{-3}$	0,8625
Zn(II)	42,61	42,15	$5,54 \times 10^{-3}$	0,9892
SEGUNDA ORDEM				
Metal	q_{exp} (mgg^{-1})	$q_{teórico}$ (mgg^{-1})	k_2 ($gmg^{-1}min^{-1}$)	R^2
Cu(II)	56,34	60,27	$3,93 \times 10^{-4}$	0,9975

Zn(II)	42,61	44,96	$4,54 \times 10^{-4}$	0,9914
--------	-------	-------	-----------------------	--------

Segundo Vieira¹⁵, o modelo de segunda ordem é bem ajustado a um experimento quando a concentração inicial do adsorvato não é excessivamente alta. Portanto, pode-se afirmar que a cinética de adsorção para estes experimentos depende da quantidade de sítios ativos disponíveis na superfície do adsorvente e da concentração inicial do metal em solução, ou seja, confirmando que o controle do mecanismo de velocidade é a adsorção química (reação química), envolvendo forças de valência por meio do compartilhamento ou troca de elétrons entre os adsorventes e os íons metálicos⁶⁹. O mecanismo indicou que a velocidade de adsorção dos metais pelo adsorvente foi dependente da concentração dos íons no adsorvente e a concentração destes adsorvidos no equilíbrio.

A Figura 24 mostra a linearidade múltipla no gráfico da capacidade de adsorção versus raiz quadrada do tempo, indicando que a difusão em várias etapas ocorreu durante o processo de adsorção.

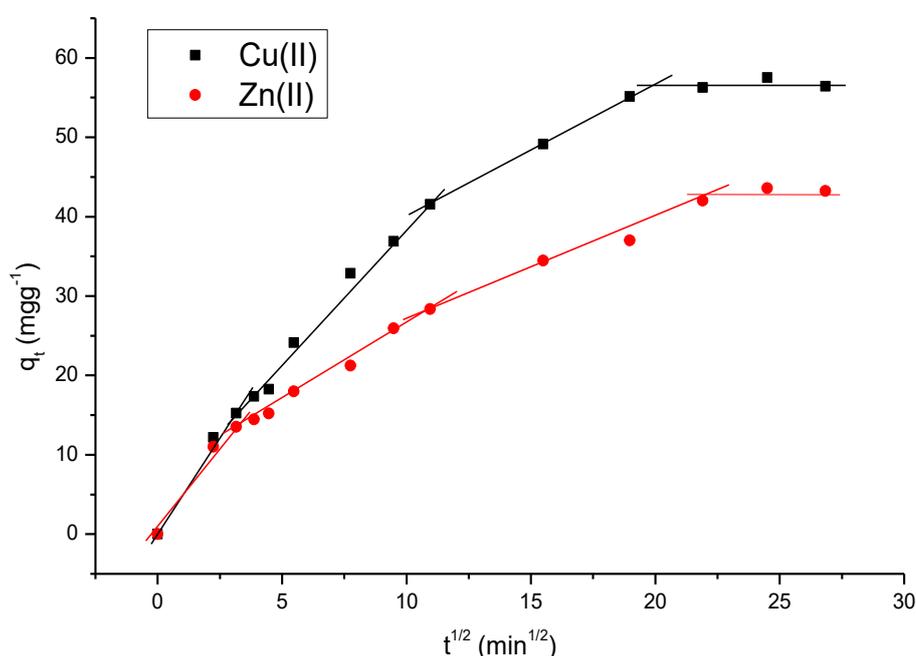


Figura 24. Gráficos cinéticos da difusão intra-partícula ($q_t \times t^{1/2}$) para os processos de remoção de íons Cu(II) e Zn(II).

A plotagem pode apresentar multilinearidade, indicando que três etapas ocorrem. O primeiro porção (estágio 1) atribuída à difusão do adsorvato através da solução para a

superfície externa do adsorvente. A segunda parte (estágio 2 e 3) descreve a adsorção gradual, à difusão de metais em macroporos e regiões⁶⁷, onde os locais ativos eram mais difíceis de alcançar pelos metais devido à interação entre os grupos de superfície⁷⁵. A quarta porção linear (estágio 3) é seguida de um platô (estágio 4), atribuído ao equilíbrio final etapa.

A Tabela 6 apresenta o resumo dos parâmetros calculados a partir do modelo de difusão intrapartícula, relacionado à adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) pela blenda QE1:2.

Tabela 6. Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo de difusão intrapartícula na adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) em solução aquosa

Difusão	Parâmetros					
	Cu(II)			Zn(II)		
Intrapartícula	k_d ($\text{mgg}^{-1}\text{h}^{-1/2}$)	C (mgg^{-1})	R^2	k_d ($\text{mgg}^{-1}\text{h}^{-1/2}$)	C (mgg^{-1})	R^2
1ª Etapa	4,9380	0,2580	0,9811	4,3900	0,2704	0,9740
2ª Etapa	3,4901	4,0822	0,9877	1,9503	6,9432	0,9920
3ª Etapa	1,6937	22,9606	0,9999	1,1950	15,3480	0,9750
4ª Etapa	0,0424	55,7060	-0,9520	0,2581	36,6460	0,1794

Os valores k_d são determinados a partir da inclinação do gráfico da Figura 14. Os valores de interceptação, C nos dão uma ideia sobre a espessura da camada limite, ou seja, quanto maior a interceptação, maior é o efeito da camada limite⁶⁷. Em certo limite de tempo (até 360 minutos para o Cu(II) e 480 minutos para o Zn(II)), as curvas revelam uma característica linear que a difusão intrapartículas controla o processo de adsorção.

