



Elayne Rohem Peçanha

Bioflotação Seletiva de Hematita em relação ao Quartzo
Cálculo da Energia de Superfície e da Adesão do *Bacillus subtilis*

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 Química e de Materiais da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Maurício Leonardo Torem
Co-orientadora: Dr^a. Marisa Bezerra de Mello Monte

Rio de Janeiro
Dezembro de 2014



Elayne Rohem Peçanha

Bioflotação Seletiva de Hematita em relação ao Quartzo
Cálculo da Energia de Superfície e da Adesão do *Bacillus subtilis*

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 da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Maurício Leonardo Torem

Orientador

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC-Rio

Dr^a. Marisa Bezerra de Mello Monte

Co-orientador

Instituto Tecnológico Vale – ITV

Prof. Roberto José de Carvalho

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC-Rio

Dr. Antônio Gutierrez Merma

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC-Rio

Dr. Laurindo de Salles Leal Filho

Instituto Tecnológico Vale – ITV

Prof. José Eugenio Leal

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

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2014

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

Elayne Rohem Peçanha

Graduou-se em Gestão Ambiental no IFRJ (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro) em 2012. Cursa atualmente Licenciatura em Química na UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e concluiu o mestrado no Departamento de Engenharia Química e de Materiais da PUC-Rio. Tem experiência na área de processamento mineral e no mestrado se aprofundou neste tema com ênfase em biotecnologia aplicada à flotação.

Ficha Catalográfica

Peçanha, Elayne Rohem

Bioflotação Seletiva de Hematita em relação ao Quartzo: Cálculo da Energia de Superfície e da Adesão do *Bacillus subtilis* /Elayne Rohem Peçanha; orientador: Mauricio Leonardo Torem. –2014.

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

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química e de Materiais, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia de materiais – Teses. 2. Biotecnologia. 3. Hematita; 4. Quartzo. 5. *Bacillus subtilis*. 6. Adesão. 7. Teoria DLVO. 8. Teoria X-DLVO. 9. Bioflotação. I. Torem, Mauricio Leonardo. II. Monte, Marisa Bezerra de Mello. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Engenharia Química e de Materiais. III. Título.

CDD:620.11

Para meus pais Ilsa e Jorge;
Meus irmãos Bruno e Mariana,
E minhas avós Maria José e Ignez.

Agradecimentos

Na dissertação de mestrado, tive ocasião de referir que uma dissertação, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas. Volto a reiterar tal afirmação, com a certeza de que nunca foi tão verdadeira quanto agora. Desde o início do mestrado, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aqueles contributos, esta investigação não teria sido possível.

Eu agradeço ao meu orientador Maurício L. Torem, pelo suporte, paciência, profissionalismo, correções e incentivos.

À minha co-orientadora Marisa B.de M. Monte, pelo suporte, liberdade e confiança referentes ao presente trabalho, além da amizade e compreensão em momentos difíceis.

Ao CNPq e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

À esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Ao CETEM/MCTI, sob a direção do Dr. Fernando A. de F. Lins, que forneceu toda sua infraestrutura para a boa execução desta dissertação.

À Professora Renata A. Simão da Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFRJ, pelas portas abertas.

À Márcia S. Sader, pela assistência na realização de parte dos experimentos e pelo carinho.

À Antonieta Middea e ao Reiner Neumann, do Setor de Caracterização Tecnológica do CETEM, pela assistência nas análises ao Microscópio Eletrônico de Varredura e no Difratorômetro de Raios-X.

Ao Nininho, Josemar e Tio (Gilvan) do CETEM, pela ajuda com a preparação das amostras minerais e pela paciência com minhas inúmeras perguntas.

Aos amigos do CETEM, advindos desde a iniciação científica, Fábio Novaes, Tiago Teotonio, Silvia C.A. França e Paulo F.A. Braga, pelos momentos de descontração, apoio e encorajamento.

Aos novos amigos que fiz no CETEM, Ana Paula, Débora Sanchez, Guilherme, Débora Monteiro, Ronan, Luciano e Diego Cara, pelo apoio laboratorial e pelos conselhos.

Aos amigos Pedro e Lucas, pela ajuda com o inglês.

Aos amigos da casa XXI, do Departamento de Engenharia Química e de Materiais, e aos demais colegas da PUC-Rio.

Aos meus eternos professores da UFRJ, Carlos Riehl, Fernanda Arruda, João Cajaíba, João Gouveia, e Ivo Lopez (*in memoriam*), pelas conversas, conselhos e apoio. À eles, que nesse caminho de mestrado concomitante à graduação, se mostraram verdadeiros mestres e dispostos a me ajudar.

À minha família, em particular, aos meus pais e minhas avós pelo carinho, incentivo, compreensão e encorajamento, durante todo este período.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Resumo

Peçanha, Elayne Rohem; Torem, Maurício Leonardo; Monte, Mariza Bezerra de Melo. **Bioflotação Seletiva de Hematita em relação ao Quartzo: Cálculo da Energia de Superfície e da Adesão da *Bacillus subtilis***. Rio de Janeiro, 2014. 111p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A literatura recente tem revelado o potencial de uso de estirpes microbianas na biotecnologia mineral. Pela afinidade com diferentes sistemas minerais, tais estirpes microbianas podem modificar as propriedades de superfície, e, dessa forma, mudar as características de uma superfície mineral. A bioflotação de minerais utiliza microrganismos como reagentes de flotação. No presente trabalho foi estudado o comportamento eletrocinético das partículas de quartzo e hematita, antes e após a interação com duas cepas da bactéria *Bacillus subtilis*. Os experimentos mostraram um deslocamento do ponto isoelétrico (PIE) da hematita que passou de 4 para 2,5 após interação com a cepa *B. subtilis* BAM, sugerindo um mecanismo de adsorção química. Já, a interação entre hematita e *B. subtilis* GLI, apresentou-se bem mais acentuada na faixa mais alcalina de pH. As medidas experimentais de ângulo de contato (método da gota sésil) foram realizadas para as superfícies das partículas minerais (hematita = 27,4°; quartzo = 13,0°) e das cepas *B. Subtilis* BAM (32,0°) e *B. subtilis* GLI (41,0°). A estirpe *B. subtilis* GLI foi capaz de modificar a superfície da hematita (46,0°) e, em menor proporção, a do quartzo (23,3°). Os valores de ângulo de contato foram utilizados para calcular as componentes de energia livre interfacial do quartzo, da hematita e das cepas. Os ensaios de microflotação realizados em tubo Hallimond modificado evidenciaram a aplicação da *B. subtilis* GLI como biorreagente. A melhor flotabilidade isolada de quartzo e hematita, conduzida por uma solução de *B. subtilis* GLI (600 mg.L⁻¹), foi obtida em pH 6, com uma recuperação de 40 e 80%, respectivamente. A seguir, o desempenho da flotação de uma mistura sintética, quartzo e hematita (na proporção 1:1), na presença de 600 mg.L⁻¹ da cepa *B. subtilis* GLI e em pH 6, foi avaliado, obtendo-

se um concentrado contendo um teor de 74% de Fe_2O_3 . As teorias DLVO e X-DLVO foram aplicadas para avaliar as energias de interação entre as cepas e os minerais em função da distância. A teoria X-DLVO foi capaz de prever a interação entre *B. subtilis* GLI e hematita justificando os resultados dos ensaios de flotação. Os resultados deste trabalho evidenciaram que a cepa *B. subtilis* GLI é promissora como biorreagente na flotação seletiva da hematita em relação ao quartzo.

Palavras chave

Biотecnologia; Hematita; Quartzo; *Bacillus subtilis*; Adesão; Teorias DLVO e X-DLVO; Bioflotação.

Abstract

Peçanha, Elayne Rohem; Torem, Maurício Leonardo (Advisor); Monte, Marisa Bezerra de Melo (Co-advisor). **Selective Bioflotation of Hematite from Quartz: Calculation of the Surface Energy and Adhesion of *Bacillus subtilis***. Rio de Janeiro, 2014. 111p. MSc. Dissertation – Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The recent literature has unveiled the potential use of microbial strains in mineral bioprocessing. Because of their affinity for different mineral systems, such microbial strains may modify the surface properties and in this way change the characteristics of a mineral surface. Mineral bioflotation uses microorganisms as flotation reagents. In the present work, the electrokinetic behavior of particles of quartz and hematite, before and after interaction with two strains of *Bacillus subtilis*, was studied. The experiments revealed a shift of the isoelectric point (IEP) which of hematite that changed from 4 to 2.5 after interaction with the strain *B. subtilis* BAM, suggesting a chemical adsorption mechanism, while the interaction between hematite and *B. subtilis* GLI presented itself much more pronounced in the alkaline pH range. The experimental measurements of the contact angle (sessile drop method) were taken for the surfaces of the mineral particles (hematite = 27.4 °, 13.0 ° = quartz) and for the *B. subtilis* BAM (32.0 °) and *B. subtilis* GLI (41.0 °) strains. The *B. subtilis* GLI strain was capable of modifying the surface of the hematite (46.0 °), and to a lesser extent, the quartz (23.3 °). The contact angle values were used to calculate the interface free energy components of quartz, hematite and the bacterial strains. The microflotation tests on a modified Hallimond tube evidenced the application of *B. subtilis* GLI as bioreagent. The best isolated flotability of quartz and hematite conducted by a solution of *B. subtilis* GLI (600 mg.L⁻¹) was obtained at pH 6, with a recovery of 40 and 80%, respectively. Subsequently, the flotation performance of a synthetic mixture, quartz and hematite (in ratio 1:1) in the presence of 600 mg.L⁻¹ of the strain *B. subtilis* GLI at pH 6, was evaluated and showed a concentrate with a content of 74% Fe₂O₃. The DLVO and

X-DLVO theories were applied to assess the energies of interaction between strains and minerals depending on the distance. The X-DLVO theory was able to preview the interaction between *B. subtilis* GLI and hematite, justifying the results of the flotation tests. The results of this study indicated that the strain *B. subtilis* GLI is promising as a bioreagent in the selective flotation of hematite relative to quartz.

Keywords

Biotechnology; Hematite; Quartz; *Bacillus subtilis*; Adhesion; DLVO and X-DLVO Theory; Bioflotation.

Sumário

1.	Introdução	22
2.	Objetivos e Relevância do Trabalho	23
2.1.	Objetivo Geral	23
2.2.	Objetivos Específicos	23
2.3.	Relevância do Trabalho	24
3.	Uso de Células Biológicas no Processamento Mineral	25
3.1.	Características Bacterianas e sua Influência na Bioflotação	27
3.2.	Estudos de Interação: Microrganismos e Minerais	34
4.	Energia de Superfície e Adesão Microbiana	40
4.1.	Dupla Camada Elétrica	40
4.2.	Ângulo de Contato e a Determinação da Energia Livre de Superfície	46
4.3.	Termodinâmica de Superfície, Teorias DLVO e X-DLVO aplicadas à Adesão das Bactérias	48
5.	Experimental	51
5.1.	Materiais	51
5.1.1.	<i>Preparação das Amostras Minerais</i>	51
5.1.2.	<i>Preparação das Seções Polidas</i>	52
5.1.3.	<i>Microrganismos e Condições de Cultivo</i>	54

5.1.3.1.	<i>Adaptação das Bactérias ao Substrato Mineral</i>	56
5.2.	Métodos	57
5.2.1.	<i>Caracterização das Amostras e das Estirpes Microbianas</i>	57
5.2.2.	<i>Ensaio de Mobilidade Eletroforética</i>	63
5.2.3.	<i>Ensaio de Ângulo de Contato</i>	63
5.2.4.	<i>Ensaio de Caracterização e Identificação de Espécies Adsorvidas por Espectrometria Infravermelha (IV)</i>	65
5.2.5.	<i>Ensaio de Microflotação em Tubo de Hallimond Modificado</i>	67
5.3.	Aplicação das Teorias Microscópica de Hamaker e Macroscópica de Lifshitz para Corpos Sólidos	68
5.4.	Aproximação Termodinâmica	70
5.5.	Estimativa da Energia de Interação pela Teoria DLVO e DLVO-X	71
6.	Resultados e Discussão	73
6.1.	Propriedades de Superfície dos Microrganismos	72
6.2.	Estudos do Efeito da Adesão Microbiana nas Propriedades de Superfície das Amostras	81
6.3.	Identificação das Espécies Adsorvidas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (IVTF)	88
6.4.	Estudos de Interação Microbiana com as Superfícies Minerais a Partir de Modelos Matemáticos	93
7.	Conclusões	101
8.	Referências Bibliográficas	104

Lista de Figuras

Figura 3.1	Fluxograma típico do bioprocessamento.	25
Figura 3.2	Fluxograma filogenético da vida.	28
Figura 3.3	Comparação entre as paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em que, WTA são os ácidos teicoicos, LTA os ácidos lipoteicoicos, CAP, IMP e OMP são proteínas, LPS são lipopolissacarídeos e LP são lipoproteínas.	29
Figura 3.4	Desenho esquemático de duas cadeias de glicanos unidas por ligações peptídicas. O hexágono mais claro se refere ao monossacarídeo N-acetilmurânico (MurNac) e o hexágono mais escuro ao N-acetil-glicosamina (GLcNac) ligado ao peptídeo correspondente.	30
Figura 3.5	Estrutura química dos lipídeos presentes na <i>B. subtilis</i> . Cardiolipina (CL), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), e lisilfosfatidilglicerol (LP), onde, R1 equivale a 17 carbonos de cadeia simples, R2 a 14 carbonos com uma saturação no carbono 9, R3 a 12 carbonos e R4 a 13 carbonos.	32
Figura 3.6	Curvas de potencial zeta vs pH para os minerais de hematita (A) e quartzo (B) antes e após interação com <i>R. opacus</i> .	35
Figura 3.7	Espectro de infravermelho da hematita antes e após interação com <i>R. erythropolis</i> .	36
Figura 3.8	Imagens por microscopia eletrônica de varredura da cepa <i>R. opacus</i> aderida às superfícies de apatita (a) e quartzo (b).	39

Figura 4.1	Dupla camada elétrica de Helmholtz e Perrin e curva de potencial correspondente.	41
Figura 4.2	(A) Superfície carregada negativamente com contra-íons (bolinhas pretas) e co-íons (bolinhas brancas); (B) Dependência da concentração dos íons com a distância x ; (C) Dupla Camada Elétrica de Gouy-Chapman e curva de potencial correspondente.	43
Figura 4.3	Distribuição do potencial eletrostático pelo modelo de Helmholtz –Grahame ou de tripla camada elétrica.	45
Figura 4.4	Representação esquemática do ângulo de contato entre as fases líquida, sólida e gasosa em equilíbrio.	46
Figura 5.1	Imagem da cominuição da amostra de quartzo em britador de mandíbulas.	52
Figura 5.2	(A) Equipamento Struers. (B) Seções polidas para os minerais de hematita e quartzo.	53
Figura 5.3	Imagem da cultura líquida em shaker rotatório antes (A) e depois (B) do crescimento bacteriano.	54
Figura 5.4	Curva de crescimento de <i>B. subtilis</i> em função do número de células.	55
Figura 5.5	Materiais para determinar a concentração celular bacteriana pelo método do peso seco.	56
Figura 5.6	(A) Difratorômetro de Raios X. (B) Amostra de quartzo no porta amostra.	58
Figura 5.7	Difratograma da amostra de hematita.	59
Figura 5.8	Difratograma da amostra de quartzo.	59

Figura 5.9	Imagens por microscopia eletrônica de varredura (A e B) e espectro de EDS (C) para amostra de hematita.	61
Figura 5.10	Imagens por microscopia eletrônica de varredura (A e B) e espectro de EDS (C) para amostra de quartzo.	62
Figura 5.11	Goniômetro Ramé-Hart.	64
Figura 5.12	Ângulo de contato sendo medido para a bactéria <i>B. subtilis</i> .	64
Figura 5.13	(A) Prensa Epecac e (B) pellet de hematita formado.	67
Figura 6.1	Imagens de microscopia óptica. 1a) e 1b) <i>Bacillus subtilis</i> GLI. 1c) e 1d) <i>Bacillus subtilis</i> BAM.	73
Figura 6.2	Micrografia de células de <i>B. subtilis</i> GLI.	74
Figura 6.3	Micrografia de células de <i>B. subtilis</i> BAM.	75
Figura 6.4	Espectros de infravermelho por transformada de Fourier referentes às cepas de <i>B. subtilis</i> GLI e BAM.	76
Figura 6.5	Curvas de potencial zeta versus pH em função da concentração de NaCl para a cepa <i>B. subtilis</i> GLI.	80
Figura 6.6	Curvas de potencial zeta versus pH em função da concentração de NaCl para a cepa <i>B. subtilis</i> BAM.	80
Figura 6.7	Curvas de potencial zeta versus pH para as cepas microbianas e hematita antes e após interação com as bactérias em função da concentração de 10^{-3} M de NaCl.	82
Figura 6.8	Curvas de potencial zeta versus pH para as cepas microbianas e quartzo antes e após interação com as bactérias em função da concentração de 10^{-3} M de NaCl.	83
Figura 6.9	Curvas de flotabilidade para hematita e quartzo em função do biorreagente e a pH 6.	85

Figura 6.10	Curvas de flotabilidade para hematita e quartzo em função do pH.	86
Figura 6.11	Imagens por microscopia eletrônica de varredura da cepa <i>B. subtilis</i> aderida às superfícies de hematita (a) e quartzo (b). As micrografias contornadas em vermelhos possuem marcação de 10 µm.	87
Figura 6.12	Espectro de infravermelho para hematita e posterior condicionamento com <i>B. subtilis</i> GLI.	89
Figura 6.13	Espectro de infravermelho para hematita e posterior condicionamento com <i>B. subtilis</i> BAM.	89
Figura 6.14	Espectro de infravermelho para quartzo e posterior condicionamento com <i>B. subtilis</i> GLI.	91
Figura 6.15	Espectro de infravermelho para quartzo e posterior condicionamento com <i>B. subtilis</i> BAM.	92
Figura 6.16	Curva de energia em função da distância para o sistema hematita- <i>B. subtilis</i> GLI à pH 6.	98
Figura 6.17	Curva de energia em função da distância para o sistema hematita- <i>B. subtilis</i> BAM à pH 6.	98
Figura 6.18	Curva de energia em função da distância para o sistema quartzo- <i>B. subtilis</i> GLI à pH 6.	99
Figura 6.19	Curva de energia em função da distância para o sistema quartzo- <i>B. subtilis</i> BAM à pH 6.	99

Lista de Tabelas

Tabela 3.1	Microrganismos empregados em diferentes sistemas minerais envolvendo hematita.	27
Tabela 3.2	Grupos ionizáveis encontrados na superfície bacteriana e suas constantes de dissociação.	33
Tabela 3.3	Ângulo de contato para diferentes espécies bacterianas.	37
Tabela 5.1	Frações granulométricas para cada ensaio realizado.	51
Tabela 5.2	Meios de Cultura bacteriana.	55
Tabela 5.3	Composição das amostras de hematita e quartzo obtidas por Florescência de Raios X.	57
Tabela 5.4	Condições empregadas na microflotação.	68
Tabela 5.5	Valores das componentes de energia de doação de elétrons, acepção de elétrons, ácido-base, Lifshitz-van der Walls e energia total para os respectivos líquidos. Constantes determinadas a 20°C, em mJ.m ² .	69
Tabela 6.1	Tamanho celular de <i>B. subtilis</i> aferido a partir de imagens por MEV.	75
Tabela 6.2	Classificação dos grupos funcionais em janelas de absorção identificados por FTIR para a composição celular das bactérias.	77
Tabela 6.3	Faixas de número de onda e grupos funcionais característicos para bactérias.	79
Tabela 6.4	Valores de ângulo de contato para as cepas em relação a água.	81

Tabela 6.5	Ângulo de contato de hematita e quartzo com e sem interação com as respectivas cepas bacterianas de estudo.	84
Tabela 6.6	Valores de flotabilidade para hematita e quartzo encontrados na literatura em trabalhos que utilizaram uma estirpe bacteriana como reagente de flotação.	88
Tabela 6.7	Resumo dos valores obtidos por IVTF da amostra de quartzo e respectivos autores que referenciam tais bandas.	92
Tabela 6.8	Ângulos de contato das superfícies de hematita, quartzo, <i>B. subtilis</i> GLI, <i>B. subtilis</i> BAM para cada um dos líquidos (água, glicerol e diiodometano)	93
Tabela 6.9	Valores das componentes de tensão superficial para os respectivos minerais e cepas bacterianas.	94
Tabela 6.10	Valores da constante de Hamaker individual e efetiva.	95
Tabela 6.11	Resultados da aproximação termodinâmica para os sistemas bactéria-mineral.	97

Lista de Símbolos e Unidades

Símbolo	Descrição	Unidade
γ	Energia livre – tensão de superfície	J.m^{-2}
γ_{SG}	Tensão superficial na interface sólido-gás	J.m^{-2}
γ_{SL}	Tensão superficial na interface sólido-líquido	J.m^{-2}
γ_{LG}	Tensão superficial na interface líquido-gás	J.m^{-2}
γ_{SG}^{LW}	Componente apolar de Lifshitz-van der Waals do sólido	J.m^{-2}
γ_{LG}^{LW}	Componente apolar de Lifshitz-van der Waals do líquido	J.m^{-2}
γ^{AB}	Componente polar de tensão ácido-base	J.m^{-2}
γ_{LG}^{AB}	Componente polar de tensão ácido-base na interface líquido-gás	J.m^{-2}
γ_{SG}^{AB}	Componente polar de tensão ácido-base na interface sólido-líquido	J.m^{-2}
γ^{+}	Parâmetro de aceitação de elétron	J.m^{-2}
γ^{-}	Parâmetro de doação de elétron	J.m^{-2}
γ_{SG}^{+}	Parâmetro de aceitação de elétron do sólido	J.m^{-2}
γ_{SG}^{-}	Parâmetro de doação de elétron do sólido	J.m^{-2}
γ_{LG}^{+}	Parâmetro de aceitação de elétron do líquido	J.m^{-2}
γ_{LG}^{-}	Parâmetro de doação de elétron do líquido	J.m^{-2}
Φ	Parâmetro de interação que depende do sistema	

ΔG	Variação de energia livre	J.m^{-2}
G_{TOTAL}	Energia livre de interação total	J.m^{-2}
G_{vdW}	Energia livre resultante da interação de van der Waals	J.m^{-2}
G_{Ele}	Energia livre resultante das interações eletrostáticas	J.m^{-2}
G_{AB}	Energia livre resultante da interação ácido-base	J.m^{-2}
r	Raio	m
ζ	Potencial zeta	V
H	Distância de aproximação	m
A_{11}	Constante de Hamaker para duas superfícies iguais no vácuo	J
A_{33}	Constante de Hamaker para a água	J
A_{132}	Constante de Hamaker para superfícies 1 e 2 em um meio 3	J
A_s	Área de superfície	m^2
C	Capacitância	$\text{C}^2.\text{J}^{-1}$
T	Temperatura absoluta	K
Ψ_0	Diferença de potencial entre a fase sólida dispersa e a solução	J.C^{-1}
δ	Distância entre as placas	m
c_i	Concentração molar dos íons i	mol.dm^{-3}
$c_{i,0}$	Concentração do íon i a uma distância infinitamente grande da fase sólida	mol.dm^{-3}
z_i	Valência dos íons/ número de carga	

Lista de Constantes

Símbolo	Constante	Valor (no S.I.)
β	Constante empírica	0,0001247 mJ.m ⁻²
d_0	Distância mínima de separação entre as partículas	1,65.10 ⁻¹⁰ m
e	Carga do elétron	1,6021.10 ⁻¹⁹ C
ε	Constante dielétrica relativa da água	80
ε_0	Permissividade do vácuo	8,854.10 ⁻¹² C ² .J ⁻¹ .m ⁻¹
k	Constante de Debye	$\frac{0,304}{\sqrt{M}} \cdot 10^{-9}$ m*
r_0	Distância de equilíbrio entre dois átomos	3.10 ⁻¹⁰ m
λ	Comprimento de correlação entre as moléculas em meio líquido	1.10 ⁻⁷ m
π		3,1415
k_B	Constante de Boltzmann	1,381.10 ⁻²³ J.K ⁻¹

* Onde M equivale a 1 mol em eletrólitos 1:1 em massa a 298 K.

