

3

3.1. Materiais e Métodos

3.1. Preparo e caracterização dos minerais

As amostras minerais foram fornecidas pela Mineração Zé da Estrada Indústria e Comércio LTDA., situada no município de Araçuaí, no estado de Minas Gerais. Análise de fluorescência de raios X das amostras foi realizada para determinar a pureza do mineral.

Seguidamente, no intuito de alcançar o tamanho adequado dos minerais para os ensaios subsequentes, as amostras foram submetidas a uma fragmentação inicial em moinho de bolas seguida de uma moagem fina. A classificação granulométrica, em úmida, da amostra foi efetuada usando peneiras com abertura de malha entre 74 e 20 μm . A distribuição de tamanho da fração fina ($<20 \mu\text{m}$) foi obtida usando o equipamento Mastersizer 2000.

3.2. Procedência e preparo da bactéria

A cepa do microorganismo *R. opacus* foi fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello do estado de São Paulo. A bactéria *R. opacus* referenciada como DSM 43250 foi subcultivada no laboratório usando o meio de cultura YMA composto por: glicose: 10g.l^{-1} , peptona: 5g.l^{-1} , extrato de malta: 3g.l^{-1} , extrato de levedura: 3g.l^{-1} , CaCO_3 : 2g.l^{-1} e agar: 20g.l^{-1} . O meio de cultura foi ajustado em pH 7,2 e posteriormente esterilizado em autoclave com 1 atm de pressão, durante 20 min.

Inicialmente a bactéria foi cultivada durante 48 h em meio sólido (meio de cultura YMA), sendo mantida e transferida por repique mensal, em placas de Petri.

Para realizar o crescimento e obter as células concentradas de *R. opacus*, as células dos repiques, conservados em geladeira ($\pm 3^\circ\text{C}$), foram ativadas e cultivadas num meio líquido. A composição do meio líquido é semelhante ao meio

sólido YMA, exceto pela exclusão do Agar, que é o componente que torna o meio de cultura líquido em sólido.

O crescimento do microrganismo *R. opacus* foi realizado em um Erlenmeyers de 500 mL, por um período de 48 h à temperatura de 28 ± 2 °C, em um agitador rotatório de marca CIENTEC CT- 712, sendo operado á 250 rpm. Após o crescimento, a cultura foi separada por centrifugação a uma velocidade de 3500 rpm, por 12 min. O precipitado obtido da centrifugação foi lavado e re-suspenso com água deionizada sendo posteriormente esterilizado em autoclave a 1 atm de pressão e 120 °C durante 20 min, esfriado naturalmente e posteriormente mantido em refrigeração (± 3 °C).

A determinação da concentração celular foi realizada pelo método de peso seco, relacionado com a densidade óptica das suspensões de bactérias usando o espectrofotômetro da marca Shimadzu- UV 1800. O comprimento de onda adotado foi de 600 nm. A contagem celular foi, também, realizada usando uma câmara de Neubauer. No apêndice 1, são descritos os procedimentos de curva de calibração de peso seco e contagem celular.

3.3. Caracterização do Biorreagente

3.3.1. Determinação da curva de crescimento da bactéria

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, por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, assim como a avaliação da carga e do ponto isoelétrico (PIE).

3.3.2. Potencial zeta

Visando identificar a carga superficial, o ponto isoelétrico e os possíveis mecanismos de adesão mineral-microrganismo, medições de potencial zeta antes e após da adesão foram realizadas, usando o equipamento Zeta sizer Nano series da Malvern.

Na preparação das amostras foi usado NaCl 1 mM como eletrólito indiferente, as amostras foram acondicionadas por 5 min. A fim de ajustar os valores de pH foram preparadas soluções de HCl e NaOH na concentrações de 1 M e 0,1 M respectivamente. O ajuste de pH (2 até 11) e as medições de potencial zeta foram realizados automaticamente pelo aparelho. As medições foram realizadas em duplicata, sendo que cada resultado de potencial zeta representam uma média de 100 valores.

