

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do Biorregente e das Partículas Mineraias Puras

#### 4.1.1 Preparação e Classificação dos Mineraias

A fim de garantir a reprodutibilidade e confiabilidade foram utilizados em todos os ensaios amostras mineraias de alta pureza. Os mineraias puros de barita, calcita e magnesita puros foram gentilmente fornecidos por diversas entidades e centros de pesquisa.

A amostra de barita pura foi cedida pelo departamento de Geografia da Universidade Estadual de Rio de Janeiro (UERJ), sendo proveniente da região de Camamú no estado da Bahia. A análise de Fluorescência de Raios X da amostra é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11: Composição da amostra de barita mediante Fluorescência de raio X

Composição	Porcentagem (%)
BaO	65,5
SO <sub>3</sub>	34,3
SiO	Abaixo 0,5

A amostra de magnesita foi fornecida pela empresa Magnesita S.A., sendo proveniente da região de Brumado no estado da Bahia. A análise de Fluorescência de raios X da amostra é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12: : Reporte da composição da Magnesita mediante Florescência de raio X

Composição	Porcentagem %
MgO	47,8
CO <sub>2</sub>	52,2.

Calcita foi fornecida pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) sendo proveniente da região de Amarinópolis no estado do Goiás A análise de Fluorescência de raios X da amostra é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13: : Reporte da composição da Calcita mediante Florescência de raio X

Composição	Porcentagem (%)
CaO	56
CO <sub>2</sub>	44

A pureza das amostras minerais foi verificada com análises adicionais mediante as técnicas de difração por Raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). No Anexo 1 encontram-se os resultados da caracterização.

Para alcançar o tamanho adequado aos ensaios subseqüentes, as amostras minerais foram submetidas a uma fragmentação e moagem em grau de ágata e classificados utilizando um sistema de peneiras entre 150 e 400 mesh. A Tabela 14 mostra a classificação dos minerais por tamanho empregado para cada um dos ensaios realizados.

Tabela 14: Frações granulométricas dos minerais para cada um os ensaios realizados.

Experimento	Tamanho da partícula
Testes Potencial Zeta	$d_{80} > 37$ ( $\mu\text{m}$ )
Ensaio de adesão e provas de aderência	$74 > d_{80} > 37$ ( $\mu\text{m}$ )
Experimentos de microflotação	$d_{80} > 106$ ( $\mu\text{m}$ )
Medidas de ângulo de contato	1.0x1.0x2.0 (cm)

#### 4.1.2 Cultivo e Crescimento do Microrganismo

A cepa de *Rhodococcus opacus* empregada nos experimentos como biorregente foi fornecida pela Fundação Andre Toselo (São Paulo Brasil). Trata-se de uma bactéria referenciada como DSM 43250. A bactéria foi subcultivada no laboratório usando o meio de cultura YMA mostrado na Tabela 15

Tabela 15: Meio de cultura YMA utilizado no cultivo do *Rhodococcus opacus*

Componente	Composição (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	10
Peptona	5
Extrato de malte	3
Extrato de levedura	3
CaCO <sub>3</sub>	2
Agar	20

O meio de cultura foi ajustado em pH 7,2 e posteriormente esterilizado em autoclave com 1 atm de pressão, durante 20 min.

A bactéria foi cultivada durante 48 horas no meio sólido e foram identificadas as colônias características do *R. opacus*, posteriormente a bactéria foi subcultivada em tubos de preservação para manter um estoque suficiente para realizar todos os ensaios.

Para realizar os crescimentos e obter as células concentradas de *R. opacus*, a bactéria foi cultivada num meio líquido e utilizando a mesma composição do meio sólido sem a presença de agar-agar. A suspensão foi levada a um agitador tipo rotatório a uma temperatura de 28°C por 24 horas.

Após o crescimento, a suspensão celular foi centrifugada a uma velocidade de 2000 rpm por 15 min. O precipitado da centrifugação, constituído pelas células de *R. opacus*, foi lavado numa solução de NaCl 0,01 M, posteriormente esterilizado em autoclave e refrigerado.

O método do peso seco foi utilizado para determinar a concentração celular. Para a contagem de células foi empregada uma Câmara de Neubauer. O Anexo 3 descreve o procedimento da curva de calibração da curva de peso seco e os resultados da contagem celular.