1. Introdução

O biobeneficiamento mineral apresenta-se como uma tecnologia complementar pela aplicação de microrganismos na concentração seletiva de minerais e inclui os processos de bioflotação e biofloculação. As propriedades hidrofóbicas dos microrganismos e dos seus produtos metabólicos podem cumprir o papel desempenhado pelos reagentes convencionais de flotação.

Esta rota biotecnológica vem se tornando muito atraente, por apresentar um grande potencial tecnológico, aceitabilidade ambiental, flexibilidade na escolha de microrganismos e seletividade mineral no processamento de partículas minerais finas e ultrafinas (MERMA et al., 2013).

A literatura recente evidencia a possível utilização de espécies microbianas como reagentes de flotação na separação seletiva de vários sistemas, dentre eles estão: hematita-quartzo-caulinita-apatita (YANG et al., 2013); apatita-quartzo (MERMA et al., 2013); esfarelita-galena (VASANTHAKUMAR et al., 2013); pirita-esfarelita (MEHRABANI et al., 2010); calcita-magnesita (BOTERO et al., 2008); pirita-calcopirita (PATRA e NATARAJAN, 2004). Invariavelmente, estes pesquisadores verificaram que a interação entre determinadas cepas microbianas e partículas minerais conduziu a alterações significativas na química da superfície dos minerais, favorecendo a separação mineral.

O estudo das propriedades de superfície, como hidrofobicidade e potencial zeta das partículas minerais e de células microbianas bem como a previsão termodinâmica das energias de interação tornam-se importantes, uma vez que a partir desses princípios, pode-se obter a seletividade necessária ao processo de concentração mineral.

No presente trabalho a aplicação de duas cepas da bactéria *B. subtilis* foi investigada para a bioflotação seletiva da hematita em relação ao quartzo. A adesão entre as diferentes cepas e as superfícies de hematita e quartzo foi estudada em detalhe. O cálculo da energia de interação foi realizado utilizando as teorias de DLVO e DLVO estendida, esta, também chamada de X-DLVO.

2. Objetivos e Relevância do trabalho

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a interação entre duas cepas da bactéria *Bacillus subtilis* e amostras minerais de hematita e quartzo, quanto a seletividade e consequente emprego em sistemas de flotação.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e avaliar as propriedades de superfície de duas cepas bacterianas da mesma espécie, no caso *Bacillus subtilis* GLI e *Bacillus subtilis* BAM.
- Avaliar se as cepas estudadas possuem características significativamente diferentes que influem na adesão aos minerais.
- Analisar propriedades de superfície dos minerais antes e após interação com as cepas bacterianas.
- Identificar dentre as cepas de *B. subtilis* se alguma apresenta indícios de seletividade para hematita em relação ao quartzo.
- Aplicar a *B. subtilis* como biorreagente na flotação de hematita e quartzo e avaliar um possível comportamento seletivo.
- Analisar os efeitos da variação de pH e da concentração do biorreagente na flotabilidade dos minerais.
- Calcular as energias de interação para o sistema cepa-água-mineral mediante aproximação termodinâmica e pelas teorias DLVO e X-DLVO.

2.3 Relevância do Trabalho

Entre os desafios encontrados pelas plantas de flotação de minério de ferro, merecem destaque as significativas perdas de partículas finas de hematita, nos rejeitos, assim como a contaminação do concentrado por partículas grossas ($+74\mu\text{m}$) de quartzo. Por razões econômicas e ambientais, a necessidade de utilização da massa de hematita contida no rejeito incentiva a pesquisa relacionada à flotação direta de óxido de ferro. Neste contexto, a literatura tem apontado o uso de microrganismos como promissores biorreagentes de flotação. Entretanto, são poucos os trabalhos relacionados a este tema que abordam a separação de hematita e quartzo. Dessa forma, torna-se interessante o estudo das propriedades de superfície, como hidrofobicidade e potencial zeta, bem como a previsão termodinâmica de interfaces (energias de interação entre mineral e o microrganismo) e ensaios de microflotação em tudo de *Hallimond* modificado. Dessa forma, o presente trabalho visa o estudo sobre a seletividade no processo de flotação de hematita em relação ao quartzo utilizando as estirpes de *Bacillus subtilis* BAM e *Bacillus subtilis* GLI como biorreagente.

3. Uso de Células Biológicas no Processamento Mineral

A demanda mundial crescente por matérias primas levou a exploração e processamento de minérios de baixo teor, especialmente para metais base, como é o caso do ferro. A combinação de especificações mais rigorosas para a produção de concentrados aliadas a uma legislação mais rígida incentivou as inúmeras investigações para encontrar outras técnicas de processamento e reagentes de flotação mais adequados (GERICKE e GOVENDER, 2011; MESQUITA et al., 2002).

Nos recentes trabalhos desenvolvidos na área de biotecnologia observa-se a grande aplicação de microrganismos no tratamento de minérios, como agentes para o bioprocessamento (GERICKE e GOVENDER, 2011). A Figura 3.1 representa o fluxograma típico do bioprocessamento.

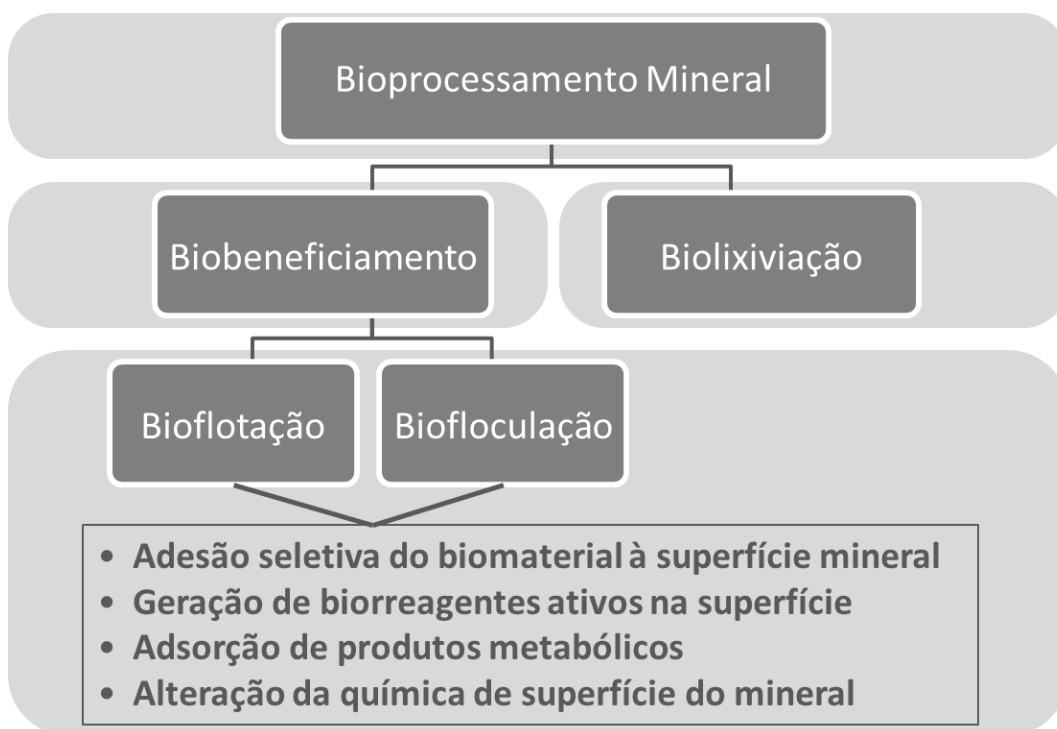


Figura 3.1 – Fluxograma típico do bioprocessamento (MESQUITA et al., 2002 - *adaptado*)

O bioprocessamento pode ser dividido em biobeneficiamento e biolixiviação. Nesta, o processo hidrometalúrgico é realizado por biorreagentes para dissolução de metais de seus minérios ou concentrados. Já a técnica convencional de

biobeneficiamento envolve a separação seletiva mediante a interação com o biorreagente.

A aplicação em escala industrial da biolixiviação de minérios sulfetados de baixo teor encontra-se consolidada, especialmente, para recuperação de cobre, urânio, chumbo, zinco e metais preciosos tais como ouro e prata. Também é comum o emprego de microrganismos por lodo ativado no tratamento de águas. Entretanto, a utilização de microrganismos em processos de flotação e floculação é recente e apresenta um grande potencial para estudo (RAO e SUBRAMANIAN, 2007).

Durante a bioflotação, microrganismos e/ou seus produtos metabólicos extracelulares associados (EPS) são usados para separar seletivamente minerais de ganga. E, esses têm sido relatados como modificadores, coletores e/ou depressores benignos, por não serem danosos ao meio ambiente, e ainda, biodegradáveis (CHANDRAPRABHA et al., 2004, CHANDRAPRABHA et al., 2005; CHANDRAPRABHA e NATARAJAN, 2006; Deo e Natarajan, 1998; EL-MIDANY e ABDEL-KHALEK, 2014, GERICKE e GOVENDER, 2011; PATRA e NATARAJAN, 2003, 2004, 2006, 2008; MERMA et al., 2013; SANTHIYA et al., 2000; SANTHIYA et al., 2001).

Na Tabela 3.1 apresenta-se algumas referências da literatura onde os pesquisadores estudaram os aspectos fundamentais da interação entre células microbianas e minerais, dentre eles a hematita, com uso potencial na flotação. Os autores realizaram medidas de potencial zeta dos microrganismos e dos minerais e, também, dos minerais após interação com as cepas microbianas. Além disso, a maioria dos pesquisadores realizou testes de flotabilidade para avaliar o desempenho dos mesmos na seletividade do processo.

A Tabela 3.1 mostra ainda que microrganismos diferentes podem atuar como depressores ou coletores, conforme o sistema mineral avaliado. Como é o caso da *R. erythropolis* usada por YANG et al. (2013) que se apresentou como coletor para hematita, enquanto a *P. polymyxa* estudada por DEO e NATARAJAN (1997) apresentou efeito depressor para este mesmo mineral, constatando, assim, a gama de possibilidades em novos estudos na área.

Tabela 3.1 – Microrganismos empregados em diferentes sistemas minerais envolvendo hematita.

Sistema Mineral	Microrganismo	Função do Biorreagente	Referência
Hematita, quartzo, caulinita, apatita	<i>R. erythropolis</i>	Coletor para hematita	Yang et al., 2013
Hematita, quartzo, corundum	<i>E. coli</i>	Depressor para hematita	Farahata et al., 2009
Hematita	<i>M. phlei</i>	Coletor	Yang et al., 2007
Hematita, quartzo	<i>R. opacus</i>	Coletor para hematita	Mesquita et al., 2003
Hematita, quartzo	<i>B. polymyxa</i>	Coletor para hematita	Shashikala e Raichu, 2002
Hematita, quartzo, corundum, calcita	<i>P. polymyxa</i>	Depressor para hematita e corundum	Deo e Natarajan, 1997

Assim como os surfactantes, os microrganismos e/ou seus produtos metabólicos (EPS) podem alterar as propriedades de superfície dos minerais. O motivo para tal está na presença de determinados grupos funcionais na parede celular bacteriana, como é o caso de amins, alcoóis, ésteres, carboxilas, entre outros, que conferem características anfipáticas aos microrganismos.

Entretanto, o processo de modificação da superfície mineral pela interação de microrganismos envolve reações adsorptivas complexas. Existem três mecanismos diferentes pelos quais pode ocorrer tal processo, são eles: a fixação de células microbianas ao substrato; reações entre as frações solúveis da célula e a superfície e; adsorção e/ou reação química com produtos metabólitos. Todos estes processos conduzem a uma alteração nas propriedades de superfície do mineral (RAO e SUBRAMANIAM, 2007).

3.1 Características Bacterianas e sua Influência na Bioflotação

A árvore filogenética da vida pode ser classificada de acordo com os domínios bactéria, archaeae e eukarya, como exemplificado na Figura 3.2. Os reinos protista, plantae, fungi e animalia pertencem ao domínio eukarya. Já, o antigo reino conhecido como monera, foi subdividido entre os domínios eubacteria e

archeabacteria. As archaee contemplam bactérias metanogênicas, termófilas extremas e halófilas extremas. Já, o grupo eubactéria, apresenta bactérias como as Gram positivas e Gram negativas.

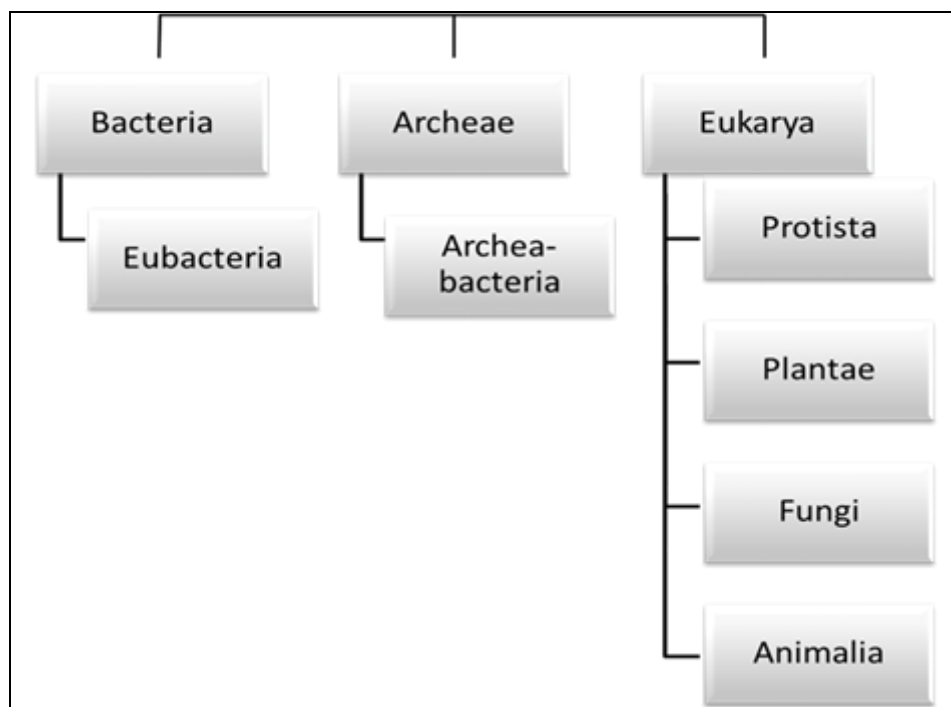


Figura 3.2 – Fluxograma filogenético da vida.

As bactérias apresentam uma estrutura relativamente simples. São organismos unicelulares, não apresentam membrana nucleada e se reproduzem por divisão assexuada. As bactérias podem ser classificadas por coloração de Gram que, é um teste simples e permite a identificação de bactérias a partir das diferenças químicas e estruturais relacionadas à sua parede celular.

As bactérias Gram positivas e Gram negativas (Figura 3.3) diferenciam-se pela constituição das suas paredes celulares. As Gram positivas são constituídas por um emaranhado de peptideoglicanos onde se encontram glicopolímeros, como ácido teicóico e/ou polissacarídeos e proteínas, já as Gram negativas possuem uma membrana mais complexa, como observado na Figura 3.3.

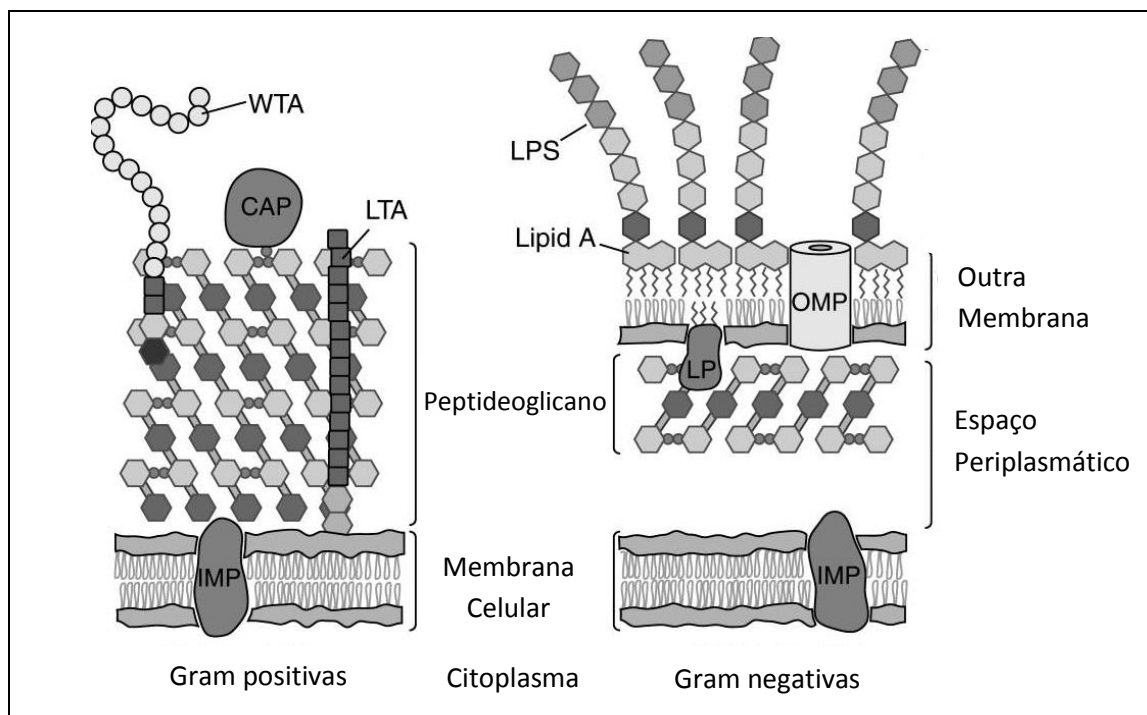


Figura 3.3 – Comparação entre as paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em que, WTA são os ácidos teicoicos, LTA os ácidos lipoteicoicos, CAP, IMP e OMP são proteínas, LPS são lipopolissacarídeos e LP são lipoproteínas (SILHAVY et al., 2010).

O peptidoglicano é o principal componente da parede celular das bactérias Gram positivas (30 a 100 nm de espessura) que, por sua vez, constitui-se de cadeias de glicanos unidas por ligações peptídicas¹. A cadeia de glicano é formada por monossacarídeos alternados (N-acetil-glicosamina e N-acetilmurâmico). A Figura 3.4 propicia uma ideia dessa constituição, bem como a composição química dos glicanos.

¹A ligação peptídica ocorre quando um grupo carboxílico reage com um grupo amina formando uma amida.

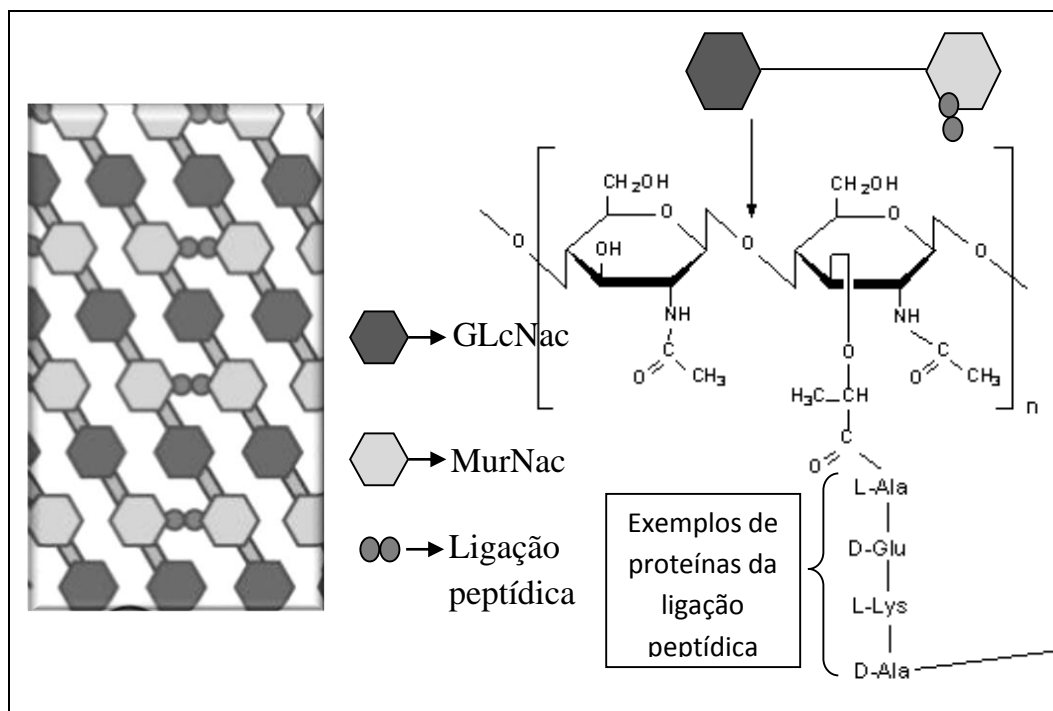


Figura 3.4 - Desenho esquemático de duas cadeias de glicanos unidas por ligações peptídicas. O hexágono mais claro refere-se ao monossacarídeo N-acetilmurânico (MurNac) e o hexágono mais escuro ao N-acetil-glicosamina (GLcNac) ligado ao peptídeo correspondente.

Especificamente para a bactéria *Bacillus subtilis*, a literatura reporta a uma cadeia de glicanos com 96 dissacarídeos que podem chegar até 5 mm de comprimento (HAYHURST et al., 2008).

Polímeros aniônicos longos estão presentes na camada de peptideoglicano e são chamados de ácido teicóico (Figura 3.3). São compostos essencialmente de glicerol (álcool com três carbonos)-fosfato ou repetições de ribitol (álcool com cinco carbonos)-fosfato. Existem duas classes principais desses polímeros que são os ácidos teicóicos acoplados ao peptideoglicano (WTA – *wall teichoic acids*) e os ácidos lipoteicóicos (LTA – *lipoteichoic acids*) que estão relacionados com os lipídeos da membrana (SILHAVY et al., 2010).