3.3.3. Espectrometria no infravermelho – FTIR

Os espectros de infravermelho foram usados para identificar e posteriormente comparar os grupos funcionais presentes na superfície dos minerais antes e após a interação com células de *R. opacus*. As análises foram realizadas no espectrofotômetro Nicolet 6700 FTIR, em modo de absorbância.

As suspensões minerais, provenientes dos testes de adsorção, na ausência e presença de *R. opacus*, assim como uma suspensão de bactéria com uma concentração de 600 mg/L foram filtradas e levadas à uma estufa à 60 °C por 24 horas. O pó resultante da secagem de cada amostra foi misturado com uma matriz de brometo de potássio (KBr) numa relação de 1/300. Os espectros foram coletados numa resolução 4 cm⁻¹ após 120 scans.

3.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observar o fenômeno de adesão da bactéria sobre a superfície mineral, análises de MEV foram empregadas neste estudo. As células de *R. opacus* e amostras minerais antes e após interações foram filtradas e secas. As amostras foram submetidas a um pré-tratamento ou preparo, para análise por MEV o qual consiste basicamente em três etapas (Mota, 2009): (i) fixação da estrutura da bactéria por um período de 3 horas em glutaraldeído a 5% (v/v), preparado em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M; (ii) desidratação mergulhando a amostra em soluções crescentes de acetona entre 30% e 100% em água destilada e levando ao aparelho de ponto crítico; e (iii) metalização da superfície das amostras com ouro (15 nm de espessura). As imagens foram adquiridas num microscópio eletrônico Carl Zeiss - DSM 960

3.4. Medida de ângulo de contato

Os ensaios de medida de ângulo de contato foram realizados baseados na técnica de ascensão capilar utilizando-se um tensiômetro da marca Krüss modelo K100 (Figura 5). A técnica envolve a medição da velocidade de ascensão do líquido (em função da massa) através de um leito empacotado de partículas contidas num tubo capilar. A amostra em pó foi pesada e compactada no tubo capilar até se obter 20 mm de altura na coluna do tubo. A parte inferior do tubo capilar foi embalada com papel filtro para reter as partículas. Devido à altura atingida pelo líquido penetrante ser influenciada pela uniformidade do leito de enchimento, o tubo capilar preenchido com partículas de -210 µm a +106 µm foi compactado uniformemente, com batidas promovidas suavemente contra uma superfície plana. O diâmetro do tubo capilar utilizado foi de 10 mm e a altura de 50 mm. O líquido, contido num recipiente cilíndrico de vidro, foi introduzido pela extremidade inferior do tubo capilar e, em seguida, foram iniciadas as medições. O devido cuidado foi tomado para remover as bolhas de ar aderidas à extremidade inferior do tubo capilar, enquanto o líquido estava sendo introduzido no recipiente cilíndrico de vidro. A presença de bolhas de ar influencia negativamente na cinética de molhagem das partículas. (Subrahmanyam *et al.*, 1996).

Assim, o ângulo de contacto de avanço da partícula mineral em função da velocidade de ascensão de líquido, foi calculada pela equação de Washburn modificada para massa, como já apresentado na equação 8 (pagina 28).

Substituindo os valores de tensão superficial (γ_{LV}); densidade (ρ); e viscosidade (η) para a água por: $68,7 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$; $997,04 \text{ Kg.m}^3$; e $0,890 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-2}.\text{s}$. respectivamente, e, para o tolueno como $28,2 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$; $886,9 \text{ Kg.m}^3$; e $0,558 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-2}.\text{s}$, respectivamente, a equação. (8) tem a forma:

$$\theta = \cos^{-1} \frac{\left(\frac{W^2}{t}\right)_{nw}}{\left(\frac{W^2}{t}\right)_w} 0.518 \quad \text{Para partículas hidrofóbicas (18)}$$

$$\theta = \cos^{-1} \frac{\left(\frac{W^2}{t}\right)_{nw}}{\left(\frac{W^2}{t}\right)_w} 1.93 \quad \text{Para partículas hidrofílicas (19)}$$

onde $(w^2/t)_{nw}$ e $(w^2/t)_w$ foram obtido diretamente no tensiômetro através de curvas w^2 vs t .