## **4.2 Caracterização da Bactéria *R. opacus***

Para determinar o comportamento e características da bactéria *R. opacus* foi construída uma curva de crescimento em função do tempo sendo também realizadas análises da composição da parede bacteriana e estudos de afinidade da bactéria por solventes polares. Outras técnicas para caracterizar a bactéria como a determinação do ponto isoelétrico (PIE), a Microscopia eletrônica de varredura MEV e espectroscopia de infravermelho mediante transformada de Fourier IVTF serão descritas em procedimentos posteriores.

Para cada uma das etapas de crescimento, foram realizadas identificações microscópicas de bactéria mediante coloração de Gram e MEV. O Anexo 2 mostra as fotografias correspondentes.

#### 4.2.1

##### **Determinação da Curva de Crescimento da Bactéria *R. opacus***

Para determinar cada uma das etapas de crescimento da bactéria *R. opacus* assim como o tempo necessário para chegar à fase estacionária foi estabelecida a curva de crescimento.

Foi preparado um pré-inóculo de 10 mL de meio líquido até alcançar uma densidade ótica (D.O) de 0,2, após essa D.O., foi feito um novo cultivo em 100 mL mais por 24 h. e finalmente uma propagação em 1 L. O monitoramento da fermentação foi feito tomando por duplicata 10 mL de amostra a cada 2 horas durante 48 horas. Cada uma das amostras foi centrifugada por 10 min, numa velocidade de rotação de 2000 rpm. O precipitado foi suspenso numa solução 0,01 M de NaCl sendo determinado o valor de absorvância para cada uma das amostras. Foi estabelecida a curva de crescimento como número de células em função do tempo da fermentação. O número de células foi calculado determinando primeiro a concentração celular para cada uma das amostras com a curva de peso seco e posteriormente realizando a contagem de células na câmara de Neubauer.

#### 4.2.2

##### **Determinação de Polissacarídeos, Lipídeos e Proteínas Associados à Parede Celular do *R. opacus*.**

A determinação da composição do material pertencente à parede celular permite estabelecer relações e comportamentos da bactéria com a superfície dos minerais, Com o objetivo de garantir que o material celular medido fizesse parte da parede celular da bactéria do *Rhodococcus opacus*, foi selecionado o método desenvolvido por Canmarota (1988).

Para obter o material associado à parede celular, células lavadas de *R. opacus* com uma concentração conhecida, foram dissolvidas numa solução pH 7 tampão de fosfato 0,01 M. Um volume de 30 mL desta suspensão e 30 mL de uma solução de EDTA foram misturadas sendo mantido a uma temperatura de 4°C. Depois de duas horas, a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm e o sobrenadante foi recolhido para análise. O procedimento foi realizado em triplicada.

Os polissacarídeos associados à parede celular, presentes na extração com EDTA, foram quantificados usando o método de Dubois et al., (1956) empregando glicose como padrão e curva de calibração conforme descrito no Anexo 4.

As proteínas associadas à parede celular, foram quantificadas pelo método de Lowry modificado (1951) e usando Albumina de soro bovino como padrão. O Anexo 5 apresenta os procedimentos assim como a curva de calibração utilizada.

Os lipídeos associados à parede celular foram extraídos adicionando, ao material extraído com EDTA, 60 mL de metanol e 30 mL de hexano. A suspensão foi agitada até formar uma única fase. Adicionou-se água destilada até a formação de duas fases, a fase orgânica foi retirada e colocada em erlemeyers previamente pesados sendo o material seco em estufa a 100°C. A porcentagem de lipídeos na parede celular foi calculada com base no peso final dos erlemeyers e na concentração inicial de células de *R. opacus*. O procedimento foi realizado em triplicata

#### 4.2.3

#### **Provas de Aderência da Bactéria *R. opacus* nos Solventes Polares**

As provas de aderência foram descritas por Bellon-Fontaine (1996) e permitem determinar a características ácido base que as células microbianas têm. As características são estabelecidas como a afinidade que o microorganismo tem por diferentes tipos de solventes orgânicos. Clorofórmio é um solvente do tipo doador de elétrons, n-hexadecano é um solvente de tipo polar e o acetato de etil é aceptor de elétrons.