Os ácidos teicóicos estão presentes em proporções próximas ao peptideoglicano das Gram positivas e são importantes para integridade desses microrganismos (SEWELLE e BROWN, 2013). Esses polialcoóis estão conectados por ésteres fosfato, normalmente estão associados aos açúcares (MADIGAN et al., 2010).

Juntos, os LTAs e WTAs compreendem o que foi nomeado como "contínuo de carga aniônica" que se origina na superfície das células Gram positivas. A carga

aniônica da superfície dessas bactérias é tão característica que mesmo quando são cultivadas em condições limitadas de fontes de fosfato² ou quando genes específicos estão ausentes para formação dos WTAs, as células produzem outros tipos de polímeros polianiónicos em que as cargas negativas são fornecidas por grupo carboxílico ou sulfato (SILHAVY et al., 2010).

Dependendo da estirpe de *B. subtilis* os WTAs variam entre ribitol-fosfato ou glicerol-fosfato (SILHAVE et al., 2010).

SEWEL e BROWN (2013) conseguiram definir as estruturas e os requisitos de biossíntese dos ácidos teicóicos para a estirpe *Bacillus subtilis* 168. Os pesquisadores citados constataram que estes ácidos possuem formação de cadeias de glicerol-fosfato. BROWN et al (2010) estudaram a cepa *B. subtilis* W23 e observaram que seus ácidos teicóicos são formados de ribitol-fosfato para essa estirpe.

Entretanto, independentemente dessa possível diferença, nos WTAs e LTAs da bactéria *B. subtilis* estarão presentes os grupos funcionais, fosfato, álcool e ácido carboxílico. Além desses compostos ressalta-se a importância de lipídeos e proteínas na estrutura de células bacterianas Gram positivas. A membrana celular é usualmente descrita como uma matriz que contém moléculas de lipídeos e proteínas distribuídas homogeneamente (NISHIBORI et al., 2005). Entretanto, DOWHAN et al. (2004), demonstraram uma distribuição heterogênea para a membrana celular, uma mistura complexa de vários lipídeos com composições diferentes para as “cabeças” hidrofílicas.

Em 1969, KAMP et al. realizaram uma análise composicional fosfolipídica de uma cepa de *Bacillus subtilis*. A presença de quatro fosfolipídeos foi identificada, dentre eles, a cardiolipina (CL), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), e lisilfosfatidilglicerol (LP). Todos classificados como um fosfolipídeopoliglicerol. BEILEN (2013), GILDDEN et al. (2009) e NISHIROBI et al. (2005) confirmaram a existência desses lipídeos e a Figura 3.5 apresenta suas estruturas.

²no caso da *B. subtilis*.

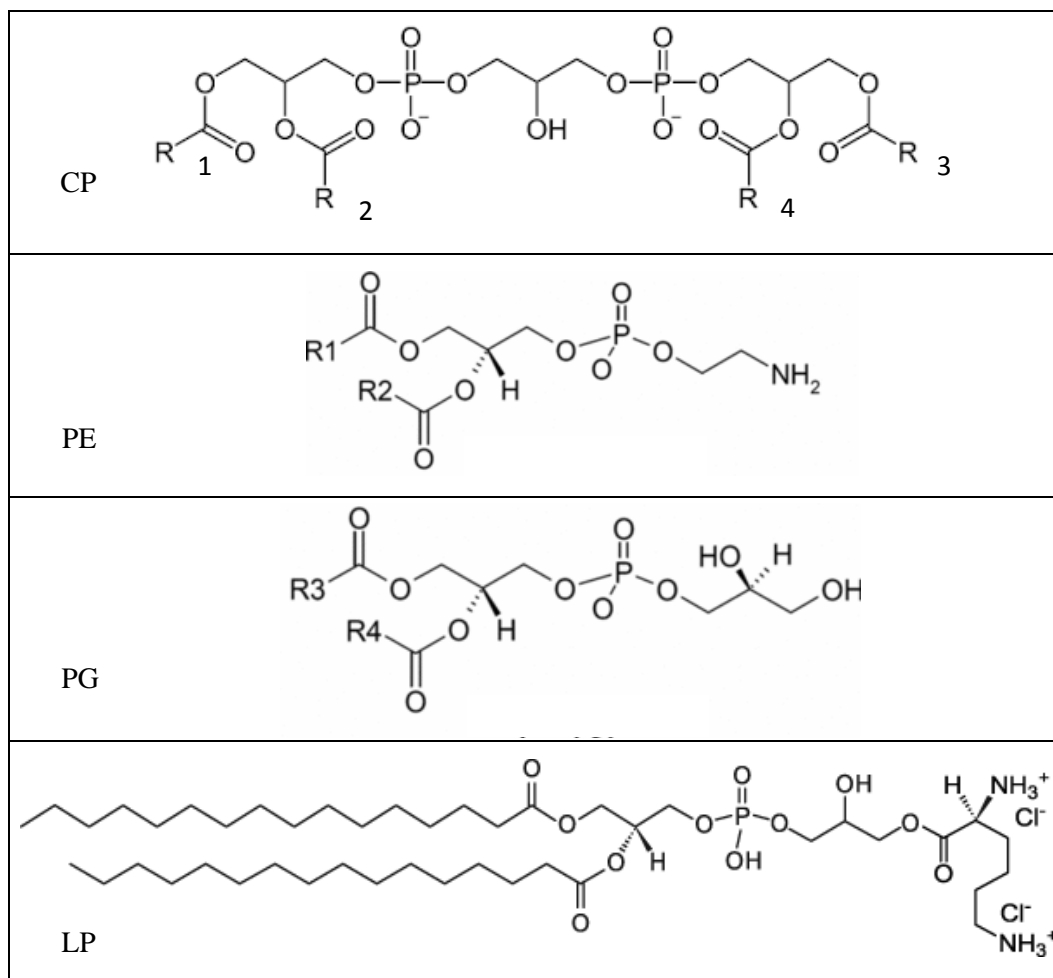


Figura 3.5 – Estrutura química dos lipídeos presentes na *B. subtilis*. Cardiolipina³ (CL), fosfatidilglicerol⁴ (PG), fosfatidiletanolamina⁴ (PE), e lisilfosfatidilglicerol⁵ (LP), onde, R1 equivale a 17 carbonos de cadeia simples, R2 a 14 carbonos com uma saturação no carbono 9, R3 a 12 carbonos e R4 a 13 carbonos.

Nas bactérias Gram positivas, as proteínas estão próximas à membrana citoplasmática, podendo ainda atravessar a membrana e se ligarem ao lipídeo (neste caso, são chamadas de glicolipídeos) bem como se associar ao peptideoglicano (SILHAVY et al., 2010). De fato, as proteínas podem ser consideradas biopolímeros, formados por monômeros de aminoácidos. Estes por sua vez, são estruturas que sempre contêm grupamento amina e carboxila e são ligados por ligações peptídicas (LIMA, 2008).

Os aminoácidos são compostos anfóteros, pois dependendo do pH do meio podem agir como base ou ácido. Além disso, são solúveis em função dos íons

³REN et al., 2014.

⁴GARRETT, 2012.

⁵SOHLENKAMP et al., 2007.

dissolvidos e do pH do meio, da temperatura do sistema e da polaridade do solvente (VOET e VOET, 1995).

As Gram positivas apresentam tanto sítios positivos como negativos, na superfície da parede celular. No entanto, devido à predominância dos grupos aniônicos, em geral, o ponto isoelétrico de carga encontra-se na faixa ácida de pH, mostrando que as mesmas comportam-se como um ácido fraco. Na Tabela 3.2 apresentam-se as substâncias, que predominam na superfície da parede celular, as constantes de dissociação, pK_a , respectivas, bem como seus produtos de dissociação. A concentração de H^+ e OH^- desempenha um papel importante na determinação do potencial de superfície bem como na determinação das espécies ionizáveis.

Tabela 3.2 - Grupos ionizáveis encontrados na superfície bacteriana e suas constantes de dissociação (POORGUINGA et al., 2002).

Reação	Origem	pK_a
$-COOH \leftrightarrow -COO^- + H^+$	Polissacarídeos	2,8
	Proteína, peptideoglicano	Entre 4,0 e 5,0
$-NH_3^+ \leftrightarrow -NH_2 + H^+$	Proteína, peptideoglicano	Entre 9,0 e 9,8
$-HPO_4^- \leftrightarrow PO_4^{2-} + H^+$	Ácidos teicoicos	2,1
$-H_2PO_4 \leftrightarrow -HPO_4^- + H^+$	Fosfolipídeos	2,1
$-HPO_4^- \leftrightarrow PO_4^{2-} + H^+$	Fosfolipídeos	7,2

Segundo a literatura, os grupos ácido-base mais prováveis na composição da parede celular são os descritos na Tabela 3.2. Uma importante observação se faz necessária: a interação entre as porções carregadas dentro de um polieletrólito pode resultar em um pK_a diferente do grupo isolado, pois o pK_a de um ânion aumenta com interações ânion-ânion e reduz com interações ânion-cátion (RIJNAARTS et al., 1995).

A predominância dos polissacáridos na parede celular, constituído por grupos de fosfato e/ou carboxilados, promove valores de $PIE \leq 2,8$. Os peptidoglicanos e proteínas contêm grupos $COOH/COO^-$ e $-NH^+/NH_2$, onde o peptidoglicano contém pelo menos uma porção de amônia para três de ácido e, portanto, apresenta um PIE

> 3,8. A interação entre os grupos carboxila e amônio podem reduzir o seu PIE para um valor menor. Por outro lado, a quantidade de grupos COO^- podem reagir, parcialmente ou completamente, formando um grupamento amida, favorecendo o aumento do valor do PIE. Assim, o ponto isoelétrico de diferentes tipos de peptidoglicano pode variar dentro de uma vasta gama de valores (superior a 3,0) (RIJNAARTS et al., 1995).

As células bacterianas são quimicamente e estruturalmente mais complexas e heterogêneas que partículas sintéticas e isto têm impacto diferente sobre a adesão bacteriana às superfícies (POORTINGA et al., 2002).

3.2 Estudos de Interação: Microrganismos e Minerais

A literatura tem apontado o uso crescente de estudos que visam a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias ambientais, para assegurar a integridade do meio ambiente e das futuras gerações. As vertentes e aplicações do uso de microrganismos na grande área de sustentabilidade têm chamado atenção, pois são biodegradáveis com resultados promissores de aplicação na área da tecnologia mineral.

Nesta temática, identifica-se uma série de trabalhos voltados para a utilização de microrganismos, como reagentes em alguma etapa do processamento mineral. MESQUITA e TOREM (2003) estudaram a aplicação de uma cepa bacteriana como coletor de flotação. A cepa *Rhodococcus opacus* foi avaliada na flotação seletiva da hematita em relação ao quartzo. O estudo de mobilidade eletroforética desses minerais, após a interação com a cepa, revelou a adsorção preferencial da cepa na superfície da hematita. Uma janela de seletividade foi observada a partir dos experimentos posteriores de microflotação.

Conforme observado na Figura 3.6, as curvas do quartzo e hematita, após condicionamento bacteriano, apresentaram um deslocamento do valor de PIE. O quartzo apresentou uma variação de, aproximadamente, 2,2 para 3,2 após a interação. Já o PIE da hematita, deslocou de 5,0 para 2,6. Essas mudanças no PIE caracterizam adsorção específica. Nota-se que as curvas dos minerais após a

interação com a cepa se aproximou da curva de potencial zeta da *R. opacus* (MESQUITA e TOREM, 2003).

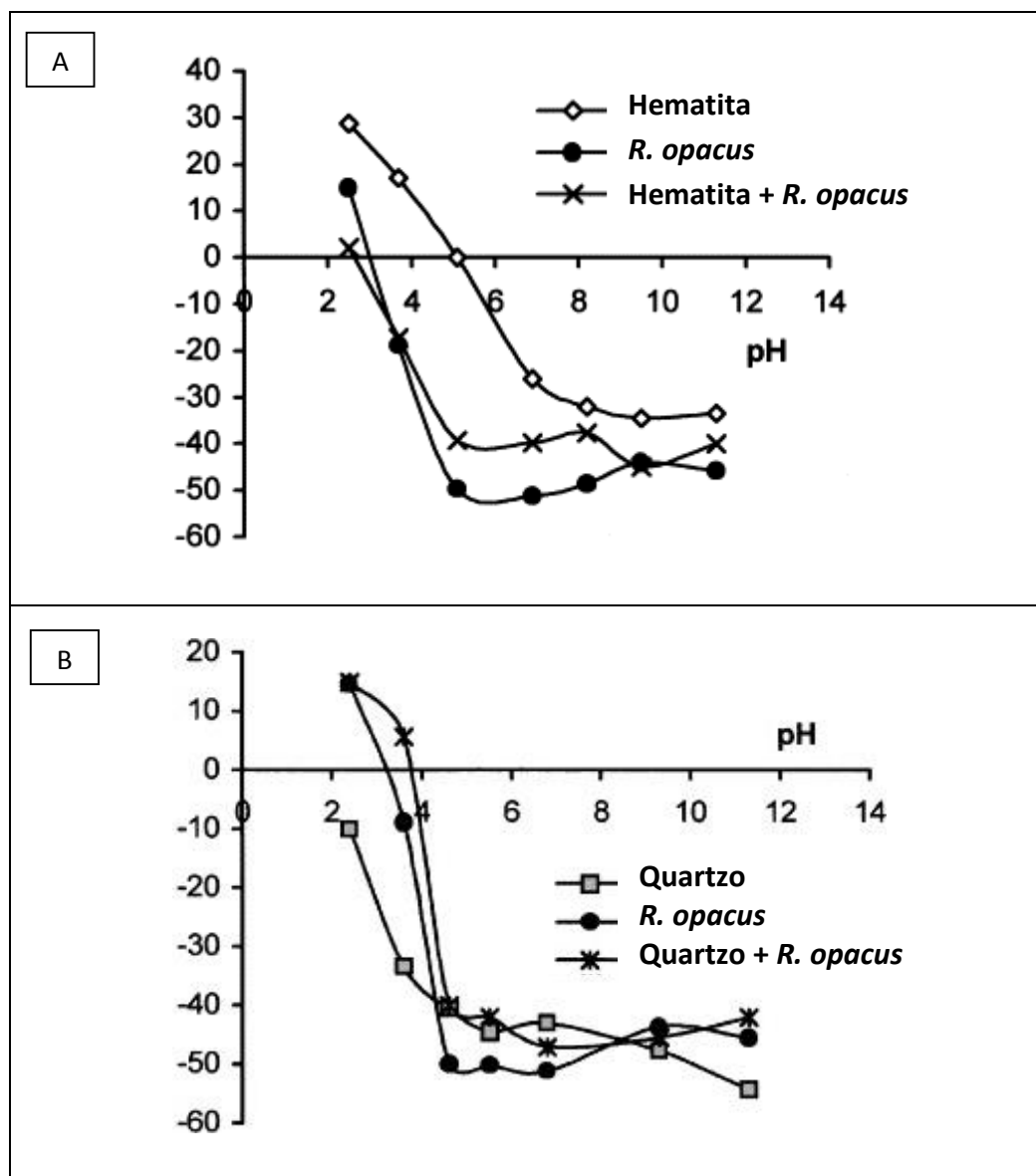


Figura 3.6 – Curvas de potencial zeta vs pH para os minerais de hematita (A) e quartzo (B) antes e após interação com *R. opacus* (MESQUITA e TOREM, 2003).

Trabalhos mais recentes caracterizaram tanto a superfície mineral quanto a microbiana por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (IVTF) (ver Figura 3.7). Mesmo sendo qualitativa, essa espectroscopia proporciona um bom comparativo quando analisado com espectros realizados antes e após da adesão bacteriana.

YANG et al. (2013) compararam os espectros de hematita e da *R. erythropolis* aderida à este mineral. Os grupamentos funcionais, característicos da estirpe, foram

observados no espectro obtido após os ensaios de interação. Dentre os grupos, encontram-se vibrações de hidroxila, C=O, COO⁻, C–O–C⁻, amida e alcanos. Os ensaios de flotação isolada da hematita comprovaram que a *R. erythropolis*, torna a superfície da mesma hidrofóbica, com recuperações de partículas de hematita na espuma.

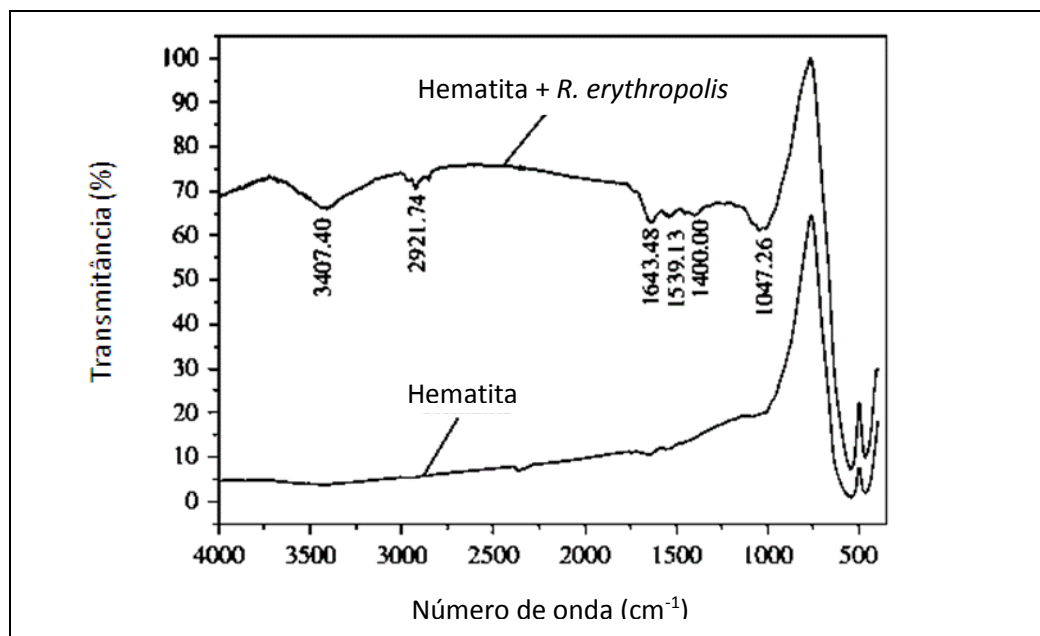


Figura 3.7 – Espectro de infravermelho da hematita antes e após interação com *R. erythropolis* (Yang et al., 2013).

A aderência de microrganismos à uma superfície sólida, depende das interações entre as partículas, dentre elas, as interações eletrostáticas, ácido-base e de van der Waals, podendo conferir características hidrofóbicas ou hidrofílicas à mesma.

Na Tabela 3.3 apresentam-se os dados mais recentes, extraídos da literatura, de valores de ângulo de contato de bactérias. Nesta tabela observa-se os diferentes valores de ângulo de contato para as cepas bacterianas, podendo variar de 12 a 90 graus. Entretanto, foram encontrados valores maiores que 100 graus para algumas espécies (RIJNAARTS et al., 1999). Destaca-se ainda a variedade de ângulos para uma mesma espécie relatados por SHARMA et al. (2001). Dessa forma, qualquer generalização se considera inválida e a determinação da hidrofobicidade da cepa estudada compila um resultado interessante. Como descrito na tabela, VIJAYALAKSHMI e RAICHUR (2003) encontraram um ângulo de contato de 50° para a cepa *B. subtilis*.

Tabela 3.3 – Ângulo de contato para diferentes espécies bacterianas.

Espécie	Ângulo de contato (°)	Referência
<i>L. monocytogenes</i>	27,8 ± 2	CASARIN et al., 2014
<i>S. Enteritidis</i>	23,4 ± 3	
<i>A. thiooxidans</i>	12,0 ± 2,1	DIAL et al., 2014
<i>L. ferrooxidans</i>	11,6 ± 1,4	
<i>C. jejuni</i> C977a	41,7 ± 0,6	NGUYEN et al., 2011
<i>C. jejuni</i> C939a	45,0 ± 1,5	
<i>Salmonella</i> S1296a	41,0 ± 2,3	
<i>B. subtilis</i>	50	VIJAYALAKSHMI e RAICHUR, 2003
<i>P. polymyxa</i>	19,85	SHARMA e RAO, 2003
<i>A. naeslundii</i> 147	53	SHARMA et al., 2001
<i>A. naeslundii</i> PK29	90	
<i>A. naeslundii</i> 5519	62	
<i>C. sp.</i> DSM 6688	89	RIJNAARTS et al., 1999
<i>P. oleovorans</i>	17	
<i>R. erythropolis</i>	87	

ZHENG et al. (1999) observaram que muitas estirpes tem a capacidade de adsorver cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}) em solução aquosa e que *B. subtilis* tem preferência por Mg^{2+} a Ca^{2+} . Essa adsorção varia em função do pH e da concentração desses íons no meio, prevalecendo a habilidade de adsorção, em pH 10. A melhor adesão aos substratos minerais, fluorapatita e dolomita, ocorreu em pH 4, entretanto, na

faixa mais alcalina de pH, a cepa apresentou melhor adesão à dolomita. Os autores justificaram o efeito de adesão pela atração de cargas elétricas, contrárias das partículas.

VIJAYALAKSHMI e RAICHUR (2003) estudaram a aplicação de *B. subtilis* como floculante para finos de carvão. Os autores consideraram que tanto as curvas de potencial zeta das partículas de carvão quanto das células bacterianas possuem cargas semelhantes, em função do pH. A teoria X-DLVO foi utilizada para explicar a interação ocorrida entre as partículas. Segundo os pesquisadores, os cálculos mostraram que forças elétricas e interações ácido-base desempenham um papel dominante no intervalo de pH ácido. E, que, acima de pH neutro, as forças ácido-base são predominantes e suficientes para vencer as forças repulsivas devido a cargas elétricas, fazendo com que ocorra adesão entre a cepa e a superfície do carvão.

SARVAMANGALA e NATARAJAN (2011) estudaram a separação seletiva de hematita, alumina, sílica e calcita através de floculação induzida e flotação por *Bacillus subtilis*. Foram utilizadas duas diferentes cepas nos ensaios de flotação. Tanto *B. subtilis* crescida no meio mineral quanto a proteína extracelular extraída da cepa foram estudadas, como possíveis reagentes. Os ensaios de adsorção mostraram maior afinidade da bactéria aos minerais de corundum e hematita. E, os ensaios de flotação indicaram que a cepa confere característica hidrofóbica para alumina, sílica e calcita em detrimento à hidrofilicidade observada para hematita.

SARVAMANGALA e NATARAJAN (2011) apontaram que a hidrofobicidade ou hidrofilicidade relativa foi adquirida em função da proporção de proteínas e polissacarídeos presentes na parede celular e que também depende do período de interação com os minerais.

Vários autores (MERMA et al., 2013; MESQUITA et al., 2003; SARVAMANGALA e NATARAJAN, 2011; SARVAMANGALA et al., 2013; YANG et al., 2013) utilizaram a imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV) como confirmação visual da adesão de microrganismos à superfície mineral. Como exemplificado por MERMA et al. (2013) que usaram as

micrografias para visualizar a adesão de células sobre a superfície de quartzo e apatita (Figura 3.8).