A água foi considerada como líquido perfeitamente molhável (w) para as partículas minerais hidrofílicas (limpas, sem adesão de bactérias), consequentemente o tolueno foi considerado líquido não molhável, após a interação microorganismo superfície mineral o tolueno foi o líquido perfeitamente molhável e a água o líquido não molhável.

Para avaliar a hidrofobicidade do biorreagente, as partículas foram condicionadas em uma solução de concentração e pH conhecida num tempo de 10 min, as amostras foram secas a 40°C durante 24 h, logo embalados em tubos capilares, compactada e então submetidas as medições de ascensão capilar.

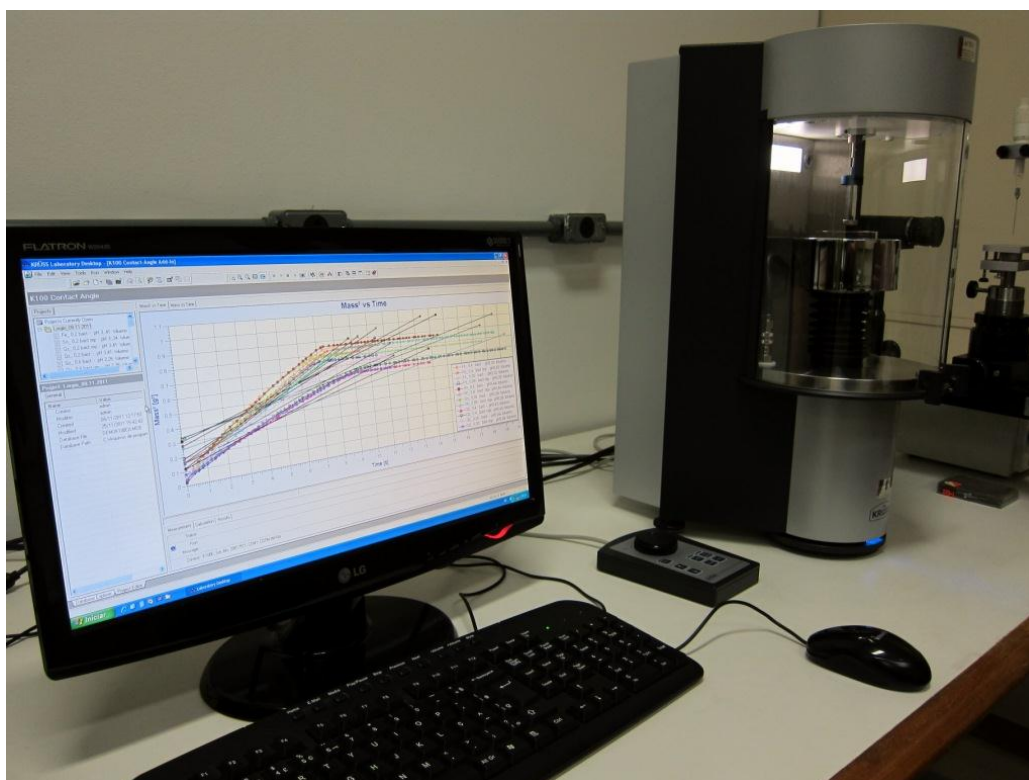


Figura 5 - Configuração experimental usada nos ensaios de medida de ângulo de contato por ascensão capilar, usando o tensiômetro Krüss K100.

3.5.

Determinação de tamanho e produção de bolhas

O método empregado para determinação do tamanho de bolhas baseou-se na técnica de espalhamento de luz de baixo ângulo (LALLS- *low Angle Laser Light Scattering*). Este método de análise consiste na medição dos ângulos de difração do raio laser, que são relacionados ao diâmetro de partícula (bolha), ou seja, quanto menor o tamanho, maior o ângulo de difração de um feixe luminoso que atravessa uma população de partículas (ou bolhas). Atualmente, esta técnica é uma das mais populares para caracterizar a distribuição de tamanho de partículas dispersas em meio líquido ou em forma de pó seco. A literatura reporta alguns trabalhos que utilizam esta técnica, principalmente, na determinação de tamanho de bolhas carregadas (*coloidal gás aphrons*, CGA) positivas ou negativas usando tensoativos com o uso de constrições tipo Venturi e na flotação por ar dissolvido (FAD) (Chaphalkar *et al.*, 1993; Bredwell *et al.*, 1998; Couto *et al.*, 2009).