As taxas de difusão do filme foram maiores para a adsorção do Cu(II) quando comparados aos do Zn(II), indicando os processos de adsorção mais rápidos para QE1:2–Cu(II). Nesse caso, as terceiras inclinações para Cu(II) e Zn(II) eram quase paralelas, e as constantes de taxa calculadas a partir das terceiras inclinações eram mais altas para Cu(II) do que para Zn(II) e as últimas constantes da taxa para Cu(II) e Zn(II) foram próximas de zero quando a adsorção alcançou o equilíbrio⁸⁸.

5.2.4 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção são obtidas de forma experimental e ajustadas a modelos não lineares de Langmuir, Freundlich e Sips, os quais fornecem parâmetros para o melhor entendimento dos processos de adsorção. As Figuras 25 e 26 apresentam as isotermas de concentração de Cu(II) e Zn(II) ajustadas aos modelos não-linearizados de Langmuir, Freundlich e Sips, respectivamente.

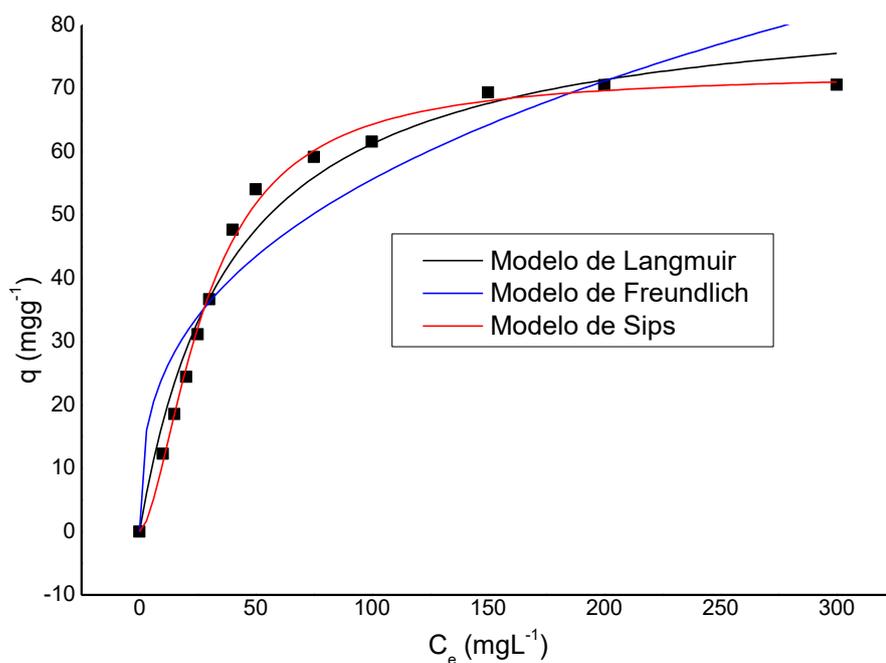


Figura 25. Isoterma de adsorção dos íons Cu(II). ($[Cu(II)] = 10 - 300 \text{ mgL}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH para o Cu(II) = 5,0; $T = 25^\circ\text{C}$; rotação = 150 rpm).

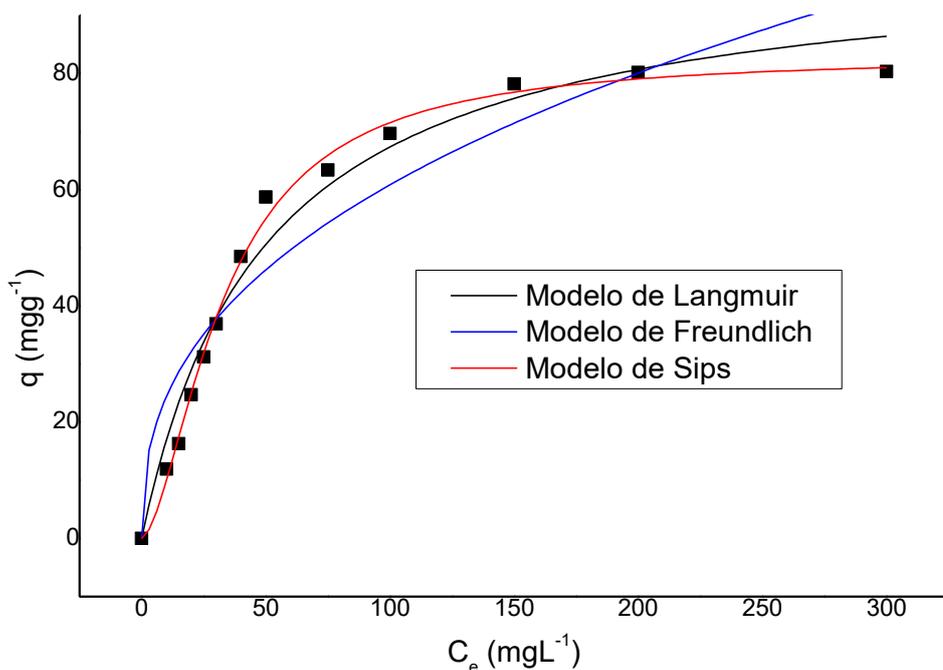


Figura 26. Isoterma de adsorção dos íons Zn(II). ($[Zn(II)] = 10 - 300 \text{ mgL}^{-1}$; volume = 25 mL; massa de adsorvente = 20 mg; pH para o Zn(II) = 5,0; $T = 25^\circ\text{C}$; rotação = 150 rpm).

A Tabela 7 apresenta os parâmetros obtidos a partir da aplicação dos modelos isotérmicos que permitem interpretar a adsorção dos metais pelos adsorventes utilizados.

Tabela 7. Parâmetros das isotermas de adsorção dos íons Cu(II) e Zn(II) obtidos pelos ajustes aos modelos não linearizados de Langmuir e Freundlich e Sips.