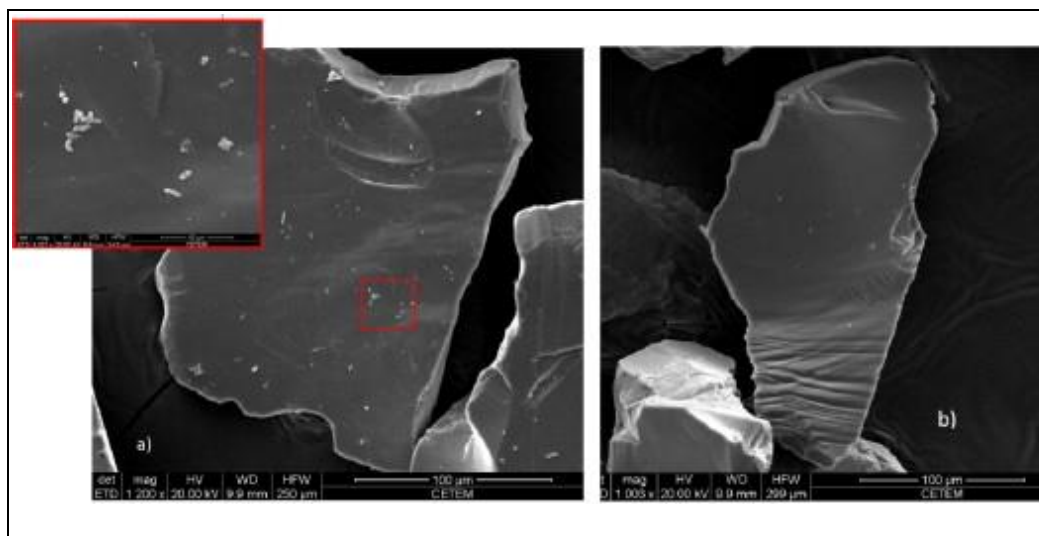


Figura 3.8 –Imagens por microscopia eletrônica de varredura da cepa *R. opacus* aderida às superfícies de apatita (a) e quartzo (b) (MERMA et al, 2013).

4. Energia de Superfície e Adesão Microbiana

4.1 Dupla Camada Elétrica

A formação da carga elétrica na superfície (S) de partículas, quando postas em contato com um meio aquoso, pode ser devido aos seguintes mecanismos: (i) ionização da superfície; (ii) dissolução de íons; (iii) adsorção de íons provenientes da solução e (iv) defeitos na rede cristalina dos minerais (MONTE e PERES, 2010). Para um grande número de partículas, a carga elétrica total da superfície das mesmas depende do valor de pH da solução, como indicado pela equação apresentada a seguir.



Conforme as Equações 4.1 e 4.2, os íons H^+ e OH^- interagem com a superfície mineral, ionizando a superfície e fazendo com que esses íons migrem para o meio aquoso (HUNTER, 1981). Por outro lado, a migração do surfatante e de outras espécies presentes na solução para a superfície da partícula depende da existência de algum tipo de atração entre o surfactante e dos íons da solução e a superfície do mineral. Há a atração elétrica ou eletrostática e de forças moleculares de van der Waals, consideradas não específicas, e ainda, as interações específicas, de hidratação ou ligação química (BRUYN e AGAR, 1962, FUERSTENAU, 1982). Os fenômenos que ocorrem na interface sólido-líquido podem ser avaliados por meio dos efeitos eletrocinéticos das partículas em suspensão e interpretados pela teoria da Dupla Camada Elétrica (DCE).

O primeiro modelo de DCE é atribuído à Helmholtz-Perrin. Esta teoria é conhecida como modelo de capacitor de placas paralelas. Onde, uma das placas está conectada diretamente à superfície sólida, enquanto a outra, que possui carga oposta, está na fase líquida, a uma pequena distância da primeira placa, como se observa na Figura 4.1 (LIMA, 2008; LINS, 1995).

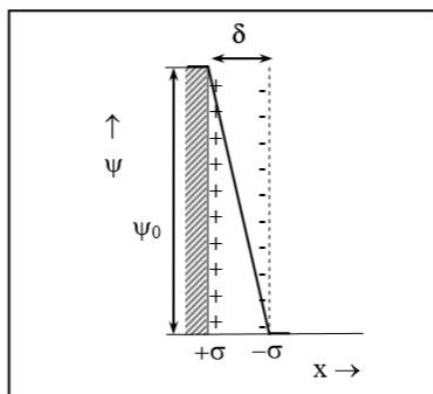


Figura 4.1 – Dupla camada elétrica de Helmholtz e Perrin e curva de potencial correspondente (LIMA, 2008).

A densidade de carga ($C.m^{-2}$) na superfície σ pode ser determinada pela fórmula da Equação IV.3.

$$\sigma = \frac{C}{A_s} \psi_0 = \frac{\epsilon \epsilon_0}{\delta} \psi_0 \quad 4.3$$

Em que ϵ_0 é a permissividade do vácuo ($C^2.J^{-1}.m^{-1}$), ϵ é a constante dielétrica relativa do meio, ψ_0 é a diferença de potencial entre a fase sólida dispersa e a solução (V ou $J.C^{-1}$); δ é a distância entre as placas (m); C é a capacitância ($C.V^{-1}$ ou $C^2.J^{-1}$) correspondente e A_s é a área de superfície das placas (m^2). É possível identificar que o perfil do potencial resultante é linear e varia abruptamente ao longo da espessura estreita da dupla camada (LIMA, 2008).

A teoria posterior a de Helmholtz-Perrin foi proposta por Gouy, em 1910, e Chapman, em 1913, de forma independente. Eles sugeriram que a superfície da partícula é plana, de extensão infinita e uniformemente carregada. E, que as cargas iônicas, que contrabalançam a carga superficial, são puntiformes¹ e distribuídas de forma difusa e contínua na solução aquosa. Além disso, é assumido que o solvente só influencia a dupla camada por meio de sua constante dielétrica (LIMA, 2008 e LINS, 1995).

De acordo com esta teoria, os contra-íons não estão concentrados apenas na interface partícula-líquido, mas dispersos pela fase líquida a certa distância da superfície. O campo elétrico da partícula atrai uma quantidade equivalente de

¹Negligencia os raios iônicos.

contra-íons para perto da superfície. A agitação térmica os mantém dispersos na fase líquida e esta combinação de forças leva à formação de uma dupla camada formada pela superfície carregada e pelo excesso de contra-íons sobre co-íons, distribuídos de forma difusa no meio líquido, neutralizando a carga da superfície (LIMA, 2008).

O perfil do potencial elétrico é não linear, diferente do considerado por Helmholtz e Perrin, pois os contra-íons compensadores da carga da superfície não estão distribuídos uniformemente. Como pode ser observado na Figura 4.2A, a inclinação da curva é maior na região onde os contra-íons estão mais concentrados e diminui gradativamente até a concentração do seio do líquido (LINS, 1995). Bem como na Figura 4.2B, a concentração dos íons varia exponencialmente com a distância à superfície, alcançando valores iguais no seio da fase líquida.

De acordo com a Figura 4.2, próximo a uma superfície carregada há um acúmulo de contra-íons (íons de carga oposta à carga de superfície) e uma diminuição de co-íons, mostrado para um eletrólito 1:1, onde c_∞ é a concentração *bulk* do íon do eletrólito (ISRAELACHVILI, 1989).

A abordagem de Gouy-Chapman considera que a concentração de íons varia com a distância em relação à superfície de acordo com a distribuição de Boltzmann, sendo afetada pelo potencial eletrostático e pela temperatura. Assim, temos a Equação IV.4.

$$c_i = c_{i,0} \exp\left(\frac{-ez_i\Psi(x)}{k_B T}\right) \quad 4.4$$

Onde c_i é a concentração dos íons i (número de íons por unidade de volume), $c_{i,0}$ é a concentração do íon i a uma distância infinitamente grande da fase sólida (no seio do fluido, $\Psi_\infty = 0$); $e = 1,6021 \cdot 10^{-19}$ C é a carga do elétron; z_i é a valência do íons i ; k_B é a constante de Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J.K⁻¹) e T é a temperatura absoluta.

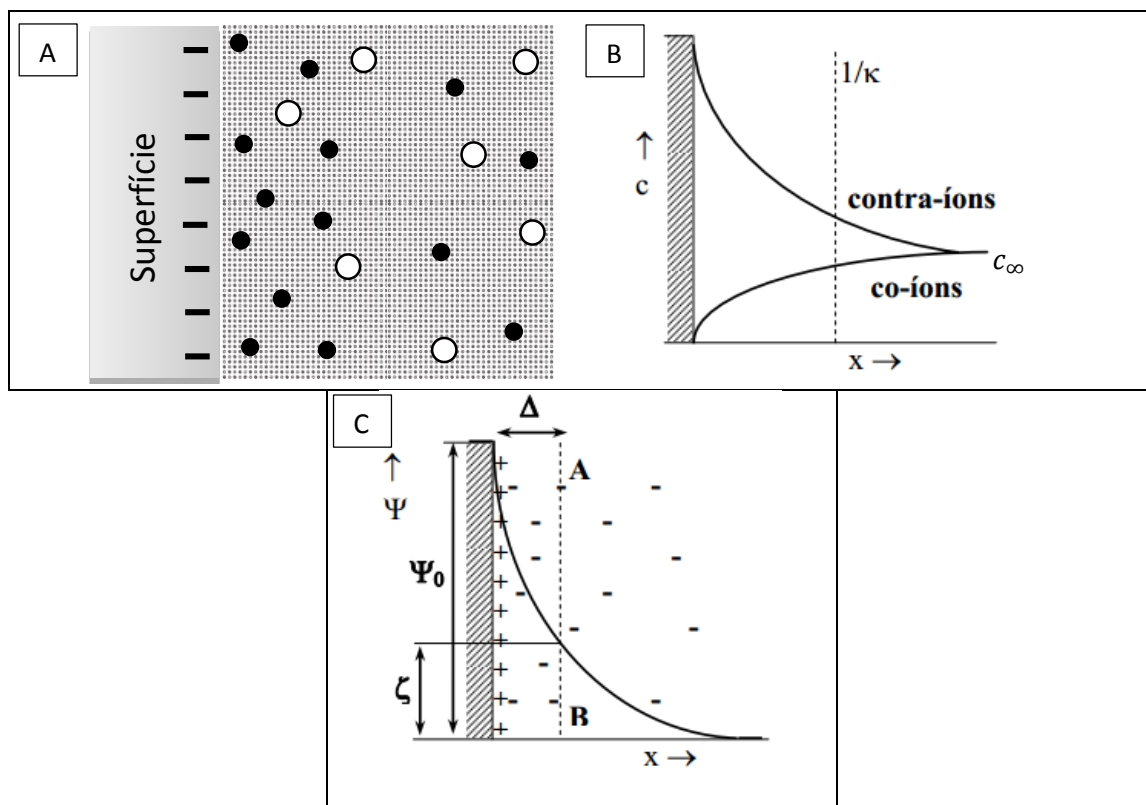


Figura 4.2 – (A) Superfície carregada negativamente com contra-íons (bolinhas pretas) e co-íons (bolinhas brancas); (B) Dependência da concentração dos íons com a distância x ; (C) Dupla Camada Elétrica de Gouy-Chapman e curva de potencial correspondente (adaptado de LIMA, 2008; ISRAELACHVILI, 1989).

Posteriormente, Stern, em 1924, modificou o modelo de Gouy-Chapman ao considerar os raios iônicos. Ou seja, agora é possível limitar a aproximação do íon à superfície, pois os centros iônicos não podem estar a uma distância maior que seu raio. Além disso, Stern combinou o modelo de Helmholtz-Perrin com a camada difusa de Gouy-Chapman. A contribuição de Grahame ao modelo constituiu, em 1947, do reconhecimento das interações específicas não eletrostáticas dos íons à DCE.

No modelo de Stern-Grahame, o plano interno de Helmholtz (PIH) é o lugar geométrico dos íons adsorvidos especificamente, ou seja, em contato com a superfície sólida. E, o plano externo de Helmholtz (PEH) é o lugar geométrico dos centros dos íons hidratados (contra-íons). Os demais íons necessários para compensar a carga dos íons determinantes do potencial de superfície (IDP) estão na camada de Gouy, também chamada camada difusa (LIMA, 2008).

A variação do potencial eletrostático ao longo da interface, apresentado nas Figuras 4.3 é hipotético. Na DCE, o único potencial que pode ser medido

experimentalmente é o potencial zeta (ζ), isto é, o potencial medido no plano de cisalhamento entre a partícula e a solução, quando os dois estão em movimento relativo, na presença de um campo elétrico. Este deslocamento diferencial das partes da DCE leva ao aparecimento de um potencial eletrocinético, podendo ser medido por meio dos quatro fenômenos ou efeitos eletrocinéticos (HUNTER, 1981): eletroforese, eletro-osmose, potencial de escoamento e potencial de sedimentação. O plano de Stern é considerado por alguns autores como o plano de cisalhamento onde são efetuadas as determinações eletrocinéticas do potencial zeta (FUERSTENAU, 1982). O potencial zeta (ζ) é um importante parâmetro a ser medido com auxílio da eletrocinética.

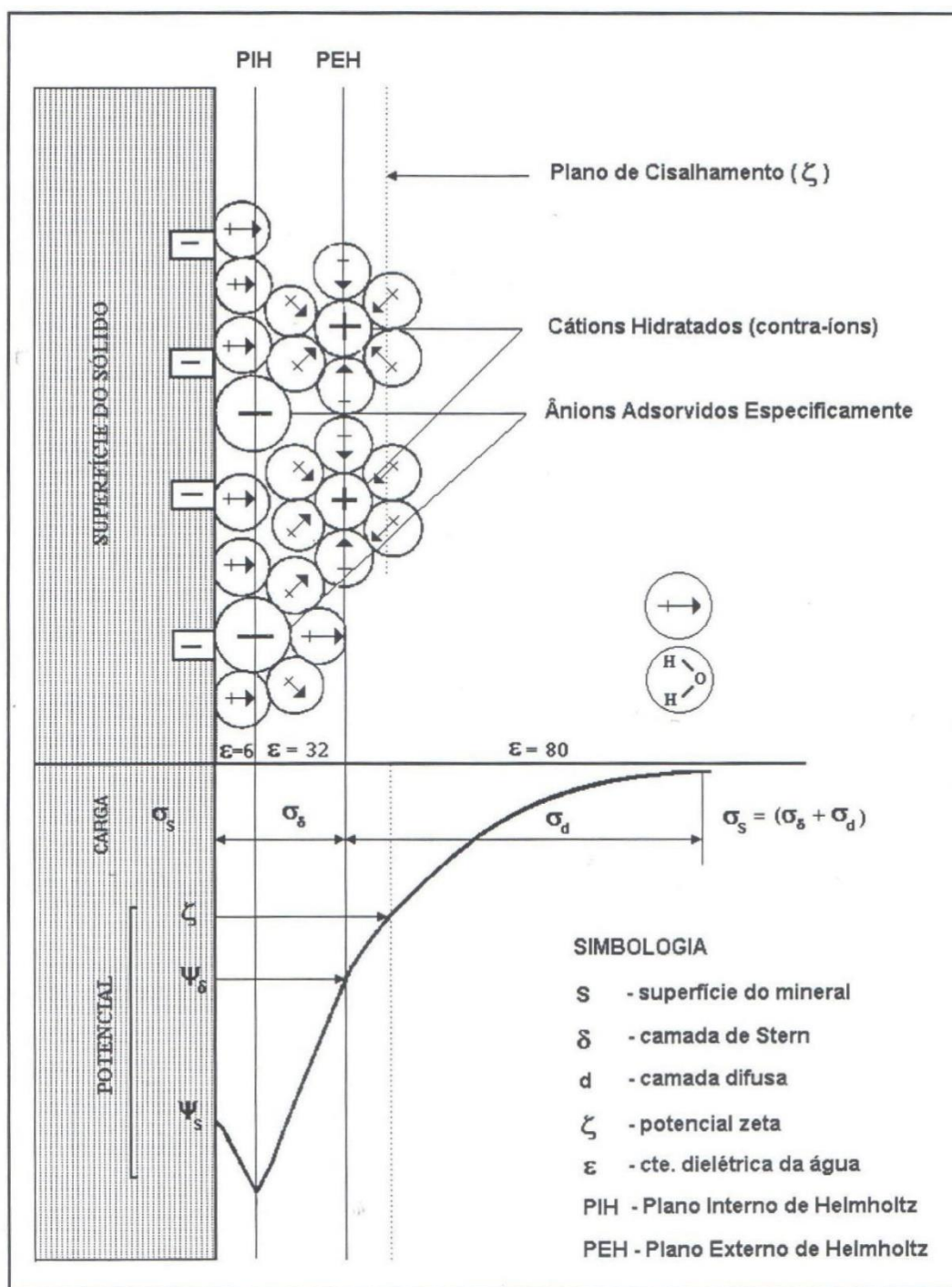


Figura 4.3. Distribuição do potencial eletrostático pelo modelo de Helmholtz –Grahame ou de tripla camada elétrica (LINS, 1995 apud ADAMSON, 1990).

4.2 Ângulo de Contato e a Determinação da Energia Livre de Superfície

Quando a superfície de um sólido é molhada por um líquido em questão (Figura 4.4) significa dizer que o ângulo de contato entre o líquido e o sólido é zero ou muito próximo de zero (ADAMSON, 1990). Ou seja, o líquido se espalha facilmente sobre o sólido. Quando esse líquido é a água, a propriedade físico-química para alta molhabilidade é hidrofiliicidade, ou seja, a superfície é hidrofílica. Na Figura 4.4 é possível observar o ângulo de contato formado entre as interfaces.

Para determinar o ângulo de contato sobre um material sólido, o método mais simples é colocar uma gota de líquido sobre a superfície plana do material. A equação de Young estabelece a condição termodinâmica de equilíbrio entre as interfaces envolvidas, de modo que, o ângulo de contato θ depende da tensão superficial, γ (N.m^{-1}), das três interfaces:

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cos \theta \quad 4.5$$

Onde, γ_{SG} representa a tensão superficial na interface sólido-gás, γ_{SL} a tensão superficial na interface sólido-líquido e γ_{LG} a tensão superficial na interface líquido-gás.

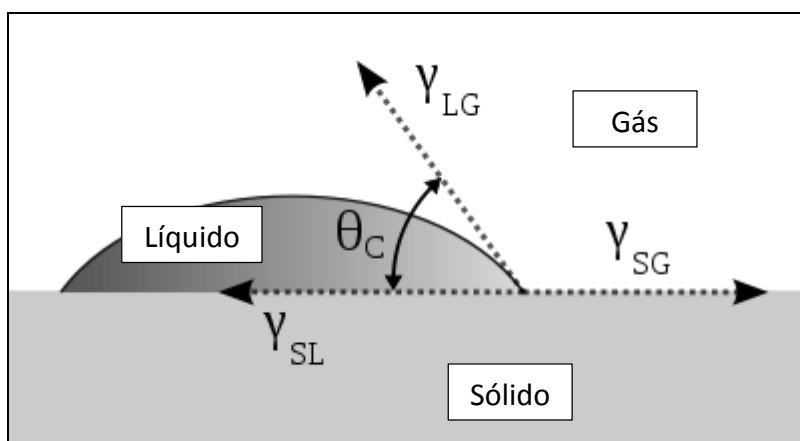


Figura 4.4 - Representação esquemática do ângulo de contato entre as fases líquida, sólida e gasosa em equilíbrio.

A equação de Young é válida para um sistema ideal, onde todos os efeitos gravitacionais estão ausentes e as três fases em equilíbrio. A designação γ_{SG} é para lembrar que a superfície do sólido, de energia livre superficial γ_s deve estar em

equilíbrio com a pressão de vapor (p) do líquido puro adsorvido nessa interface (MONTE e PERES, 2010).

Existem outros métodos para a identificação do ângulo de contato. Mas, independentemente, ainda existem duas incógnitas na equação de Young, a saber, a tensão superficial na interface sólido-líquido e a energia de superfície do sólido (γ_{SG}). Para determinar as energias de superfície, por conseguinte, várias abordagens estão disponíveis.

O ângulo de contato, que dá uma medida da hidrofobicidade da partícula, pode ser calculado com auxílio da equação de Young. Desta forma, considerando que a energia de superfície de um sólido é uma função da tensão interfacial e da tensão superficial de um líquido, uma equação empírica combinada com a equação de Young foi obtida (NEUMANN et al., 1974):

$$\cos \theta = -1 + 2 \sqrt{\left(\frac{\gamma_{SG}}{\gamma_{LG}}\right) e^{-\beta(\gamma_{LG}-\gamma_{SG})^2}} \quad 4.6$$

Onde β é uma constante e vale $0,0001247 \text{ mJ.m}^{-2}$.

FOWKES (1962) dividiu as energias de superfície em duas componentes, uma parte dispersiva (LW) e uma polar, sendo que apenas a parte dispersiva foi considerada.

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG} - 2 \sqrt{\gamma_{SG}^{LW} \gamma_{LG}^{LW}} \quad 4.7$$

Já a abordagem de aproximação média geométrica, considerando a tensão interfacial como uma função das energias de superfície do líquido e do sólido, o número de incógnitas constituintes da equação de Young foi, então, reduzido. De acordo com GIRIFALCO e GOOD (1957), a tensão interfacial é expressa como:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG} - 2 \Phi \sqrt{\gamma_{SG}^P \gamma_{LG}^P} \quad 4.8$$

Onde Φ é um parâmetro de interação que depende do sistema e P é a referência de componente polar. OWENS e WENDT (1969) combinaram a

abordagem da aproximação média geométrica para calcular as interações dispersivas (LW) e polares de interfaces e obtiveram a seguinte equação:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG} - 2\sqrt{\gamma_{SG}^{LW}\gamma_{LG}^{LW} - \gamma_{SG}^P\gamma_{LG}^P} \quad 4.9$$

VAN OSS(1993) expressou a energia de superfície correspondente à parte polar da interação pelo modelo ácido-base de Lewis. A componente polar de energia de superfície é igualada às propriedades dos elétrons doados e recebidos durante a interação das fases:

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-} \quad 4.10$$

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG} - 2\left(\sqrt{\gamma_{SG}^{LW}\gamma_{LG}^{LW}} + \sqrt{\gamma_{SG}^+\gamma_{LG}^-} + \sqrt{\gamma_{SG}^-\gamma_{LG}^+}\right) \quad 4.11$$

A equação a seguir é obtida pela combinação da equação de Young com a equação acima.

$$(1 + \cos\theta)\gamma_{LG} = 2\left(\sqrt{\gamma_{SG}^{LW}\gamma_{LG}^{LW}} + \sqrt{\gamma_{SG}^+\gamma_{LG}^-} + \sqrt{\gamma_{SG}^-\gamma_{LG}^+}\right) \quad 4.12$$

As componentes de energia de superfície de sólidos podem ser determinadas pela medição do ângulo de contato de pelo menos três líquidos diferentes com componentes ácidos e básicos definidos. Dessa forma, as componentes da energia de superfície do sólido podem ser definidas.