Figura 6 - Configuração experimental usada na medição do tamanho da bolha: I) DC fonte de alimentação; II) Metasizer 2000; III) célula de eletroflotação

Para realizar a determinação do tamanho de bolha, uma célula de eletrocoagulação foi construída de material de acrílico com 1 L. de capacidade em escala de bancada. O cátodo foi uma chapa de aço de 8,5 cm de diâmetro e uma área superficial de 56.7 cm^2 , localiza em no fundo da célula. Uma tela de Ti/RuO_2 fornecido pela DENORA foi usada como ânodo (3 mm acima do catodo). Esta configuração permitiu medir tanto as bolhas de hidrogênio quanto as de oxigênio no mesmo reator.

O equipamento utilizado foi Mastersizer 2000SM de Malvern Instruments, UK (Figura 6). Este instrumento é capaz de analisar partículas na faixa de diâmetros de 0,01 a 1000 μm . A velocidade de bombeamento foi mantida em 1500 rpm, para evitar a formação de bolhas indesejadas através da entrada de ar atmosférico. A quantidade de microbolhas em suspensão foi ajustada pela fonte de corrente, para um obscurecimento entre 10 e 20%. A análise foi iniciada imediatamente, para evitar a coalescência de bolhas. Quando mais medições são realizadas em sequência, a distribuição de tamanho de bolha pode ser deslocada para o lado direito (tamanho maior). A corrente elétrica foi aplicada utilizando uma fonte de alimentação DC TECTROL mod.-TCA-30-10XR1A com uma classificação máxima de corrente de 10A e potencial de 30 V. Na figura 6 é apresentada a configuração experimental e os principais equipamentos usados na medição de tamanho de bolha.

Tabela 4 - Condições empregadas para a determinação da influencia do pH, densidade de corrente e concentração inicial de bioreagente na determinação de tamanho de bolha.

Condições operacionais	Parâmetro Avaliado		
	pH	Densidade de corrente	Concentração Inicial de bactéria
Vol. Solução (mL)	500	500	500
Massa de mineral (g)	0	0	0
Conc. biomassa (mg.L^{-1})	0	0	50 até 200
Veloc. Agitação (rpm)	1500	1500	1500
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25 ± 2	25 ± 2	25 ± 2
pH	2 até 10	7	7
Densidade de corrente (mA cm^{-2})	49,4	24,7 até 93,0	49,4
Tempo (s)	9	9	9

Para avaliar o efeito do pH a densidade de corrente foi mantida constante ($49,4 \text{ mA cm}^{-2}$), e quando o efeito da densidade de corrente foi avaliada, o pH foi mantido constante ($\text{pH}=7$). Igualmente na avaliação da concentração de bactéria, tanto o pH quanto a densidade de corrente foram mantidas constante $49,4 \text{ mA. cm}^{-2}$ e 7.0 , respectivamente. Todas as experiências foram realizadas em uma força iônica de $0,1 \text{ M}$ de NaCl e em duplicata. Na Tabela 4 são apresentados de forma detalhada os parâmetros avaliados e as condições operacionais.

Adicionalmente, a partir dos dados de concentração em volume de bolhas obtidos na folha de resultados do Mastersizer 2000, foi determinada a quantidade de bolhas produzidas na célula eletrolítica. Os cálculos são apresentados no apêndice 3 (Produção de bolhas).

3.6.

Experimentos de Adesão

Alguns dos principais fatores que afetam a capacidade de adesão do biorreagente foram examinados. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente, em frascos Erlenmeyers sob agitação constante de 250 rpm . As amostras foram coletadas no tempo correspondente e centrifugadas numa velocidade de 2000 rpm . A concentração celular foi medida no sobrenadante e comparada com a curva de peso seco, previamente estabelecida.

Assim, com o objetivo de encontrar as melhores condições para a adesão do microrganismo na superfície mineral, foram avaliados o pH da solução, concentração inicial de biorreagente e tempo de contato.

