



Jose Jonathan Vallejos Moran

**Aspectos Fundamentais da Adesão da estirpe
Rhodococcus opacus na superfície de apatita**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos do Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Técnico Científico da PUC-Rio.

Orientador: Profº. Mauricio Leonardo Torem

Rio de Janeiro
Agosto de 2012



JOSE JONATHAN VALLEJOS MORAN

**Aspectos Fundamentais da Adesão da estirpe
Rhodococcus opacus na superfície de apatita**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos do Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profº. Mauricio Leonardo Torem

Orientador e Presidente

Departamento de Engenharia de Materiais - PUC-Rio

Profº Roberto José de Carvalho

Departamento de Engenharia de Materiais - PUC-Rio

Drº Antonio Gutierrez Merma

Departamento de Engenharia de Materiais - PUC-Rio

Profº Rui de Goes Casqueira

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Profº. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação do Centro Técnico Científico da
PUC-Rio

Rio de Janeiro, 01 de Agosto de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Jose Jonathan Vallejos Moran

Jose Jonathan Vallejos Moran possui graduação em Engenharia Metalúrgica - Universidad Nacional de Trujillo (2009). Cursa no momento, o Mestrado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Tem experiência na área de Engenharia de Materiais e Metalúrgica, com ênfase em Tratamento de Minérios. Atua, principalmente, nos seguintes temas: Tratamento de efluentes líquidos, Flotação e Biotecnologia Mineral e Ambiental.

Ficha Catalográfica

Vallejos Moran, Jose Jonathan

Aspectos fundamentais da adesão da estirpe rhodococcus opacus na superfície de apatita / Jose Jonathan Vallejos Moran. Orientador: Mauricio Leonardo Torem - 2013.

82 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia de Materiais, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia de materiais – Teses. 2. Adesão. 3. Biorreagente. 4. Fósforo. 5. Apatita. I. Torem, Maurício Leonardo. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Engenharia de Materiais. III. Título.

CDD:620.11

A meus pais José Israel Vallejos Diaz e Teresa Gloria Morán Gonzales e irmãs Llelina e Lizbet pela motivação na culminação neste trabalho. Os meus avôs que me cuidam desde o céu. Os meus companheiros de estudos, pelos grandes momentos vividos nesta cidade maravilhosa.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde, fortaleza e paciência.

Agradeço ao meu orientador Mauricio Leonardo Torem pelo apoio e confiança depositada; aos professores do departamento de Engenharia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro – PUC-Rio.

Agradeço a Antonio Gutierrez Merma pela paciência e ajuda constante no laboratório.

Agradeço a Gabriela Alejandra Huamán Pino pela ajuda na correção deste trabalho.

Agradeço a Karla Mota pela ajuda na preparação das amostras de bactéria e mineral a serem observadas no microscópio eletrônico.

Aos meus amigos da casa XXI do departamento DEMa e demais colegas da PUC-Rio.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelos auxílios concedidos.

Resumo

Vallejos Moran, Jose Jonathan; Torem, Mauricio Leonardo. **Aspectos Fundamentais da Adesão da estirpe *Rhodococcus opacus* na superfície de apatita.** Rio de Janeiro, 2012. 82p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Engenharia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A bactéria *Rhodococcus opacus* apresenta a capacidade de tornar hidrofóbica a superfície do mineral de apatita, devido aos compostos presentes na sua parede celular. Para avaliar esta característica da bactéria, foi estudada no presente trabalho a influencia de diferentes parâmetros para tentar entender a interação entre bactéria e o mineral. Os resultados de mobilidade eletroforética da bactéria e mineral mostram um ponto isoelétrico em torno a 2,8 e de 2,5 respectivamente. Após a interação da bactéria com o mineral pode se observar uma variação na curva de potencial zeta do mineral. Os resultados mostram que existe uma maior afinidade da parede celular da bactéria pela superfície mineral de apatita em um pH=7. Foi observado que um aumento na concentração inicial de bactéria é favorável para a captação (mg bactéria/g mineral). Os dados experimentais de adesão foram ajustados aos modelos de Langmuir e Freundlich, apresentando o ultimo um melhor ajuste. As constantes de Freundlich obtidas foram 1.111, 1.154, 1.198 para 293 K, 303 K, 313 K respectivamente. Os resultados mostram uma influencia positiva na captação quando existe um incremento na temperatura e no tempo de interação. Foi avaliado o modelo cinético de pseudo-primeira ordem obtendo-se constantes de taxa de 0.0228, 0.0353, 0.449 min⁻¹ para 293 K, 303 K, 313 K respectivamente. Os resultados mostram uma energia de ativação de 25,91 KJ/mol, sugerindo-se a predominância de interações químicas entre a parede celular da bactéria e a superfície mineral. As imagens do microscópio eletrônico de varredura evidenciaram a adesão em multicamadas da bactéria sobre o mineral de apatita. O presente trabalho provê um pouco de conhecimento para o uso potencial da bactéria como biorreagente na flotação.

Palavras-chave

Adesão; Biorreagente; Fosfatos; Apatita

Abstract

Vallejos Moran, Jose Jonathan; Torem, Mauricio Leonardo (Advisor). **Fundamental Aspects of the Adhesion of *Rhodococcus opacus* strain onto Apatite Surface.** Rio de Janeiro, 2012. 82p. MSc. Dissertation - Departamento de Engenharia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Bacteria *Rhodococcus opacus* has the ability of turn hydrophobic the surface of apatite mineral due compounds present in their cell wall, then for evaluate this particular characteristic of the bacteria, was studied the influence of different parameters to try to understand the interaction between bacteria and mineral. The results of electrophoretic mobility of the bacteria and mineral showed an isoelectric point around 2.8 and 2.5 respectively; after of the bacteria and mineral interaction was observed a change in the zeta potential curve of the apatite mineral. The results showed that there is a greater affinity between the bacterial cell wall and the surface of apatite mineral at pH around 7. It was observed that an increasing in the initial concentration of bacteria is favorable to uptake (mg bacteria/ g mineral). The experimental data of adhesion were fitted of the Langmuir and Freundlich models. Freundlich model showed a suitable adjustment and was obtained constants $n = 1.111, 1.154, 1.198$ to 293 K, 303 K, 313 K respectively. The results showed the positive influence in the uptake when there is an increase of temperature and interaction time. Was evaluated the pseudo-first order kinetic model and were obtained rate constants of 0.0228, 0.0353, 0.449 min^{-1} to 293 K, 303 K, 313 K respectively. The results showed an activation energy of 25.91 kJ / mol, suggesting the predominance of chemical interactions between the bacterial cell wall and mineral surface. The images of scanning electron microscope revealed the multilayer adhesion of bacteria onto apatite mineral. This study provides some understanding for the potential use of bacterial as bioreagent in flotation.

Keywords

Adhesion; Biorreagent; Phosphates; Apatite

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Revisão bibliográfica	16
3.1. Fósforo e fosfatos	16
3.2. Depósitos de fosfatos	17
3.3. Reservas e produção mundial de fosfatos	18
3.4. Minerais de apatita	20
3.5. Flotação de fosfatos	20
3.5.1. Coletores	22
3.5.2 Depressores	25
3.6. Emprego de Microrganismos na Flotação Mineral	29
3.6.1. Composição superficial do microrganismo	33
3.6.2 Cargas elétricas na superfície do microrganismo	34
3.6.3 Hidrofobicidade e Hidrofilicidade	36
3.7. Adesão do microrganismo na superfície mineral	37
3.7.1. Mecanismos de adsorção	37
3.7.2. Forças que atuam na adesão	39
3.7.3 Ligações de íons metálicos no microorganismo	39
3.7.4 Isotermas de adsorção	40
3.7.4.1. Isoterma de Langmuir	42
3.7.4.2 Isoterma de Freundlich	43
4 Materiais e Métodos	45
4.1 Preparação das amostras minerais	45
4.2 Cultivo e obtenção da bactéria <i>Rhodococcus opacus</i>	46

4.3 Ensaio de adesão	48
4.4 Influência nas amostras antes e após a interação com a bactéria <i>R. opaccus</i>	49
4.4.1 Medidas de ângulo de contato	49
4.4.2 Medidas de potencial zeta	50
4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	51
5 Resultados e Discussões	52
5.1. Caracterização da amostra de apatita	52
5.2. Medidas de ângulo de contato	52
5.3. Medidas de potencial zeta	54
5.4. Imagens no Microscópio eletrônico de varredura	55
5.5 Ensaio de adesão	57
5.5.1 Influência da concentração	57
5.5.2 Influência do pH	60
5.5.3 Isotermas de adesão	61
5.5.3.1. Modelo de Langmuir	62
5.5.3.2. Modelo de Freundlich	63
5.5.4. Influência do tempo e temperatura	64
5.5.5. Cinética de adesão	65
6. Conclusões	69
7. Recomendações para futuros trabalhos	71
8. Referências Bibliográficas	72

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química do peptidoglicano (SHARMA, 2001).	31
Figura 2. Parede celular de um microorganismo gram-positivo (SHARMA, 2001).	32
Figura 3. Curva de crescimento da bactéria <i>Rhodococcus opacus</i> (BOTERO et al. 2007).	33
Figura 4. Etapas na colonização da superfície mineral por microorganismos (SHARMA, 2001).	37
Figura 5. Formas comuns das isotermas de adsorção (PINO, 2005).	41
Figura 6. Placa de Petri, capela e shaker rotativo.	47
Figura 7. Centrífuga digital e Espectrofotômetro UV-1800.	47
Figura 8. Curva de calibração de peso seco da bactéria em função da absorbância	48
Figura 9. Goniômetro Ramé Hart-inc.	49
Figura 10. Zeta meter system +4.0.	50
Figura 11. Ângulo de contato do mineral de apatita após interação com a bactéria <i>R. opacus</i> . Concentração celular 0,1 g/L.	
Tempo de interação 5 minutos.	53
Figura 12. Curva de potencial zeta do mineral de apatita. Eletrólito indiferente NaCl 1M. Concentração de bactéria e mineral 0,1 g/L.	54
Figura 13. Imagem do MEV mostrando as células da bactéria <i>Rhodococcus opacus</i> . Aumento 16000X.	55
Figura 14. Imagem do MEV mostrando as células da Bactéria <i>Rhodococcus opacus</i> aderidas sobre a superfície de apatita. Aumento 5000X. Tempo de interação 30 minutos.	56
Figura 15. Imagem do MEV mostrando as células da Bactéria <i>Rhodococcus opacus</i> aderidas sobre a superfície de apatita. Aumento 4453X. Tempo de interação 2 minutos.	56
Figura 16. Efeito da concentração inicial da bactéria na adesão. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 1×10^{-3} M.	59

Figura 17. Efeito do pH na adesão da bactéria <i>R. opacus</i> sobre a superfície mineral de apatita. Concentração inicial 0.4 g/L. Temperatura 303 K. Eletrólito indiferente NaCl 1×10^{-3} M.	60
Figura 18. Dados experimentais de captação em função da concentração final da bactéria. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 10^{-3} M.	61
Figura 19. Isoterma linearizada de Langmuir com os dados não ajustados. pH=7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 10^{-3} M.	62
Figura 20. Isoterma linearizada de Freundlich. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 10^{-3} M.	63
Figura 21. Efeito do tempo e temperatura na captação. pH=7. Concentração inicial de bactéria 0,1 g/L. Eletrólito indiferente NaCl 1×10^{-3} M.	64
Figura 22. Ajuste linear dos dados experimentais no modelo cinético de pseudo-primeira ordem.	66
Figura 23. Dados de temperatura e constantes cinéticas ajustadas à equação de Arrhenius na forma linearizada.	67

Lista de tabelas

Tabela 1. Reservas e produção mundial	18
Tabela 2. Composição mineralógica dos principais depósitos no Brasil (GUIMARÃES et al., 2005).	23
Tabela 3. Coletores usados no beneficiamento de depósitos de fosfato	24
Tabela 4. Depressores usados no beneficiamento de depósitos de fosfatos.	28
Tabela 5. Bactérias e os seus meios de cultura.	30
Tabela 6. Pontos isoelétricos para diversas cepas de bactérias (BOTERO, 2007).	35
Tabela 7. Relação entre o fator de separação e o tipo de isoterma (AMUDA et al., 2007).	43
Tabela 8. Ensaios e frações granulométricas	45
Tabela 9. Composição do meio de cultura	46
Tabela 10. Fases e componentes da amostra mineral	52
Tabela 11. Influência da concentração inicial na captação. T=293 K.	57
Tabela 12. Influência da concentração inicial na captação. T=303 K.	58
Tabela 13. Influência da concentração inicial na captação. T=313 K.	58
Tabela 14. Parâmetros do modelo linearizado de Freundlich, para diferentes temperaturas.	63
Tabela 15. Parâmetros cinéticos para o modelo de pseudo-primeira ordem.	66

1. Introdução

O fósforo é um elemento que é indispensável para o desenvolvimento normal das culturas. Na natureza, o fósforo está combinado com outros elementos formando fosfatos; os quais apresentam diferentes características químicas e mineralógicas, dependendo do tipo de jazida de rocha fosfática. O 90% do fosfato produzido no mundo é empregado na indústria de fertilizantes, o 10% que resta é empregado na fabricação de detergentes, produtos dentais, inseticidas e ração de animais (ZHENGXING, 2007; WANG, 2004).

Os tipos de jazida fosfáticas mais comuns são as ígneas e sedimentares. Menos que 20% de fosfatos no mundo são extraídos de depósitos ígneos e mais que o 80% da produção mundial de fosfatos é devido ao beneficiamento dos depósitos sedimentários (SIS, 2001).

No Brasil, cerca de 80% das jazidas fosfáticas são de origem ígnea, com baixo teor de fósforo, expresso em P_2O_5 , e com presença acentuada de rocha carbonatítica e minerais micáceos (FONSECA e SOUZA, 2008).

O principal mineral da rocha fosfática é a apatita e a importância no beneficiamento deste mineral é a produção de ácido fosfórico, que se utiliza como matéria prima para produzir fertilizantes.

A demanda crescente de fosfatos no mundo todo levou à exploração de jazidas de baixos teores. Este fato associado às rigorosas especificações dos concentrados de flotação, às duras leis ambientais e à necessidade de reduzir os custos operacionais, levou a inúmeras investigações com vista a encontrar uma melhor técnica de processamento e maior efetividade dos reagentes de flotação convencionais. Neste contexto, a biotecnologia é um processo atrativo, devido à flexibilidade (os microrganismos exibem interações com diversas superfícies

minerais) e baixos custos operacionais. Também representa um processo com menor impacto ambiental (MESQUITA et. al. 2003).

Os compostos presentes na parede celular dos microrganismos conferem características hidrofóbicas e hidrofílicas. A hidrofobicidade da bactéria é conferida pela combinação de estruturas ou moléculas hidrofóbicas, que se encontram na superfície da bactéria. Quando o microrganismo hidrofóbico atinge a superfície mineral torna ela hidrofóbica, permitindo assim a adesão das partículas minerais às bolhas de ar, promovendo assim a flotação. A variação da hidrofobicidade na parede celular da bactéria depende da proporção dos grupos graxos da sua parede, (MESQUITA et al. 2003; BOTERO et al., 2007).

No sentido de obter uma maior compreensão na bioflotação do mineral de apatita, o presente trabalho desenvolve os fundamentos básicos de adesão da bactéria *Rhodococcus opacus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Ter uma melhor compreensão dos fundamentos que norteiam a bioadesão da cepa microbiana hidrofóbica *Rhodococcus opacus*.

2.2. Objetivos específicos

- Contribuir para o conhecimento do uso de biocoletores.
- Estudar o fenômeno de adesão sobre a superfície mineral de apatita.
- Avaliar as propriedades superficiais do mineral antes e após da interação com a bactéria *Rhodococcus opacus*.
- Fazer uma análise dos modelos de adsorção.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Fósforo e fosfatos

O fósforo, cujo símbolo químico é P é um elemento pertencente ao grupo dos metalóides, integrante do grupo V da Tabela Periódica dos elementos, com número atômico 15. Esse elemento se apresenta abundantemente na superfície da terra, sendo que a sua única forma estável, é o íon ortofosfato $(PO_4)^{3-}$. Elemento essencial para o desenvolvimento normal de todos os organismos vivos.

Na natureza, o fósforo está combinado com outros elementos formando fosfatos; os quais apresentam diferentes características químicas e mineralógicas, dependendo do tipo de jazida de rocha fosfática. O 90% do fosfato produzido no mundo é empregado na indústria de fertilizantes, o 10% que resta é empregado na fabricação de detergentes, produtos dentais, inseticidas e comida de animais (ZHENGXING, 2007; WANG, 2004).

Na adubação, os elementos usados em maior proporção são o fósforo, o nitrogênio e o potássio. As plantas assimilam uma quantidade menor do nutriente fósforo, quando comparado com as quantidades de potássio e nitrogênio, isto é devido à forte interação do nutriente com os solos e a existência de baixos teores do fósforo nos solos (RAIJ, 1991). O fósforo é fundamental e indispensável para produção de culturas, não existindo substituto na natureza.