IV.3 Termodinâmica de Superfície, Teorias DLVO e X-DLVO aplicadas à Adesão das Bactérias

Para estimar as forças físico-químicas responsáveis pela adesão das bactérias, duas importantes abordagens foram utilizadas: termodinâmica de superfície e teorias DLVO e DLVO estendida (neste caso, X-DLVO). As interações entre as superfícies da bactéria e do mineral dependem das propriedades físico-químicas de cada uma das superfícies, e, além disso, os estudos experimentais mostraram que a hidrofobicidade da superfície celular bacteriana desempenha um papel crítico nessas interações.

De acordo com a teoria termodinâmica, o sistema vence espontaneamente uma mudança de estado A para o estado B, se a mudança aponta para um estado de menor energia. No caso da adesão mineral, o estado A representa as partículas minerais dispersas em um líquido e as células também dispersas nesse líquido, enquanto que no estado B, uma nova fase surge, bactéria aderida à superfície do mineral dispersas em um líquido. A mudança de uma fase dispersa para um estado aderido será espontâneo somente se o estado de energia do sistema aderido for menor.

Matematicamente, a energia de adesão $\Delta G_{adesão}$ pode ser expressa:

$$\Delta G_{adesão} = \gamma_{bs} - \gamma_{bl} - \gamma_{sl} \quad 4.13$$

Onde γ representa a energia livre interfacial para as diferentes interfaces: bactéria-sólido; bactéria-líquido e sólido-líquido. (VILINSKA, 2007). A adesão é energeticamente favorecida somente se $\Delta G_{adesão} < 0$. Para o cálculo da $\Delta G_{adesão}$, a energia livre de adesão foi dividida em duas componentes: Lifshitz van der Waals e ácido-base.

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{adesão}^{AB} + \Delta G_{adesão}^{LW} \quad 4.14$$

A teoria DLVO clássica foi desenvolvida por dois grupos de cientistas de forma distinta. São eles, os russos, Derjaguin e Landau, em 1941 e, os holandeses, Verwey e Overbeek, em 1948 (ISRAELACHVILI, 1989). Eles propuseram que, a energia de interação total (G_{TOTAL}) ou a força de adesão é dada pelo somatório do balanço de interações atrativas (G_{vdW}), resultantes das interações de van der Waals, e do balanço de interações repulsivas (G_{Ele}), como consequência da sobreposição das camadas difusas, ou seja, forças entre as duplas camadas elétricas das partículas. Posteriormente Van OSS et al. (1986) acrescentou a contribuição ácido-base (G_{AB}). E, então se convencionou chamar a teoria como DLVO estendida ou X-DLVO. Dessa forma, a adesão é dada como um somatório de interações como mostrado na equação.

$$G_{TOTAL} = G_{vdW} + G_{Ele} + G_{AB} \quad 4.15$$

O procedimento para aplicação da teoria consiste em calcular a energia livre total de interação em função da distância de separação entre as partículas (LINS, 1995). Significa dizer que, experimentalmente só é possível medir o potencial de interação entre as partículas em função da distância de separação entre elas.

Para a teoria DLVO, quando G_{vdW} e G_{Ele} se equilibram, a força resultante é zero. Nessa situação, os centros dos átomos irão permanecer separados pela distância de equilíbrio r_0 , onde para muitos átomos, r_0 vale aproximadamente 0,3 nm.

As equações para G_{vdW} e G_{Ele} são verificadas a seguir.

$$G_{ELE} = \pi\epsilon\epsilon_0 r \left[2\zeta_1\zeta_2 \ln\left(\frac{1 + e^{-kH}}{1 - e^{-kH}}\right) + (\zeta_1^2 + \zeta_2^2) \ln(1 - e^{-2kH}) \right] \quad 4.16$$

$$G_{vdW} = -\frac{A_{132}r}{6H} \quad 4.17$$

Bem como, a equação considerada para G_{AB} é dada por:

$$G^{AB} = \pi r \Delta G_{adh}^{AB} e^{\frac{(d_0-H)}{\lambda}} \quad 4.17$$

5. Experimental

5.1 Materiais

5.1.1 Preparação das Amostras Minerais

As amostras de hematita e quartzo, de pureza mineral, utilizadas neste trabalho foram coletadas no estado de Minas Gerais.

Da amostra total, alíquotas de 3 Kg de cada mineral foram reservadas para beneficiamento.

As amostras foram previamente separadas. Cerca de 100 g de cada material seguiu para pulverização em moinho planetário com o intuito de possuir passante em 106µm. Esse material foi destinado às análises em Florescência de Raios X e Difractometria de Raios X.

Três peças de cada amostra mineral, de cerca de 1x1x2 cm, foram selecionadas e encaminhadas para serem fixadas em resina (mais detalhes no tópico 5.1.2 *Preparação das Seções Polidas*). O restante dos minerais foi britado em britador de mandíbulas (Figura 5.1) e classificado por peneiramento a úmido em peneiras de 210µm, 150µm, 106µm, 74µm, 37µm, 20µm. O tamanho dos minerais específico para cada experimento é distinguido na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Frações granulométricas para cada ensaio realizado.

Tamanho de Partícula	Experimento
1x1x2 cm	Ângulo de contato
74 µm – 106µm	Flotação, MEV, DR-X
37 µm – 74 µm	Tamanho do quartzo para a flotação 1:1,
< 20 µm	Potencial zeta, ensaios de adaptação das bactérias ao substrato mineral, FTIR



Figura 5.1 – Imagem da cominuição da amostra de quartzo em britador de mandíbulas.

A preparação das amostras, para serem realizados ensaios de mobilidade eletroforética e espectros de infravermelho, se deu a partir da obtenção de 10,00 g das amostras minerais passantes em 20 μm . O material passou ainda por mais uma redução das partículas com auxílio de um grau de ágata por 1 hora.

A seguir, as amostras obtidas para cada etapa experimental (Figura 5.1) foram submetidas à um processo de limpeza das superfícies. Este tratamento consistiu do condicionamento das amostras, por um período de 24 h, em soluções contendo KOH, na concentração de 0,01 M. Após o tempo de condicionamento, as partículas foram exaustivamente lavadas com água Milli-Q.

5.1.2 Preparação das Seções Polidas

As unidades de cada amostra, previamente separadas, seguiram para fixação em resina epóxi (1g de resina EpoFixHardener para 0,12g de catalisador). Após o processo, as amostras foram desbastadas no equipamento Struers Tegramin 20, com lixas de 125 μm , 75 μm , 40 μm , 15 μm , 9 μm e panos de 6 μm , 3 μm e 1 μm , nessa ordem. Sendo que, quando passados os panos as superfícies foram polidas com

solução de diamante e lubrificante. Entre a troca dos panos, os minerais fixados foram lavados em ultrassom por 3 minutos. Posteriormente, foram deixadas em solução de KOH 1M por 24 horas e lavadas sucessivamente com água milli-Q. Seguiram, então, para análise de ângulo de contato.

Na Figura 5.2 é possível observar o equipamento Struers e as amostras de hematita e quartzo fixadas.

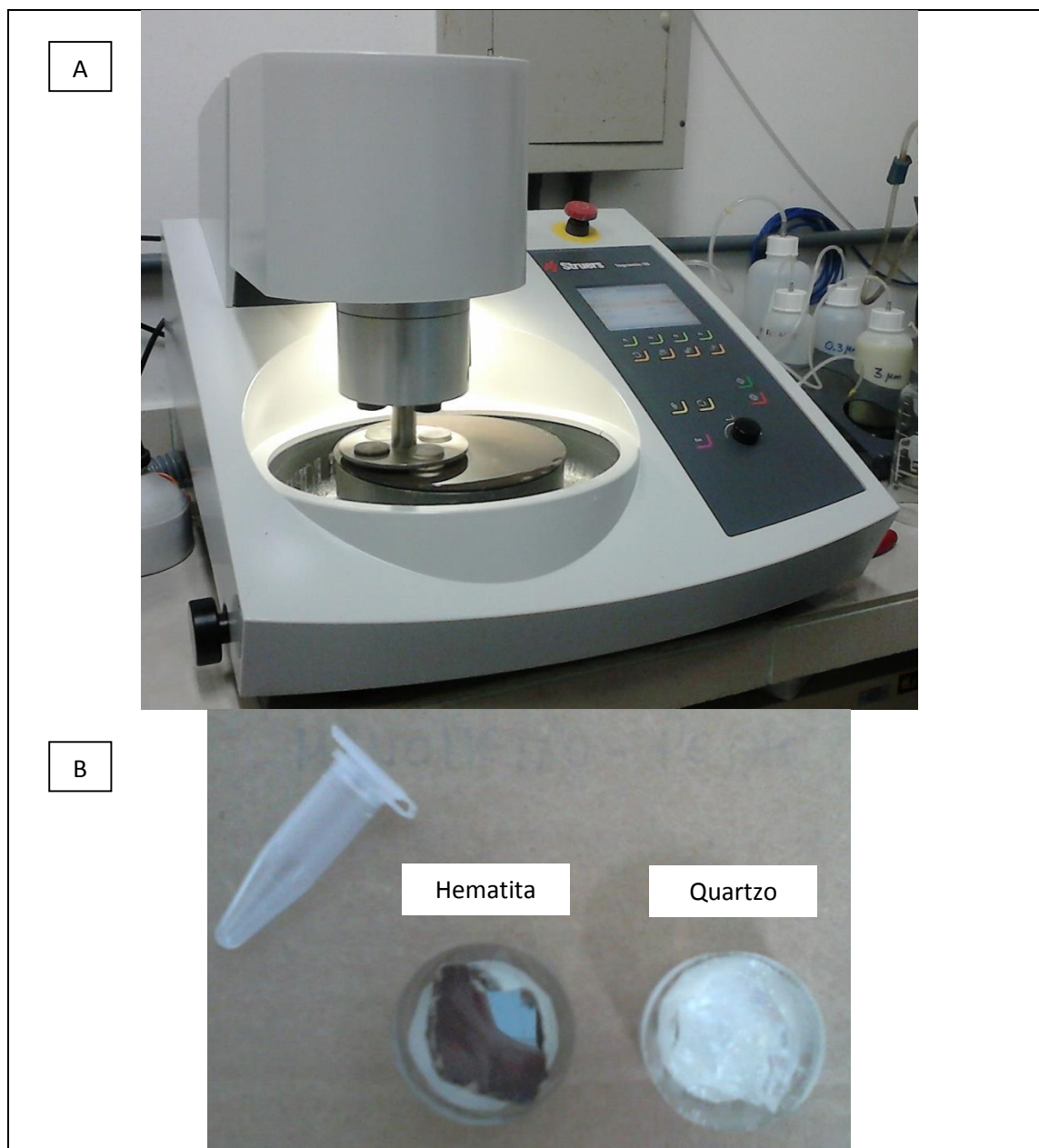


Figura 5.2 – (A) Equipamento Struers. (B) Seções polidas para os minerais de hematita e quartzo.

5.1.3 Microrganismos e Condições de Cultivo

As bactérias sofrem constantemente mutações genéticas. Por este fato e por serem microrganismos simples, suas classificações são organizadas em termos gerais. Ou seja, bactérias que apresentam uma série de características são atribuídas a uma espécie. Entretanto, tais bactérias podem possuir particularidades entre si que não as destoam do grupo. Com o objetivo de estudar se estas particularidades conferem diferenças de superfície que influenciem na físico-química de adesão aos minerais de quartzo e hematita, duas cepas da mesma espécie foram utilizadas neste trabalho.

Tais microrganismos foram utilizados como biorreagente e obtidos pelo BioInovar, laboratório do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da UFRJ. As duas cepas (*Bacillus subtilis* BAM e *Bacillus subtilis* GLI) foram isoladas do solo. Estas são espécies bacterianas não patogênicas. As culturas foram recebidas sob a forma de *slants* (gelose inclinada), sendo mantidas em refrigerador a 2°C.

A propagação das células foi realizada em meio sólido (em placas Petri) para que, então, pudessem ser inoculadas em meio líquido (em frascos Erlenmeyer de 500mL) (Figura 5.3). A composição dos meios segue na Tabela 5.2. Todos os meios, bem como as placas Petri, foram esterilizados em autoclave a 1 atm de pressão e 121 °C durante 20 minutos. A inoculação foi realizada em capela de fluxo previamente esterilizada com lâmpada germicida de luz ultravioleta. A curva de crescimento de *B. subtilis* pode ser observada pela Figura 5.4.

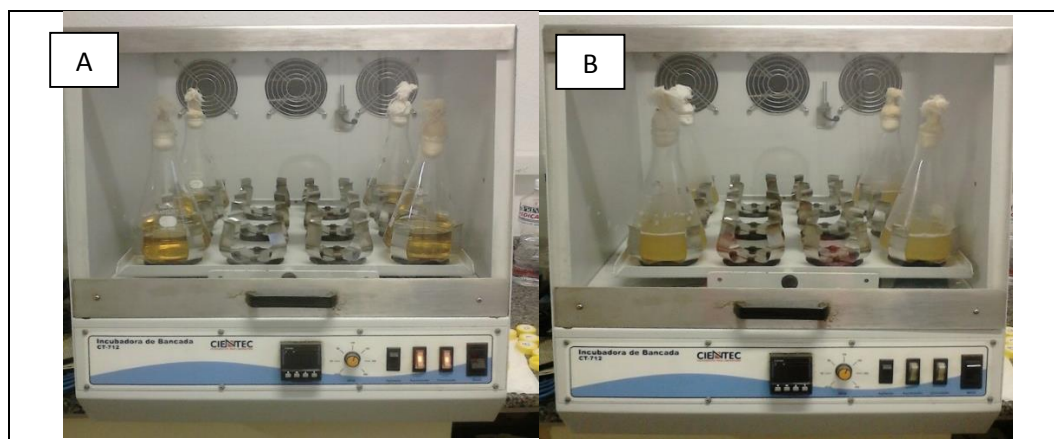


Figura 5.3 – Imagem da cultura líquida em shaker rotatório antes (A) e depois (B) do crescimento bacteriano.

Tabela 5.2 – Meios de Cultura bacteriana.

Componente	Meio Sólido (g/L)	Meio Líquido (g/L)
Peptona	10,00	10,00
Extrato de Levedura	5,00	5,00
Cloreto de Sódio	10,00	10,00
Agar	15,00	-
Sulfato de Magnésio	0,592	-
Sulfato de Manganês	0,05	-
Sulfato Ferroso	0,15	-

O tempo de cultivo para ambos os meios foi de 56 horas à 32°C.

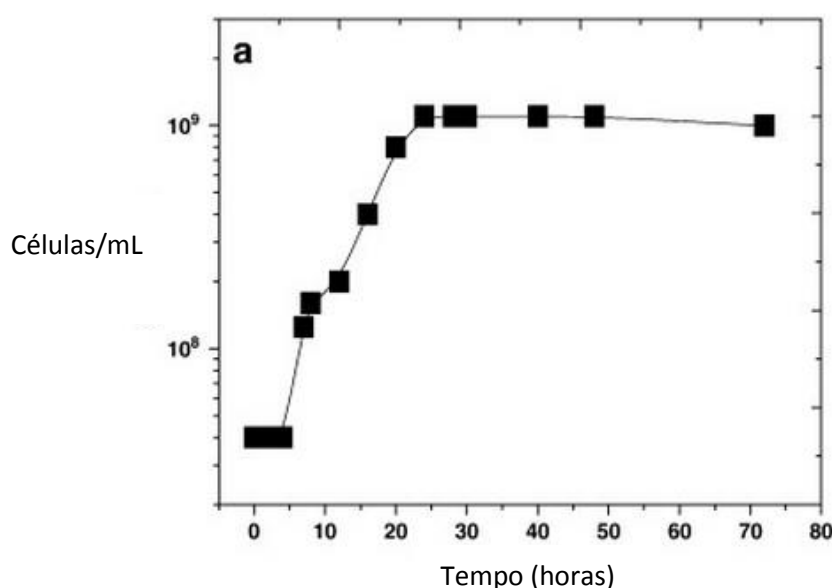


Figura 5.4 – Curva de crescimento de *B. subtilis* em função do número de células (SARVAMANGALA e NATARAJAN, 2011).

Para obtenção do concentrado celular, o crescimento em meio líquido que ocorreu em *shaker* rotatório (CIEN TEC CT-712) foi interrompido após as 56 horas e, então, a suspensão celular foi centrifugada em tubos Falcon de 50 mL a 3300 G durante 8 minutos em centrífuga digital CIEN TEC CT-5000. O precipitado da centrifugação, constituído pelas células bacterianas, foi por três vezes ressuspensão em água deionizada e centrifugado. Com o mínimo possível de água deionizada, os

precipitados foram ressuspensos e colocados em recipientes autoclaváveis de vidro de 200 mL. Posteriormente, os concentrados seguiram para esterilização em autoclave e foram mantidos em geladeira.

A concentração celular da suspensão bacteriana foi determinada, em triplicata, pelo método do peso seco (Figura 5.5). Onde, 1,00 mL do concentrado foi filtrado em Millipore de 0,45 μm a vácuo. Estes foram secos em estufa a 45 °C durante 2 horas e 30 minutos. A partir da diferença de pesos é possível obter a concentração celular em g.mL^{-1} .

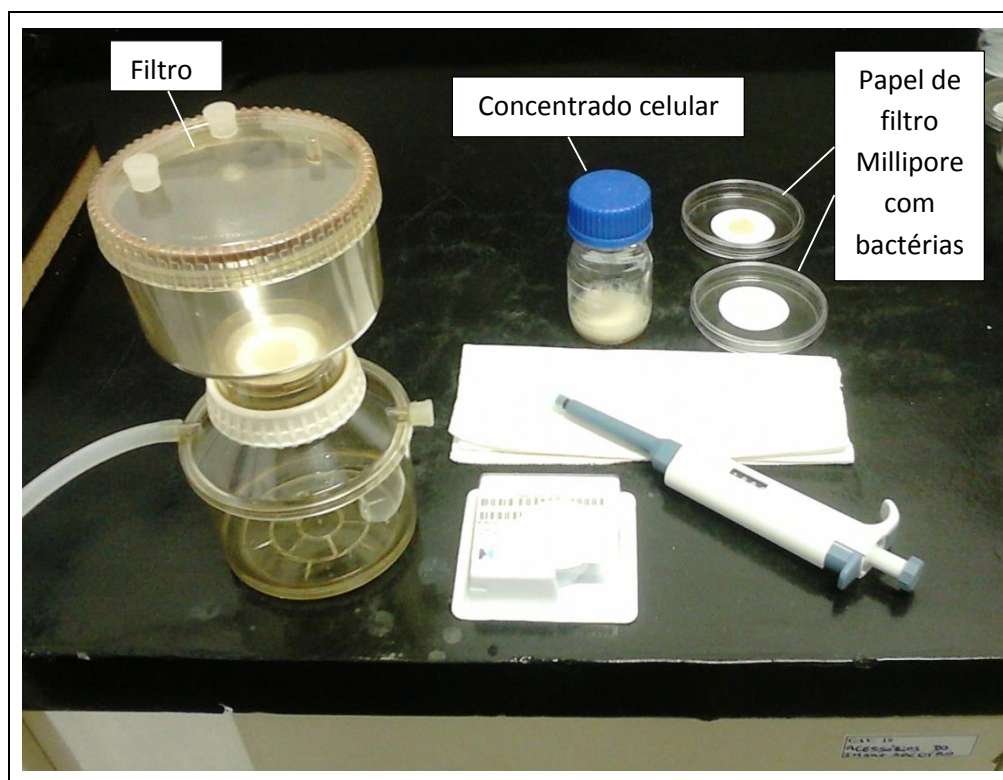


Figura 5.5 – Materiais para determinar a concentração celular bacteriana pelo método do peso seco.

É importante ressaltar que os concentrados foram utilizados em um prazo de 7 dias. Passado esse tempo, foram realizadas novas culturas líquidas.

5.1.4 Adaptação das Bactérias ao Substrato Mineral

Com o objetivo de observar um comportamento seletivo após a interação dos minerais com as cepas, as bactérias foram condicionadas individualmente a cada substrato mineral. Seguiram, então, para ensaios de mobilidade eletroforética (ver tópico V.2.2) e para serem realizados espectros de infravermelho por transformada de Fourier (ver tópico V.2.4).

Para o condicionamento, 5,0 g dos minerais passaram por redução de grãos com auxílio de grau de ágata (ver tópico 5.1.1) e seguiram para interação com cada uma das cepas. Preparou-se a suspensão numa proporção de 1,00 g de mineral para 100,00 mL de NaCl 10^{-3} mol.L⁻¹, respeitando-se a concentração de 600 mg.L⁻¹ de células e pH 6. Foi realizada agitação mecânica por 2 horas e, posteriormente, seguiu para filtração a vácuo em Millipore de 0,45 µm. O retido passou por uma nova agitação de 1 minuto, respeitando-se a concentração de NaCl e o valor de pH. Posteriormente, a suspensão foi filtrada a vácuo em papel de filtro Wachtman 50 (abertura de 2,7 µm). O material foi então seco a vácuo em dessecador e a temperatura ambiente.

5.2 Métodos

5.2.1 Caracterização das Amostras e das Estirpes Microbianas

Com o objetivo de conhecer as amostras de estudo, foram realizadas análises por Fluorescência de Raios X, Difractometria de Raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura nos laboratórios de caracterização mineral da Co-ordenação de Análises Minerais – COAM, do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM. Também foram realizados ensaios de perda ao fogo.

Para ser analisada por Fluorescência de Raios X, a hematita foi fundida na proporção de 1,000 g de amostra para 5,000 g de fundente (66,25% de tetraborato de lítio - Li₂B₄O₇, 32,25% de metaborato de lítio - LiBO₂, e 0,5% de iodeto de lítio - LiI). Já o quartzo, foi prensado na proporção de 1,000 g de amostra para 2,000 g de fundente (ácido bórico – H₃BO₃). Os resultados da composição química realizada por FR-X estão presentes na Tabela 5.3 em porcentagem e na forma de óxidos mais prováveis. Para hematita encontrou-se um teor de Fe₂O₃ de 96,82% e para o quartzo um teor de SiO₂ de 99,35%.

	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	Cr ₂ O ₃	SiO ₂	H ₂ O	outros
Hematita	96,82	1,38	0,28	0,26	0,23	< 1%
	SiO ₂	CaO	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	H ₂ O	
Quartzo	99,347	0,206	0,121	0,100	0,170	

Tabela 5.3 - Composição das amostras de hematita e quartzo obtidas por Florescência de Raios X.

Os difratogramas de Raios-X das amostras, obtidos pelo método do pó, foram coletados em equipamento Bruker-d4 Endeavor (Figura 5.6), nas seguintes condições de operação: radiação $\text{CuK}\alpha$ (40 kV/40 mA); velocidade do goniômetro de $0,02^\circ 2\theta$ por passo com tempo de contagem de 0,5 segundos e coletados de 4 a $80^\circ 2\theta$, com detector sensível à posição Lynxeye. As interpretações qualitativas de espectro foram efetuadas por comparação com padrões contidos no banco de dados (ICDD, 2006) em software Bruker Diffrac Plus.