Células lavadas de *R. opacus* com uma concentração conhecida, foram dissolvidas numa solução tampão de fosfato em pH 7. A contração tampão foi modificada entre 0,01 – 1 M para estabelecer o comportamento da força iônica

Para 5 mL de suspensão celular foram adicionados 2 mL de solvente (Clorofórmio, n-hexadecano e acetato de etil), depois de 10 min de incubação o sistema de duas fases foi misturado num vortex por 2 min. Para permitir a separação completa das fases da mistura, a fase aquosa foi removida depois de 15 min e foi medida a densidade óptica da suspensão num comprimento de onda de 620 nm ( $A_t$ )

A porcentagem de aderência microbiana para o solvente foi calculada como

$(1 - A_t / A_o) \times 100$ . O procedimento foi realizado em triplicada.

### 4.3

#### **Comportamento das Amostras Antes e Após Interação com a Bactéria *R. opacus***

##### 4.3.1

##### **Medidas de Potencial Zeta.**

As medidas de potencial zeta para a bactéria *R. opacus* assim como para os minerais de barita, calcita e magnesita foram determinadas num equipamento de micro eletroforese do tipo Zeta Meter System 3.0+. O equipamento permite determinar o valor de potencial zeta baseado da velocidade da partícula submetida a uma diferença de voltagem entre dois eletrodos.

Para avaliar o Ponto Isoelétrico (PIE) de cada uma das amostras, foram preparadas, separadamente, suspensões de *R. opacus*, barita, calcita e magnesita de 100 mg. L<sup>-1</sup> numa solução de NaCl 0,01 M. O cloreto de sódio foi usado como eletrólito indiferente. Fizeram-se medidas de potencial Zeta em função do pH. Para garantir a exatidão de medição, tomou a media de 20 valores e o valor de desvio padrão.

Foi também avaliada a influência de adesão das células mediante modificação das curvas de potencial zeta dos minerais em função do pH para barita, calcita e magnesita após da interação com a bactéria do *R. opacus*. No estudo, verificou-se o deslocamento do PIE para cada um dos minerais na presença do microorganismo.

##### 4.3.2

##### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Microfotografias no microscópio eletrônico de varredura foram obtidas com a finalidade de observar o fenômeno de adesão da bactéria sobre as superfícies minerais de barita, calcita e magnesita. Células de *R. opacus* e amostras minerais antes e após interação com o *R. opacus* foram filtrados, lavadas e secadas. As partículas foram submetidas a um recobrimento em ouro, num sistema a vácuo do tipo BAL-TEC. As imagens foram adquiridas num microscópio eletrônico Carl Zeiss – DSM 960 pertencente ao laboratório de microscopia do CETEM.

### 4.3.3

#### **Análise no Espectroscópio de Infravermelho com Transformada de Fourier.**

Os espectros de infravermelho foram usados para comparar os grupos funcionais presentes nas superfícies dos minerais de barita, calcita e magnesita antes e após interação com células de *R. opacus*.

As suspensões minerais de barita, calcita e magnesita provenientes dos testes de adsorção, na ausência e na presença de *R. opacus* assim como uma suspensão de bactéria com uma concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> foram filtradas e secadas numa estufa de temperatura de 75°C. O pó resultante da secagem de cada amostra foi apropriadamente misturado com uma matriz de brometo de potássio (KBR) numa relação de 1/50. Os espectros dos minerais e da bactéria foram obtidos num espectrofotômetro Nicolet FTIR 2000 pertencente ao Departamento da Química da PUC-Rio. Foi empregado um detector do tipo DTGS (deuterated triglycine sulphate). A aquisição dos dados foi realizada no modo de transmissão. Os espectros foram coletados numa resolução de 4 cm<sup>-1</sup> após de 120 scans.