Para todos os ensaios foi usado um volume de 50 mL de solução de NaCl 1 mM e adicionando $0,5 \text{ g}$ de mineral. O ajuste do pH foi realizado utilizando soluções de NaOH 0.1 M e/ou HCl 0.1 M . Na Tabela 5 são apresentadas as condições experimentais empregadas nestes testes.

O efeito da concentração de microrganismo foi estudado para conhecer a concentração adequada de *R. opacus* visando obter a máxima adesão. Com este objetivo foram realizados os ensaios com diferentes concentrações de microrganismo, empregando os valores de pH obtidos do ensaio prévio.

Finalmente, o tempo de contato entre *R. opacus* e o mineral foi estudado a fim de conhecer o tempo de residência necessário para obter a máxima adesão do microrganismo sobre a superfície mineral. Para isso, foram coletadas amostras em diferentes intervalos de tempo para verificar se foi atingido o equilíbrio. O valor de pH e concentração de bactéria empregados para a determinação do tempo de equilíbrio foram obtidos dos ensaios anteriores. O esquema de bioadesão é apresentado na Figura 7.

Tabela 5 - Condições empregadas para a determinação da influencia do pH, concentração inicial de biorreagente e tempo de contato no processo de bioadesão. T (oC) 25 ± 2 .

Condições operacionais	Parâmetro Avaliado		
	pH	Concentração. Inicial de bactéria	Tempo de contato
Vol. Solução (mL)	50	50	50
Massa de mineral (g)	0.5	0.5	0.5
Conc. biomassa (mg.L ⁻¹)	600	200 até 900	600
Veloc. Agitação (rpm)	200	200	200
pH	2 até 10	3* e 4**	3* e 4**
Tempo (min)	30	30	3 até 60

* SiO₂, **SnO₂

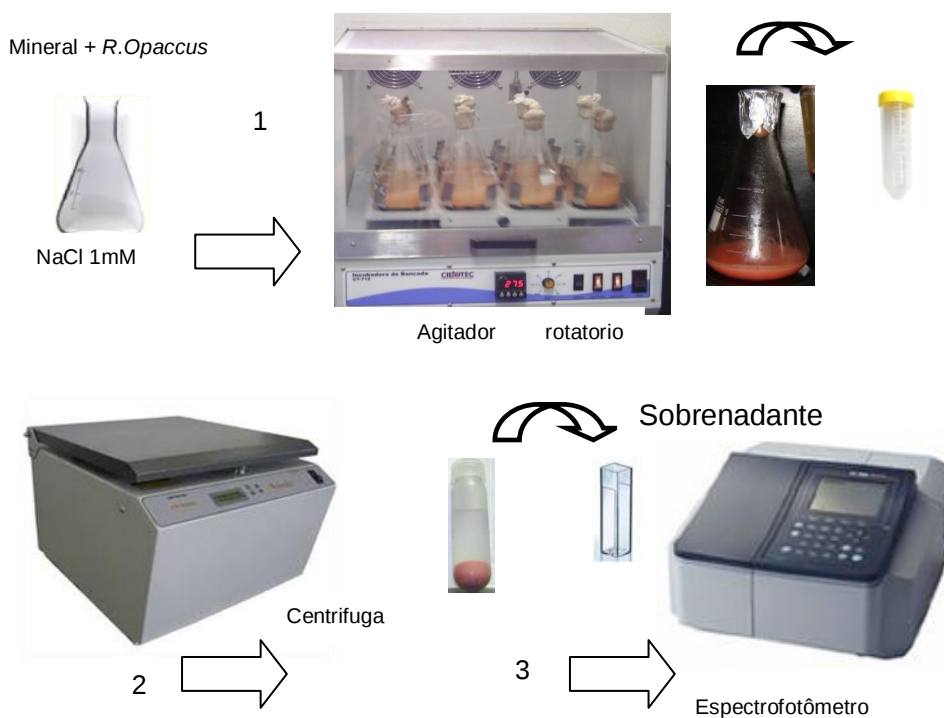


Figura 7 - Esquema de experimentos de bioadesão.