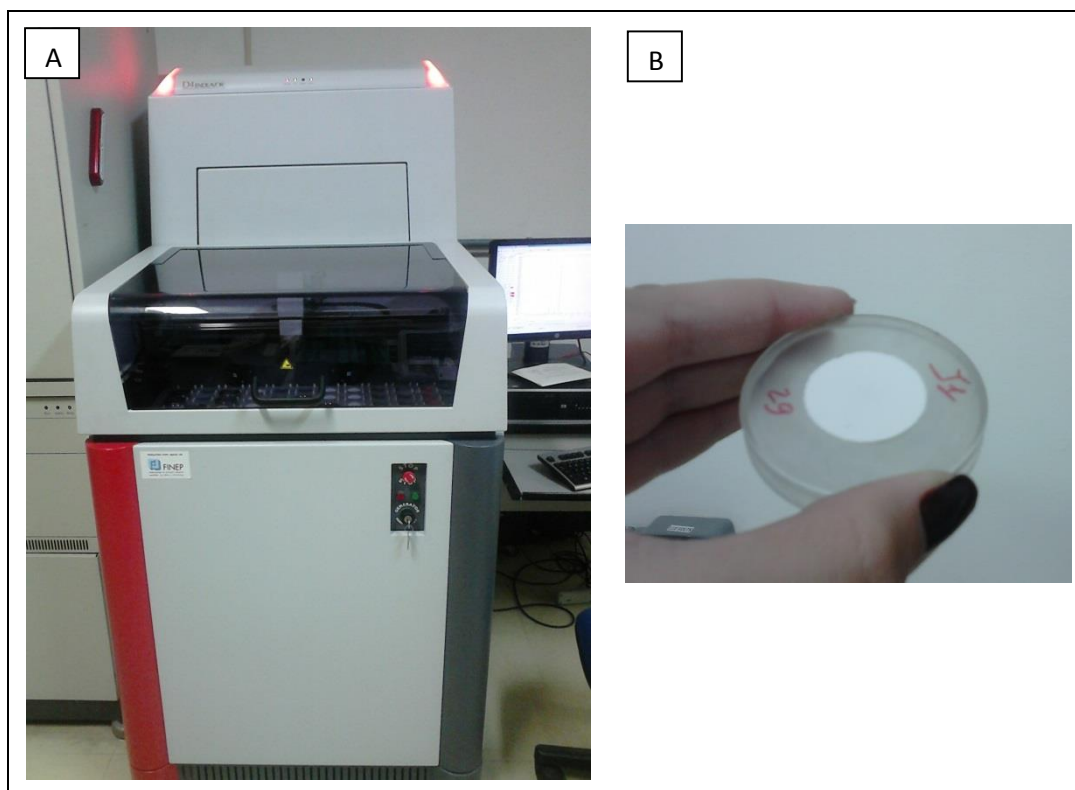


Figura 5.6 - (A) Difratorômetro de Raios X. (B) Amostra de quartzo no porta amostra.

Os difratogramas da amostra de hematita e quartzo são apresentados nas Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente.

Os difratogramas de Raios-X revelaram que a hematita (α) é a única fase cristalina presente na amostra, assim como a SiO_2 na amostra de quartzo.

Os picos dos DR-X indicaram que as fases apresentam boa cristalinidade.

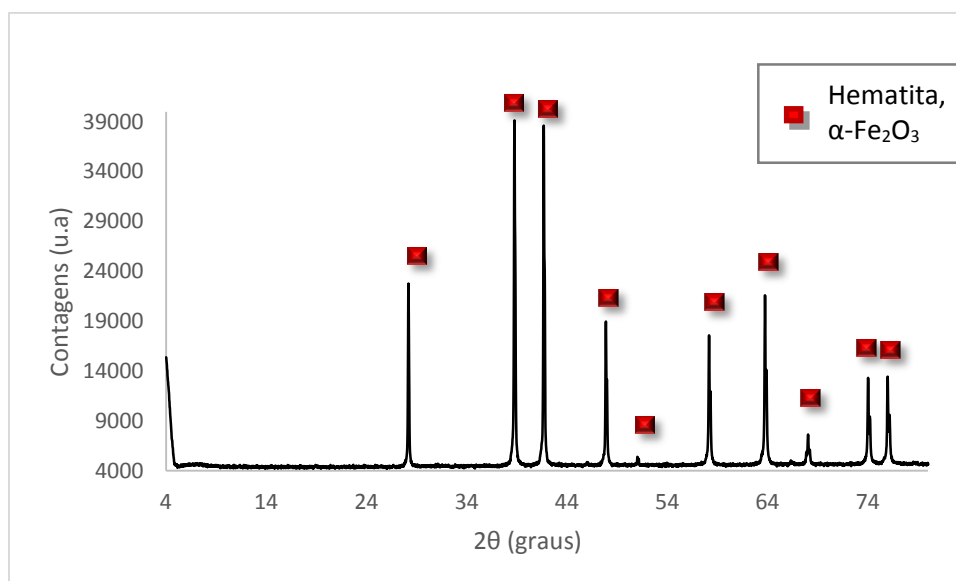


Figura 5.7 - Difratoograma da amostra de hematita.

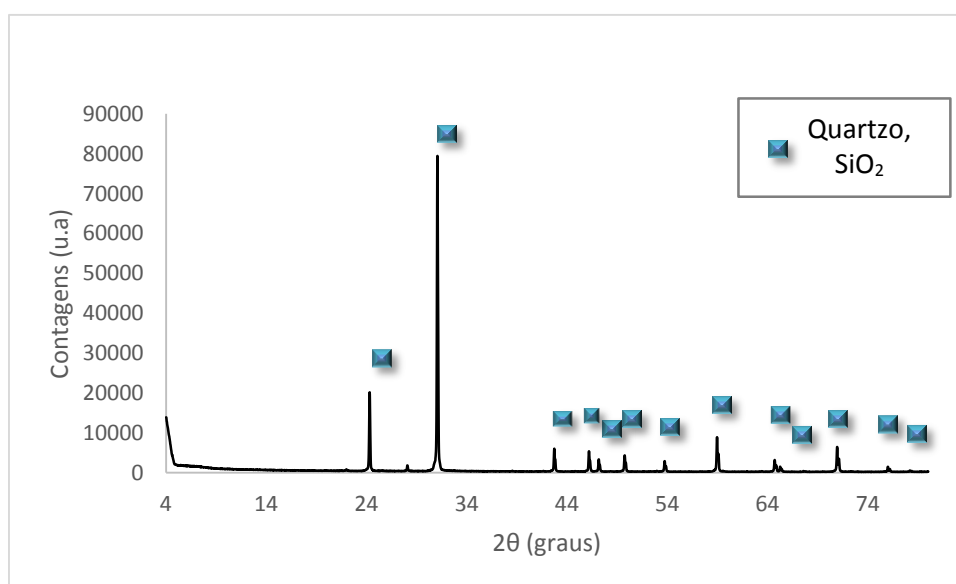


Figura 5.8 - Difratoograma da amostra de quartzo.

Com o intuito de quantificar quais elementos estavam presentes na superfície da hematita e do quartzo, foram realizadas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura e posteriormente foram obtidas imagens desse mesmo campo. Já, aos microrganismos, é necessário descobrir o tamanho das bactérias para que pudesse ser estimada a energia de interação pela teoria DLVO e X-DLVO. Para tanto, foram obtidas imagens das cepas e realizada uma estimativa do diâmetro das estirpes *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM a partir do MEV.

Com o intuito de observar a adesão de células bacterianas na superfície mineral, foram realizadas imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da fração que foi flotada em pH 6.

Os minerais, antes e depois de serem flotados, bem como as bactérias, foram depositados em superfície de alumínio e depois levados ao MEV. A adesão dos minerais no suporte de alumínio foi realizada por fita dupla face de carbono. Já o concentrado celular bacteriano de cada estirpe, foi diluído e gotejou-se 20,0 µL na superfície de alumínio. Posteriormente, estas foram secas em estufa a 45 °C antes de serem metalizadas.

Todas as amostras foram metalizadas com ouro no aparelho Bal-Tec SCD 050 por 150 segundos e seguiram para análise de microscopia. Utilizou-se um FEI QUANTA 400 com alto vácuo, tensão de aceleração de elétrons de 25 kV, com detector de elétrons retroespalhados. A espectrometria de dispersão de energia de raios X (EDS) acoplada a ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi usada para identificação dos elementos presentes nas amostras minerais analisadas. O espectrômetro de dispersão de energia de raios X (EDS) usado foi da Bruker-AXS Quantax, com detector SDD (*silicone drift detector*) XFlash de janela de 30 mm² acoplado ao MEV.

Nas Figuras 5.9 e 5.10 são apresentadas as imagens e os espectros dos grãos de hematita e quartzo, respectivamente.

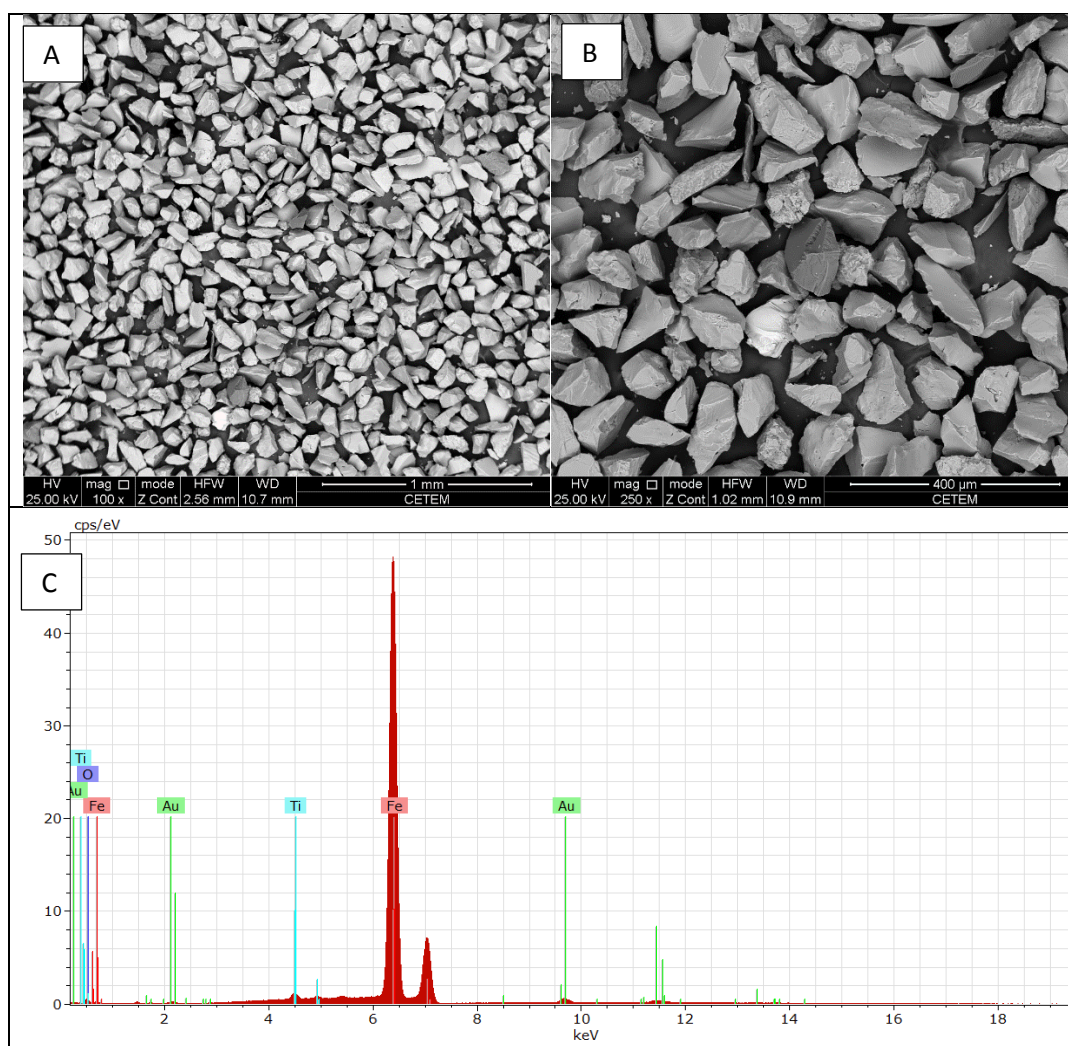


Figura 5.9 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura (A e B) e espectro de EDS (C) para amostra de hematita.

Observa-se a presença de pequenas impurezas no espectro da amostra de hematita. Já para o espectro referente a amostra de quartzo, observa-se a presença de silício e oxigênio. O ouro visualizado nos dois espectros provém da metalização.

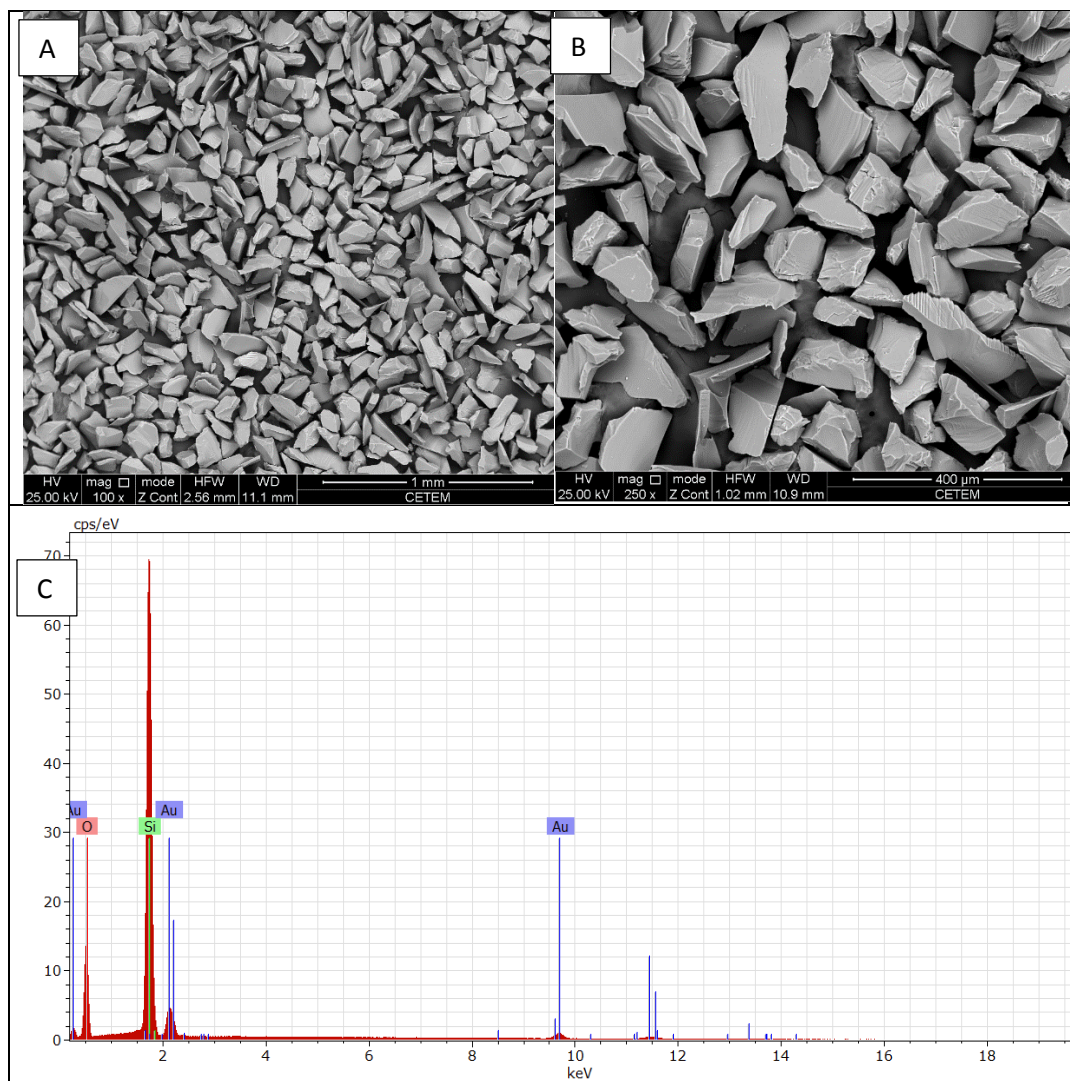


Figura 5.10 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura (A e B) e espectro de EDS (C) para amostra de quartzo.

Cada microrganismo tem um padrão de crescimento que é resultado da formulação genética e da interação existente entre os corpos celulares (Rudge et al., 2013). Buscando observar o crescimento das cepas adquiridas e comparar com a literatura, foram realizadas imagens em microscópio óptico das culturas em meio sólido.

O microscópio utilizado foi o da marca Zeiss de luz refletida com câmera AxioCamICc 1. Adquiriram-se imagens do biofilme formado com o crescimento das cepas *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM.

5.2.2 Ensaios de Mobilidade Eletroforética

A fim de identificar as cargas superficiais das amostras de estudo e avaliar uma possível atração ou repulsão eletrostática entre partículas de natureza diferentes, foram realizados ensaios de mobilidade eletroforética em Zetasizer nano ZS.

A carga de superfície dos minerais de hematita e quartzo, das cepas *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, bem como dos minerais após condicionamento (ver tópico V.1.3.1) com as bactérias, foi avaliada em função do pH.

O eletrólito utilizado nos ensaios foi NaCl na concentração de 10^{-3} mol.L⁻¹. O pH foi ajustado com HCl e NaOH. E a suspensão foi preparada com 0,100 g de amostra para 8,00 mL de eletrólito. O equipamento foi ajustado para um mínimo de 30 e máximo de 100 medidas de potencial em cada ponto de pH.

Embora existam referências para o PIE da cepa *B. subtilis*, a variação dos constituintes dos meios de crescimento pode alterar a composição da parede celular bacteriana e consequentemente a carga de superfície desses microrganismos. Somado ao objetivo deste trabalho, que é observar se diferentes cepas de uma mesma espécie possuem interação diferenciada com uma dada superfície, a concentração de eletrólito foi variada em específico para ensaios de potencial zeta das cepas bacterianas para determinar se o NaCl é um eletrólito indiferentes às células.

5.2.3 Ensaios de Ângulo de Contato

Os ensaios para determinar o ângulo de contato foram realizados a partir do Goniômetro modelo Ramé-Hart (Figura 5.11) da COPPE pelo método da gota sêssil. O estudo experimental consistiu das medidas de ângulo de contato envolvendo gotas de 2 µL de líquido nas interfaces mineral/ar e bactéria/ar.

O ângulo de contato das células bacterianas foi medido com água milli-Q com o intuito de observar se as cepas de *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM possuíam caráter hidrofóbico ou hidrofílico. Após realização do processo para obtenção do concentrado celular, 1,00 mL de cada concentrado contendo pelo menos 20 g/L de células foram filtradas, individualmente, a vácuo em millipore de 0,45 µm.

Posteriormente, o millipore foi retirado com cuidado do filtro, colocado em placa petri e seco a vácuo em dessecador à temperatura ambiente. Cada millipore que continha as células bacterianas foi cortado e aderido com fita dupla face em lâmina de vidro.



Figura 5.11 – Goniômetro Ramé-Hart.

Antes de realizar as medidas de ângulo das bactérias, as lâminas de vidro com os millipore contendo as células foram reservadas por 20 minutos em estufa a 30 °C e, em seguida, as medidas foram realizadas.

Na Figura 5.12 é possível observar o ângulo de contato sendo medido para as bactérias.

Bem como às células bacterianas, também foram realizadas medidas de ângulo de contato das superfícies minerais com água milli-Q a pH neutro. Como já descrito nos materiais, os minerais foram fixados em resina epoxídica

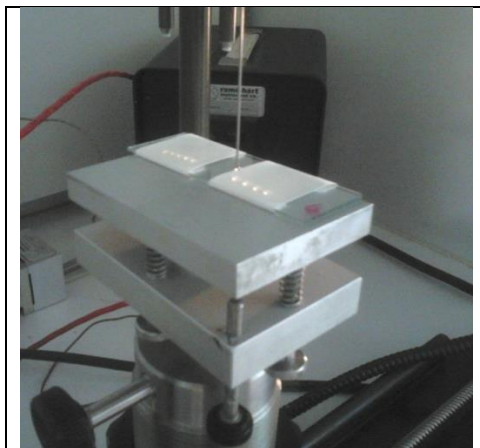


Figura 5.12 – Ângulo de contato sendo medido para a bactéria *B. subtilis*.

Como explicado na revisão deste trabalho, para calcular as tensões superficiais de sólidos a partir da equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes é necessário utilizar dois líquidos polares e um apolar. Para tanto, glicerol e diiodometano também foram utilizados como fase líquida.

Para os ensaios referentes as cepas bacterianas condicionadas a cada mineral, a metodologia seguiu-se por deixar em contato 3 mL de células na concentração de 600 mg.L^{-1} na superfície mineral fixada à resina epóxi por 30 minutos. Posteriormente, a superfície foi lavada, repetidas vezes, com água milli-Q e seca em estufa a 30°C .

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada superfície e pelo menos 60 medidas de ângulo foram feitas para cada gota depositada, em um intervalo de 0,2 segundos.

5.2.4 Ensaios de Caracterização e Identificação de Espécies Adsorvidas por Espectrometria Infravermelha (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho (IR) é uma técnica que utiliza a transformada de Fourier e fornece espectros de absorção e/ou transmissão em determinada faixa de número de onda.

O infravermelho causa vibração nas moléculas e o equipamento de leitura identifica em que ou quais comprimentos de onda houve deformação na estrutura química (REUSCH, 2014). Pelo fato de existir uma variedade de movimentos

vibracionais característicos dos átomos componentes de tal ligação, cada espectro de infravermelho torna-se individual para cada amostra.

A utilização de espectroscopia de infravermelho para diferenciar os microrganismos tem sido estudada desde 1950 (MARIEY et al., 2001). Embora as possibilidades de interpretação e diferenciação entre espectros bacterianos sejam limitadas devido à sobreposição de bandas de absorção específicas aos componentes da célula, para o nosso caso, que é somente distinguir os grupos funcionais, esta é uma técnica válida (DZIUBA et al., 2007). Já para trabalhos mais específicos, MARIEY et al. (2001) escreveram uma revisão sobre as técnicas de espectroscopia de IV como ferramenta na caracterização de microrganismos.

Neste trabalho foram realizados espectros das amostras minerais, de cada cepa de *Bacillus subtilis* e também da mistura bactéria-mineral após condicionamento.