PARÂMETROS	ÍON METÁLICO	
	Cu(II)	Zn(II)
$q_{\text{exp.}} (\text{mgg}^{-1})$	70,55	80,89
LANGMUIR NÃO LINEAR		
$q_{\text{máx}} (\text{mgg}^{-1})$	85,54	100,65
$K_L (\text{Lg}^{-1})$	0,0252	0,0202
R_L	0,317	0,329
R^2	0,9727	0,9722

Continuação da Tabela 6.

FREUDLICH NÃO LINEAR		
q_{máx} (mgg⁻¹)	135,91	189,46
K_F (L.mgg⁻¹)	10,810	9,814
n	2,811	2,524
R²	0,8813	0,8477
SIPS NÃO LINEAR		
q_{máx} (mgg⁻¹)	72,51	83,12
K_s	0,0039	0,0030
n_s	1,652	1,656
R²	0,9956	0,9955

O valor R_L obtido tanto para o Cu(II) quanto para o Zn(II) é maior do que zero e menor do que a unidade indica a adsorção favorável de ambos os metais pela blenda QE1:2, além dos valores de R^2 que são maiores que 0,800⁶⁸. Isso significa que as isotermas de equilíbrio poderiam ser bem descritas pelo modelo de Langmuir, e o processo de adsorção é adsorção em monocamada em uma superfície com número finito de locais idênticos, que são distribuídos homogeneamente sobre a superfície adsorvente⁶⁹, mas, apesar dos altos valores de R^2 (Tabela 5), o modelo de Langmuir não podia ser suficientemente representativo para simular equilíbrio de adsorção de um componente de Cu(II) e Zn(II) em QE1:2, pois as capacidades de adsorção máxima estimada não correspondem aos valores experimentais.

Como visto na Tabela 5, os valores de n maiores do que um indica adsorções heterogêneas. O modelo de Freundlich não se ajustou bem aos dados experimentais com coeficientes de correlação mais baixos que o do modelo de Langmuir. As Figuras 13 e 14 ilustram que o gráfico de Freundlich não apresenta uma saturação máxima em alta concentração aquosa, enquanto dados experimentais mostram um platô⁸⁸.

Tudo isso sugere que o modelo de Freundlich não poderia representar o equilíbrio de adsorção de um componente de Cu(II) e Zn(II) em QE1:2. Os coeficientes de correlação de regressão foram maiores que 0,800⁶⁸, no entanto, a capacidade máxima de sorção calculada é muito maior que as quantidades experimentais adsorvidas em equilíbrio, correspondentes ao platô das isotermas de sorção.

O comportamento isotérmico de Sips é o mesmo da equação de Freundlich, com exceção de se aproximar de uma capacidade de adsorção constante quando a concentração é suficientemente alta. O parâmetro de heterogeneidade (n_s) na Tabela 5 fornece suporte para a existência de vários locais de sorção ($n_s \neq 1$) dentro da estrutura da blenda. Assim, condições sintéticas que empregam proporções variáveis de peso de polissacarídeos (QE) podem resultar em blendas com heterogeneidade variável ($n_s \neq 1$). Além disso, os valores de R^2 em Sips foram maiores e mais próximos da unidade do que em Langmuir e Freundlich, confirmando esse modelo como melhor ajuste.

5.2.5 Ensaios de dessorção

Os estudos de dessorção são importantes para reuso ou funções carreadoras dos adsorventes. Três tipos de soluções, com diferentes concentrações, serviram como eluentes para uma possível dessorção. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Percentagem de dessorção dos íons Cu(II) e Zn(II) da blenda QE1:2–M(II). Volume de eluente = 50 mL; massa de adsorvente = 20 mg; $t = 180$ min; $T = 25^\circ\text{C}$; rotação = 150 rpm

Eluente	$[\text{H}^+]$ (molL ⁻¹)	Dessorção (%)	
		Cu(II)	Zn(II)
H ₂ O	10 ⁻⁷	0,4	0,3
HNO ₃	0,1	60,7	57,1
HNO ₃	1	62,5	61,8
HCl	0,1	57,8	55,1
HCl	1	64,3	59,2

Para a dessorção do Cu(II) o melhor eluente foi a solução de HCl 1 molL⁻¹ (64,3%), seguido do HNO₃ 1 molL⁻¹ (62,5%). Na dessorção do Zn(II) a solução de HNO₃ 1 molL⁻¹ (61,8%) obteve melhor desempenho, seguido do HCl 1 molL⁻¹ (59,2%).

5.2.6 Aplicação das blendas como inoculante

5.2.6.1 Influência da concentração de micronutrientes no crescimento bacteriano

A adsorção de íons metálicos aquosos nas superfícies celulares de bactérias é um processo significativo em muitos contextos, mas apesar de vários estudos recentes

investigando a complexação de metais em superfícies bacterianas, os mecanismos ainda não são satisfatoriamente explicados⁸⁷.

A *Rhizobium tropici* CIAT 899 não foi altamente sensível quando cultivada com excesso de micronutrientes, pois havia células viáveis nas concentrações mais elevadas em 72 h de crescimento. Esse fato pode estar relacionado à sua alta tolerância a estresses ambientais, como alta temperatura, acidez e salinidade³¹. A influência do aumento da concentração de micronutrientes no crescimento bacteriano da *Rhizobium tropici* CIAT 899 está apresentada na Figura 27, indicando a concentração ótima de produção e as concentrações que minimizaram as colônias.