A deficiência do nutriente fósforo na planta durante o seu crescimento pode afetar o desenvolvimento dos frutos ou sementes, assim como um crescimento pequeno de raízes as quais não chegam a ocupar as áreas maiores do solo impedindo-as assimilar água e nutrientes (STAUFFER e SULEWSKI, 2003). Outras características devido à deficiência de fósforo podem ser a presença de manchas pretas e malformações nas folhas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Entre os minerais que contêm fósforo se encontram as apatitas, cuja fórmula geral é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2$, sendo a fluorapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ a forma mais comum nas jazidas fosfáticas. As apatitas são utilizadas para produzir ácido fosfórico, sendo este ácido a matéria prima para a produção de fertilizantes fosfatados.

O teor percentual de fósforo em um concentrado de fosfato ou em uma jazida é usualmente expresso na forma de pentóxido de fósforo P_2O_5 , principalmente nos meios técnicos e científicos, no comércio e na indústria (FONSECA e SOUZA, 2008).

3.2. Depósitos de fosfatos

Segundo FONSECA e SOUZA (2008) a rocha fosfática é a única fonte de fósforo viável, estando contida nos depósitos de origem sedimentar (em torno de 85% da oferta mundial) e ígnea (aproximadamente 15%). No Brasil, cerca de 80% das jazidas fosfáticas são de origem ígnea, com baixo teor de fósforo sendo expresso em P_2O_5 e com presença acentuada de rocha carbonatítica e minerais micáceos.

Inúmeros depósitos de fosfatos estão distribuídos pelo mundo, porém os economicamente mais importantes se encontram localizados nos Estados Unidos, Marrocos, China, Rússia, África do Sul, Jordânia e Austrália. A grande maioria destes depósitos é de origem sedimentar e geralmente o beneficiamento ocorre a céu aberto e uma pequena porção em minas subterrâneas. Os principais depósitos nos Estados Unidos estão localizados nos Estados da Flórida (Bone Valley) e Carolina do Norte (Beaufort Country), ambos de origem sedimentar, assim como o de Qulad Abdoun, no Marrocos. Outros importantes depósitos de origem sedimentar estão no Egito, na região do Mar Vermelho, e a Rússia, na Península de Kola (Bacia Kara Tau). Dentre os depósitos de fosfato com a presença de complexos alcalinos e os de maior importância econômica destacam-se o de Khibina, na Península de Kola, na Rússia; e o complexo carbonatítico de Palabora, na África do Sul (ULIANA, 2010).

3.3.

Reservas e produção mundial de fosfatos

O crescimento da população mundial é responsável por gerar uma maior demanda de alimentos, de modo que faz incrementar a produção de culturas no mundo, precisando desta forma o uso de fertilizantes fosfatados.

A produção de fosfatos no mundo deve incrementar de 215 milhões de toneladas em 2011 para 256 milhões de toneladas até 2015. Sendo que o maior incremento espera-se por Marrocos que pretende aumentar a sua produção anual de 27 milhões de toneladas para 50 milhões de toneladas até 2017. Outras importantes minas foram planejadas na Austrália, Brasil, Namíbia e Arábia Saudita. O consumo de P_2O_5 no mundo foi projetado para crescer em 2,5% por ano durante os seguintes cinco anos, com um considerável incremento na Ásia e Sul América (UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY, 2012).

No ritmo atual de produção, as reservas serão suficientes por vários séculos. Porém, é necessário o desenvolvimento de boas práticas na agricultura que levem à otimização do uso dos fertilizantes, minimizando as perdas para o meio ambiente; discussão que tem crescido no mundo todo (ULIANA, 2010).

No ano 2010, a China dominou a produção mundial com praticamente 37% de participação, mais do que a soma dos 2º e 3º colocados que são os Estados Unidos e Marrocos - Saara Ocidental, com 14,8% de participação cada um (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2011). Na Tabela 1 pode se observar os mais importantes países produtores e as suas reservas.

Tabela 1. Reservas e produção mundial

Discriminação	Reservas (10 ³ t P ₂ O ₅)	Produção (10 ³ t)		
		2009 ^(r)	2010 ^(p)	%
Países	2010^(p) (1)			
Brasil ⁽²⁾	273.000	6.084	6.192	3,5
China	3.700.000	60.200	65.000	37,0
Estados Unidos	1.400.000	26.400	26.100	14,8
Marrocos e Saara Ocidental	50.000.000	23.000	26.000	14,8
Rússia	1.300.000	10.000	10.000	5,7
Tunísia	100.000	7.400	7.600	4,3
Jordânia	1.500.000	5.280	6.000	3,4
Egito	100.000	5.000	5.000	2,8
Israel	180.000	2.700	3.000	1,7
Síria	1.800.000	2.470	2.800	1,6
Austrália	82.000	2.800	2.800	1,6
África do Sul	1.500.000	2.240	2.300	1,3
Outros países	3.065.000	12.426	13.208	7,5
TOTAL	65.000.000	166.000	176.000	100

Fontes: DNPM/DIPLAM; USGS – Mineral Commodity Summaries 2011; ANDA.

Notas: (1) Nutrientes em P₂O₅; (2) Reservas lavráveis; (r) Revisado; (p) Dados preliminares.

No Brasil, o minério de rocha fosfática tem sido extraído há alguns anos de forma expressiva em apenas quatro Estados; Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Bahia; por três companhias: Vale Fertilizantes, Anglo American/Copebrás e Galvani (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2011).

Os dados apresentados na Tabela 1 referem-se ao concentrado de rocha fosfática com teor médio de 35% de P₂O₅, produto que é utilizado na fabricação de ácido fosfórico. Em 2010 a Vale Fertilizantes ficou com 72% da produção nacional, seguida da empresa Anglo American/Copebrás, com 21%, e da empresa Galvani, que ficou com 7%. A produção em 2010 foi ligeiramente maior que a de 2009, sendo que o complexo de Tapira-MG (Vale) respondeu por 33,4% da produção nacional, seguido de Catalão-GO (Anglo/Copebras), com 20,7% da produção, e de Araxá-MG (Vale), com 19%. Outras participações importantes foram as de Catalão-GO (Vale) e Cajati-SP (Vale), seguidas pelas de Lagamar-MG, Angico dos Dias-BA-/PI e Irecê-BA, todas da Galvani. Em Irecê-BA, a extração é realizada no rejeito, estando as reservas esgotadas (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2011).

Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), o ácido fosfórico teve uma alta na produção nacional de 17,3% no 2010 em relação ao 2009. Entre os produtos intermediários, com o fim de ser utilizado na produção de fertilizantes, o superfosfato simples e o triplo tiveram altas de 18,9% e 17,7% respectivamente, em relação ao 2009. As entregas de fertilizantes em 2010 foram 9,4% maiores que em 2009 (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2011).

3.4. Minerais de apatita

O fósforo está principalmente concentrada nos minerais de apatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2$. Dois tipos principais de apatita encontram-se na natureza, eles são: hidroxi- fluorapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F})$, comum na maioria de depósitos ígneos carbonatíticos, e fluorapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3, \text{OH})_3(\text{F}, \text{OH})$ que se encontra em sedimentos marinhos. A fluorapatita é também conhecida como francolita (carbonato de apatita) ou apatita cryptocristalina, aparece em pequenas concentrações as quais podem coalescer sobre camadas maciças como grânulos compactos pretos ou como nódulos de uma cor clara e também como pedras incrustadas em uma matriz de areia fosfática. Os depósitos de apatita contêm também grãos de cimento, partículas de argila ou fragmentos de conchas fósseis. Os depósitos de fosfato sedimentário são algumas vezes referidos como fosforitos. Os minerais de apatita são relativamente macios e se descrevem com uma dureza igual a 5 na escala de Moh. A clivagem se desenvolve no eixo C(0001) e a cor dos minerais da apatita varia entre incolor, violeta e azul, predominando o verde e o castanho (SIS, 2001).

3.5. Flotação de fosfatos

A flotação trata-se de uma técnica de separação muito usada na indústria mineral. A técnica utiliza as diferenças nas propriedades superficiais das partículas minerais para as separar do meio líquido. As partículas a serem flotadas

são tornadas hidrofóbicas pela adição dos produtos químicos denominados coletores. Então, se faz passar ar através da mistura e as partículas que se pretende recolher ligam-se as bolhas de ar formadas e deslocam-se para a superfície, onde se acumulam sob a forma de espuma. Em resumo, a flotação é um processo de separação de sólido-líquido, na qual a partícula mineral se adere à superfície da bolha de ar fazendo com que ela se separe do líquido.

Antes de ser realizado o processo de flotação o mineral de fosfato é submetido a outros processos tais como deslamagem, triagem e classificação; isto depende do tipo de minerais de fosfato que se encontram e da ganga associada aos depósitos. No processo de flotação direta de minerais de fosfatos, se adiciona usualmente depressores de argilas e micas com o objetivo de eliminar a sua influência negativa deixando-as no fundo da célula de flotação. No processo de flotação reversa se tem a finalidade de deprimir os minerais de fosfatos comumente apatita; e flotar os minerais de ganga como carbonatos e os que têm conteúdo de sílice (YING-YONG et al. 2008; ZAFAR et al. 1996).

Na natureza, os depósitos de fosfato de maior quantidade são os de sedimentos marinhos, os quais contêm proporções variáveis de silicatos e carbonatos (dolomita e calcita). Quando o depósito de fosfato tem a presença de carbonatos, o processo de flotação é um tanto complicado, devido às características físico-químicas similares que apresentam os carbonatos e fosfatos (apatitas). Os minerais de ganga mais comuns que se podem encontrar num depósito de fosfato são o quartzo, calcita, dolomita, mica, feldspato e argila (ABOUZEID et al., 2009; ELGILLANI and ABOUZEID, 1993).

No mundo, aproximadamente 80% dos depósitos de fosfatos são sedimentários com um conteúdo variável de carbonatos. Devido a este fato, as pesquisas em escala piloto são focadas na separação dos carbonatos, na tentativa de melhorar o processo de flotação (SIS, 2001).

Segundo HENCHIRI (1993), os principais problemas no processo de flotação de depósitos de fosfatos com conteúdo de carbonatos em comparação com depósitos de fosfatos com conteúdo de silicatos; são:

1. Os carbonatos aparecem formando uma cobertura parcial nas partículas minerais de fosfato.
2. Os minerais sedimentários apresentam a característica de produzir mais lodos.
3. Uma maior substituição de $(\text{CO}_3)^{-2}$ e F^- por $(\text{PO}_4)^{-2}$ nas apatitas.

Segundo ABDEL-ZAHER (2008), mais de 60% de concentrado de fosfato, é produzido pelo processo de flotação.

3.5.1. Coletores

A maioria dos coletores usados na flotação de fosfatos são os ácidos graxos e seus sais, especialmente ácido oléico e oleato de sódio. Quase 100% dos ácidos graxos normalmente usados na flotação de fosfatos vêm do Tall-oil que é um subproduto da indústria do papel. O óleo extraído dos vegetais é purificado e submetido a um processo que combina calor, pressão e alcalinidade, sendo logo convertido em ácidos graxos. Os ácidos graxos passam por um processo de saponificação usando NaOH para produzir sabões solúveis. Vegetais diferentes produzem ácidos graxos com distintas proporções dos componentes destes ácidos. Em alguns tipos de vegetais, o tipo de solo, as condições de clima e a variedade genética influenciam na composição dos ácidos graxos (SIS, 2001).

No Brasil, alguns dos principais coletores usados atualmente pelas principais empresas concentradoras de fosfatos é o óleo de soja hidrogenado, óleo de farelo de arroz e soja, sarcosinato, óleo de soja hidrogenado misturado com sulfosuccinato. O óleo vegetal normalmente se mistura com um coletor sintético (sulfosuccinato) com o objetivo de aproveitar a boa seletividade do coletor sintético e uma maior capacidade de recuperação devido ao óleo vegetal. Antigamente era empregado como coletor o óleo de sementes de uvas misturadas com óleo de soja, e o óleo de sementes de maracujá com o mesmo propósito (GUIMARÃES et al., 2005).

A flotação direta consiste em concentrar o mineral de apatita e deixar as gangas no rejeito, o processo inverso é chamada de flotação reversa. Na flotação direta apresenta-se o problema da falta de um depressor efetivo de gangas minerais, levando a um baixo conteúdo de P_2O_5 no concentrado. Na flotação reversa, torna-se complicado devido à baixa flotabilidade de alguns silicatos quando é utilizado amina como coletor, especialmente do mineral vermiculita; existindo sempre conteúdo de sílice no concentrado final para ambos tipos de flotação. Nos depósitos (ígneos) de fosfatos brasileiros é comum encontrar carbonatos e sílice como gangas (GUIMARÃES et al., 2005). A composição mineralógica típica dos principais depósitos de fosfatos no Brasil é mostrada na tabela 2.

Tabela 2. Composição mineralógica dos principais depósitos no Brasil (GUIMARÃES et al., 2005).

Mineral %	Bunge Araxá	Bunge Cajati	Fosfertil Tapira	Ultrafertil Catalão	Copebrás Catalão
Apatita	31	11	25	28	33
Magnesita	8	7	13	15	14
Barita	5	-	-	3	3
Carbonatos	2	78	1	1	1
Micas	12	2	24	8	6
Quartzo	12	-	5	18	15
Diopsídio	-	-	15	-	-
Minerais de titanium	3	-	12	-	-
Outros	27 ^a	2	5	27 ^a	28 ^a

^aPrincipalmente goethita e limonita

Na flotação de óxidos de titânio e óxidos de ferro foi empregado o coletor hidroxamato (ASSIS et. al., 1996). A adesão de hidroxamato na flotação de calcita e barita foi estudada por PRADIP e FUERSTENAU (1984). Na flotação seletiva de apatita e calcita do quartzo, o reagente Dissódicododecil fosfato foi indicado como coletor para um pH acima de 9 (SETH et al., 1975). Sulfossucinato foi usado com oleato de sódio para o estudo na cinética da flotação do mineral de

apatita (PINTO et. al., 1991). Outros coletores empregados no mundo estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Coletores usados no beneficiamento de depósitos de fosfatos.

Mineral flotado	Propriedade iônica	Coletor	Referência
Apatita	Aniônica	Acido oléico	Hernáinz et. al. 2004
		Ácidos graxos	Kou et. al. 2010
		Dodecil sulfato de sódio/cálcio	Chander et. al. 1980
		Oleato de Sódio	Ipek e Ozdag, 2000
		Hidroxamato	Assis et. al. 1996
	Catiônica	Acetato de amina	Thyabat Salah et. al. 2011
		Cloreto de decilamônio	Chander et. al. 1980
Carbonatos	Aniônica	Oleato de Potássio	Abouzeid et. al. 2009
		Ésteres fosfóricos	Bauded e Save, 1999
		Acido Oléico	Abdel-Khalek, 2000
		Fosfato de potássio	Rao et. al. 1985
	Catiônico	Brometo Dimethyl do amônio de disoctyl (BDDA)	Sun et. al. 2011
Sílica	Catiônico	Dodecilamina	Ata et. al. 2012
		Amina	Zhang et. al. 1997

O reagente oleato de sódio foi empregado como coletor na flotação de fosfatos por CHANDER et. al. (1980), IPEK e HOZDAG (2000) e THYABAT SALAH et al. (2011).

CHANDER et. al. (1980) empregaram dois reagentes catiônicos, cloreto de decilamônio e cloreto de amônio do trimethyl de tetradecil em uma faixa de pH de 5-10, com a finalidade de avaliar a sua influencia nas curvas de potencial zeta da hidroxiapatita.

Segundo PLETNEV (2001), os surfactantes anfotéricos são compostos que têm a capacidade de apresentar características catiônicas ou aniônicas, e isto depende do pH da solução. Na flotação reversa de fosfatos foram empregados surfactantes anfotéricos, os quais apresentaram um comportamento aniônico em um pH básico e catiônico em um pH ácido (SHAO et. al., 1998; BUTTNER et. al., 1991).

Na flotação de minerais de scheelita e calcita foi empregado como coletor o Brometo dimethyl do amônio de Disoctyl (BDDA); estes minerais foram testados individualmente e misturados. Foi realizada uma comparação entre ácido oléico e BDDA e os resultados mostraram um maior rendimento do BDDA em uma faixa de pH entre 8 e 10. O estudo revelou que o BDDA reage com a sheelita mediante interações eletrostáticas (SUN et. al., 2011).

3.5.2

Depressores

Para realizar a escolha certa de um depressor é preciso ter em conta que o depressor deve ter o mesmo grupo funcional que o coletor das partículas a serem beneficiadas. Por exemplo, os ácidos graxos contêm o grupo funcional carboxilato e são efetivos coletores para carbonatos e apatitas; portanto o depressor carboximetilcelulose (CMC) que contêm o mesmo grupo funcional, será um efetivo depressor para esses minerais. Assim minerais de quartzo, são flotados pelos coletores catiônicos de amina, portanto um depressor de polissacarídeo catiônico é efetivo para deprimir quartzo (SIS, 2001).