A principal dificuldade na investigação de espécies adsorvidas por espectrofotometria IV reside no volume extremamente pequeno de material adsorvido, em relação ao volume muito maior do adsorvente. Consequentemente, as raias devidas à absorção da espécie (ou espécies adsorvidas) têm intensidade muito menor em relação às raias produzidas pelo adsorvente. Esse problema pode ser minimizado produzindo-se um pó finíssimo, por moagem, isto é, aumentando a área específica superficial (MONTE, 1998). Para esse fim, 10,0 g das amostras minerais passantes em 20 µm foram cominuídas em grau de ágata por 1 hora (ver tópico 5.1.1).

Para as bactérias, foi retirada alíquota de 1 mL do concentrado celular e colocado em cadinho de porcelana para secar em estufa a 45°C.

Já as amostras utilizadas para fornecer os espectros das bactérias aderidas aos minerais são descritas no tópico “5.1.3.1 Condicionamento das Bactérias ao Substrato Mineral”.

Para obtenção dos espectros foi necessário confeccionar pastinhas de KBr. As amostras foram misturadas em grau de ágata e prensadas em aço inox na proporção de 0,001 g de amostra para 0,099 g de KBr por 2 minutos com 2 toneladas sendo

exercidas sobre o material (Figura 5.13). O espectrômetro utilizado foi o FTIR Nicolet 2000, no modo de transmissão em resolução de 4 cm^{-1} usando 120 varreduras e detector DTGS. O intervalo de frequência analisado foi entre 4000 e 400 cm^{-1} .

Os dados obtidos pelo software OMNIC foram tratados e plotados em Excel nos eixos de número de onda versus absorvância.

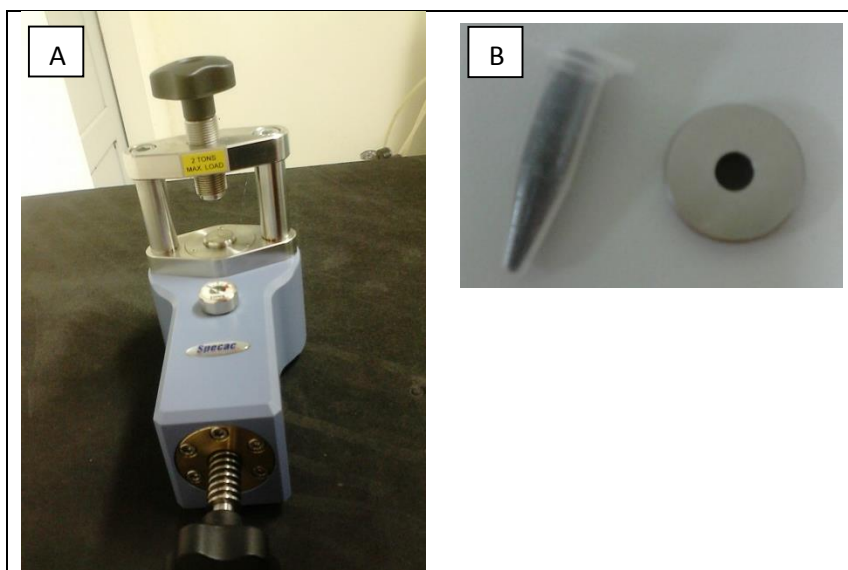


Figura 5.13 – (A) Prensa Epecac e (B) *pellet* de hematita formado.

5.2.5 Ensaios e Microflotação em Tubo de Hallimond Modificado

Os ensaios de microflotação foram realizados em tubo de Hallimond modificado. A vazão de ar foi controlada por um rotâmetro previamente calibrado por bolhômetro, garantindo uma vazão de $15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Visando manter as partículas em suspensão, foi utilizada agitação magnética com peixinho de 1 cm em 792 rpm . O condicionamento foi realizado na própria célula com 90 mL de eletrólito ($\text{NaCl } 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e cepa *Bacillus subtilis* GLI. Tanto o tempo de flotação como o de condicionamento foi de 5 minutos.

Primeiramente foram realizados testes de flotabilidade em função do pH na concentração de biomassa de $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ao pH que resultou no melhor valor de flotação foram realizados testes em função da concentração do biorreagente e também montado um sistema mineral 1:1 de hematita e quartzo.

As condições empregadas na microflotação seguem na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Condições empregadas na microflotação.

Parâmetro	Hematita	Quartzo
Volume do condicionamento (mL)	90	90
Volume da célula (mL)	175	175
Vazão (mL.min ⁻¹)	15	15
Massa (g)	0,7	0,7
Tempo de condicionamento (min)	5	5
Tempo de flotação (min)	5	5
Flotação em função do pH		
Concentração da biomassa (mg.L ⁻¹)	600	600
pH	3, 4, 5, 6, 8, 10	3, 4, 5, 6, 8, 10
Flotação em função da concentração da biomassa		
Concentração da biomassa (mg.L ⁻¹)	300, 450, 600, 750, 900	300, 450, 600, 750, 900
pH	6	6

5.3 Aplicação das Teorias Microscópica de Hamaker e Macroscópica de Lifshitz para Corpos Sólidos

Para as contas propostas, é necessário ter em mãos as constantes de cada líquido utilizado nos ensaios de ângulo de contato. Estas são observadas na Tabela 5.5.

Após a obtenção do ângulo de contato das superfícies com os determinados líquidos, foi possível dar início aos cálculos para encontrar as componentes de tensões superficiais.

Tabela 5.5 – Valores das componentes de energia de doação de elétrons, aceitação de elétrons, ácido-base, Lifshitz-van der Walls e energia total para os respectivos líquidos. Constantes determinadas a 20°C, em mJ.m² (VAM OSS. 1994).

Constante	Glicerol	Água	Diiodometano
γ^-	57,4	25,5	<0,1
γ^+	3,92	25,5	<0,1
$\gamma^P = \gamma^{AB}$	30	51	≈ 0
$\gamma^d = \gamma^{LW}$	34	21,8	50,8
$\gamma_L = \gamma^{Total}$	64	72,8	50,8

Com o ângulo formado entre a superfície sólida, ar e o líquido apolar, neste caso o diiodometano, calculou-se a componente apolar de tensão superficial dos sólidos a partir da equação de Young-Dupré.

$$\gamma_{LG}(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{(\gamma_s^{LW}\gamma_L^{LW})} \quad 5.1$$

Posteriormente, foram calculadas a constante de Hamaker individual (A_{11}) para cada um dos sólidos a partir da teoria macroscópica de Lifshitz e, a constante de Hamaker efetiva (A_{132}) para interação entre dois sólidos em um meio pela teoria microscópica de Hamaker.

Os sistemas levados em consideração para o cálculo de A_{132} foram: hematita e *B. subtilis* GLI; hematita e *B. subtilis* BAM; quartzo e *B. subtilis* GLI; e quartzo e *B. subtilis* BAM. O meio 3 pressuposto para todos os sistemas foi a água.

Tanto para A_{132} quanto para A_{11} foi utilizado o valor de 1,65 Å como distância mínima de separação entre partículas (d_0) (ISRAELACHVILI, 1989).

$$A_{11} = 24\pi\gamma_s^{LW}(d_o)^2 \quad 5.2$$

$$A_{132} = (\sqrt{A_{11}} - \sqrt{A_{33}})(\sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{33}}) \quad 5.3$$

A equação completa de Young-Dupré, também chamada de Young-Good-Girifalco-Fowkes, possibilita o cálculo das componentes de tensão polar (ácido-base) de superfícies:

$$\gamma_{LG}(1 + \cos\theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+} \right) \quad 5.4$$

O termo γ_s^{LW} , calculado utilizando a equação 5.1, os ângulos de contato (θ), medidos experimentalmente para cada líquido sobre a superfície, e as tensões superficiais dos líquidos (tabela 5.5), necessários para o cálculo da Equação 5.4 estão disponíveis.

Montou-se, então, a equação 5.4 para cada um dos líquidos polares e com o sistema formado foi possível encontrar as variáveis polares do sólido de aceitação de elétrons (γ_s^+) e doação de (γ_s^-).

Para o cálculo da componente de tensão superficial ácido-base das superfícies foi utilizada a fórmula a seguir.

$$\gamma_s^{AB} = 2 \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} \quad 5.5$$

A tensão superficial de um sólido é o somatório das tensões apolar e polar.

$$\gamma_s^{Total} = \gamma_s^{AB} + \gamma_s^{LW} \quad 5.6$$

5.4 Aproximação termodinâmica

A aproximação termodinâmica foi utilizada para avaliar as energias de interação entre os sistemas dos minerais com as bactérias.

A variação de energia livre de adesão total para um sistema é o somatório da variação de energia livre de adesão da contribuição apolar (LW) e polar (AB).

Para o cálculo de cada uma das contribuições foram considerados os valores das componentes individuais

$$\Delta G_{adh}^{Total} = \Delta G_{adh}^{LW} + \Delta G_{adh}^{AB} \quad 5.7$$

$$\Delta G_{adh}^{LW} = -2 \left(\sqrt{\gamma_b^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right) \left(\sqrt{\gamma_m^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}} \right) \quad 5.8$$

$$\Delta G_{adh}^{AB} = -2 \left(\sqrt{\gamma_b^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right) \left(\sqrt{\gamma_m^{AB}} - \sqrt{\gamma_l^{AB}} \right) \quad 5.9$$

5.5 Estimativa da Energia de Interação pela Teoria DLVO e X-DLVO

As energias de interação entre as células bacterianas, *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, e as superfícies minerais de quartzo e hematita foram estimadas com base na teoria DLVO e X-DLVO.

Na teoria DLVO levou-se em consideração as energias eletrostáticas (G_{ELE}) e de van der Waals (G_{vdW}), equações 5.10 e 5.11, respectivamente.

$$G_{ELE} = \pi \varepsilon \varepsilon_0 r \left[2\zeta_1 \zeta_2 \ln \left(\frac{1 + e^{-kH}}{1 - e^{-kH}} \right) + (\zeta_1^2 + \zeta_2^2) \ln(1 - e^{-2kH}) \right] \quad 5.10$$

Onde ε_0 é a permissividade no vácuo e equivale $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ (C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}\text{)}$, ε é a constante dielétrica do meio e vale 79; r é o raio da bactéria (m); ζ_1 e ζ_2 são os de potencial zeta para a célula bacteriana e a partícula mineral, respectivamente, medidos em V que equivale a $\text{J} \cdot \text{C}^{-1}$; $1/k$ é o comprimento de Debye-Hückel (nm) e H é a distância entre as partículas.

$$G_{vdW} = -\frac{A_{132}r}{6H} \quad 5.11$$

A curva resultante de interação pela teoria DLVO é o somatório das energias eletrostática e de van der Waals em função da distância H .

Na teoria X-DLVO foi considerada, além das forças atrativas de van der Waals e da força eletrostática, a energia de interação ácido-base entre as partículas (G^{AB}).

$$G^{AB} = \pi r \Delta G_{adh}^{AB} e^{\frac{(d_0 - H)}{\lambda}} \quad 5.12$$

Onde λ é o parâmetro de comprimento de moléculas presentes em um líquido (6Å).

6. Resultados e Discussão

6.1 Propriedades de Superfície dos Microrganismos

Na Figura 6.1 observam-se as imagens realizadas a partir de microscopia óptica das duas cepas de *B. subtilis* cultivadas em meio sólido. Esses microrganismos se organizam de formas diferentes e o rearranjo peculiar de suas células promove o biofilme mostrado nas imagens da Figura 6.1. Nas Figuras 6.1a) e 6.1d) encontram-se colônias isoladas da *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, respectivamente. Em que, GLI e BAM são uma forma de diferenciar as espécies de *B. subtilis*.

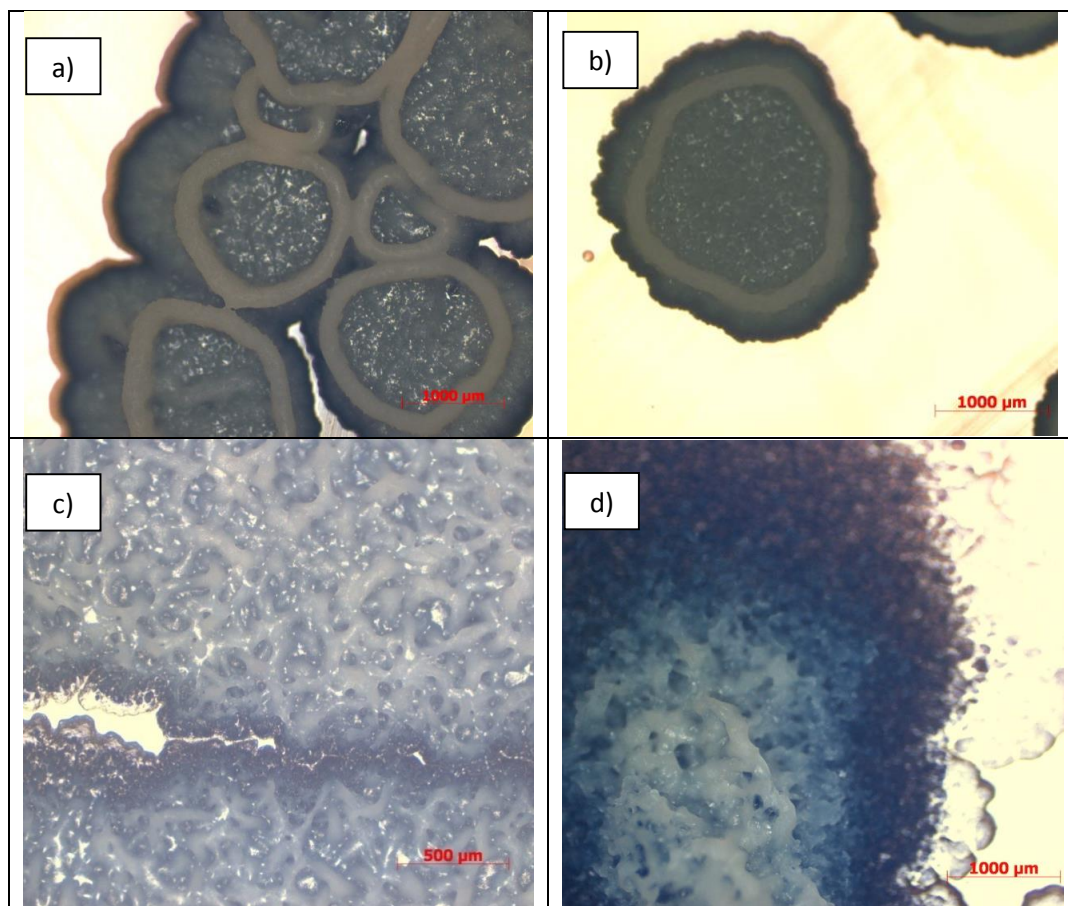


Figura 6.1 – Imagens de microscopia óptica. a) e b) *Bacillus subtilis* GLI. c) e d) *Bacillus subtilis* BAM

RUDGE et al. (2013) estudaram a formação de padrões complexos fractais que, são observados em função do resultado da regulação genética, da sinalização celular e de forças físicas entre as células. Existe uma série de padrões biológicos

complexos que podem surgir a partir de interações físicas. Os autores explicam que organismos coloniais, tais como bactérias, se auto-organizam em nível da população, pois apresentam a expressão do gene espacialmente modelado, passam por uma diferenciação celular e criam estruturas morfológicas elaboradas.

De acordo com ASALLY et al. (2012), a bactéria *B. subtilis* organiza-se formando biofilmes microbianos e a morte celular localizada juntamente com formação de rugas compreende um processo ordenado e controlado durante o desenvolvimento do biofilme. Dando, assim, origem às fraturas organizadas de acordo com cada microrganismo, observadas nas imagens de microscopia óptica (Figura 6.1).

A partir da microscopia eletrônica de varredura foi possível reconhecer a micromorfologia das cepas de *B. subtilis* além de identificar o tamanho de suas células. As imagens de *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, em escala microscópica, são passíveis de observação nas Figuras 6.2 e 6.3, respectivamente. Conforme pode ser observado, as células de *B. subtilis* crescem em forma de bastonetes (Figuras 6.2 e 6.3).

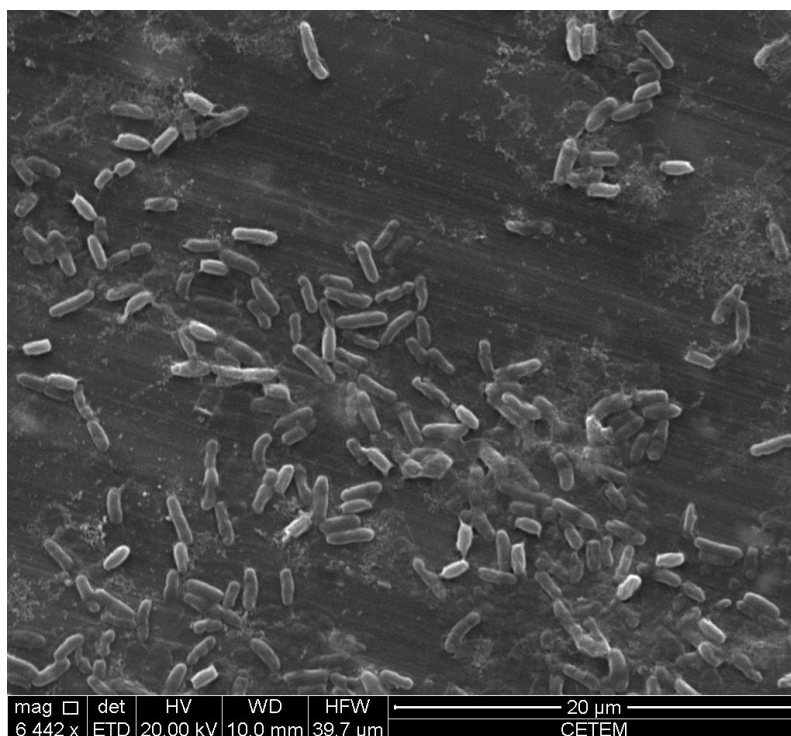


Figura 6.2 – Micrografia de células de *B. subtilis* GLI.

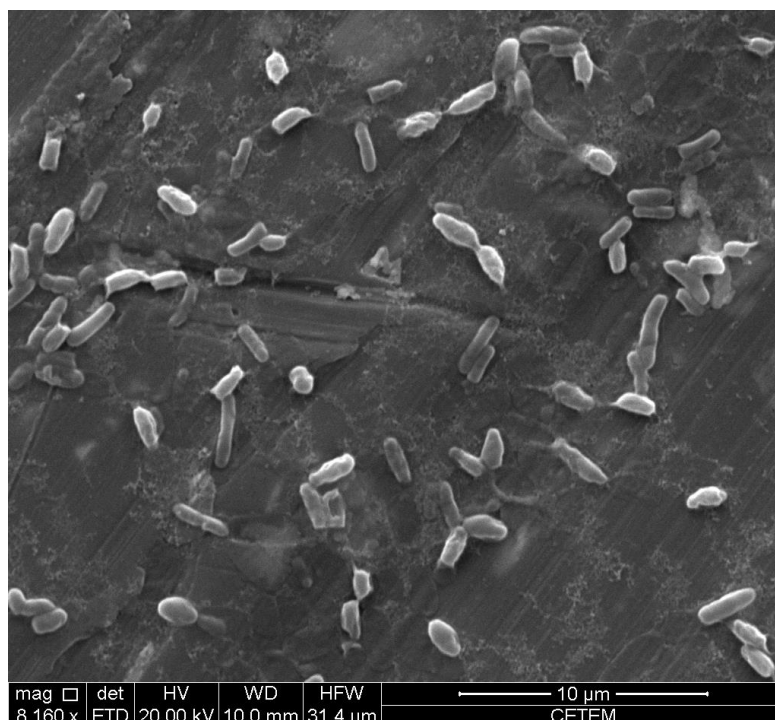


Figura 6.3 – Micrografia de células de *B. subtilis* BAM.

A Tabela 6.1 apresenta o tamanho celular medido para as *B. Subtilis* após 15 e 30 dias de armazenamento, a $T = 4^{\circ}\text{C}$. Um aumento de diâmetro das células é observado, que passa, por exemplo, de 1,95 para 2,12 μm , indicando que as mesmas sofreram osmose em função do tempo de armazenamento.

Tabela 6.1 – Tamanho celular de *B. subtilis* aferido a partir das imagens obtidas por MEV.

<i>B. subtilis</i> GLI	15 dias de armazenamento		30 dias de armazenamento	
	Diâmetro (μm)	Raio (μm)	Diâmetro (μm)	Raio (μm)
	1,95	0,97	2,12	1,06
Desvio Padrão	0,14	---	0,19	--
<i>B. subtilis</i> BAM	15 dias de produção		30 dias de produção	
	Diâmetro	Raio	Diâmetro	Raio
	1,92	0,99	2,04	1,02
Desvio Padrão	0,27	---	0,2	--

GOMES (2013) observou que as espécies do gênero *Bacillus* possuem tamanhos que variam entre 1,2 e 10 μm de diâmetro. A literatura reporta tamanhos celulares de *B. subtilis* de 1,6 μm (TOLENTINO e BIDOIA, 2002),

(VIJAYALAKSHMI e RAICHUR, 2003) e $4,14\ \mu\text{m}$ (HARIMAWAN et al, 2013). Dessa forma, o diâmetro medido neste trabalho está em concordância com os dados obtidos da literatura.

Ainda na caracterização de superfície bacteriana, foram realizadas análises por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier para identificar os grupos funcionais presentes na parede celular das cepas. Os espectros das amostras celulares são observados na Figura 6.4.

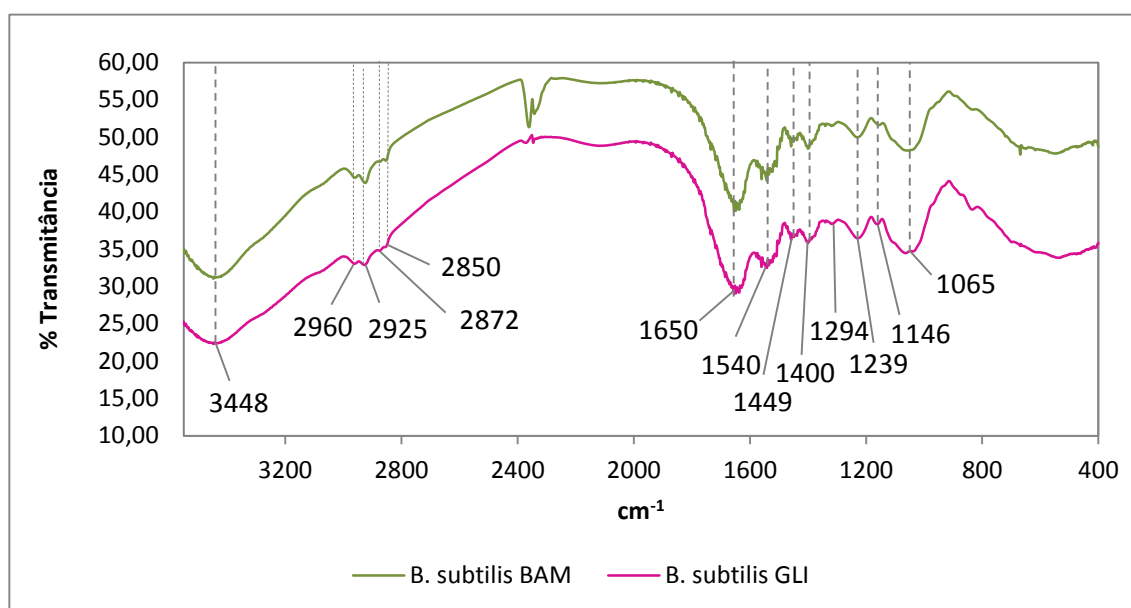


Figura 6.4 – Espectros de infravermelho por transformada de Fourier referentes às cepas de *B. subtilis* GLI e BAM.