### 4.3.4

#### **Medidas de Hidrofobicidade dos Minerais**

Com o objetivo de avaliar a possível alteração na hidrofobicidade da superfície dos minerais após da adsorção de *R. opacus* foram medidos os valores de ângulo de contato das amostras de barita, calcita e magnesita antes e após da interação com a bactéria. Foi empregado um goniômetro Ramé Hart-inc modelo 100-00-115. As medidas foram realizadas no laboratório de química de superfícies pertencente ao Departamento de Metalurgia da UFRJ

Para as medidas dos valores de ângulo de contato das amostras minerais, seções de 1,0x1,0x2,0 cm de cada um dos minerais foram cuidadosamente polidas usando uma lixa de 37 µm de espessura, sendo verificado com uma lupa a remoção de qualquer partícula que pudesse ficar aderida nas superfícies. A metodologia está descrita por Mesquita (2000)

Foram preparadas suspensões celulares de *R. opacus* com uma concentração de 0,5 g/L em uma solução de NaCl 0,01 M com diferentes valores de pH. Gotas de cada solução foram depositadas sobre a superfície dos minerais e deixadas em

repouso por 15 min. Posteriormente as amostras foram lavadas com NaCl 0,01 M para remover as células não aderidas. Depois de secas, foram depositadas bolhas de água MiliQ com tamanho de 2  $\mu$ L sobre as superfícies, sendo realizadas as medidas de ângulo de contato no goniômetro, utilizando o método de bolha cativa. As medidas foram realizadas em triplicata.

Com a finalidade de remover as células aderidas entre cada uma das medidas, as superfícies minerais foram lavadas com solução sulfocromica concentrada, seguida de água MiliQ e posteriormente secadas, sendo submetidas a uma nova suspensão de *R. opacus*.

### 4.3

#### Provas de Adsorção.

As provas de adsorção foram realizadas para determinar o efeito da concentração inicial do microrganismo, o pH e o tempo de adsorção sobre a velocidade de adesão da bactéria *R. opacus* às superfícies dos minerais de barita, calcita e magnesita.

Foram preparadas soluções de 100 mg.L<sup>-1</sup> de barita calcita e magnesita em NaCl 0,01 M. Uma suspensão bacteriana, com a concentração desejada do microrganismo, foi adicionada na solução mineral. As provas de adsorção para os diferentes valores de pH estudados foram feitas num agitador orbital durante 30 minutos. A cada 5 minutos foram coletadas alíquotas de 10 mL, e posteriormente centrifugadas numa velocidade de 2000 rpm. A concentração celular foi medida no sobrenadante e comparada com a curva de peso seco, previamente estabelecida.

### 4.4

#### Ensaio de Bio Flotabilidade

##### 4.4.1

#### Experimentos de Microflotação

Os ensaios de microflotação foram conduzidos num tubo de Hallimond modificado. O sistema de microflotação foi montado no laboratório do DCMM da PUC-Rio. A montagem do sistema é ilustrada na Figura 11. Antes de realizar os testes de

flotação o rotâmetro foi calibrado para garantir uma vazão de ar entre 40 e 80 mL min<sup>-1</sup>. A curva de calibração rotâmetro é mostrada no Anexo 6.

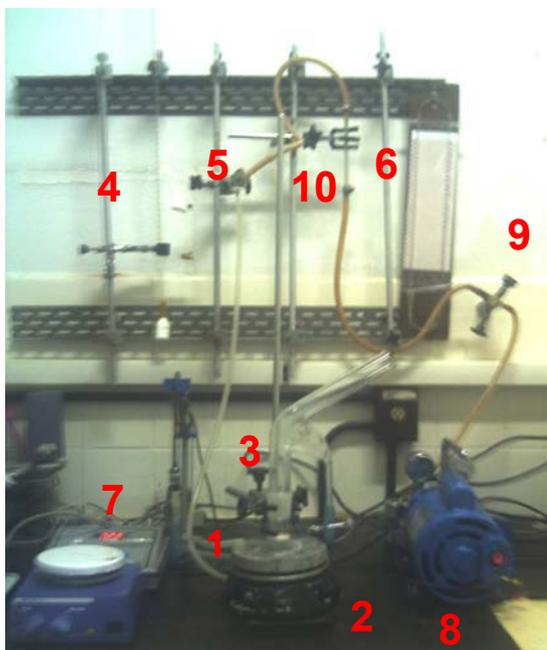


Figura 11 Montagem Sistema de Microflotação em Tubo de Hallimond.  
 1. Entrada de Ar. 2. Agitador Magnético. 3. Tubo de Hallimond-modificado.  
 4. Bolhometro. 5. Torneira de 3 vias. 6. Manômetro de mercúrio.  
 7. Medidor de pH. 8. Bomba de Ar 9. Válvula entrada de ar.  
 10. Medidor de fluxo.