Num estudo de flotação do sistema calcita-apatita foi feita uma comparação entre os reagentes de amido, ácido fluorssilícico e fosfato dipotássico, com o

objetivo de deprimir apatita, sendo que o melhor resultado obtido foi com o último reagente (RAO et. al. 1985).

O trifosfato de sódio foi avaliado como um depressor de calcita, apatita e dolomita por PARSONAGE et. al. (1984), onde eles mostraram que o trifosfato de sódio se aderiu nos lugares catiônicos da superfície de calcita, tornando aniônica a superfície mineral. Na presença de oleato de sódio, o trifosfato de sódio tende a competir pelos lugares catiônicos da superfície de calcita, reduzindo desta forma a adesão do coletor oleato de sódio, portanto causando a depressão da calcita. Eles encontraram que a recuperação de calcita e dolomita incrementou-se com concentrações elevadas de trifosfato de sódio, mas não puderam explicar o fenômeno.

O hexametáfosfato de sódio e difosfato de sódio foram avaliados em uma pesquisa feita por CHANGGEN e YONGXIN (1983) onde sugerem que os fosfatos não foram aderidos corretamente na superfície mineral porque a depressão dos minerais de cálcio está estritamente relacionada com a dissolução de íons cálcio nos minerais, sendo que a estrutura cristalina dos minerais foi o principal fator na influência da dissolução de cálcio. Estes pesquisadores estudaram a flotação seletiva de scheelita, utilizando como coletor o oleato de sódio e fosfatos (reagentes) como depressores de calcita e fluorita. Eles avaliaram os efeitos dos fosfatos (reagentes) na solubilidade dos minerais de cálcio na água, na carga superficial dos minerais e também na adesão na superfície dos minerais. Segundo RAO et. al. (1985) a depressão de apatita por fosfatos pode ser devido à adesão específica de íons de fosfatos (H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}) nos lugares de Ca^{2+} na superfície da apatita, prevenindo a adesão do coletor. O mesmo mecanismo pode ser explicado na superfície da calcita

Para minerais de fosfato de baixo teor (em torno de 5.01 % P_2O_5) presentes em um depósito sedimentário, foi usado o processo de flotação reversa, empregando-se como depressores, o silicato de sódio, amido, ácido tânico, tartarato de sódio e potássio, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, tripolifosfato de sódio e sulfato de alumínio, em condições ácidas e alcalinas; demonstrando que o sulfato de alumínio e o tartarato (K, Na) trabalham sinergicamente para deprimir

estes minerais. O emprego de ácido sulfúrico e fosfórico na depressão de minerais de fosfato é possível, devido a que, em um meio ácido existe a formação de fosfato monoácido de cálcio (CaHPO_4) na superfície mineral, prevenindo assim a adsorção do coletor; portanto o consumo destes ácidos é elevado o que resulta não desejável para minerais de fosfato de baixo teor, devido a questões econômicas (MOHAMMADKHANI et. al. 2011).

QUN e HEISKANEN (1990) avaliaram nove diferentes tipos de depressores de sílica e minerais oxidados; dentre deles estão o cromato de potássio, ácido tânico, dextrina, dicromato de potássio, ácido oxálico, amido de milho, quebracho, carboximetilcelulosa e borresperse (lignosulfonato) de sódio.

Um estudo foi realizado por ELGILLANI e ABOUZEID (1993) com a finalidade de avaliar a flotação em meio ácido de carbonatos que se encontram presentes nos depósitos de fosfatos. Baseado na análise do sistema carbonato/fosfato/água, concluíram que:

1. As apatitas são deprimidas em um meio ácido quando é empregado como coletor um ácido graxo ou sabão, enquanto o carbonato é flotado nas mesmas condições; sempre que eles não estejam misturados. A presença de KH_2PO_4 melhora a depressão de apatita.
2. Existem duas condições para conseguir a separação seletiva de carbonatos e apatitas no meio ácido (pH 5.5-6.0). Estas são: (a) diminuir a presença de íons Ca^{2+} na solução, mediante a adição de ácido sulfúrico ou ácido oxálico, e (b) a adição de um sal de fosfato solúvel para melhorar a depressão de apatitas.
3. Quando são utilizados H_2SO_4 , $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ou H_3PO_4 como agentes depressores de apatita, cada um mostrará a sua força atuante da seguinte forma $\text{H}_3\text{PO}_4 > \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 > \text{H}_2\text{SO}_4$. Quando misturados $\text{H}_3\text{PO}_4 / \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ou $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ os resultados são melhores.

Na pesquisa realizada por GUIMARÃES et. al. (2005) se mostra que o rendimento do amido de milho é maior que outros reagentes depressores tais como, goma de guar, tanino, etil celulose e caboximetilcelulose (CMC). Nas concentradoras brasileiras, o amido de milho é empregado na depressão de gangas que se encontram presentes nos depósitos ígneos. Uma lista de reagentes empregados no mundo é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4. Depressores usados no beneficiamento de depósitos de fosfatos.

Mineral	Depressor	Referencia
Apatitas	Fosfato dipotássico	Rao et. al., 1985
	Sulfato de alumínio	Mohammadkhani et. al., 2011
	Acido fosfórico	Elgillani e Abouzeid, 1993
	Acido sulfúrico	Abouzeid et. al., 2009
	Vermelho de alizarina S	Fu e Somasundaran, 1986
	Acidofluossilícico	Rule et. al., 1982
Carbonatos	Trifosfato de sódio	Parsonage et. al., 1984
	Difosfato de sódio	Changgen e Yongxin, 1983
	Carboximetilcelulose (CMC)	Guimarães et. al., 2005
	Acido cítrico	Zheng e Smith, 1997
	Amido	Barrozo et. al., 2011
	Acidofluorídrico	Snow, 1982
Silício	Silicato de sódio	Al-Thyabat e Al-zoubi, 2012
	Cromato de Potássio	Qun e Heiskanen., 1990

FU e SOMASUNDARAM (1986) empregaram o vermelho de alizarina S, como depressor de calcita e apatita encontrando uma maior afinidade de este reagente com a apatita. O estudo mostra que para obter uma boa seletividade na flotação destes minerais é necessário controlar duas variáveis, o tempo de condicionamento e a concentração do reagente. Modificando essas variáveis é possível se obter a separação entre calcita e apatita. Os testes revelam que a adesão da molécula (reagente) é controlada mais pelos grupos OH^- que pelos grupos SO_3^- quando se empregam reagentes relacionados em estrutura química com o vermelho de alizarina S.

3.6.

Emprego de Microrganismos na Flotação Mineral

Nos últimos anos, vêm sendo estudados diversos tipos de microrganismos com a finalidade de ser empregados como bioreagentes (coletores ou depressoires) no processo de flotação para diversos sistemas minerais.

A demanda crescente de minerais no mundo todo levou à exploração de minérios de baixos teores. Este fato, associado às rigorosas especificações dos concentrados de flotação, às estritas leis de proteção ambiental e à necessidade de reduzir os custos operacionais, levou a inúmeras investigações com vista a encontrar uma melhor técnica de processamento e maior efetividade dos reagentes de flotação convencionais. Neste contexto, a biotecnologia é um processo atrativo, devido à flexibilidade que os microrganismos exibem interações com diversas superfícies minerais e a os baixos custos operacionais, além de representar também um processo com menor impacto ambiental (MESQUITA et. al. 2003).

Segundo HANUMANTHA RAO e VILINSKA (2008), a adesão da bactéria e/ou as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) no mineral induz um câmbio nas suas propriedades superficiais; esta modificação da superfície mineral é devido a uma ação complexa dos microrganismos. Existem três mecanismos diferentes por meio do qual a modificação pode ocorrer.

1. Fixação dos microrganismos no substrato sólido (superfície mineral).
2. Reações de oxidação.
3. Reações químicas com os produtos metabólicos.

A parede celular dos microrganismos está formada por diversos compostos como polímeros, peptídeos, fosfolipídeos, proteínas e ácidos micólicos; nos quais estão presentes os diferentes grupos funcionais como carboxila, amina básica, fosfato ácido, hidroxila, carbonila, metil, fenil. Estes microorganismos se aderem à superfície mineral diretamente ou indiretamente e utilizam a sua superfície celular ou polímeros extracelulares para catalisar reações químicas na superfície mineral (BOTERO et. al. 2007). Estes produtos metabólicos que são produzidos pelos microrganismos têm vantagens quando comparados com reagentes

convencionais, devido a sua biodegradabilidade e eficácia em baixas ou altas temperaturas e pH, além de ter menor toxicidade, SUBRAMANIAN et. al. (2003).

A composição do meio de cultura influi nas características da parede celular do microrganismo. Na tabela 5 podemos observar o tipo de bactérias e meio de cultura que usaram.

Tabela 5. Bactérias e os seus meios de cultura.

Microorganismo	Meio de cultura	Composição do meio de cultura	pH	Referência
<i>Thiobacillus Ferrooxidans</i>	9 K	3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.5 g/l K_2HPO_4 ; 0.1 g/l KCl	1.9	Hosseini et. al. 2005
<i>Rhodococcus Opacus</i>	Streptomyces; SM	10 g/l Glicose 5 g/l Peptona 5 g/l Extrato de malta 2.5 g/l Extrato de levedura	7.2	Botero et. al. 2007
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Leptospirillum; HH	40 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.132 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 62 ug $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 68 ug ZnCl_2 64 ug $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 31 ug H_3BO_3 10 ug Na_2MoO_4 67 ug $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.8	Hanumantha Rao e Vilinska, 2008
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Bromfield	0.5 g/l KH_2PO_4 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15 g/l Extrato de levedura 0,2 g/l MgSO_4 5 g/l sacarose	7.0	Sharma et. al. 2001
<i>Escherichia coli</i>	LB	10 g/l triptona 5 g/l extrato de levedura 10 g/l cloreto de sódio	-	Farahat et. al. 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPDA	10 g/l extrato de levedura 20 g/l glucose 20 g/l peptona	6.2	Usha Padukone e Natarajan, 2011

Dependendo da composição da parede celular do microrganismo, se classificam em dois grupos; as bactérias gram-positivas ou gram-negativas.

Na parede celular de uma bactéria gram-positiva o componente principal é a capa de peptidoglicano que pode ter até 40 subcapas e constituem pelo menos o 40% e algumas vezes até 90% da parede celular. A capa de peptidoglicano pode ter o 10% do volume total da bactéria. O restante da parede celular da bactéria está composta de polímeros aniônicos que estão covalentemente ligados aos peptidoglicanos (SHARMA, 2001).

Os peptidoglicanos consistem em cadeias de glicanos que contêm ácidos alternados tais como N-acetilglucosamine (NAG) e o N-acetilmurâmico (NAM); essas cadeias de glicanos estão ligadas umas as outras mediante cadeias curtas de peptidos os quais têm na sua composição quatro aminoácidos, que são o L-alanina, D-alaina, ácido glutâmico e ácido diaminopimélico (DAP). A capa de peptidoglicano apresenta carga negativa. Na figura 1 podemos ver a estrutura do peptidoglicano.

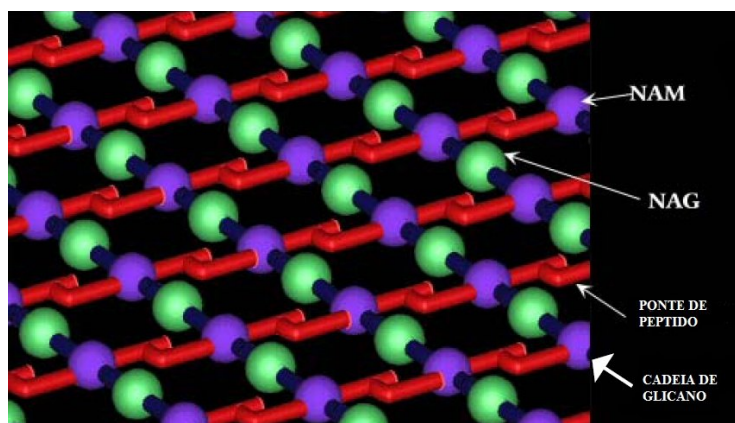


Figura 1. Estrutura química de um peptidoglicano (SHARMA, 2001).

Os tipos de polímeros aniônicos mais comuns são os ácidos teicóicos e urónicos. Os ácidos teicóicos são polímeros lineares de fosfatos alditol (fosfatos de glicerol, fosfato de ribitol, ou fosfato de manitol) ou fosfatos de açúcar (normalmente N-acetilglucosamine fosfato ou N-acetilgalactosamine fosfato) onde os grupos fosfatos conectam-se aos alditóis ou açúcares mediante ligações fosfodiéster. A natureza aniônica do ácido teicóico é devido à carga dos grupos fosfatos. Na figura 2 podemos ver os compostos presentes na parede celular de um microrganismo gram-positivo.

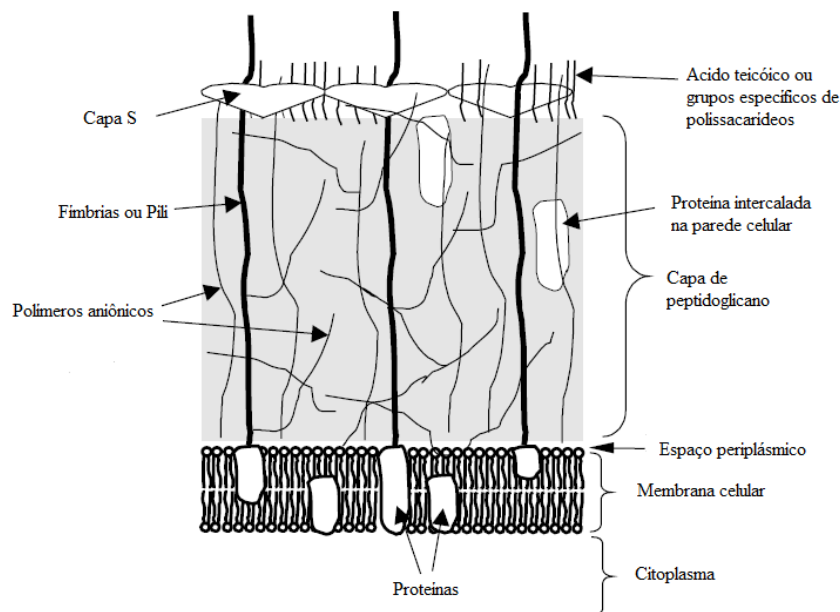


Figura 2. Parede celular de uma bactéria gram-positiva (SHARMA, 2001).

A bactéria *Rhodococcus opacus*, objeto deste estudo, é um microrganismo unicelular gram-positivo que tem uma variedade de compostos na sua superfície; esses compostos são polissacarídeos, ácidos carboxílicos, ácido micólicos e grupos lipídicos que oferecem um comportamento anfotérico à parede celular, BOTERO et. al. (2007).

Este microrganismo já foi avaliado como um bioreagente na flotação de quartzo e hematita mostrando uma maior preferência das bactérias pela superfície mineral da hematita, MESQUITA et. al. (2003). Outro estudo empregando o mesmo microrganismo foi estudado por BOTERO et. al. (2007) na qual os minerais de magnesita e calcita foram utilizados, obtendo uma maior afinidade das bactérias pela superfície da magnesita.

CAYLLAHUA e TOREM (2011) avaliaram a combinação dos processos de adsorção e flotação, com o objetivo de remover íons metálicos de alumínio (III) e níquel (II) utilizando a bactéria *Rhodococcus opacus*; obtendo uma melhor captação de níquel e alumínio em um pH em torno de 5.

O *R. opacus* foi cultivada utilizando o meio líquido Streptomyces, na qual emprego-se 48 horas para atingir o máximo crescimento das células. Na figura 3 podemos ver o crescimento das bactérias em função do tempo.

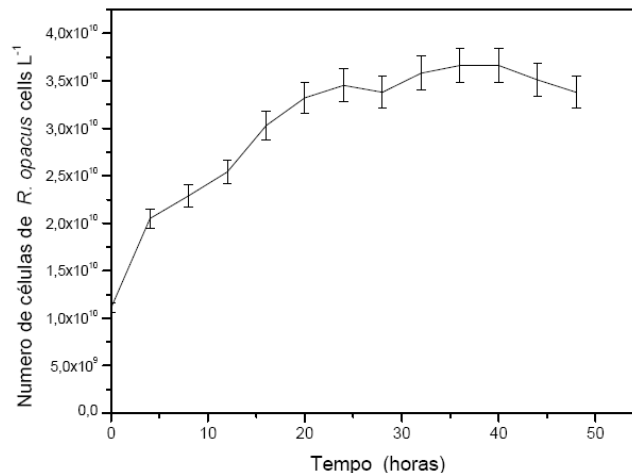


Figura 3. Curva de crescimento da bactéria *Rhodococcus opacus* (BOTERO et al. 2007).

3.6.1. Composição superficial do microrganismo

Segundo SHARMA (2001), a parede celular do microrganismo é uma estrutura que protege a membrana celular e tem as seguintes funções:

1. Prover uma plataforma rígida para fímbrias e flagelos;
2. Neutralizar os efeitos de pressão osmótica sobre a célula;
3. Promover os sítios de adesão para vírus;
4. Manter as características do microrganismo.