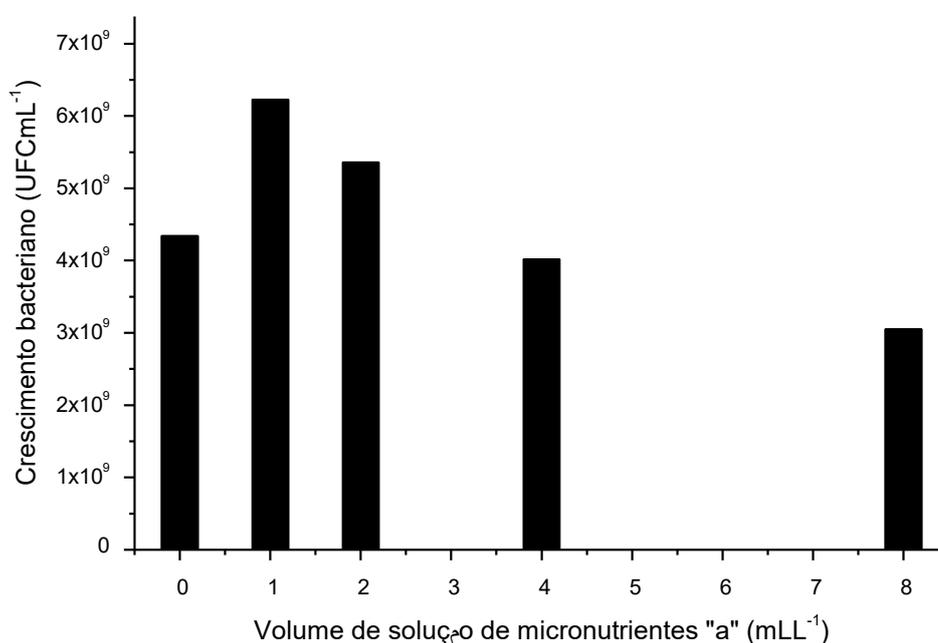


Figura 27. Influência do crescimento bacteriano pelo aumento da concentração de íons *Cu(II)* e *Zn(II)* após 72h de crescimento. 1 mLL⁻¹ dessa solução corresponde a 0,08 gL⁻¹ de *Cu(II)* e 0,22 gL⁻¹ de *Zn(II)*.

Embora a tolerância a metais da *Rhizobium* esteja associada à cápsula polissacarídica ao redor das células, que é responsável pela formação de biofilmes, essa bactéria não possui tal estrutura tão densa, portanto, não retém tanto os metais, favorecendo a absorção⁸⁹. Além disso, o crescimento desse microrganismo diminui o pH do meio, que em ambientes com excesso de micronutrientes, aumenta a disponibilidade e toxicidade dos metais, dificultando o desenvolvimento bacteriano.

A adição de 1 mL de solução “a” e de Fe-EDTA por litro de meio YM possibilitou o aumento do crescimento da *Rhizobium tropici* CIAT 899, chegando a pouco mais de 6 bilhões de UFCmL⁻¹. A adição de 4 mL⁻¹ e 8 mL⁻¹ reduziu aproximadamente 4 e 3 bilhões de UFCmL⁻¹, respectivamente. Metais em quantidades vestigiais são essenciais para o desenvolvimento celular. Em quantidades maiores, eles interferem na síntese de ácidos nucleicos⁹⁰, que constituem os genes, responsáveis pelo armazenamento, transmissão e tradução das informações genéticas.

5.2.6.2 Influência da blenda QE1:2-M(II) no crescimento bacteriano

Conforme descrito no item 4.5.2, a *Rhizobium tropici* necessita de 80 mg de Cu(II) e 220 mg de Zn(II) para cada 1 L do meio YM. Pelos dos resultados obtidos com os estudos das isotermas de adsorção, 1g da blenda QE1:2 adsorve 70,55 mg e 80,89 mg de íons Cu(II) e Zn(II), respectivamente. Portanto, determinou-se para cada ensaio com as blendas a quantidade de massa equivalente a aproximadamente 1,13 g de QE1:2-Cu(II) e 2,72 g de QE1:2-Zn(II) por litro de meio de cultura.

A Figura 28 apresenta os resultados do crescimento bacteriano dos ensaios E1 (condições padrões, segundo Hoagland & Arnon⁷⁶), E2 (inoculação com excesso de micronutrientes, nesse caso, 8 mL de solução “a” e solução Fe-EDTA por litro de meio YM) e E3 (a mesma concentração do meio E2 com a adição da blenda QE1:2 livre de qualquer metal adsorvido).