Para realizar os testes de flotação no tubo de Hallimond modificado, uma quantidade de 0,8 g de mineral foi adicionada a 170 mL numa solução 0,01 M de NaCl. O eletrólito foi utilizado para manter a força iônica da solução. O pH da suspensão foi ajustado com soluções de Na(OH) ou HCl.

Para avaliar o efeito da concentração de *R. opacus* no desempenho da flotação dos minerais, uma concentração variável da bactéria *R. opacus* foi adicionada. Após o condicionamento do biorreagente na suspensão durante 10 min, foi realizada a flotação do mineral com vazão de ar equivalente à 60 mL min<sup>-1</sup>. A flotação foi realizada durante 10 minutos.

Os minerais flotados e não flotados foram recolhidos separadamente, lavados e filtrados. A porcentagem de flotabilidade foi calculada como a relação de peso entre o material flotado e o total do material recolhido (flotado e não flotado). Os ensaios foram realizados em duplicata.

## 4.5 Avaliação das Energias de Interação

As energias de interação permitem prever a afinidade que pode ter a bactéria de *R. opacus* pelos solventes de tipo orgânico ou pelas superfícies dos minerais. No cálculo das energias de interação são necessários os valores dos componentes de energia livre interfaciais individuais de Lifshitz - van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ), e ácido - base  $\gamma_s^{+}$ , e  $\gamma_s^{-}$  para bactéria *R. opacus* assim como dos minerais de calcita, barita e magnesita.

Neste trabalho foram calculados cada um dos componentes individuais baseados nos métodos descritos exhaustivamente por van Oss (1994), Kwok e Neumann (1999) e Médout- Marère et al., (1998) já mencionados no Capítulo 1. Posteriormente foram determinadas as energias de interação entre a bactéria e as superfícies usando as aproximações termodinâmicas e as teorias DLVO, X-DLVO.

### 4.5.1 Medidas de Ângulo de Contato

Foram estabelecidas as medidas de ângulo de contato para cada uma das superfícies minerais assim como para a bactéria *R. opacus* usando o goniômetro Ramé-Hart modelo 100-00-115.

A preparação das superfícies minerais da calcita, barita e magnesita foi descrita no procedimento de avaliação da hidrofobicidade, item 4.3.4.

Para determinar as medidas de ângulo de contato da bactéria foi utilizado o método descrito por Raichur et al., (1996). Foi preparada uma suspensão de *R. opacus* com uma concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de células. Com o fim de obter uma camada homogênea da bactéria, a solução foi filtrada a vácuo através de um filtro de papel de triacetato de celulose de  $0,45 \mu\text{m}$  e secado durante 2 horas a  $75^\circ\text{C}$ , posteriormente o filtro, com as células aderidas, foi cortado em pedaços de  $2 \times 2 \text{ mm}^2$  e estes foram colocados numa placa de vidro usando uma fita de dupla face.

A partir destas superfícies foram feitas as medidas de ângulo de contacto utilizando como solventes dois líquidos polares: Água e Formamida e um líquido apolar:  $\alpha$ -Bromonaftaleno. O tamanho das bolhas de solventes depositadas sobre a superfície

para cada uma das medidas foi de 2  $\mu\text{L}$ . As medidas de ângulo de contato obtidas no goniômetro foram realizadas em triplicata.

#### 4.5.2

#### Avaliação da Constante de Hamaker para os sistemas de *R. opacus* – água - mineral

A constante  $A_{bwm}$  do sistema pode ser calculada como a relação das constantes individuais e a seguinte equação:

$$A_{bwm} = [(A_m)^{0.5} - (A_w)^{0.5}][(A_b)^{0.5} - (A_w)^{0.5}] \quad (1)$$

O Valor da constante de Hamaker para água ( $A_w$ ) encontrada na literatura tem um valor de  $3,7 \times 10^{-20}$  J (Rijnaarts et al., 1995)

Para determinar a constante individual para a bactéria *R. opacus* ( $A_b$ ) assim como para as partículas minerais ( $A_m$ ), foi usada a seguinte equação:

$$A_{11} = 6\pi r^2 \gamma_s^d \quad (2)$$

A equação (2) foi usada por Laskowski e Ralston (1992) para calcular diferentes constantes de superfícies sólidas baseado na relação da constante de Hamaker  $A_{11}$ , a distância molecular  $r$  e o componente superficial de energia livre do sólido  $\gamma_{sd}$ .