3.7. Ensaio de eletroflotação

Os ensaios de eletroflotação foram realizados no tubo de Hallimond modificado e adaptado para conter os eletrodos na parte inferior. Uma quantidade de 1,2 g de mineral foi adicionada a 120 mL de uma solução 0,1 M de NaCl. O eletrólito foi utilizado para manter a força iônica da solução. O pH da suspensão foi ajustado com soluções de NaOH 0,1M ou HCl 0,1 M.

Experimentos em branco de eletroflotação foram realizados previamente sem a presença de *R. opacus* com o objetivo de determinar o arraste mecânico das partículas finas com o aumento da densidade de corrente. Usando densidades de corrente de $51,4 \text{ mA cm}^{-2}$, o arraste mecânico foi determinado em 2%. Assim, os valores de recuperação apresentados nos resultados foram devidamente corrigidos, a curva de flotabilidade para minerais puros é apresentada no apêndice 5 (fig. A39).

Após o condicionamento do bioreagente na suspensão durante 5 min, foi iniciada a flotação a diferentes valores de pH, com densidade de corrente e concentração de bactéria constante. Para avaliar o efeito da densidade de corrente a concentração de *R. opacus* e o pH foram mantidos constantes. Na avaliação de concentração inicial de bactéria, uma concentração variável da bactéria foi adicionada, sendo mantidos os dois parâmetros anteriores constantes (densidade de corrente e pH). Para a avaliação destes parâmetros o tempo de flotação foi de 5 min.

A linha experimental dos ensaios de microflotação realizados por eletroflotação é apresentada na Figura 8 e na Tabela 6, sendo especificadas as condições experimentais anteriormente comentadas.

Numa segunda etapa, uma mistura das amostras minerais foi avaliada. Nesse ensaio foi empregada uma mistura contendo 0,6 g de cada amostra mineral. A mistura foi condicionada por 5 minutos em 120 ml de suspensão celular de concentração $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A flotação foi conduzida por 5 min, com densidade de corrente de $49,24 \text{ mA cm}^{-2}$. Após este tempo a massa flotada, assim como a deprimida foram recolhidas, filtradas e pesadas. O teor dos minerais foi obtido por FRX. Todos os ensaios foram realizados com agitação constante de 200 rpm usando agitador magnético, visando manter as partículas minerais em suspensão.

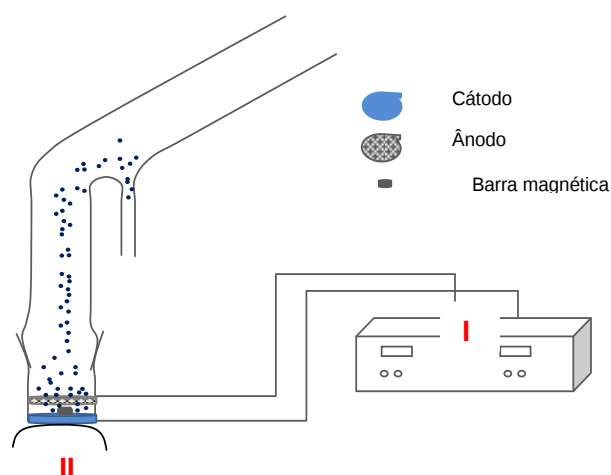


Figura 8 - Linha de Montagem da Eletroflotação: I) Fonte de tensão; II) Agitador Magnético; III) Tubo de Hallimond modificado.

Tabela 6 - Condições empregadas para a determinação da influencia da densidade de corrente, pH, concentração inicial de bioreagente e tempo de contato no processo de eletroflotação.

Parâmetro Avaliado					
Condições operacionais		Densidade de corrente	pH	Concentração inicial de bactéria	Tempo de contato
Vol. Solução (mL)		120	120	120	120
Massa de mineral (gr)		1.2	1.2	1.2	1.2
Conc. biomassa (mg.L ⁻¹)		600	600	200 até 800	600
Veloc. Agitação (rpm)			150	150	150
Temperatura (°C)			25 ± 2	25 ± 2	25 ± 2
pH			2 até 10	3* e 4**	3* e 4**
Densidade de corrente (mA cm ⁻²)		44,1 até 93,1	57,1	57,1	57,1
Tempo (min)			5	5	5

* SiO₂, **SnO₂