Existe a presença de grupos apolares como as cadeias de hidrocarbonos assim como também grupos polares (carboxila, hidroxila e fosfatos) na parede celular da bactéria; estes grupos ou produtos metabólicos podem modificar direta ou indiretamente a superfície mineral. O mecanismo direto envolve a adesão dos microrganismos às partículas minerais, já o mecanismo indireto se refere à adesão dos compostos biológicos do microrganismo, tais como os metabolitos secretados

e as substâncias poliméricas extracelulares (EPS), além das frações solúveis derivados da ruptura do microrganismo (GOVENDER e GERICKE, 2011).

Em um estudo realizado por CHANDRAPRABHA e NATARAJAN (2010), foi observada a presença de grupos funcionais como NH₃, NH₂, NH, CONH, CO, CH₃, CH₂, CH e COOH na superfície do microrganismo *A. ferrooxidans*.

Polissacarídeos extracelulares (PEC) contendo açúcar e ácido urônico foram isolados do metabolito produzido pela bactéria *Bacillus polymyxa* para ser usados como bioreagentes. Os estudos mostraram que é possível a flotação seletiva de esfalerita, empregando o PEC como depressor da galena num pH de 9.5. Estudos de infravermelho indicaram a presença de enlaces hidrogênio e interações químicas na adesão da PEC sobre a superfície dos minerais. Além da utilização de PEC, foram também testados outros dois componentes metabólicos, os carboidratos e as proteínas, mostrando que ambos componentes têm uma maior preferência pela superfície da galena (SANTHIYA et al., 2002).

SHARMA et. al. (2001) estudaram o efeito da adaptação da bactéria *Paenibacillus polymyxa* com sulfetos nos compostos da parede celular do microrganismo. A adaptação com minerais de pirita, calcopirita, galena e esfalerita mostraram de forma geral, um aumento de polissacarídeos, proteínas e cadeias alquílicas na parede celular da bactéria. Quando foi feita a adaptação com o mineral de esfalerita, se apresentou uma redução nos compostos mencionados. As bactérias adaptadas com galena mostram uma maior produção de proteínas.

3.6.2

Cargas elétricas na superfície do microrganismo

Em pH neutro, as bactérias apresentam uma carga superficial negativa na sua parede celular, isto devido à presença de peptidoglicanos que são ricos em grupos carboxila e amino. Os ácidos teicóicos que estão presentes na parede celular da bactéria são compostos ricos em fosfatos os quais também contribuem com a presença de cargas negativas. Do ponto de vista físico-químico, as propriedades dos microrganismos têm sido correlacionadas com partículas

coloidais. As bactérias adquirem cargas através da ionização de grupos funcionais na sua superfície, tais como amino, carboxila e grupos fosfatos, os quais são dependentes do pH. Existem contraíons que tendem a unir-se aos grupos carregados e desta maneira uma dupla camada é estabelecida na interface e a espessura de esta dupla camada depende da força iônica do eletrólito. De forma similar para uma interface sólido-líquido, a carga superficial do microorganismo pode ser caracterizada pelo potencial zeta e o ponto isoelétrico (PIE) estabelecido pelas medições de mobilidade eletroforética.

O aumento da força iônica incrementa a capacidade que tem a bactéria para aderir-se à superfície mineral, isto devido ao incremento de íons que atuam como pontes entre a superfície da bactéria e a superfície mineral e também gera a diminuição de espessura da dupla camada, (CHANDRAPRABHA e NATARAJAN, 2010). Na tabela 6 pode se observar os diversos pontos isoelétricos para diferentes cepas bacterianas.

Tabela 6. Pontos isoelétricos para diversas cepas de bactérias (BOTERO, 2007).

Microorganismo	PIE
<i>Arthobacter SP</i>	1,7
<i>Pseudomona olecorants</i>	1,7
<i>Pseudomonas SP</i>	2,2
<i>Pseudomanos putida</i>	3,2
<i>Coryneform SP</i>	2,6
<i>Rhodococcus erytropolis</i>	2,8
<i>Rhodococcus SP</i>	3,0
<i>Gordona SP</i>	3,4

3.6.3

Hidrofobicidade e hidrofiliidade

Os compostos presentes na parede celular do microorganismo lhe conferem características hidrofóbicas ou hidrofílicas. A hidrofobicidade da bactéria é conferida pela combinação de estruturas ou moléculas hidrofóbicas, que se encontram na superfície da bactéria. Quando o microorganismo hidrofóbico se

adere à superfície mineral torna esta também hidrofóbica, permitindo assim a adesão das partículas minerais às bolhas de ar, promovendo assim a flotação. Existe uma variação nas propriedades hidrofóbicas da bactéria que depende da proporção dos grupos graxos da sua parede, (MESQUITA et al. 2003; BOTERO et al., 2007).

As bactérias que apresentam uma maior quantidade de proteínas na sua parede celular contribuem em dar uma característica hidrofóbica, enquanto os polissacarídeos presentes na superfície da bactéria oferecem uma característica hidrofílica. No estudo da parede celular do microrganismo *Paenibacillus polymyxa*, feito por uma análise de infravermelho se observou uma superfície parcialmente hidrofílica e parcialmente hidrofóbica, (SHARMA et al., 2001; USHA PADUKONE e NATARAJAN, 2011).

Em um estudo realizado por TAN e CHEN (2012), os autores mostraram que a afinidade da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* no quartzo é provavelmente devido às características hidrofílicas que apresentam a bactéria e o mineral, mostrando um ângulo de contato de 22.7-25° e 30-45° respectivamente. A afinidade de uma bactéria hidrofílica é baixa sobre os sulfetos, provavelmente devido às características hidrofóbicas que apresentam os sulfetos mostrando um ângulo de contato de 65-85°. Em geral, a afinidade das bactérias depende, em grande medida, da molhabilidade que apresentam as superfícies dos minerais.

A bactéria não patogênica *Rhodococcus opacus* exibe uma significativa hidrofobicidade devido aos compostos presentes na sua parede celular, tais como ácido palmítico, ácido pentadecanóico, ácido micólico e traços de peptidoglicanos, (CALFA e TOREM, 2008).

Com a finalidade de evitar que o mineral de pirita esteja presente no concentrado final na flotação de carvão e prevenir a utilização de cianeto de sódio, foi desenvolvido um estudo por AMINI et al. (2009), onde avaliam a possibilidade de usar a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, com o objetivo de tornar a superfície do mineral de pirita hidrofílica e evitar a contaminação a causa do cianeto.

3.7. Adesão do microrganismo na superfície mineral

3.7.1. Mecanismos de adsorção

A formação do biofilme na interface sólido-líquido é mostrada na figura 4.

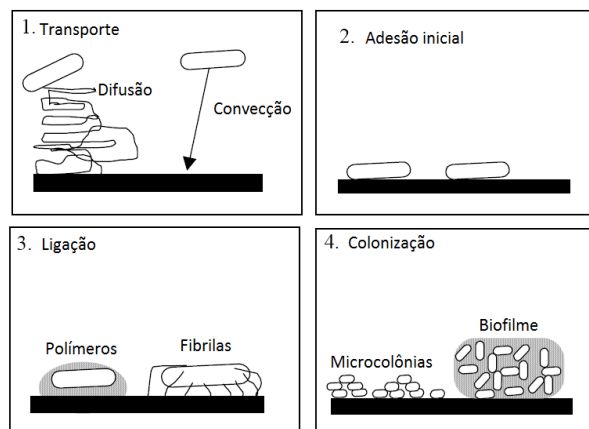


Figura 4. Etapas na colonização da superfície mineral por microorganismos (SHARMA, 2001).

Transporte. As bactérias podem atingir a superfície do mineral de três formas distintas (SHARMA, 2001).

1. Transporte por difusão. Este tipo de mecanismo apresenta-se mediante condições de repouso. As bactérias mostram um movimento browniano de 15 $\mu\text{m/h}$; esse movimento é responsável pelo contato aleatório das bactérias com a superfície mineral.
2. Transporte por convecção. As bactérias atingem a superfície do mineral mediante o fluxo interno do líquido. Este tipo de transporte é mais rápido do que o transporte por difusão. Contribui significativamente em fluxo turbulento.
3. Transporte ativo. É o movimento característico de um microrganismo ao longo de uma gradiente de concentração, causado por um estímulo químico. Este mecanismo não contribui significativamente em condições de fluxo turbulento e quando existem células imóveis.

Adesão inicial. É um processo físico-químico e pode ser dividido em duas diferentes etapas, reversível e irreversível. Adesão reversível se produz quando bactérias após a sua adesão à superfície, ainda apresentam movimento browniano de duas dimensões e podem ser retiradas da superfície por cisalhamento devido às correntes internas do líquido. Adesão irreversível ocorre quando as bactérias não apresentam movimento browniano e não podem ser removidas por alguma força cisalhante (SHARMA, 2001).

Ligação. Depois que as bactérias atingem a superfície mineral, os compostos presentes na parede celular da bactéria (fibrilas, polímeros) podem formar uma forte conexão com superfície mineral. Os polissacarídeos são importantes na formação destes biofilmes (SHARMA, 2001).

Colonização. Quando as bactérias se aderem firmemente, começam a crescer e formar novas bactérias que permanecem ligadas umas às outras, formando micro colônias e criando o biofilme (SHARMA, 2001).

No processo de flotação se precisa de poucos minutos para que as bactérias consigam se aderir à superfície mineral e se logre a separação das partículas minerais sob a forma de espuma; então um ponto que merece ser estudado em detalhe é a adesão inicial devido a que nestes poucos minutos a bactéria não tem suficiente tempo para ter uma forte ligação nem formar o biofilme com a superfície mineral.

A adesão do microrganismo com a superfície mineral depende de interações eletrostáticas, de van der Waals e ácido/base. Todas as interações estão em função das propriedades superficiais da bactéria como, carga superficial e hidrofobicidade. Os microrganismos aderidos à superfície mineral transferem as suas propriedades superficiais ao mineral (BOTERO et al. 2007).

3.7.2.

Forças que atuam na adesão

Para se conhecer como a bactéria permanece na superfície do mineral é preciso saber como atuam as diversas forças, que determinam se a adesão vai acontecer ou não; estas forças podem ser fracas ou fortes. As interações de Van Der Waals são usualmente de atração; ocorrem entre superfícies adjacentes e atuam em distâncias de separação maiores que 50 nm, esse tipo de interações são fracas. Já as interações eletrostáticas ocorrem a distâncias entre 10-20 nm se a bactéria e a superfície mineral apresentam cargas opostas então essas interações são de atração, porém se apresentam cargas iguais então as interações serão repulsivas e irão impedir que a bactéria se aproxime à superfície mineral. As forças de repulsão decrescem com o incremento da força iônica do meio, por exemplo, a água de mar tem suficiente concentração de eletrólito para eliminar as forças repulsivas (SHARMA, 2001).

A água absorvida pela bactéria ou pela superfície mineral representa uma barreira para a adesão, contudo, se as superfícies apresentam grupos apolares, estes grupos podem ajudar na remoção da água devido às interações hidrofóbicas e desta maneira promover o mecanismo de adesão ou facilitando a aproximação (SHARMA, 2001).

3.7.3

Ligações de íons metálicos no microorganismo

A parede celular de uma bactéria gram-positiva pode ser considerada como uma camada microporosa com a capacidade de trocar íons, além disso, contêm grupos funcionais não-iônicos capazes de formar complexos com cátions metálicos presentes na superfície mineral. As superfícies destas bactérias são tipicamente aniônicas, portanto interagem com cátions, permitindo a ligação da bactéria com a superfície mineral. O peptidoglicano e ácido teicóico que se encontram presentes na parede celular da bactéria *B. subtilis* são fortemente aniônicas o que promove o enlace com íons positivos.

No caso de *Bacillus subtilis*, quando se encontra na presença de fosfatos (apatita, dolomita) as ligações de íons de Mg^{2+} são maiores que os íons de Ca^{2+} . A ligação de íons de Mg^{2+} com a parede da bactéria é dez vezes maior que com os íons Ca^{2+} e também apresenta uma maior ligação quando comparado com íons de Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} e outros metais. Isto implica que a ligação metálica de bactérias é seletiva e que o ácido teicóico é o responsável pela ligação com íons de Mg^{2+} (ZHENG, 1998).

Assim, as ligações características desta bactéria podem ajudar a entender a adesão de outras bactérias gram-positivas às superfícies minerais que contem Ca^{2+} e Mg^{2+} na sua superfície.

3.7.4 **Isotermas de adsorção**

As isotermas de adsorção definem a relação que existe entre a quantidade de bactérias aderidas por unidade de massa do mineral e a concentração de bactérias na solução no equilíbrio, a uma temperatura constante.

No processo de adsorção, quando se obtém o equilíbrio, se tem certa quantidade de bactérias aderidas e imobilizadas na superfície mineral e a outra porção de bactérias se encontram dissolvidas na solução aquosa (CAYLLAHUA, 2008; BUENO, 2007; PINO, 2005). A natureza do mineral (sítios ativos, íons presentes) e da bactéria (compostos da parede celular) são determinantes no alcance do equilíbrio.

Assim, em condições de equilíbrio, a capacidade de captação do mineral pode ser quantificada através de diferentes concentrações de bactéria para um pH e uma temperatura constante (ZOUBOULIS et al., 2004). Na construção das isotermas, se obtém uma variável simbolizada pela letra q , denominada como captação, a qual expressa a quantidade de bactérias aderidas por unidade de massa do mineral. A captação pode ser obtida com a formula 1.

$$q = \frac{V(C_i - C_f)}{M} \quad (1)$$

Onde:

q: Captação do mineral (mg de bactéria/ g mineral)

V: Volume da solução (litro)

C_i: Concentração inicial de bactéria (mg de bactéria /litro)

C_f: Concentração final ou em equilíbrio, de bactéria (mg de bactéria/litro)

M: Massa do mineral (gramas)

A expressão gráfica da isoterma é geralmente uma curva, mas pode apresentar-se de forma linear como se pode observar na figura 5.

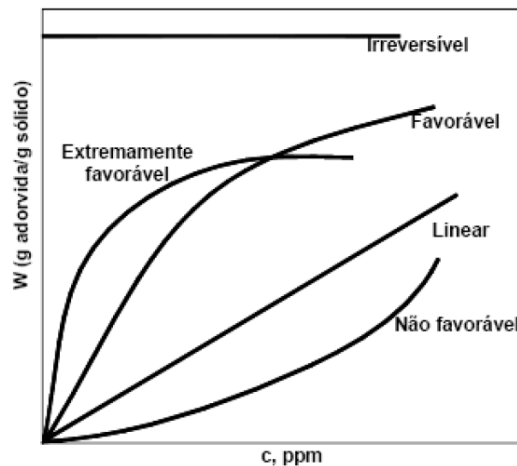


Figura 5. Formas comuns das isotermas de adsorção (PINO, 2005).

No processo de adsorção, as relações de equilíbrio são apresentadas na forma de modelos matemáticos que correlacionam a quantidade de bactérias aderidas na superfície mineral com as bactérias não aderidas. Os modelos mais usados que avaliam a adsorção são os de Langmuir e Freundlich, mas existem outros como o modelo de Dubinin-Raduchkevich, Redlich-Peterson, Temkin e Sips (CAYLLAHUA, 2008).

3.7.4.1. Isoterma de Langmuir

O cientista Langmuir propôs um modelo com a finalidade de explicar a adsorção sobre uma superfície homogênea, não porosa e infinita. O modelo baseia-se no movimento e interações das moléculas adsorvidas pela superfície do adsorvente, de modo que, a medida que mais moléculas são adsorvidas, vão formando uma distribuição uniforme, gerando uma monocamada na superfície do adsorvente (AMUDA et al., 2007).

O modelo de Langmuir assume que: (a) a adsorção é reversível, (b) a adsorção é limitada a monocamada, (c) a superfície contém um número fixo de sítios de adsorção, (d) as espécies adsorvidas interagem somente com um sítio e não entre elas, (e) os sítios de adsorção são energeticamente idênticos (RADHIKA e PALANIVELU, 2006; REYNOLDS e RICHARDS, 1992).

O modelo de Langmuir é representado pela equação 2:

$$q = \frac{q_{max} K_{ads} C_f}{(1 + K_{ads} C_f)} \quad (2)$$

Onde:

q : quantidade de bactérias retidas no sólido no equilíbrio (mg/g)

q_{max} : parâmetro de Langmuir relativo à capacidade de adsorção (mg/g)

K_{ads} : constante de Langmuir relativa à energia de adsorção (L/mg)

C_f : concentração de bactérias na solução em equilíbrio (mg/L)

Os parâmetros de adsorção, q_{max} e K_{ads} , podem ser determinados graficamente, linearizando a equação 2 e resultando na equação 3.

$$\frac{C_f}{q} = \frac{1}{q_{max} K_{ads}} + \frac{C_f}{q_{max}} \quad (3)$$

A representação gráfica de C_f/q em função de C_f é uma reta com interseção igual a $1/(K_{ads}q_{max})$ e inclinação igual a $1/q_{max}$. Os dois parâmetros, obtidos a partir das isotermas, podem ser avaliadas mediante a equação 4.

$$R = \frac{1}{1 + q_{max}K_{ads}} \quad (4)$$

Na tabela 7 se pode observar a relação entre o valor de R e a possibilidade de adesão entre a superfície do mineral e a parede celular da bactéria.