Usando a suposição de Van Oss (1994) que em sistemas aquosos e matérias que possuem átomos do tipo metálicos assim como grupos tipo  $\text{CH}_2$  ou  $\text{CH}$ , o valor de  $6\pi r^2$  pode ser considerado como de  $1.44 \times 10^{-18}$   $\text{m}^2$ .

O  $\gamma_s^d$  para a bactéria *R. opacus*, barita, calcita e magnesita foi calculado usando a aproximação de Fowkes (Sharma, 2001) e os valores de ângulo de contato resultantes das medições com o líquido apolar ( $\alpha$ -Bromonaphaleno). A aproximação de Fowkes foi descrita no Capítulo 1 e esta dada por:

$$\cos \Theta = -1 + 2\sqrt{\gamma_s^d} \frac{\sqrt{\gamma_l^d}}{\gamma_l} \quad (3)$$

Para o  $\alpha$ - Bromonaphthaleno, os valores para  $\gamma_L^d$  e o  $\gamma_L$  são iguais 44.4 (mJ.m<sup>-2</sup>).

Após o cálculo da constante de Hamaker individual  $A_{11}$  para o *R. opacus*, barita, calcita e magnesita , a constante  $A_{bwm}$  para o sistema foi determinada usando a Equação no 1.

### 4.5.3

#### Avaliação dos componentes individuais de energia livre interfacial

A equação desenvolvida por Van Oss (1994), foi descrita no Capítulo 1 e foi usada para calcular cada um dos componentes individuais de energia livre.

$$(1 + \cos \Theta)\gamma_l = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}}) + 2(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad (4)$$

Para encontrar os valores de  $\gamma_s^{LW}$ ,  $\gamma_s^+$ , e  $\gamma_s^-$  para as superfícies de *R. opacus* e dos minerais foram usados os valores de  $\gamma$ ,  $\gamma^{LW}$ ,  $\gamma^+$ , e  $\gamma^-$  dos líquidos utilizados nas medidas de ângulo de contato. A Tabela 16 apresenta os valores dos componentes para os solventes polares (água e formamide) e o solvente apolar ( $\alpha$ -Bromonaftaleno).

Tabela 16: Valores dos componentes de energia interfacial (van Oss, 1994) solventes polares (água e formamide) e o solvente apolar ( $\alpha$ -Bromonaftaleno). (mJ m<sup>-2</sup>)

Líquido	$\gamma$	$\gamma^{LW} / \gamma^d$	$\gamma^{AB}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Água	72,8	21,8	51	25,5	25,5
Formamide	58	39	19	2,3	39,6
$\alpha$ -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0	<0,1	<0,0

Desta forma, empregando os valores de  $\gamma_s^{LW}$  para o  $\alpha$ -bromonaftaleno A equação de van Oss toma a seguinte forma:

$$(1 + \cos \Theta)\gamma_l = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}}) \quad (5)$$

Com os valores de ângulo de contato medidos entre as superfícies e o bromonaftaleno , foram determinados os componentes  $\gamma_s^{LW}$  para a bactéria *R. opacus* e para os minerais.

Com os valores de  $\gamma_s^{LW}$  correspondentes à bactéria *R. opacus* e dos minerais de barita, calcita e magnesita, e usando novamente a equação de Van Oss com valores de ângulo de contato para os dois solventes polares (água e formamida) foram calculados os valores respectivos de  $\gamma_{+s}$ , e  $\gamma_{-s}$ . Para resolver os sistema de equações 2x2 foi utilizado o software Mathcad 13. O Anexo 7 mostra o sistema de equações ingressados no software para a bactéria *R. opacus* e para os minerais de barita, calcita e magnesita.