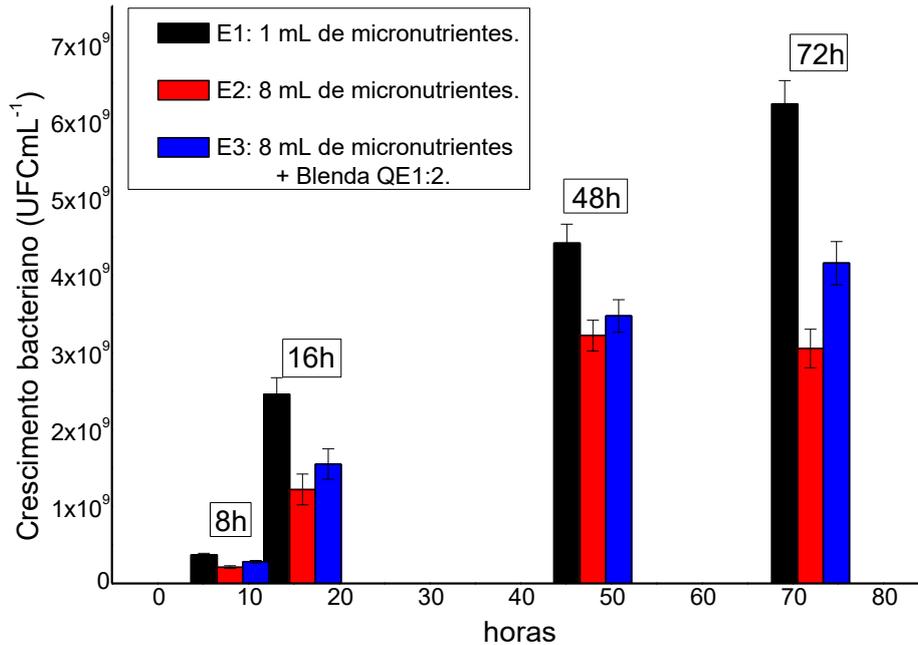


Figura 28. Influência do crescimento bacteriano em função do tempo pelo aumento da concentração de micronutrientes e adição da blenda QE1:2. ([Cu(II) e Zn(II)] = 1 e 8 mL⁻¹ de solução de micronutrientes “a”; volume de meio YM = 100 mL; massa da blenda QE1:2 = 30 mg; T = 25°C; rotação = 110 rpm).

A Figura 18 mostra um crescimento muito parecido da *Rhizobium tropici* nos ensaios E2 e E3 até as 48 h de experimento, mas sempre o E3 apresentando um maior número de colônias em relação a E2. Às 8 h E2 apresentou 2,11x10⁸ UFCmL⁻¹ e E3 2,83x10⁸ UFCmL⁻¹. Já E1 apresentou 3,72x10⁸ UFCmL⁻¹. A partir das 16 h ficou mais evidente a influência do meio no crescimento bacteriano, onde o excesso de micronutriente conseguiu diminuir as colônias bacterianas. Nesse horário E1 apresentou 2,46x10⁹ UFCmL⁻¹, E2 1,22x10⁹ UFCmL⁻¹ e E3 1,55x10⁹ UFCmL⁻¹.

Após 48 h, a diferença da quantidade de colônias no E2 e E3 ainda não era significativa, e havia um crescimento linear em todos os ensaios, E1 com 4,42x10⁹ UFCmL⁻¹, E2 com 3,22x10⁹ UFCmL⁻¹ e E3 com 3,48x10⁹ UFCmL⁻¹, mas, no último estágio dos ensaios, após as 72 h, E1 aumentou para 6,23x10⁹ UFCmL⁻¹, E2 diminuiu para 3,05x10⁹ UFCmL⁻¹ e E3 aumentou para 4,16x10⁹ UFCmL⁻¹ destacando o rápido aumento da *Rhizobium tropici* CIAT 899 nas melhores condições e comprovando como a blenda QE1:2 foi capaz de favorecer o crescimento bacteriano, tanto adsorvendo micronutrientes como também podendo servir como fonte de carbono por conta da sua composição.

A Figura 29 apresenta os resultados do crescimento bacteriano dos ensaios E1 (inoculação normal, segundo Hoagland & Arnon⁷⁶), E4 (inoculação sem os íons de Cu(II)), E5 (inoculação sem os íons Cu(II) mais a blenda QE1:2-Cu(II)), E6 (inoculação sem os íons Zn(II)), E7 (inoculação sem os íons Zn(II) mais a blenda QE1:2-Zn(II)), E8 (inoculação sem os íons Cu(II) e sem íons Zn(II)) e E9 (inoculação sem os íons Cu(II) e sem os íons Zn(II) mais a blenda QE1:2-Cu(II) e a blenda QE1:2-Zn(II)).

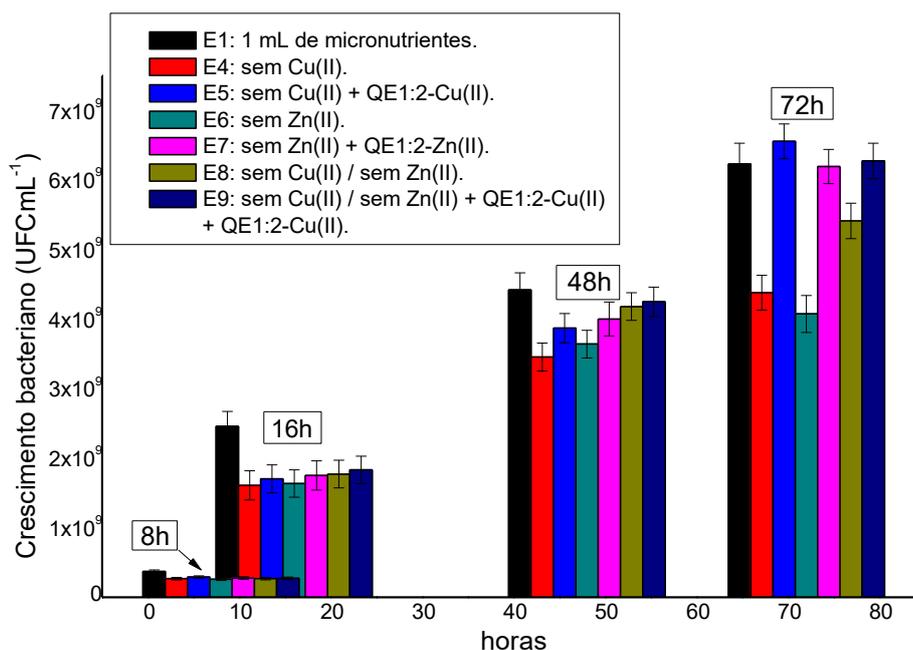


Figura 29. Influência do crescimento bacteriano em função do tempo em diferentes meio de concentração de micronutrientes e adição das blenda QE1:2-Cu(II) e QE1:2-Zn(II). (volume de meio YM = 100 mL; massa da blenda QE1:2-Cu(II) = 0,134 mg; massa da blenda QE1:2-Zn(II) = 0,272 mg; T = 25°C; rotação = 110 rpm).