Tabela 7. Relação entre o fator de separação e o tipo de isoterma (AMUDA et al., 2007).

Fator de separação, R	Tipo de Isoterma
$R > 1$	Desfavorável
$R = 1$	Linear
$0 < R < 1$	Favorável
$R < 0$	Irreversível

3.7.4.2 Isoterma de Freundlich

O cientista Freundlich, em 1907, propôs um modelo puramente empírico para adsorção de gases em superfícies sólidas. O modelo não está estruturado para adsorção em monocamada, porém considera a adsorção em multicamada e não prevê a saturação da superfície baseada no processo de adsorção. O modelo pode ser aplicado a sistemas não ideais e em superfícies heterogêneas. A equação de Freundlich foi originalmente introduzida, admitindo-se que a energia de distribuição para os sítios de adsorção é essencialmente exponencial, indicando que a adsorção das espécies em solução aumentará com o aumento de sua concentração, em sistemas suficientemente diluídos (VOLESKY e HOLAN, 1995; PINO, 2005; MEZZARI, 2002; KALAVATHY et al., 2005).

O modelo de Freundlich é representado pela equação 5:

$$q = K_f C_f^{1/n} \quad (5)$$

Onde:

q: quantidade de bactérias retidas no sólido no equilíbrio (mg/g)

K_f : constante relacionada à capacidade de adsorção do mineral (L/g)

n : constante relacionada à eficiência de adsorção.

C_f : concentração de bactérias na solução em equilíbrio (mg/L)

As constantes de K_f e “n” podem ser determinadas graficamente, pela equação 6 .

$$\log q = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_f \quad (6)$$

A representação gráfica de $\log q$ em função de $\log C_f$ é uma reta com interseção igual a $\log K_f$ e inclinação igual a $1/n$. Valores de “n” na faixa de $1 < n < 10$ indicam adsorção favorável.

4 Materiais e Métodos

4.1 Preparação das amostras minerais

No presente trabalho utilizaram-se amostras do mineral de apatita de alta pureza a fim de garantir confiabilidade e reprodutibilidade nos resultados. O mineral foi fornecido pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM). O grau de pureza da amostra de apatita foi determinado mediante análise de difração e fluorescência de raios X.

Depois de uma seleção manual das amostras minerais de apatita, estas foram fragmentadas e moídas até atingir os diferentes tamanhos para todos os ensaios realizados. A tabela 8 mostra o tamanho de partícula mineral utilizado nos diversos testes.

Tabela 8. Ensaios e frações granulométricas

Experimento	Tamanho de Partícula
Testes de potencial Zeta	$< 38 \mu\text{m}$
Experimentos de adesão	$(74 - 38) \mu\text{m}$
Medidas de ângulo de contato	$(0,5 \times 0,5 \times 1,0) \text{ cm}$

Com a finalidade de empregar uma amostra livre de impurezas, utilizou-se uma solução de HCl 0.01 M para uma rápida lavagem no meio ácido devido à alta solubilidade do mineral; após esta etapa, a amostra foi submetida a varias lavagens com água Milli-Q (água deionizada) até que retornasse ao pH inicial da água Milli-Q. Posteriormente, as amostras foram secadas no forno a uma temperatura de 70°C e mantidas em um dessecador até o momento dos ensaios.

4.2

Cultivo e obtenção da bactéria *Rhodococcus opacus*

A bactéria *Rhodococcus opacus* é uma espécie não patogênica e foi obtida e isolada do solo. Foi fornecida pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI – UNICAMP.

Para o cultivo da bactéria, utilizaram-se placas de Petri e erlenmeyer autoclavados a 1,2 atm de pressão, durante 20 min. Com o material de vidro esterilizado, se procede a fazer um cultivo de bactérias em placas de Petri, que foram estocadas em geladeira para a realização de todos os experimentos. O meio de cultura empregado para a propagação das bactérias pode ser observado na tabela 9.

Tabela 9. Composição do meio de cultura.

Componente	Meio líquido (g/L)	Meio sólido (g/L)
Glicose	10	4
Peptona	5	5
Extrato de malte	3	10
Extrato de levedura	3	4
CaCO ₃	-	2
Agar	-	12

A partir das placas Petri se faz outro subcultivo em frascos Erlenmeyer de 500 ml, este procedimento foi realizado em uma capela para evitar que durante a manipulação, outros microrganismos ingressem e cresçam no meio de cultura. Depois os frascos são levados a um shaker a 170 rpm durante 48 ou 70 horas, a uma temperatura de 28°C e 170 rpm. Na figura 6 pode-se observar os instrumentos e equipamentos utilizados no cultivo da bactéria.



Figura 6. Placa de Petri, capela e shaker rotativo.

Ao atingirem o crescimento máximo, as bactérias presentes nos frascos erlenmeyer foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm; descartando a parte líquida, foi feito um concentrado com a parte sólida do processo de centrifugação e depois foi introduzido em um frasco com uma solução de NaCl 10^{-3} M. Este concentrado foi levado à autoclave nas mesmas condições de esterilização (1,2 atm durante 20 minutos) com a finalidade de evitar a contaminação, além de tornar inativas as bactérias. Depois de atingir a temperatura ambiente, o concentrado foi guardado na geladeira. Na figura 7 se observa os equipamentos utilizados nos experimentos.



Figura 7. Centrifuga digital e Espectrofotômetro UV-1800.

Para determinar a concentração celular da suspensão foi feita uma curva de calibração de peso seco das bactérias por absorbância, em um espectrofotômetro (UV-Spectrophotometer, UV-1800, Shimadzu). O comprimento de onda que foi utilizado foi característico da bactéria ($\lambda=620\text{nm}$).

4.3 Ensaio de adesão

Os ensaios de adesão foram feitos num eletrólito indiferente de $\text{NaCl } 1 \times 10^{-3}$ M, durante 30 minutos, a 175 rpm e a três temperaturas, também em cada ensaio foram usadas 10 gramas de mineral por litro. Os ensaios foram feitos em duplicata.

O ensaio consistiu em colocar um grama de mineral de apatita em um frasco contendo 100 ml de $\text{NaCl } 0,001\text{M}$, e depois adicionar uma concentração inicial de bactérias nos frascos, que posteriormente foram levados até um shaker rotativo durante 30 minutos, a 170 rpm. Após as bactérias se aderirem à superfície mineral no transcurso desse tempo, a suspensão de bactérias foi levada até uma centrífuga a uma velocidade de 2000 rpm durante 5 minutos. A concentração final de bactérias foi determinada no sobrenadante, usando uma curva de calibração feita com antecedência no espectrofotômetro UV-1800 como é mostrada na figura 8.

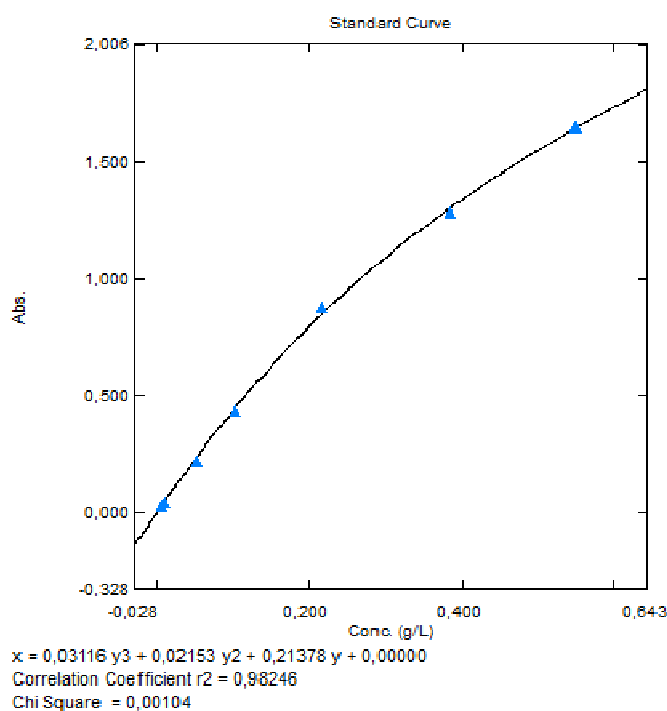


Figura 8. Curva de calibração de peso seco da bactéria em função da absorbância.

4.4

Influência nas amostras antes e após a interação com a bactéria *R. opaccus*

4.4.1

Medidas de ângulo de contato

Para avaliar uma possível mudança na hidrofobicidade da superfície da amostra de apatita após da interação com a bactéria *R. opaccus*, foram medidos os valores de ângulo de contato em um Goniômetro Ramé Hart-inc modelo 100-00-115, o equipamento é mostrado na figura 9.

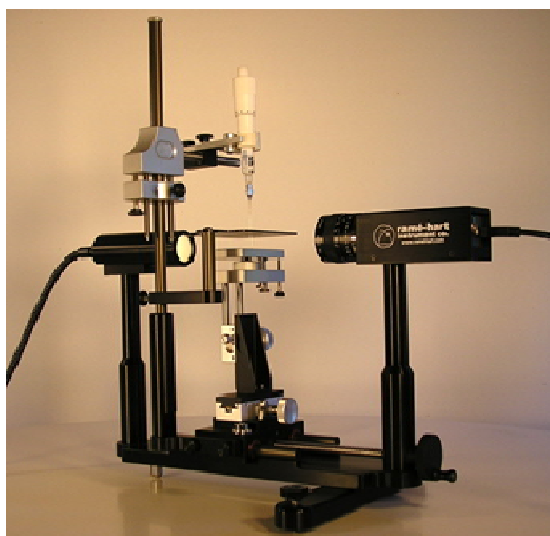


Figura 9. Goniômetro Ramé Hart-inc.

Uma seção de amostra de apatita medindo 0,5 x 0,5 x 0,1 cm, foi moldada com resina epóxi. O topo da superfície da amostra foi cuidadosamente polida até chegar a suspensão diamante (1 μ m). Para remover pequenas partículas aderidas à superfície da amostra, ela foi levada a banho ultrassom durante 2 minutos e logo lavada com jatos de água Milli-Q.

Empregaram-se soluções da bactéria *R. opacus* com uma concentração de 0,1 g/L em uma solução de NaCl 10⁻³ M a diferentes valores de pH. Os valores foram ajustados com HCl e NaOH. Depois se colocou gotas da solução de bactéria sobre a superfície da amostra e deixou-se em repouso durante 10 minutos. Para remover as células não aderidas na superfície da amostra, foi feita uma

lavagem com NaCl 10^{-3} M. A amostra foi submergida e na mesma solução foram liberadas bolhas de ar com um tamanho de $5\mu\text{m}$ de diâmetro sobre a sua superfície, sendo determinadas as medidas de ângulo de contato no goniômetro. Utilizou-se o método de bolha cativa. As medidas foram feitas em triplicata. Antes de cada ensaio, realizou-se um polimento com suspensão de diamante e banho ultrassom para remover as células aderidas à superfície.

4.4.2 Medidas de potencial zeta

As medidas de potencial zeta para a bactéria *R. opacus* assim como para o mineral de apatita foram realizadas em um equipamento de micro eletroforese do modelo Zeta meter system +4.0. O equipamento consegue determinar os valores de potencial (mV), baseado na velocidade da partícula em suspensão submetida a uma diferença de voltagem entre dois eletrodos. O equipamento é mostrado na figura 10.

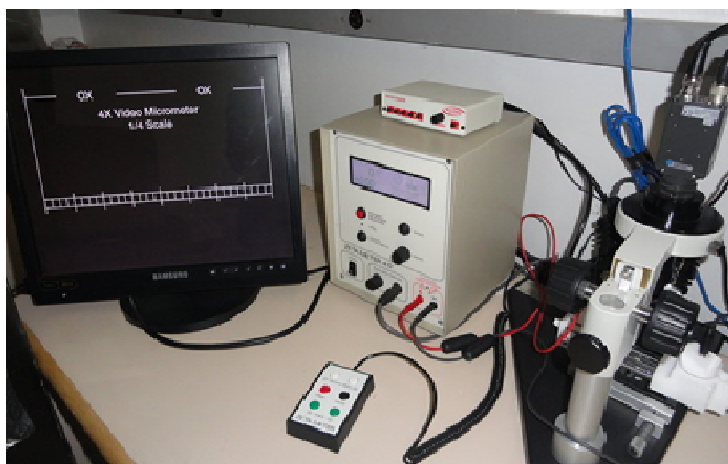


Figura 10. Zeta meter system +4.0.

Foram preparadas soluções separadas de bactéria *R. opacus* e mineral de apatita, com uma concentração de 0,1 g/L em um eletrólito indiferente de NaCl 1×10^{-3} M. As medições do potencial foram feitas em função do pH e estes valores foram ajustados com alíquotas de NaOH e HCl. Para garantir uma medição confiável, tomou-se a média aritmética de 20 valores e o valor do desvio padrão.

Para avaliar a influência da interação das bactérias com a superfície mineral, foram realizadas também medidas de potencial zeta. Em um balão volumétrico foram misturadas concentrações conhecidas de bactéria e mineral. Agitou-se a solução e se deixou em repouso durante 15 minutos. Após o repouso o sobrenadante da solução foi introduzido na célula acrílica do Zeta Meter +4.0 para realizar as medidas. Utilizou-se diferentes valores de pH e um eletrólito indiferente de NaCl $1 \times 10^{-3} \text{M}$.

4.4.3.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com a finalidade de obter imagens para observar o fenômeno de adesão da bactéria *R. opacus* na superfície do mineral de apatita, foi utilizado um microscópio eletrônico Carl Zeiss – DSM 960 pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais.

Antes de realizar a análise da bactéria pelo MEV foi necessária uma preparação: primeiro fixou-se a estrutura da bactéria durante um período de 3 horas em glutaraldeído, preparado com uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, a amostra desidratou-se ao ser mergulhada em uma solução de acetona, para logo ser transferida para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico de CO_2 . Finalmente a amostra foi metalizada com ouro.

As partículas de mineral de apatita também foram metalizadas, isto consiste em um recobrimento em ouro, em um sistema a vácuo do tipo BAL-TEC, com a finalidade de possibilitar a condução da corrente elétrica pelas superfícies das partículas.

5 Resultados e Discussões

5.1. Caracterização da amostra de apatita

A análise de difração e fluorescência de raios X foram feitas para determinar as fases e componentes da amostra mineral de apatita. Os valores podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10. Fases e componentes da amostra mineral.

Fase	Apatita (%)	Componente	Apatita (%)
Fluorapatita	97,9	P ₂ O ₅	39,96
Quartzo	1,5	CaO	53,14
Rutilo	0,1	Cl	-
Talco	0,5	PF	0,10
Calcita	-	CaO/ P ₂ O ₅	1,33

Mediante a análise de difração de raios X, determinou-se o grau de pureza da amostra mineral de apatita, igual a 97,9% da fase de Fluorapatita, mostrando impurezas de quartzo, rutilo e talco. Mediante a análise de fluorescência de raios X, determinaram-se quantitativamente os componentes presentes na amostra mineral; encontrando uma relação de CaO/ P₂O₅ igual a 1,33.

5.2. Medidas de ângulo de contato

O efeito da interação da bactéria com a superfície mineral foi avaliado mediante a verificação da variação do ângulo de contato em função do pH, como

se mostra na figura 11. Antes da interação microbiana, os resultados de ângulo de contato mostraram valores em torno de zero para o mineral de apatita.

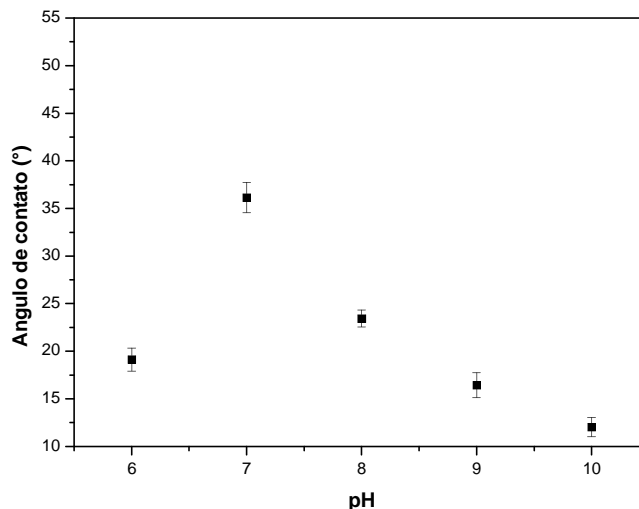


Figura 11. Ângulo de contato do mineral de apatita após interação com a bactéria *R. opacus*. Concentração celular 0,1 g/L. Tempo de interação 5 minutos.