#### 4.5.4

#### Aproximação Termodinâmica da bactéria com solventes polares

A avaliação das energias de interação do *R. opacus* com os solventes de clorofórmio, hexadecano e acetato de etil foram estabelecidas. O método de avaliação da energia foi descrito por Sharma (2001). Para avaliar a energia de interação total foi usada a seguinte equação:

$$\Delta G_{adh} = \Delta G_{adh}^{LW} + \Delta G_{adh}^{AB} \quad (6)$$

Usando a aproximação de LW-AB apresentada na literatura (van Oss, 1994), o componente de energia para as interações de van der Waals é dado por:

$$\Delta G_{adh}^{LW} = -2(\sqrt{\gamma_{bv}^{LW}} - \sqrt{\gamma_{wv}^{LW}})(\sqrt{\gamma_{sv}^{LW}} - \sqrt{\gamma_{wv}^{LW}}) \quad (7)$$

Onde  $\gamma_{bv}^{LW}$ ,  $\gamma_{sv}^{LW}$ ,  $\gamma_{wv}^{LW}$  são os componentes interfaciais de Lifshitz - van der Waals de energia livre para a bactéria, o solvente e água respectivamente.

O componente da energia da interação ácido base é obtido pela seguinte equação:

$$\Delta G_{adh}^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_{bv}^+} - \sqrt{\gamma_{sv}^+})(\sqrt{\gamma_{bv}^-} - \sqrt{\gamma_{sv}^-}) - 2(\sqrt{\gamma_{bw}^+} - \sqrt{\gamma_{ww}^+})(\sqrt{\gamma_{bv}^-} - \sqrt{\gamma_{wv}^-}) - 2(\sqrt{\gamma_{sw}^+} - \sqrt{\gamma_{wv}^+})(\sqrt{\gamma_{sv}^-} - \sqrt{\gamma_{wv}^-}) \quad (8)$$

A Tabela 17 apresenta os valores dos componentes de energia de interação da bactéria *R. opacus* e de cada um dos solventes utilizados no estudo da aderência da

bactéria. Os valores de tensão interfacial  $\gamma^{LW}_b$ ,  $\gamma^+_b$ , e  $\gamma^-_b$  para a bactéria *R. opacus* foram obtidos experimentalmente como foi descrito no procedimento anterior.

Tabela 17: Valores dos componentes de energia de interação da bactéria *R. opacus* e de cada um dos solventes utilizados ( $\text{mJ m}^{-2}$ )

Material	$\gamma^{\text{total}}$	$\gamma^{\text{LW}}$	$\gamma^{\text{AB}}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
<i>R. opacus</i> (b)	31,06	0,641	30,42	8,116	28,51
Clorofórmio (s)	27,15	27,15	3,8	3,8	0
Hexadecane (s)	27,7	27,7	0	0	0
Acetato de Etilo (s)	23,9	23,9	19,2	0	19,2
Água (w)	72,8	21,8	51	25,5	25,5

#### 4.5.5

#### Aproximação Termodinâmica Bactéria *R. opacus* e os Minerais

A avaliação das energias de interação do *R. opacus* com as partículas minerais de barita, calcita e magnesita foram também estabelecidas. O método de avaliação da energia para as partículas minerais é similar ao usado para determinar a interação com os solventes polares. Neste caso para avaliar a energia de interação total são considerados os componentes interfaciais individuais  $\gamma^{\text{LW}}$ ,  $\gamma^+$ , e  $\gamma^-$  de energia livre da bactéria e os minerais calculados no item 3.6.3.

A avaliação da energia de interação total está dada por:

$$\Delta G_{adh} = \Delta G_{adh}^{\text{LW}} + \Delta G_{adh}^{\text{AB}} \quad (9)$$

Usando a aproximação de LW-AB referenciada no Capítulo 1, o componente de energia dado por as interações de van der Waals para o sistema bactéria – água – mineral é dado por:

$$\Delta G_{adh}^{\text{LW}} = -2(\sqrt{\gamma_{bv}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{wv}^{\text{LW}}})(\sqrt{\gamma_{mv}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{wv}^{\text{LW}}}) \quad (10)$$

Onde  $\gamma_{bv}^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_{mv}^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_{wv}^{\text{LW}}$  são os componentes interfaciais de Lifshitz - van der Waals de energia livre para a bactéria, o mineral e água respectivamente.