A Figura 19 permitiu analisarmos melhor a necessidade de micronutrientes que a *Rhizobium tropici* CIAT 899 tem. Nos ensaios que houve a falta de um ou mais íons de micronutrientes, o crescimento da bactéria foi considerado satisfatório após as 72h, com crescimento na faixa de $4,38 \times 10^9$ UFCmL⁻¹ no E4, $4,07 \times 10^9$ UFCmL⁻¹ no E6 e $5,41 \times 10^9$ UFCmL⁻¹ no E8, mas comparado aos outros ensaios, a diferença fica mais evidente.

Nos ensaios que tiveram as blendas de QE1:2 com metais adsorvidos substituindo os íons completamente disponíveis, os resultados obtidos foram próximos da inoculação convencional, de acordo com Hoagland & Arnon⁷⁶.

A Tabela 9 apresenta o resmuno do crescimento nos ensaios com a adição das blendas após as 16 h, 48 h e 72 h.

Tabela 9. Crescimento bacteriano no ensaio com a inoculação convencional (E1) e os ensaios com a adição das blendas QE1:2-Cu(II) e QE1:2-Zn(II).

Tempo (h)	Crescimento bacteriano (UFCmL ⁻¹) x 10 ⁹			
	E1	E5	E7	E9
16	2,46	1,71	1,75	1,83
48	4,42	3,87	4,00	4,25
72	6,23	6,56	6,19	6,28

No ensaio E1, as bactérias inoculadas no meio entraram em contato com os íons metálicos que estavam livres em solução. Nos ensaios E5, E7 e E9, as bactérias inoculadas não tinham contato total com os íons de cobre e zinco, pois ambos estavam adsorvidos na blenda, o que pode explicar um lento crescimento dos microrganismos nesses ensaios, evidenciado pelo fato de que o crescimento bacteriano no ensaio E1 sempre foi maior do que os demais até as 48 h.

Mas, no decorrer dos ensaios, a dessorção gradativa permitiu que os íons fossem disponibilizados em solução à medida que as bactérias cresciam, minimizando os possíveis efeitos deletérios que o cobre e o zinco poderiam oferecer as bactérias, comprovado pela proximidade dos valores obtidos das unidades formadoras de colônias quando o experimento atingiu as 72 h.

Apesar disso, os resultados mostraram que não houve grande influência na taxa de crescimento da *Rhizobium tropici* CIAT 899 quando inoculadas com a blenda QE1:2-Cu(II), ou QE1:2-Zn(II), ou com ambas, até as 72 h, pois, os valores de unidades formadoras de colônias dos ensaios com as blendas foram próximas do ensaio registrado na literatura. Mesmo que os ensaios E5 e E9 tenham sido maiores que o ensaio E1, esperávamos que os resultados fossem maiores que os obtidos.

6. CONCLUSÃO

A quitina foi extraída da casca de camarão e desacetilada, obtendo a quitosana com grau de desacetilação com cerca de 90° e o EPS bacteriano foi extraído da bactéria *Rhizobium tropici* UFLA 05-16 e a rota proposta de síntese levou a modificação da quitosana com o EPS, que foi comprovada pelas técnicas de espectroscopia infravermelho, solubilidade, TG/DTA, grau de intumescimento e pH_{zpc} .

A adsorção de Cu(II) não foi influenciada pelo pH tanto quanto a adsorção de Zn(II). Entre os pH 3 a 7, o q (mgg^{-1}) para o Cu(II) foram parecidos, já para o Zn(II) os pH's 4 e 5 foi onde obteve-se as maiores remoções.

O estudo cinético demonstrou que o mecanismo de adsorção para os íons Cu(II) e Zn(II) seguiu o modelo de segunda ordem, porque este modelo correlacionou melhor os dados experimentais. Os estudos das isotermas de adsorção indicaram que o modelo de Sips foi o que melhor de ajustou aos dados experimentais. A dessorção dos íons Cu(II) e Zn(II) foi comprovada após a eluição dos adsorventes a solução de HNO_3 e HCl em diferentes concentrações.

A blenda QE1:2 foi capaz de adsorver micronutrientes e servir como fonte de carbono por apresentar unidades de açúcares em sua composição, favorecendo o aumento das colônias da *Rhizobium tropici* CIAT 899, em relação ao ensaio nas mesmas condições que não apresentava a blenda.

As blendas QE1:2-Cu(II) e QE1:2-Zn(II) dessorveram metais em meio crescimento bacteriano conforme a necessidade dos microrganismos, aumentando o número de unidades formadoras de colônia em relação aos ensaios que não continham micronutrientes.

REFERÊNCIAS

- [1] GLICK, BERNARD R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica (2012).
- [2] CERRO, P. del.; et al. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid independent manner. *Scientific Reports* 7 (2017) 1–12.
- [3] BAHAT-SAMET, E.; et al. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 237 (2004) 195–203.
- [4] SOUZA, R. de.; et al. Plant growth promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38:4, (2015) 401-419.
- [5] CHANRATANA, M.; et al. Assessment of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 aggregates for salt tolerance and plant growth promoting characteristics for bio-inoculant development. *AMB Expr* (2017) 7:208.
- [6] CATROUX, G.; et al. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil* 230 (2001) 21–30.
- [7] BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16 (1998) 729–770.
- [8] BASHAN, Y.; et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378 (2014) 1–33.
- [9] GENTILLI, A. R.; et al. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 57:4 (2006) 222-228.
- [10] HUANG, GUO-QING; et al. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry* 135 (2012) 534-539.
- [11] TOLAIMATE, A.; et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, 41 (2000) 2463-2469.
- [12] FENG, T.; et al. Removal of Copper (II) from an Aqueous Solution with Copper (II)-Imprinted Chitosan Microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* (2013) 3631–3638.
- [13] LAUS, R.; et al. Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. *Journal of Hazardous Materials* 183 (2010) 233–241.