Devido às propriedades hidrofóbicas da bactéria, a superfície mineral de apatita pode se tornar hidrofóbica após da interação entre elas (BOTERO, 2007). Pode-se observar na figura 12 que dos cinco valores de pH testados, em pH 7 se consegue atingir um ângulo de contato maior (36 graus), mostrando uma mudança na característica superficial do mineral, devido a uma maior quantidade de bactérias aderidas à superfície mineral neste valor de pH. Os valores de ângulo de contato nos outros valores de pH, mostram uma menor interação entre a bactéria e as partículas minerais de apatita.

MESQUITA et al. (2003) e BOTERO, (2007), observaram variações no ângulo de contato após a interação da bactéria *R. opacus* com a superfície de minerais de hematita, quartzo, calcita e magnesita.

5.3. Medidas de potencial zeta

Os resultados mostram as curvas de potencial zeta do mineral de apatita antes e após a interação com a bactéria *Rhodococcus opacus*.

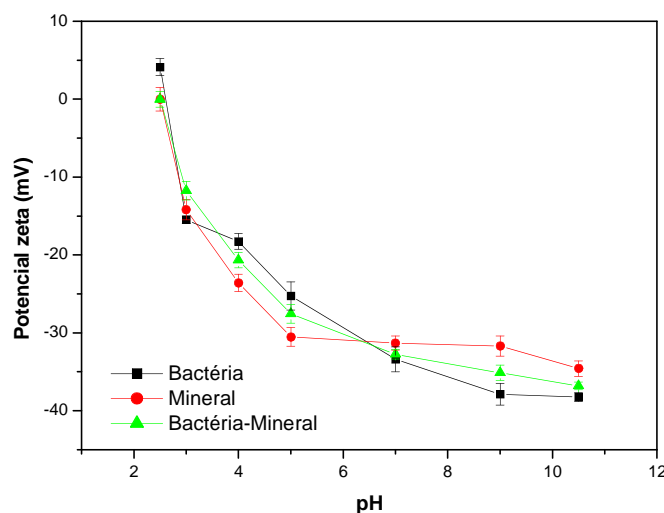


Figura 12. Curva de potencial zeta do mineral de apatita e da bactéria. Eletrólito indiferente NaCl $1 \times 10^{-3} \text{M}$. Concentração de bactéria e mineral 0,1 g/L.

Pode-se observar na figura 12 um valor do ponto isoelétrico (PIE) para a bactéria *R. opacus* em torno de 2,8; resultado que coincide com um estudo feito por VAZQUEZ et al. (2007). Outros autores como BOTERO et al. (2007), CAYLLAHUA et al. (2009) e BUENO et al. (2008) encontraram um valor da mesma cepa microbiana em torno 3,2. Isto devido possivelmente às condições de cultivo e origem da cepa. Em pH 7 pode se observar que o mineral, após a interação com a bactéria, apresenta características eletrocinéticas parecidas com as da bactéria, o que sugere que existe uma maior adesão neste pH. Esta observação está em concordância aos resultados apresentados no item 5.5.2 que mostra a influência do pH.

Os resultados não apresentam uma diferença entre o ponto isoelétrico da bactéria *R. opacus* e o mineral, sugerindo que as ligações eletrostáticas não

predominam entre a parede celular do microrganismo e a superfície mineral. Pode-se observar que a curva do mineral após a interação, se junta à curva da bactéria o que sugere que os compostos da parede celular da bactéria se aderiram à apatita, mudando as cargas iniciais na superfície mineral. De acordo com os resultados, as curvas de potencial zeta sugerem a predominância de ligações de tipo químicas, pois as duas superfícies (bactéria e mineral) apresentam cargas iguais antes a adesão.

EL-SHALL et al. (2002) encontraram variações nas medidas de potencial zeta de minerais de apatita e dolomita utilizando o microrganismo codificado como CTR3. Neste estudo se sugere que existe a predominância de interações químicas entre a apatita e o microrganismo.

5.4. Imagens no Microscópio eletrônico de varredura

As imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) apresentam a bactéria *R. opacus* aderida sobre a superfície do mineral de apatita.

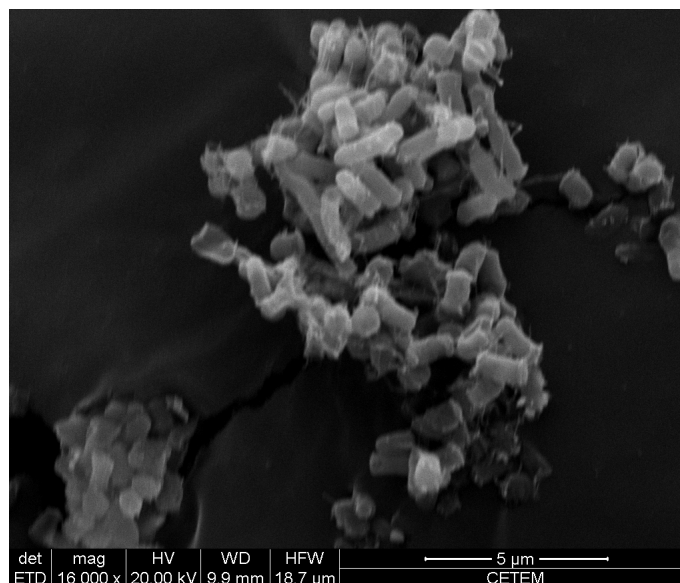


Figura 13. Imagem do MEV mostrando as células da bactéria *Rhodococcus opacus*. Aumento 16000X.

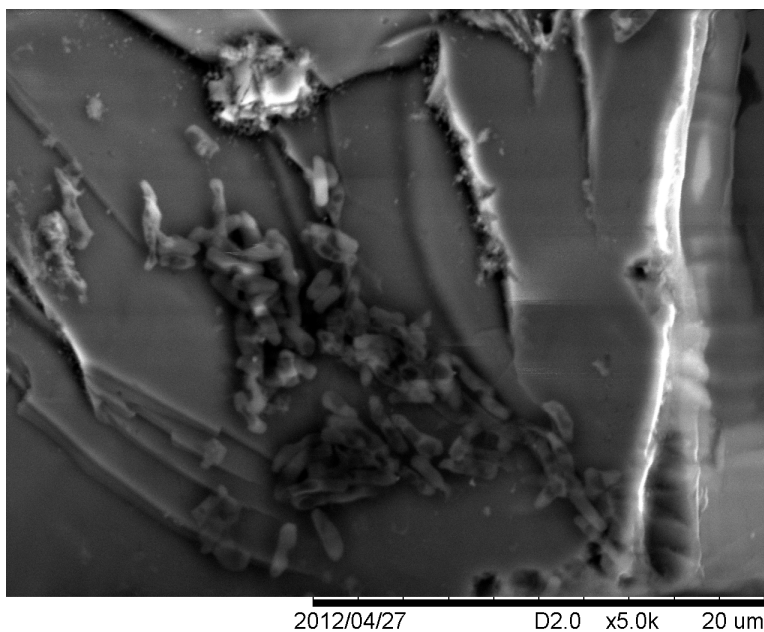


Figura 14. Imagem do MEV mostrando as células da Bactéria *Rhodococcus opacus* aderidas sobre a superfície de apatita. Aumento 5000X. Tempo de interação 30 minutos.

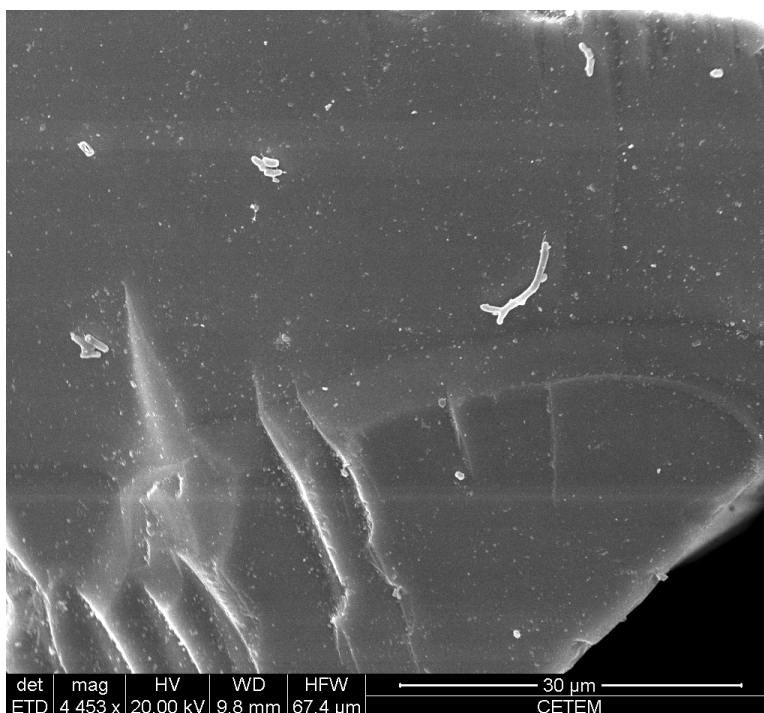


Figura 15. Imagem do MEV mostrando as células da Bactéria *Rhodococcus opacus* aderidas sobre a superfície de apatita. Aumento 4453X. Tempo de interação 2 minutos.

As figuras 13, 14 e 15 mostram bactérias de forma alargada e esférica (BOTERO, 2007) o que sugere que existe uma mistura de fases no crescimento (exponencial e estacionária), provavelmente porque as bactérias passam um maior tempo no shaker rotatório. Pode-se observar nas imagens que existe uma interação entre bactérias, mesmo assim, elas conseguem aderir-se à superfície do mineral.

Numerosos estudos de adesão microbiana sobre as superfícies de diversos minerais foram realizadas e as imagens apresentadas por diferentes autores (ZHENG et al. 2001; SANTHIYA et al. 2001; CHANDRAPRABHA e NATARAJAN, 2006; FARAHAT et al. 2008; PATRA e NATARAJAN, 2008).

5.5. Ensaio de adesão

5.5.1 Influência da concentração inicial

Nas tabelas 11, 12 e 13 se apresentam a relação que existe entre a concentração inicial da bactéria e a sua capacidade de adesão (captação) sobre a superfície mineral de apatita.

Tabela 31. Influência da concentração inicial na captação. T=293 K.

Concentração Inicial	Captação (mg bactéria/ g mineral)				
	pH				
	6	7	8	9	10
0.025	1,55	1,65	1,50	1,45	1,25
0.05	2,65	2,85	2,70	2,55	2,30
0.1	5,30	5,55	5,40	5,05	4,90
0.2	11,25	11,45	11,35	10,85	10,25
0.3	17,05	17,45	17,10	16,75	16,60
0.4	22,40	22,50	22,45	22,35	22,20

Tabela 12. Influência da concentração inicial na captação. T=303 K.

Concentração Inicial	Captação (mg bactéria/ g mineral)				
	pH				
	6	7	8	9	10
0.025	1,55	1,75	1,60	1,55	1,40
0.05	2,75	3,00	2,80	2,65	2,45
0.1	5,50	5,75	5,60	5,30	5,15
0.2	11,60	11,80	11,70	11,15	10,55
0.3	17,55	17,95	17,65	17,30	17,15
0.4	23,20	23,30	23,25	23,15	23,05

Tabela 13. Influência da concentração inicial na captação. T=313 K.

Concentração Inicial	Captação (mg bactéria/ g mineral)				
	pH				
	6	7	8	9	10
0.025	1,65	1,90	1,75	1,65	1,45
0.05	2,85	3,15	2,90	2,75	2,55
0.1	5,70	5,95	5,80	5,60	5,45
0.2	11,90	12,10	12,00	11,45	10,85
0.3	18,05	18,45	18,15	17,8	17,65
0.4	24,00	24,10	24,05	23,95	23,85

Os resultados obtidos neste estudo apresentam um incremento na captação devido ao aumento da concentração inicial da bactéria. Sugere-se que este fenômeno acontece porque existe uma maior probabilidade de colisão entre a parede bacteriana e a superfície mineral de apatita; isto porque existe uma quantidade maior de bactérias na solução. A figura 16 mostra este fenômeno.

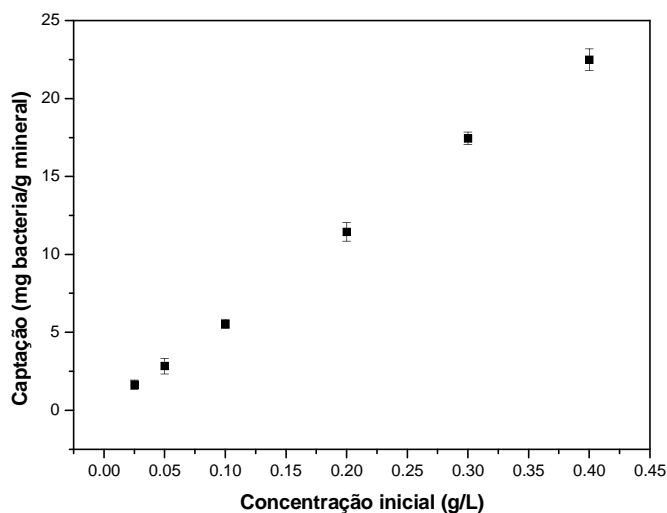


Figura 16. Efeito da concentração inicial da bactéria na adesão. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 1×10^{-3} M.

Nos resultados apresentados por SCHILLING et al. (1994) onde se estudou a adesão da bactéria *Actinomyces naeslundii* sobre a superfície de hidroxiapatita, é mostrado um incremento na captação, quando existe um aumento na concentração de bactérias. O mesmo fenômeno foi apresentado num estudo feito por BOTERO et al. (2007) usando a cepa *R. opacus* com minerais de calcita e magnesita para um pH 7.

5.5.2 Influência do pH

O valor do pH da solução bactéria-mineral é um parâmetro importante nos resultados de adesão. Devido à uma maior solubilidade no meio ácido do mineral de apatita, os valores de pH foram acima de 6. A figura 17 mostra o efeito do pH na adesão.

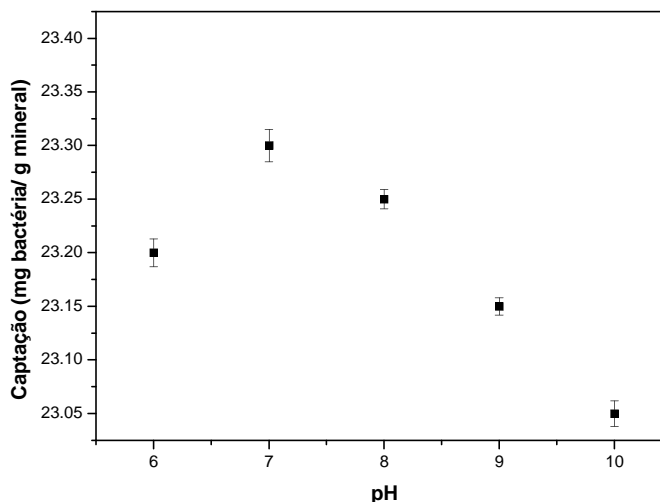


Figura 17. Efeito do pH na adesão da bactéria *R. opacus* sobre a superfície mineral de apatita. Concentração inicial 0.4 g/L. Temperatura 303 K. Eletrólito indiferente NaCl 1×10^{-3} M.

Mediante os resultados obtidos pode-se observar a influência da concentração de íons H^+ e OH^- na adesão da bactéria sobre o mineral. Sugere-se que estes íons interagem com os grupos funcionais das diversas moléculas presentes na parede celular da bactéria (proteínas, ácido micólico, peptidoglicanos, etc), ativando tais moléculas, permitindo a interação entre elas e com a superfície mineral. Para valores de pH diferentes de 7, a capacidade de adesão da bactéria sobre a superfície mineral tende a diminuir; isto também foi encontrado por RONG et al. (2010) no estudo de adesão da bactéria *Pseudomonas putida* sobre a superfície de goetita. Os resultados obtidos em este item podem ser comparados com a figura 11, onde se mostra que existe uma melhor afinidade da bactéria sobre a superfície mineral em um pH 7.

Os resultados sugerem que em um pH neutro, existe uma afinidade maior entre bactéria e mineral, portanto apresenta-se uma quantidade maior de bactérias aderidas sobre a superfície mineral; o valor de captação obtido neste pH é de 23,30 mg bactéria/g mineral para uma concentração inicial de 0,4 g/L. Em um estudo realizado por JIANG et al., (2007) se apresentaram variações na captação, devido à influencia do pH na adesão da bactéria *Pseudomonas putida* sobre os minerais de caulinita, goetita e montmorilonita.

5.5.3 Isotermas de adsorção

Os dados experimentais de captação e concentração final foram ajustados aos modelos de Langmuir e Freundlich na forma linearizada, no pH de melhor captação. A partir destes modelos, se obtêm parâmetros que são utilizados para a análise da afinidade que tem a bactéria *Rhodococcus opacus* pela superfície mineral de apatita. A figura 18 mostra os dados experimentais de captação e concentração final antes de serem submetidos aos modelos de adsorção.