O componente de energia da interação ácido base é obtido dado pela seguinte equação:

$$\Delta G_{adh}^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_{bv}^+} - \sqrt{\gamma_{mv}^+})(\sqrt{\gamma_{bv}^-} - \sqrt{\gamma_{mv}^-}) - 2(\sqrt{\gamma_{bv}^+} - \sqrt{\gamma_{wv}^+})(\sqrt{\gamma_{bv}^-} - \sqrt{\gamma_{wv}^-}) - 2(\sqrt{\gamma_{mv}^+} - \sqrt{\gamma_{wv}^+})(\sqrt{\gamma_{mv}^-} - \sqrt{\gamma_{wv}^-}) \quad (11)$$

Onde  $\gamma_{bv}^+$ ,  $\gamma_{bv}^-$ ,  $\gamma_{mv}^+$ ,  $\gamma_{mv}^-$ ,  $\gamma_{wv}^+$ ,  $\gamma_{wv}^-$  são os componentes de energia livre interfaciais ácido – base para a bactéria, o mineral e água respectivamente.

#### 4.5.6 Teoria DLVO clássica

Como foi exposto no capítulo de revisão bibliográfica, a teoria DLVO considera a energia de interação total como a somatória de forças eletrostáticas e forças atrativas do tipo Van der Waals em função da distância entre as superfícies (Hemmasson, 1999).

Considerando a forma da *R. opacus* como uma esfera e a superfície mineral como plana, a contribuição eletrostática entre eles está dado por  $\Delta G_{ele}$  ( $Jm^{-2}$ )

$$\Delta G_{elt} = \pi \varepsilon_o \varepsilon a \{ 2 \zeta_1 \zeta_2 \ln \frac{(1 + e^{(-kH)})}{(1 - e^{(-kH)})} + (\zeta_1^2 + \zeta_2^2) \ln(1 - e^{(-2kH)}) \} \quad (12)$$

Onde

$\varepsilon_o$  : permissividade no vácuo igual a  $8.85 \times 10^{-12}$  ( $C^2 J^{-1} m^{-1}$ ),

$\varepsilon$  : constante dielétrica do meio igual a 79

$a$  : raio equivalente da célula de *R. opacus*  $1.24 \times 10^{-6}$  (m)

$\xi_1$  e  $\xi_2$  : valores de potencial zeta para o microorganismo e a partícula mineral respectivamente. (mV)

$1/k$  : comprimento de Debye Huckel (nm)

$H$  : distancia entre a partícula mineral e a célula (nm)

As forças atrativas de van der Waals  $\Delta G_{ATR}$  ( $Jm^{-2}$ ) estão dadas pela equação:

$$\Delta G_{ATR} = -\frac{A_{bwm}}{6} \left[ \frac{a}{H} + \frac{a}{H+2a} + \ln\left(\frac{H}{H+2a}\right) \right] \quad (13)$$

Onde  $A_{bwm}$  é a constante de Hamaker para o sistema bactéria – água – mineral calculado no item 4.5.2

#### 4.5.7 Teoria DLVO Estendida (X-DLVO)

A Teoria X-DLVO considera, além das forças atrativas e eletrostáticas, as energias de interação ácido - base em função da distância entre as partículas. A força ácido-base  $\Delta G^{AB}$  ( $\text{Jm}^{-2}$ ) está dado pela seguinte equação:

$$\Delta G^{AB} = \pi\alpha\lambda\Delta G_{adh}^{AB} e^{\frac{(d_0-H)}{\lambda}} \quad (14)$$

Onde

$d_0$ : Separação mínima entre duas superfícies (1,57 Å)

$\lambda$ : Parâmetro de comprimento de moléculas presentes em líquido ( $\cong 6$  Å)

O Anexo 8 apresenta a planilha de Excel correspondente aos cálculos das forças atrativas e eletrostáticas e ácido - base para os sistemas *R. opacus* – água - barita, *R. opacus* – água - calcita e *R. opacus* - água – magnesita consideradas na teoria de DLVO e X-DLVO .