- [14] WANG, J.; et al. Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. *Bioresource Technology* 160 (2014) 129 – 141.
- [15] VIEIRA, A. P. Quitosana modificada quimicamente como agente na remoção de metais e corantes e liberação controlada de fármacos. Tese (doutorado) UNICAMP – Campinas, SP: 2012.
- [16] MOURYA, V. K.; NAZMA, N. Inamdar. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers* 68 (2008) 1013–1051.
- [17] SQUILLACI, G.; et al. Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100 (2016) 613–623.
- [18] COMTE, S.; et al. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry* 41 (2006) 815–823.
- [19] LAMELAS, C.; et al. Characterization of H⁺ and Cd²⁺ binding properties of the bacterial exopolysaccharides. *Chemosphere* 65 (2006) 1362–1370.
- [20] LIU, S.; et al. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the arctic sea ice bacterium *pseudolateromonas* sp. Strain SM20310. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1 (2013) 224 - 230.
- [21] SHAMEER, S. Biosorption of lead, copper and cadmium using the extracellular polysaccharides (EPS) of *Bacillus* sp., from solar salterns. *Biotech* 6 (2016).
- [22] BERGER, L. R. R.; et al. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustacean chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. *Biological Control* 92 (2016) 45–54.
- [23] VALLE, T. A. del; et al. Effect of chitosan on the preservation quality of sugarcane silage. *Grass Forage Sci.* 73 (2018) 630–638.
- [24] GANDRA, J. R.; et al. Chitosan improves the chemical composition, microbiological quality, and aerobic stability of sugarcane silage. *Animal Feed Science and Technology* 214 (2016) 44–52.
- [25] GANDRA, J. R.; et al. Soybean whole-plant ensiled with chitosan and lactic acid bacteria: Microorganism counts, fermentative profile, and total losses. *J. Dairy Sci.* 101 (2018) 7871–7880.
- [26] PEREZ, J.J.; et al. A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers* 202 (2018) 409–417.

- [27] POSTMA, J.; et al. Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3.1T8 and chitosan. *Biological Control* 48 (2009) 301–309.
- [28] PRAPAGDEE, B.; et al. Phytoremediation of cadmium-polluted soil by *Chlorophytum laxum* combined with chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria. *Environ Sci Pollut Res* 24 (2017) 19249–19258.
- [29] YUAN, B.; et al. Synthesis of biocontrol macromolecules by derivative of chitosan with surfactin and antifungal evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 66 (2014) 7–14.
- [30] BURDMAN, S.; et al. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters* 189 (2000) 259–264.
- [31] DATE, R. A. Advances in inoculant technology: a brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41 (2001) 321–325.
- [32] Deaker R.; et al. Legume seed inoculation technology. *Soil Biol Biochem* 36 (2004) 1275-1288.
- [33] MOREIRA, F.M.S.; et al. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA. (2002).
- [34] Oliveira-Longatti, S. M. de.; et al. *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in a dystrophic oxisol. *Ann Microbiol* (2015).
- [35] ZOU, Pan; et al. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry* 190 (2016) 1174–1181.
- [36] AZZAM, E. M. S.; et al. Preparation and characterization of chitosan-clay nanocomposites for the removal of Cu(II) from aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules* 89 (2016) 507–517.
- [37] GHOSH, A.; et al. Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. *J Mater Sci* 47 (2012) 1196–1204.
- [38] ABDELHADY, M. M. Preparation and Characterization of Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles for Imparting Antimicrobial and UV Protection to Cotton Fabric. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, Article ID 840591 (2012).
- [39] ZUO, Xiao Jun. Preparation and Evaluation of Novel Thiourea/Chitosan Composite Beads for Copper(II) Removal in Aqueous Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53 (2014) 1249 – 1255.
- [40] BADAWY, M. E. I.; et al. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* (2011) 1 – 29.

- [41] AHMED, Z.; et al. Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolado do kefir do Tibete - Parte II. *Food Hydrocolloids* 30 (2013) 343–350.
- [42] FEIN, J. B. et al. Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72 (2008) 5885–5895.
- [43] DONOT F.; et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, extraction genetics and extraction. *Carbohydr Polym* 87 (2012) 951–962.
- [44] ARGANDONA, M., et al. The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph. *FEMS Microbiology Letters* 244 (2005) 69–74.
- [45] KRÜGER, M.; et al. A novel, multi-layered methanotrophic microbial mat system growing on the sediment of the Black Sea. *Environ Microbiol* 10(8) (2008) 1934–1947.
- [46] MA, L.S.; et al. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate Polymers* 89 (2012) 371–378.
- [47] ZHENG, W.; et al. Effects of melanin on the accumulation of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* grown on nitrate. *Bioresour Technol* 99 (2008) 7480–7486.
- [48] VU, B.; et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14 (2009) 2535–2554.
- [49] SEESURIYACHAN, P.; et al. Optimization of Exopolysaccharide Overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid State Fermentation under High Salinity Stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 912-917.
- [50] SILVI, S.; et al. Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. *Microbial Cell Factories*, 12 (2013).
- [51] KRUIF, C. G. de.; et al. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloid* 15 (2001) 555–563.
- [52] TOLSTOGUZOV, V. B. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloid* 17 (2003) 1–23.
- [53] DICKINSON, E.; et al. *Advances in food colloids*. London: Blackie Academic & Professional (1996) 5 – 10.
- [54] WALSTRA, P. *Physical chemistry of foods*. New York-Basel: Marcel Dekker, Inc (2003) 179 – 187.
- [55] ESPINOSA-ANDREWS, H.; et al. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers* 79 (2010) 541–546.