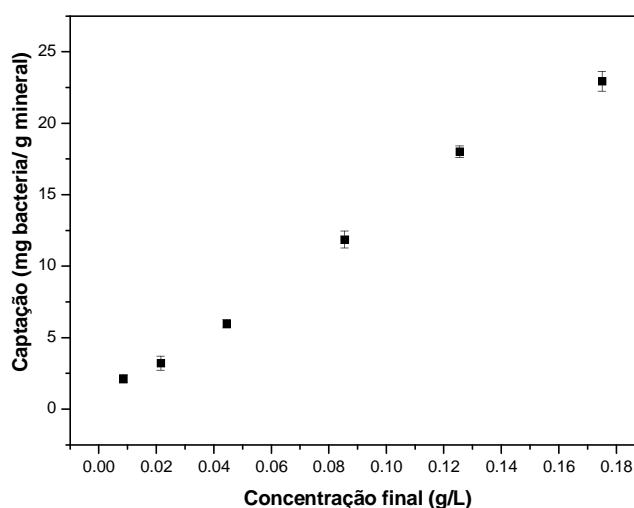


Figura 18. Dados experimentais de captação em função da concentração final da bactéria. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 10-3M.

Os dados experimentais mostrados na figura 18 apresentam um comportamento similar ao estudo realizado por CHANDRAPRABHA e NATARAJAN (2006), onde avaliaram a adesão da bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* sobre as superfícies de pirita e calcopirita.

5.5.3.1. Modelo de Langmuir

Na figura 19 pode se observar que os dados experimentais não se ajustaram à isoterma de Langmuir na forma linearizada.

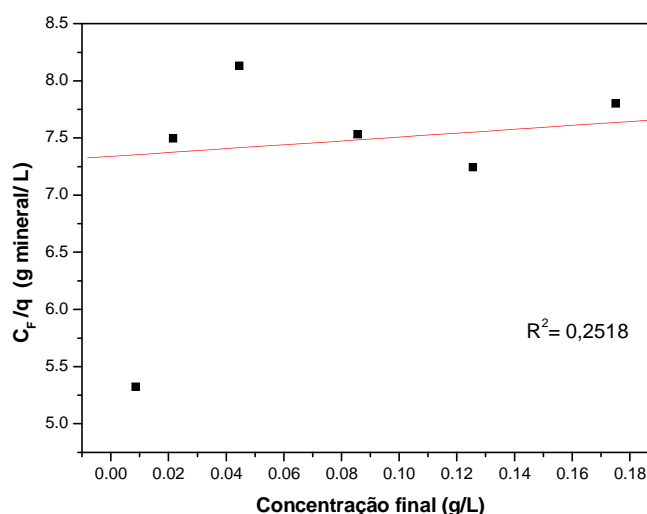


Figura 19. Isotherma linearizada de Langmuir com os dados não ajustados. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 10-3 M.

Isto aconteceu porque este modelo assume que as bactérias adsorvidas interagem somente com um sítio e não entre elas, assim como a uniformidade da superfície mineral (item 5.4 figura 14), além de ser aplicável só para processo reversível, o que não está em concordância com os resultados apresentados nos itens 5.3 e 5.5.5, onde se sugere a predominância de interações específicas (enlaces covalentes), sendo estas irreversíveis devido ao compartilhamento de um ou dois pares de elétrons entre átomos, causando uma atração entre eles, que mantém a molécula resultante unida.

5.5.3.2. Modelo de Freundlich

A figura 20 apresenta os dados experimentais ajustados ao modelo linearizado de Freundlich.

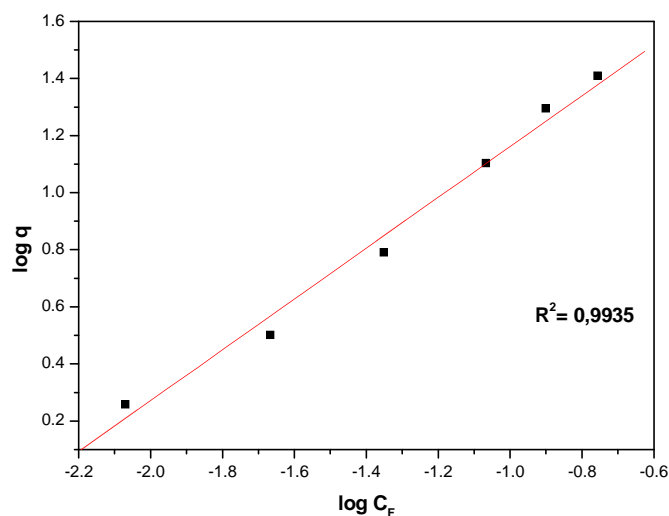


Figura 20. Isotherma linearizada de Freundlich. pH 7. Temperatura 293 K. Eletrólito indiferente NaCl 10-3 M.

Pode se observar que uma reta é obtida, pois o modelo assume interações sobre uma superfície heterogênea, assim como ligações entre as células do microorganismo. Na tabela 14 se apresentam os valores dos parâmetros do modelo, para as temperaturas avaliadas.

Tabela 14. Parâmetros do modelo linearizado de Freundlich, para diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	K_f	n	R^2
293	104,102	1,111	0,9935
303	103,435	1,154	0,9922
313	102,159	1,198	0,9888

Os resultados apresentam um parâmetro “n” maior que um, o que representa um processo de adesão favorável, demonstrando a afinidade que existe entre a superfície mineral e os compostos presentes na parede da bactéria *R. opacus*. Pode se observar que, com o incremento da temperatura ocorre o aumento do parâmetro “n” indicando um aumento na eficiência da adsorção.

5.5.4. Influência do tempo e da temperatura

Os resultados na figura 21 apresentam o efeito do tempo e da temperatura na adesão da bactéria sobre a superfície do mineral de apatita. Os ensaios foram realizados em duplicata.

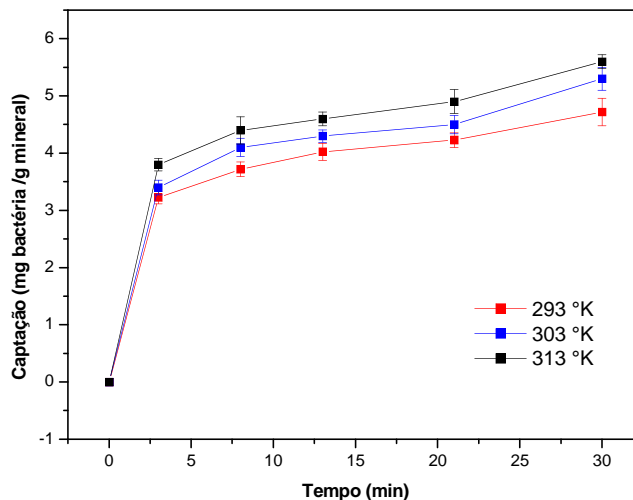


Figura 21. Efeito do tempo e da temperatura na captação. pH 7. Concentração inicial de bactéria 0,1 g/L. Eletrólito indiferente NaCl 1×10^{-3} M.

O tempo de adesão escolhido foi de 30 minutos porque segundo JIANG et al. (2007) em tempos maiores de adesão se pode gerar agregação bacteriana na solução, influenciando de forma negativa no momento de determinar a captação.

Pode-se observar na figura 21 que para uma temperatura de 293 K, se consegue uma captação de 3,2 mg bactéria/g mineral quando se atinge os 3 minutos de interação entre a bactéria e a superfície mineral de apatita; após de

atingir os 30 minutos se consegue uma captação igual a 4,7 mg bactéria/g mineral. Os resultados mostram que para 21 minutos de interação a captação aumenta de 4,2 para 4,9 mg bactéria/g mineral devido a um incremento da temperatura de 293 K para 313 K, indicando desta forma que o incremento da temperatura acelera o processo de adesão das bactérias.

5.5.5. Cinética de adesão

Na figura 21 são apresentados os dados experimentais de captação (quantidade de bactérias aderidas à superfície mineral) em função do tempo, em três temperaturas diferentes. Estes dados obtidos experimentalmente foram ajustados ao modelo cinético de pseudo-primeira ordem na forma linearizada com a finalidade de obter o parâmetro (constante de taxa de adesão) da equação, para logo ser introduzida na equação de arrhenius e determinar a energia de ativação.

Na equação 7 se apresenta o modelo de pseudo-primeira ordem na forma linearizada.

$$\ln(q_e - q) = \ln q_e - kt \quad (7)$$

Na figura 22 se observa os dados experimentais de captação e tempo ajustados ao modelo cinético de pseudo-primeira ordem. Os parâmetros de k e q_e foram determinados da inclinação e do intercepto, respectivamente.

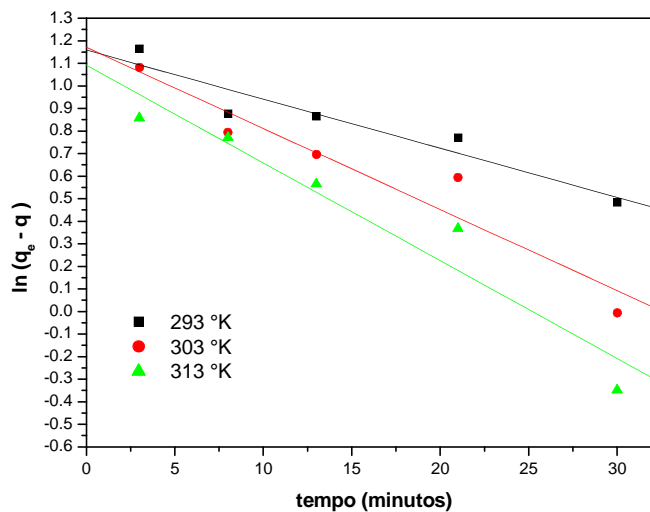


Figura 22. Ajuste linear dos dados experimentais no modelo cinético de pseudo-primeira ordem.

Na tabela 15 encontram-se os parâmetros obtidos, após o ajuste linear dos dados experimentais no modelo cinético.

Tabela 15. Parâmetros cinéticos para o modelo de pseudo-primeira ordem.

Temperatura (K)	q_e (mg.g ⁻¹)	k (min ⁻¹)	R^2
293	3,2153	0,0228	0,9738
303	3,1769	0,0353	0,9241
313	3,0277	0,0449	0,9521

A equação de Lagergren, também conhecida como modelo de pseudo-primeira ordem, foi utilizada por TAN e CHEN (2012) para avaliar a adesão da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre as superfícies de bornita, calcopirita, pirita e quartzo. Nesse trabalho, obtiveram um valor da constante de taxa de adesão $k = 0,0290 \text{ min}^{-1}$ para Bornita.

No presente trabalho o valor da constante de taxa para a adesão de *Rhodococcus opacus* sobre a superfície de apatita foi de 0.0228, 0.0353, 0.0449 min^{-1} para 293 K, 303 K, 313 K respectivamente.

Quando os valores das constantes cinéticas e temperaturas são diretamente proporcionais podem ser descritas pela equação de Arrhenius na forma linearizada, representada pela equação 8 (CAYLLAHUA et al., 2009).

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (8)$$

Onde k é a constante cinética de adesão (min^{-1}), k_0 é o fator independente da temperatura (min^{-1}), E_a é a energia de ativação da adesão, R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$), e T a temperatura em Kelvin. Os valores de E_a e k_0 foram determinados, pela inclinação e intercepto respectivamente (Figura 23).

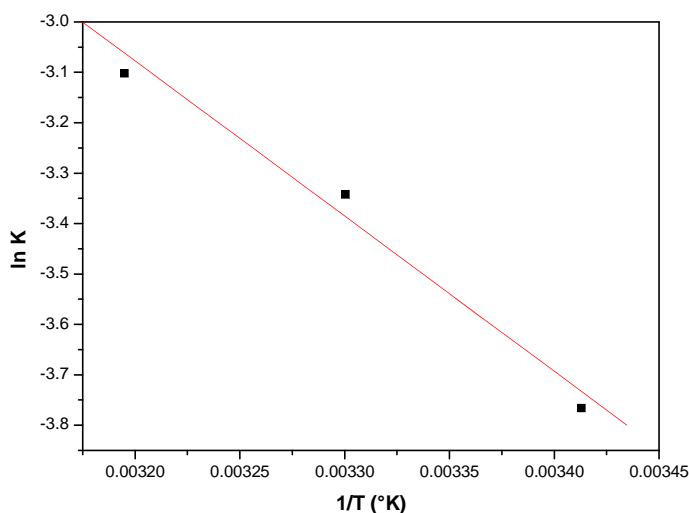


Figura 23. Dados de temperatura e constantes cinéticas ajustadas à equação de Arrhenius na forma linearizada.

A magnitude da energia de ativação pode descrever os tipos de interações que estão acontecendo na adesão entre a bactéria e o mineral. Podem ser interações fracas como as físicas, que precisam uma energia menor a 4.2 KJ/mol

ou interações muito mais fortes como as químicas, que precisam uma energia entre 8,4 e 83,7 KJ/mol (SMITH, 1981).

Os resultados mostram uma $E_a = 25,91$ KJ/mol, sugerindo desta forma a existência de interações químicas entre os compostos da parede da bactéria *Rhodococcus opacus* e a superfície mineral de apatita. Estes resultados podem se relacionar aos obtidos no item 5.3, onde a superfície da bactéria e o mineral apresentam cargas iguais, porém mesmo assim elas conseguem-se aderir, o que sugere que existe uma predominância de ligações químicas.

6 CONCLUSÕES

Foi realizado no mineral de apatita a análise de difração e fluorescência de raios x mostrando respectivamente a fase de fluorapatita (97,9%) e o componente P_2O_5 (39,96%).

As medidas de ângulo de contato revelaram mudanças na superfície mineral, devido à adesão das bactérias *R. opacus* sobre ela. Em um pH ao redor de 7 foi obtido um valor de ângulo de contato de 36 graus.

As medições de potencial zeta indicaram um ponto isoelétrico da bactéria *R. opacus* em torno de 2,8. Após a interação com a bactéria, a curva de potencial zeta do mineral de apatita apresentou um deslocamento no sentido da curva da bactéria. A análise das curvas de potencial zeta indicou a predominância de interações químicas entre a parede celular da bactéria e a superfície do mineral de apatita.

Se observou que a capacidade de adesão das bactérias sobre a superfície mineral foi dependente do pH; obtendo uma maior afinidade em um pH 7. Neste pH foi obtida uma captação de 23,30 mg bactéria/g mineral para uma concentração inicial de 0,4 g/L em uma temperatura de 303 K. O estudo mostra um incremento na captação quando existe um aumento na concentração inicial de bactéria *R. opacus*.

As imagens realizadas pelo microscópio eletrônico de varredura confirmam a adesão da bactéria *Rhodococcus opacus* sobre a superfície do mineral de apatita.

Os dados experimentais obtidos nos ensaios de adesão se ajustaram ao modelo de Freundlich na forma linearizada, pois este modelo assume superfícies heterogêneas e a interação entre bactérias. Foram obtidas constantes $n = 1.111$, 1.154 e 1.198 para 293 K , 303 K e 313 K respectivamente. Os dados experimentais não se ajustaram ao modelo de Langmuir, pois o modelo considera que cada bactéria deve ocupar somente um lugar na superfície mineral, além disso, assume a homogeneidade da superfície mineral.

O estudo mostrou que o incremento no tempo e na temperatura, gera um aumento na captação. O estudo indica que em 30 minutos de interação entre a bactéria e as partículas minerais não se consegue atingir o equilíbrio.

Os dados experimentais de captação em função do tempo foram utilizados no modelo cinético de pseudo-primeira ordem, obtendo constantes de taxa de 0.0228 , 0.0353 , 0.0449 min^{-1} para 293 K , 303 K e 313 K respectivamente. Estes dados de constantes de taxa e temperaturas foram empregadas na equação de arrhenius, obtendo uma energia de ativação (E_a) de $25,91\text{ KJ/mol}$, o que sugere a predominância de ligações químicas entre a parede celular do microrganismo e a superfície mineral de apatita.

7. Recomendações para futuros trabalhos

- Estudar a influência de diferentes meios de cultivo na capacidade de adesão da bactéria *R. opacus* sobre o mineral de apatita.
- Estudar a captação (mg bactéria/g mineral) em condições extremas de temperatura.
- Utilizar, nos ensaios de adesão, compostos extracelulares segregados pelo microrganismo.
- Aplicar a teoria DLVO clássica para descrever o tipo de ligações (químicas-irreversíveis ou físicas-reversíveis) entre as bactérias e partículas minerais.
- Estudar a adesão da bactéria *R. opacus* adaptada ao mineral de apatita e a sua influência na captação.

8. Referências Bibliográficas

ABDEL-KHALEK, N. Technical note evaluation of flotation strategies for sedimentary phosphate with siliceous and carbonates gangues. **Minerals Engineering** v. 13 No.7 , 789-793, 2000.

ABDEL-ZAHER, M. Physical and thermal treatment of phosphate ores-an overview , **International Journal of Mineral Processing** v. 13, p. 59-84, 2008.

ABOUZEID, A., NEGM, A., & ELGILLANI, E. Upgrading of calcarerous phosphate ores by flotation: Effect of ore characteristics. **International Journal of Mineral Processing** , p. 81-89, 2009.