- [56] ASLI, A.; et al. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PLOS ONE* 12 (2017) 1-23.
- [57] TAN, Y.; et al. Inhibition of mixed fungal and bacterial biofilms on silicone by carboxymethyl chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 148 (2016) 193–199.
- [58] DIVYA, K.; et al. antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: mode of action and factors affecting activity. *Fibers and Polymers* 18(2) (2017) 221-230.
- [59] WEST, Thomas P. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* cells immobilized in chitosan beads Fungal pullulan production by immobilized cells. *Folia Microbiol* (2011) 56:335 – 338.
- [60] FERREIRA, A. R. V.; et al. FucoPol and chitosan bilayer films for walnut kernels and oil preservation. *LWT - Food Science and Technology* 91 (2018) 34–39.
- [61] LUO, Y.; et al. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 64 (2014) 353 – 367.
- [62] BRUINS, M. R. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (45) 2000 198 – 207.
- [63] CUBILLAS, C.; et al. A comprehensive phylogenetic analysis of copper transporting P1B ATPases from bacteria of the Rhizobiales order uncovers multiplicity, diversity and novel taxonomic subtypes. *Microbiology Open*. 6 (2017).
- [64] MCDEVITT, C. A.; et al. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathogens* 7 (2011) pp. 1 – 9.
- [65] CAPDEVILA, D. A.; et al. Bacterial Strategies to Maintain Zinc Metallostasis at the Host-Pathogen Interface. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (2016) 20858 – 20868
- [66] BLENCOWE, D. K.; et al. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2003) 291 – 311.
- [67] ÖNAL, Y. Kinetics of adsorption of dyes from aqueous solution using activated carbon prepared from waste apricot. *Journal of Hazardous Materials* 137 (2006) 1719 – 1728.
- [68] SIMONIN, J. On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics. *Chemical Engineering Journal* 300 (2016) 254 – 263.
- [69] HU, X. Adsorption of chromium (VI) by ethylenediamine-modified cross-linked magnetic chitosan resin: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials* 185 (2011) 306 – 314.

- [70] RODRIGUES, A. P.; et al. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 109 (2008) 2703 – 2710.
- [71] MOTTA, C. Preparação e caracterização de hidrogéis superabsorventes a partir de quitosana e poliácridonitrila. Tese (Doutorado) UFSC – Florianópolis, SC: 2009.
- [72] KAUSAR, A.; et al. Preparation and characterization of chitosan/clay composite for direct Rose FRN dye removal from aqueous media: comparison of linear and non-linear regression methods. *Journal of Materials Research and Technology* 8(1) (2019) 1161 – 1174.
- [73] SIROTIK, M.; et al. UV-VIS Spectrophotometric determinations of selected elements in modelled aqueous solutions. *Journal of Environmental Protection, Safety, Education and Management* 2 (2014) 75 – 87.
- [74] FABRE, PAUL-LOUIS; et al. Determination of Copper and Zinc in Brass: Two Basic Methods. *Journal of Chemical Education* 87 (2010) 836 – 837.
- [75] REPO, E. Heavy metals adsorption by novel EDTA-modified chitosan–silica hybrid materials. *Journal of Colloid and Interface Science* 358 (2011) 261 – 267.
- [76] HOAGLAND, D.R.; et al. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, CA: Agric. Exp. Stn., Univ. of California. (1950).
- [77] REASONER, D. J. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology* 92 (2004) 307 – 315.
- [78] KUCUKGULMEZ, A.; et al. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry* 126 (2011) 1144 – 1148.
- [79] FARIA, S.; et al. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymers* 86 (2011) 469 – 476.
- [80] HORN, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico. Tese (doutorado) USP – São Carlos, SP: 2009.
- [81] QING-XI, W.; et al. Design of chitosan and its water soluble derivatives-based drug carriers with polyelectrolyte complexes. *Marine Drugs* 12 (2014) 6236 – 6253.
- [82] GARCIA-OCHOA, F.; et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 18 (2000) 549 – 579.
- [83] KASAAI, M. D.; Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers* 79 (2010) 801 – 810.
- [84] VEIGA, I. G.; et al. Study of the Swelling and Stability Properties of Chitosan–Xanthan Membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 124, (2012) 154 – 160.

- [85] FUKAMI, J.; et al. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr* 8 (2018) 73.
- [86] LEDIN, M.; et al. Microorganisms as metal sorbents: comparison with other soil constituents in multi-compartment systems. *Soil Biology and Biochemistry* 31 (1999) 1639 – 1648.
- [87] TOURNEY, J.; et al. Physical and chemical effects of extracellular polymers (EPS) on Zn adsorption to *Bacillus licheniformis* S-86. *Journal of Colloid and Interface Science* 337 (2009) 381 – 389.
- [88] ZHAO, F.; et al. Adsorption of Cd(II) and Pb(II) by a novel EGTA-modified chitosan material: Kinetics and isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science* 409 (2013) 174 – 182.
- [89] MATSUDA, A. Tolerance of rhizobia from different sources to zinc, copper and cadmium. *Pesq. agropec. bras., Brasília* 37 (2002) 343 – 355.
- [90] LEONEL, T. F.; et al. The influence of copper and chromium ions on the production of exopolysaccharide and polyhydroxybutyrate by *Rhizobium tropici* LBMP-C01. *Journal of Polymers and the Environment* 27 (2019) 445 – 455.