AL-THYABAT, S., & AL-ZOUBI, H. Purification of phosphate beneficiation wastewater: Separation of phosphate from Eshydia Mine (Jordan) by colum-DAF flotation process. **International Journal of Minerals Processing** v. 110-111, p. 18-24, 2012.

AMINI, E., OLIAZADEH, M., & KOLAHDOOZAN, M. Kinetic comparison of biological and conventional flotation of coal. **Minerals Engineering** v. 22 , p. 344-347, 2009.

AMUDA, O., GIWA, A., & BELLO, I. Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified actived coconut shell carbon. **Biochemical Engineering Journal** v. 38(2) , p. 174-181, 2007.

ASSIS, S., MONTENEGRO, L., & PERES, A. Utilization of hydroxamates in minerals froth flotation. **Minerals Engineering** v. 9(1), p. 103-114, 1996.

ATA, S., RAHMAN, M. R., & GRAEME, J. J. The effect of flotation variables on the recovery of different particle size fractions in the froth and the pulp. **International Journal of Minerals Processing** v. 106-109 , p. 70-77, 2012.

BARROZO, A. M., ATAÍDE, H. C., RICARDO, S. C., & OLIVEIRA, S. M. Recovery of apatite from flotation tailings. *Separation and Purification Technology* v. 79 , p. 79-84, 2011.

BAUDET, G., & SAVE, M. Phosphoric esters as carbonate collectors in the flotation of sedimentary phosphate ores. **In Beneficiation of Phosphates: Advances in Research and Practice**, (Editors: Zhang P., El-Shall H., and Wiegel R.), p. 163-185, 1999.

BOTERO, A. E. **Bioflotação de Magnesita, Calcita e Barita, usando Rhodococcus Opacus como bioreagente.** Tesis de Doutorado. Pontificia Universidade Católica de Rio de Janeiro. 2007. 130 p.

BOTERO, A. E., TOREM, M. L., & MESQUITA, L. M. Fundamental studies of Rhodococcus opacus as a biocollector of calcite and magnesite. **Minerals Engineering** v. 20 , p. 1026-1032, 2007.

BUENO, B. Y. **Remoção de Pb, Cr e Cu por processo combinado biossorção/flotação utilizando a cepa Rhodococcus opacus.** Tese de doutorado, Pontificia Universidade Católica de Rio de Janeiro, 2007, 172 p.

BUENO M., B., TOREM, M., MOLINA, F., & MESQUITA, L. Biosorption of lead (II), chromium (III) and cooper (II) by R. opacus: Equilibrium and kinetic studies. **Minerals Engineering** v. 21 , p. 65-75, 2008.

BUTTNER, B., GROTE, J., VOGT, V., & BAHR, A. Flotation and flocculation of ultrafine-grained apatite ores. **Proceeding of XVII. Int. Min. Process. Congress. Bergakademie, Freiberg**, v. 1 , p. 71-82, 1991.

CALFA, B. A., & TOREM, L. M. On the fundamentals of Cr(III) removal from liquid streams by a bacterial strain. **Minerals Engineering** , p. 48-54, 2008.

CAYLLAHUA, J. E. **Flotação biosorptiva de níquel e alumínio usando a cepa *Rhodococcus opacus***. Tese de Mestrado, Pontificia Universidade Católica de Rio de Janeiro, 2008, 159 p.

CAYLLAHUA BASURCO, J. E., CARVALHO, R. J., & TOREM, M. L. Evaluation of equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters for biosorption of nickel(II) ions onto bacteria strain, *Rhodococcus opacus*. **Minerals Engineering** v. 22 , p. 1318-1325, 2009.

CAYLLAHUA, J., & TOREM, M. Biosorptive flotation of nickel and aluminum ions from aqueous solution. **Desalination** v. 279 , p. 195-200, 2011.

CHANDER, S., MISHRA, R., & FUERSTENAU, D. Effect of Ionic Surfactants on the Electrophoretic Mobility of Hydroxyapatite. **Colloids and Surfaces**, v. 1, p. 105-119, 1980.

CHANDRAPRABHA, M., & NATARAJAN, K. Microbially induced mineral beneficiation. **Mineral Processing & Extractive Metall.** Rev. 31 , p. 1-29, 2010.

CHANDRAPRABHA, M., & NATARAJAN, K. Surface chemical and flotation behaviour of chalcopyrite and pyrite in the presence of *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Hydrometallurgy** v. 83 , p. 146-152, 2006.

CHANGGEN, L., & YONGXIN, L. Selective flotation of scheelite from calcium minerals with sodium oleate as a collector and phosphate as modifiers. II. The mechanism of the interaction between phosphate modifiers and minerals. **International Journal of Mineral Processing** v. 10 , p. 219-235, 1983.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. **Sumário Mineral**, Fosfato, 2011. Disponível em: https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=6376

ELGILLANI, D., & ABOUZEID, A. Flotation of carbonates from phosphate ores in acidic media. **International Journal of Mineral Processing** v. 38, p. 235-256, 1993.

EL-SHALL, H., ABDEL-KHALEK, Z., BOICE, C., & FARRAH, S. Beneficiation of phosphate: Fundamentals and Technology, **SME**, 2002.

FARAHAT, M., HIRAJIMA, T., SASAKI, K., AIBA, Y., & DOI, K. Adsorption of SIP E. coli onto quartz and its applications in froth flotation. **Minerals Engineering** , p. 389-395, 2008.

FONSECA, D., & SOUZA, A. Fosfato. **Departamento Nacional de Produção Mineral**, Brasília, 2008.

FU & SOMASUNDARAN, P. Alizarin red S as a flotation modifying agent in calcite-apatite systems. **International Journal of Minerals Processing**, v. 18, p. 287-296, 1986.

GOVENDER, Y., & GERICKE, M. Extracellular polymeric substances (EPS) from bioleaching systems and its application in bioflotation. **Minerals Engineering** v. 24, p. 1122-1127, 2011.

GUIMARÃES, R., ARAUJO, A., & PERES, A. Reagents in igneous phosphate ores flotation. **Minerals Engineering** , p. 199-204, 2005.

HANUMANTHA RAO, K., & VILINSKA, A. Leptosirillum ferrooxidans-sulfide mineral interactions with reference to bioflotation and bioflocculation. **Trans. Nonferrous Met. Soc. China** v. 18, p. 1403-1409, 2008.

HENCHIRI, A. A contribution to carbonates-phosphate separation by flotation technique. In: Beneficiation of Phosphate: Theory and Practice (Eds. EL-SHALL, H., MOUDGIL, B.M., WIEGEL, R.), **SME**, p. 225-243, 1993.

HERNAÍNIZ, F., CALERO, M., & BLÁZQUEZ, G. Flotation of low-grade phosphate ore. **Advanced Powder Technology** v. 15(4), p. 421-433, 2004.

HOSSEINI, T., KOLAHDOOZAN, M., TABATABAEI, Y., OLIAZADEH, M., NOAPARAST, M., & ESLAMI, A., MANAFI, Z., ALFANTAZI, A. Bioflotation of Sarcheshmeh copper ore using Thiobacillus Ferrooxidans bacteria. **Minerals Engineering** v. 18, p. 371-374, 2005.

IPEK, H., & OZDAG, H. An investigation into the enrichment of phosphate slime by column flotation. Proceedings of the XXI International Mineral Processing Congress. **Developments in Mineral Processing** v. 13, C8a-1/C8a-5, 2000.

JIANG, D., HUANG, G., CAI, P., RONG, R., & CHEN, W. Adsorption of Pseudomonas putida on clay minerals and iron oxide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** **54**, p. 217-221, 2007.

KALAVATHY, M., KARTHIKEYAN, T., RAJGOPAL, S., & MIRANDA, L. Kinetic and isotherm studies of Cu(II) adsorption onto H₃PO₄-activated rubber wood sawdust. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 292 issue 2, p. 354-362, 2005.

KOU, J., TAO, D., & XU, G. Fatty acid Collectors for phosphate flotation and their adsorption behavior using QCM-D. **International Journal of Mineral Processing** v. 95, p. 1-9, 2010.

MESQUITA, L., LINS, F., & TOREM, M. Interaction of a hydrophobic bacterium strain in a hematite-quartz flotation system, **International Journal of Minerals Processing** v. 71 issues 1-4, p. 31-44, 2003.

MEZZARI, I. **Utilização de carvões adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas**, Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002, 117 p.

MOHAMMADKHANI, M., NOAPARAST, M., SHAFAEI, S., AMINI, A., AMINI, E., & ABDOLLAHI, H. Double reverse flotation of a very low grade sedimentary phosphate rock, rich in carbonate and silicate. **International Journal of Mineral Processing** v. 100, p. 157-165, 2011.

PARSONAGE, P., MELVEN, D., HEALY, A., & WATSON, D. Depressant function in flotation of calcite, apatite and dolomite. **In Reagents in the Minerals Industry, The Institution of Mining and Metallurgy**, eds. JONES M.J. e OBLATT R., p.33-40, 1984.

PATRA, P., & NATARAJAN, K. Microbially-induced separation of chalcopyrite and galena. **Minerals Engineering** v. 21 , p. 691-698, 2008.

PINO, G. A. **Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (Cocos nucifera)**, Tese de Mestrado, Pontifícia Universidade de Rio de Janeiro, 2005, 116 p.

PINTO, C., YARAR, B., & ARAUJO, A. Apatite flotation kinetics with conventional and new collectors, **Society for Mining, Metallurgy, and Exploration**, Denver-Colorado, preprint number 91-80, 1991.

PLETNEV, Y. M. **Chemistry of Surfactants**, Belgorod State University, Russia, 2001, 97 p.

PRADIP, & FUERSTENAU, D. Adsorption of hydroxamate collectors on semi-soluble minerals. **Colloids and Surfaces**, p. 137-146, 1985.

QUN, W., & HEISKANEN, K. Batch flotation tests by fatty acid on a phosphate-iron oxide-silicate regolith ore sample from Sokli, Finland. **Minerals Engineering**, p. 473-481, 1990.

RADHIKA, M., & PALANIVELU, K. Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent-kinetics and isotherm analysis, **Journal of Hazardous Materials B138** , p. 116-124, 2006.

RAIJ, B. (1991). Fertilidade do solo e adubação, **Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, Piracicaba-São Paulo, 1991, 343p.

RAO, D., NARAYANAN, M., NAYAK, U., ANANTHAPMANABHAN, K., & SOMASUNDARAN. Flotation of calcareous Missouri phosphate ore, **International Journal of Mineral Processing** v. 14 , p. 57-66, 1985.

REYNOLDS, T., & RICHARDS, P. Unit operations and processes in environmental engineering, **PWS publishing company**, Boston, 1992, p. 93-110.

RONG, X., CHEN, W., HUANG, Q., CAI, P., & LIANG, W. Pseudomonas putida to goethite: Studied by equilibrium adsorption, SEM, FTIR and ITC. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 80 , p. 79-85, 2010.

RULE, A., LARSON, D., & DALLENBACH, C. 1982. Application of calcite-silica flotation techniques to western phosphate minerals, *US Bureau of Mines, RI. No. 8728*.

SANTHIYA, D., SUBRAMANIAN, S., & NATARAJAN, K. Surface chemical studies on sphalerite and galena using extracellular polysaccharides isolated from *Bacillus polymyxa*. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 256, p. 237-248, 2002.

SANTHIYA, D., SUBRAMANIAN, S., NATARAJAN, K., HANUMANTHA RAO, K., & FORSSBERG, K. Bio-modulation of galena and sphalerite surfaces using *Thiobacillus thiooxidans*. **International Journal of Mineral Processing** v. 62 , p. 121-141, 2001.

SCHILLING, K., CARSON, R., BOSKO, C., GOLIKERI, G., BRUINOOG, A., HOYBERG, K., et al. A microassay for bacterial adherence to hydroxyapatite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 3 , p. 31-38, 1994.

SETH, V., KUMAR, R., ARORA, S., & BISWAS, A. Disodium dodecyl phosphate as a collector in the calcite-apatite mineral system. **Trans. Inst. Min. Metall.** v. 84 , p. C56-C58, 1975.

SHAO, X., JIANG, C., & PAREKH. Enhanced flotation separation of phosphate and dolomite using a new amphoteric collector. **SME-Minerals and Metallurgical Processing** v. 15(2) , p. 11-14, 1998.

SHARMA, P. K. **Surface studies relevant to microbial adhesion and bioflotation of sulfide minerals**, Doctoral Thesis, Lulea University of Technology, Suíça, 2001.

SHARMA, P., HANUMANTHA RAO, K., FORSSBERG, K., & NATARAJAN, K. Surface chemical characterisation of *Paenibacillus polymyxa* before and after adaptation to sulfide minerals. **International Journal of Minerals Processing** v. 62 , p. 3-25, 2001.

SIS, H. **Enhancing Flotation Recovery of Phosphate Ores Using Nonionic Surfactants**, Doctoral Thesis, The Pennsylvania State University, United States of America, 2001, 337 p.

SMITH, J. **Chemical Engineering Kinetics**, 1981, 3^a Ed. McGraw-Hill Inc., New York.

SNOW, R. **Flotation of phosphate ores containing dolomite**, 1982, *US Patent* #4,364,824.

STAUFFER, M., & SULEWSKI, G. Phosphorus: essential for life, **In: Simpósio Sobre Fósforo na Agricultura Brasileira**, Anais, Piracicaba: Potafos/Anda, 2003, 1 CD-ROM.

SUBRAMANIAN, S., SANTHIYA, D., & NATARAJAN, K. Surface modification studies on sulphide minerals using bioreagents. **International journal of Minerals Processing** v. 72 , 175-188, 2003.

SUN, W., YANG, F., & HU, Y.-H. The flotation separation of scheelite from calcite using a quaternary ammonium salt as collector. **Minerals Engineering** , p. 82-84, 2011.

TAIZ, L., & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 2004, Porto Alegre: Artmed, 722 p.

TAN, S., & CHEN, M. Early stage adsorption behaviour of Acidithiobacillus ferrooxidans on minerals I: An experimental approach. **Hydrometallurgy** v. 119-120, p. 87-94, 2012.

THYABAT SALAH, A., ROE-HOAN, Y., & DONGCHEOL, S. A comparison of anionic and cationic flotation of a siliceous phosphate rock in a column flotation cell. **Mining Science and Technology (China)** v. 21 , p. 147-151, 2011.

ULIANA, D. **Caracterização tecnológica do minério do fosfato do complexo alcalino de salitre**, Tese de Mestrado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2010, 217 p.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY, **Mineral Commodity Summaries**, Phosphate Rock, Annual Publications, 2012, Disponível em: http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate_rock/mcs-2012-phosp.pdf

USHA PADUKONE, S., & NATARAJAN, K. Microbially induced separation of quartz from calcite using Saccharomyces Cerevisiae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 88, p. 45-50, 2011.

VÁSQUEZ P., T. G., BOTERO C., A. E., MESQUITA S., L. M., & TOREM, M. L. Biosorptive removal of Cd and Zn from liquid streams with a *Rhodococcus opacus*. **Minerals Engineering** v. 20 , p. 939-944, 2007.

VOLESKY, B., & HOLAN Z.R. Biosorption of heavy metals, **Biotechnology Progress** v. 11(3), p. 235-250, 1995.

WANG, X. (2004). **The Surface Chemistry of Phosphate Mineral Flotation with Solutions of Octyl Hydroxamic Acid**, Doctoral Thesis, Department of Metallurgical Engineering the University of Utah, 2004, 220 p.

YING-YONG, G., SHUN-PEN, G., XIAO-BO, Z., & YONG-FU, Y. Double reverse flotation process of colophonite and regulantng froth action, **Trans. Nonferrous Met. Soc. China** v. 18 , p. 449-453, 2008.

ZAFAR, I., ANWAR, M., & PRITCHARD, D. Innovations in Beneficiation Technology for low Grade Phosphate Rocks, **Nutrient cycling in agro ecosystems** v. 46, p. 135-151, 1996.

ZHANG, P., YU, Y., & BOGAN, M. Challenging the "crago" double float process II. amine-fatty acid flotation of siliceous phosphates. **Minerals Engineering** v.10 No.9 , p. 983-994, 1997.

ZHENG, X. (1998). **Flotation separation of phosphate from dolomite using bacteria as depressants**, Doctoral Thesis, University of Nevada, 1998, 194 p.

ZHENG, X., & SMITH, R. Dolomite depressants in the flotation of apatite and colophonite from Dolomite. **Minerals Engineering** v. 10(5) , p. 537-545, 1997.

ZHENG, X., ARPS, P. J., & SMITH, R. W. Adhesion of two bacteria onto dolomite and apatite: their effect on dolomite depression in anionic flotation. **International Journal of Mineral Processing** v. 62 , p. 159-172, 2001.

ZHENGXING, G. **Dolomite Flotation of High Magnesium Phosphate Ores Using Fatty Acid Soap Collectors**, Doctoral Thesis, West Virginia University, 2007, 207 p.

ZOUBOLIS, A., LOUKIDOU, M., & MATIS, K. Biosorption of toxic metals from aqueous by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. **Process. Biochemistry** v. 39 , p. 909-916, 2004.