Os espectros de bactérias por IVTF são específicos para uma determinada estirpe e mostram as características espectrais dos componentes celulares, tais como ácidos graxos (lipídeos), proteínas intracelulares e da membrana e polissacarídeos (DZIUBA et al. 2007).

Para analisar espectros de amostras de bactérias, HELM et al. (1991) elaboraram um processo de identificação e classificaram cinco janelas espectrais dentro da faixa de 3000 a $700\ \text{cm}^{-1}$, observadas na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Classificação dos grupos funcionais em janelas de absorção identificados por FTIR para a composição celular das bactérias.

Janelas (cm ⁻¹)		Grupos
W1 (3000 – 2800)	“Região de ácidos graxos ⁶ ”	– CH ₃ , =CH ₂ , ≡CH e grupos representantes de ácidos
W2 (1800 – 1500)	“Região de amidas”	–COO ⁻ , C=O, e cetonas. Região de amidas I e II, proteínas e peptídeos
W3 (1500 – 1200)	“Região mista”	Compreende proteínas, ácidos e fosfatos
W4 (1200 – 900)	“Região de polissacarídeos”	Impressões digitais de polissacarídeos ⁷
W5 (900 – 700)	“Região de impressão digital”	Verdadeira impressão digital que mostra padrões específicos

Para os espectros de *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM observam-se as mesmas bandas com intensidades diferentes. A variação de transmitância, neste caso, pode estar atrelada à diferença na concentração das células. Em primeiro momento, poderíamos dizer que as cepas possuem a mesma constituição. Entretanto, para fazer essa afirmação seria necessário um estudo mais detalhado, como proposto por HELM et al. (1991) e MARIEY et al. (2001).

Os picos de absorção encontrados neste trabalho, na região do espectro entre 1800 e 900 cm⁻¹, são semelhantes aos encontrados por FILIP et al. (2004), MYSLIWIEC et al. (2009) e WEI et al. (2011) para *B. subtilis* utilizando o mesmo meio de crescimento celular.

A banda larga observada no comprimento 3448 cm⁻¹ corresponde a sobreposição dos alongamentos O–H e N–H (OMOIKE e CHOROVE, 2004). O

⁶ Lipídeos.

⁷ Interior da célula.

estiramento N–H de sais de amônio (correspondentes a aminoácidos) é largo e ocorre em $3300 - 2600 \text{ cm}^{-1}$. Já o de aminas ocorre entre $3500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$. E, o de amidas, em $3475 - 3150 \text{ cm}^{-1}$. Discutindo a presença de amidas e aminas, amidas primárias apresentam dubleto na região de estiramento de N–H ($3475 - 3150 \text{ cm}^{-1}$) e amidas secundárias, uma banda só, bem como as aminas primárias apresentam duas bandas e aminas secundárias um singlete correspondente ao seu estiramento N–H (PAVIA et al., 2010). Mesmo que essa característica não seja visível por conta da sobreposição é possível identificar as amidas. Vários trabalhos, já comentados aqui, estudaram o método de HELM et al. (1991) e a literatura se faz consistente para correlacionar as bandas. A Tabela 6.3 resume as bandas e as respectivas referências.

As bandas presentes entre 2960 e 2850 cm^{-1} são referentes aos compostos alifáticos presentes na parede celular, nos lipídeos e carboidratos (FILIP et al., 2004). A banda em 1650 cm^{-1} é uma sobreposição de grupamentos C=O de ácidos, amidas e carboxilatos (aminoácidos) e de grupamento N–H de aminas, amidas e sais de amônio (aminoácidos).

A banda larga que aparece antes de 800 cm^{-1} é característica dos compostos contendo ligações de fósforo (FILIP et al., 2004; OJEDA et al., 2008; OMIKE e CHOROVER, 2004; PAVIA et al., 2010; WEI et al., 2011;) e C–O (FILIP et al., 2004).

Em meio aquoso, a maioria das partículas apresenta carga elétrica em sua superfície. Há uma variação de potencial eletrostático ao longo da interface em questão, onde, somente o potencial zeta pode ser medido experimentalmente (HUNTER, 1981). A variação do potencial zeta em função do pH e da concentração de um mesmo eletrólito foi medida para as duas cepas de *B. subtilis*. Estes resultados são apresentados nas Figuras 6.5 e 6.6 para *B. subtilis* GLI e BAM, respectivamente.

Tabela 6.3 – Faixas de número de onda e grupos funcionais característicos para bactérias.

Nº de onda	Característica	Ref.
3448 cm ⁻¹	Estiramento NH ₂ e OH (proteínas)	ERNEST et al., 2014; FILIP et al., 2004; PEREIRA et al., 2013.
2960 cm ⁻¹	Estiramento assimétrico CH ₃	FILIP et al., 2004; HELM et al., 1991;
2925 cm ⁻¹	Estiramento assimétrico CH ₂	ERNEST et al., 2014; FILIP et al., 2004; HELM et al., 1991;
2872 cm ⁻¹	Estiramento simétrico CH ₃	PEREIRA et al., 2013; HELM et al, 1991;
2850 cm ⁻¹	Estiramento simétrico CH ₂	PEREIRA et al., 2013; HELM et al, 1991;
1650 cm ⁻¹	Sobreposição de estir. C=O de amida I e along. NH, NH ₂ (peptídeos)	HELM et al, 1991; WEI et al., 2011; OJEDA et al., 2008; FILIP et al., 2004; OMIKE e CHOROVER, 2004.
1540 cm ⁻¹	Amida II – along. NH combinada com estir. C–N	HELM et al, 1991; PEREIRA et al., 2013; WEI et al., 2011; FILIP et al., 2004.
1449 cm ⁻¹	Deformação de CH ₃ alifático	HELM et al, 1991; PEREIRA et al., 2013; OJEDA et al., 2008
1400 cm ⁻¹	Estiramento simétrico COO ⁻	HELM et al, 1991; OJEDA et al., 2008; WEI et al., 2011; OMIKE e CHOROVER, 2004.
1239 cm ⁻¹	Estiramento assimétrico PO ₂ ⁻ de grupos fosfatados presentes nos lipídeos	HELM et al, 1991; WEI et al., 2011; OJEDA et al., 2008
1065 cm ⁻¹	Grupos fosfato de polissacarídeo	HELM et al, 1991; WEI et al., 2011; OMIKE e CHOROVER, 2004; OJEDA et al., 2008

A presença de grupos aniônicos na superfície das cepas proporciona valores baixos de PIE, conforme mostrado nas curvas das Figuras 6.5. e 6.6. Tanto para *B. subtilis* GLI quanto para *B. subtilis* BAM, o PIE estimado foi próximo a 0,5. Além disso, as cepas apresentaram PIEs próximos e o formato das curvas obtidas, pela a variação do potencial zeta em função do pH, mostrou ser semelhante.

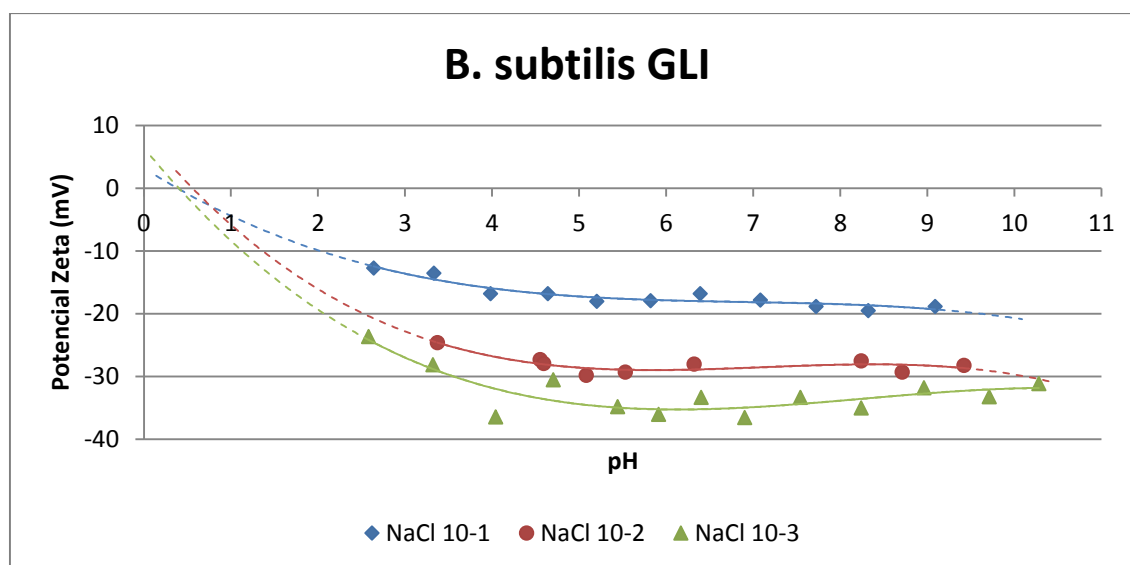


Figura 6.5 – Curvas de potencial zeta versus pH em função da concentração de NaCl para a cepa *B. subtilis* GLI.

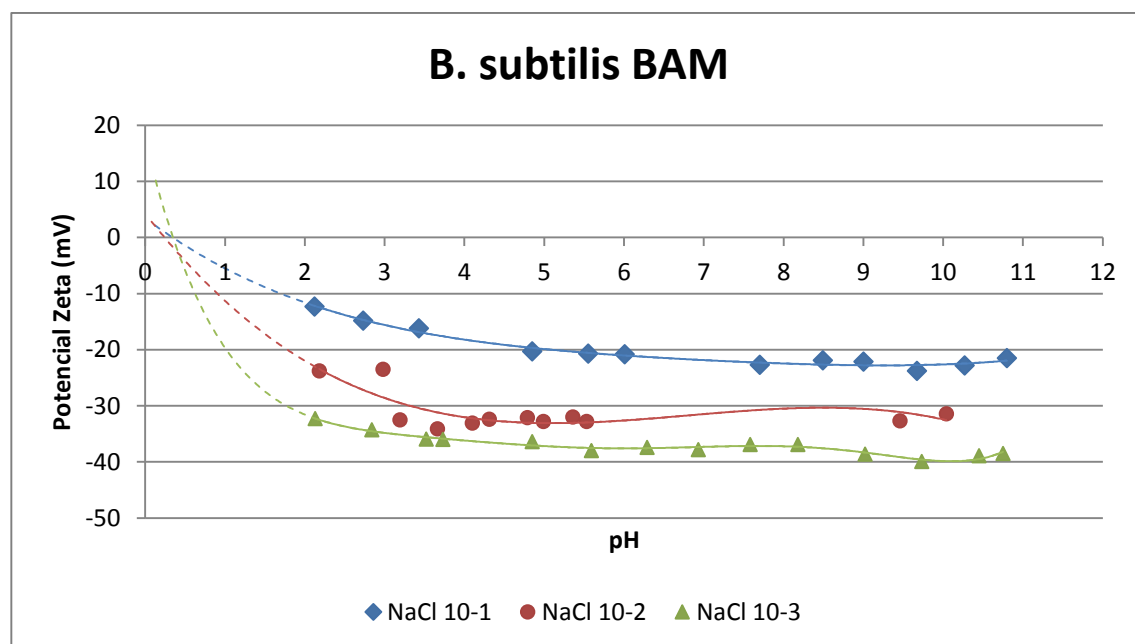


Figura 6.6 - Curvas de potencial zeta versus pH em função da concentração de NaCl para a cepa *B. subtilis* BAM.

A estrapolação das curvas de potencial zeta das bactérias nos possibilitou observar que ambas passam pelo mesmo ponto de pH, no qual $\zeta=0$, para as diferentes concentrações de eletrólito, indicando que o NaCl é um eletrólito indiferente e seus íons não são adsorvidos especificamente na DCE das células bacterianas. Neste caso, o PIE coincide com o PCZ (MONTE e PERES, 2010). Os resultados obtidos foram corroborados pelos estudos de KHAN et al. (2011) e KUBOTA et al. (2008).

A partir do comportamento das curvas, obtidas nos estudos do efeito do pH no potencial zeta das cepas *B. subtilis*, pode ser observado que o valor do potencial zeta diminuiu com o aumento da força iônica. Esta ocorrência justifica-se pelo acúmulo de contra-íons no PEH e com a compressão da DCE. Por outro lado, a mudança dos valores de potencial zeta, em função do aumento do valor de pH do meio aquoso, sugere que os íons OH^- e H^+ são íons determinadores de potencial para os sistemas *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM. .

A Tabela 6.4 apresenta os valores de ângulo de contato, medidos na fase líquida (água Milli-Q), para as estirpes *B. subtilis* GLI e BAM.

Tabela 6.4 – Valores de ângulo de contato para as cepas em relação a água.

Estirpe Bacteriana	Ângulo de contato
<i>B. subtilis</i> BAM	32°
<i>B. subtilis</i> GLI	41°

Os ensaios de ângulo de contato para identificar a afinidade das cepas em contato com a água remetam a uma diferença de 11° entre uma cepa e outra. Observa-se uma característica mais hidrofóbica para a cepa *B. subtilis* GLI em consequência do seu maior ângulo de contato.

6.2 Estudos do Efeito da Adesão Microbiana nas Propriedades de Superfície das Amostras

Esta parte do estudo visa a análise dos resultados dos ensaios antes e após da interação bacteriana com o mineral. A intenção foi reconhecer indicativos dos melhores parâmetros e do melhor sistema para obtenção de uma flotação seletiva para hematita em relação ao quartzo.

A Figura 6.7 apresenta o potencial zeta da hematita antes e após interação com as cepas de *B. subtilis*. Observa-se que após a interação da estirpe *B. subtilis* BAM com a superfície de hematita, a curva de potencial zeta sofreu um deslocamento do PIE, que passou de 4 (hematita pura) para 3,8 (hematita + GLI) e 2,5 (hematita + BAM), para faixa mais ácida de pH. A partir do valor do PIE, os valores de potencial obtidos para a curva que representa a interação entre a superfície de hematita e a cepa *B. subtilis* GLI apresentam-se mais negativos, quando comparado a curva da hematita sem adição de cepa microbiana.

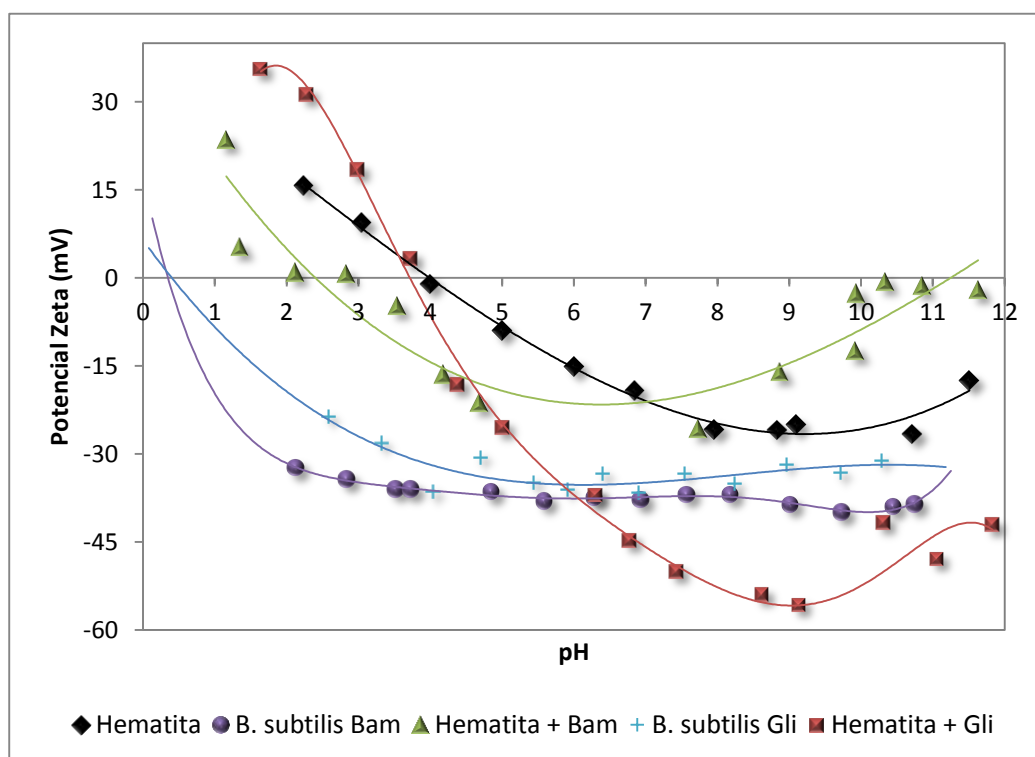


Figura 6.7 - Curvas de potencial zeta versus pH para as cepas microbianas e hematita antes e após interação com as bactérias em função da concentração de 10^{-3} M de NaCl.

Os ensaios de mobilidade eletroforética indicaram uma janela de seletividade para os valores de pH entre 0,5 e 4, que são os PIE de *B. subtilis* e da hematita, respectivamente. Para valores maiores que estes, o potencial zeta das partículas de hematita, na presença e na ausência das cepas, é negativo. Logo, a faixa ácida de pH indicaria uma possível atração eletrostática entre as superfícies de hematita e de *B. subtilis*, favorecendo a adesão. Já para o quartzo observa-se uma janela menor, entre 0,5 e 1,8.

Um mecanismo possível para a mudança do PIE da hematita devido à interação com a *B. subtilis* seria a adsorção específica, com a ligação entre a

superfície da hematita e os grupos funcionais das proteínas e carboidratos presentes na parede celular das cepas. Essa discussão também foi levantada por BOTERO et al. (2008) e DEO e NATARAJAN (1997). Como comentado, no tópico anterior, os espectros de infravermelho por transformada de Fourier revelaram vibrações correspondentes aos grupos de funcionais das proteínas e carboidratos presentes na parede celular.

A Figura 6.8 apresenta a variação do valor do potencial zeta do quartzo antes e após interação com as cepas de *B. subtilis*. O resultado encontrado de PIE para quartzo foi de 1,8. Os valores de PIE mencionados na literatura para o quartzo estão entre 1,8 e 3,0 e, para a hematita, entre 5,0 e 7,0. Essa variação do ponto isoelétrico ocorre pela presença de impurezas ou substituição isomórfica de cátions (SANTOS e OLIVEIRA, 2007). As análises por difratometria de raios X não revelaram outras fases minerais presentes nas amostras de hematita bem como nas de quartzo.

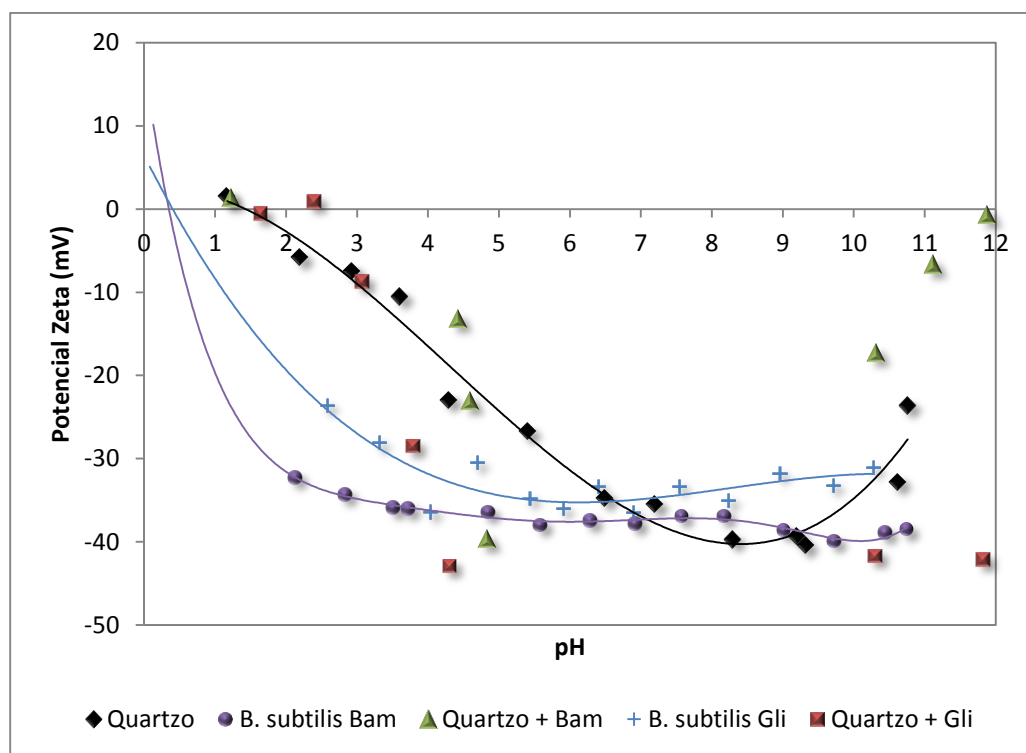


Figura 6.8 - Curvas de potencial zeta versus pH para as cepas microbianas e quartzo antes e após interação com as bactérias em função da concentração de 10^{-3} M de NaCl.

Os valores de potencial zeta obtidos para o quartzo, após a interação com a *B. subtilis* BAM e GLI, não revelaram uma mudança significativa quando comparada com a curva obtida para o quartzo, na ausência de interação.

Os resultados das medidas de ângulo de contato das superfícies minerais antes e após interação com as estirpes bactérias são mostrados na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 - Ângulo de contato de hematita e quartzo com e sem interação com as respectivas cepas bacterianas de estudo.

Mineral	Interação com a cepa	Ângulo de Contato (°)
Hematita	Sem interação	$27,40 \pm 7,55$
	<i>B. subtilis</i> GLI	$46,04 \pm 6,99$
	<i>B. subtilis</i> BAM	$37,87 \pm 8,94$
Quartzo	Sem interação	$13,91 \pm 4,08$
	<i>B. subtilis</i> GLI	$23,24 \pm 7,79$
	<i>B. subtilis</i> BAM	$26,04 \pm 7,23$

As duas superfícies em estudo (quartzo e a hematita) tiveram suas propriedades físico-químicas de superfície alteradas após interação com as bactérias. Uma vez que, percebe-se mudança do ângulo de contato após contato dos dois minerais isoladamente com as cepas.

Assim como os resultados dos ensaios de mobilidade eletrocinética, os de ângulo de contato indicam que há uma forte interação entre a estirpe *B. subtilis* GLI e a superfície de hematita. O ângulo deste mineral passou de $27,40^\circ$ para $46,04^\circ$, quando em contato com a cepa. Também se observa uma diferença de ângulo da hematita, depois de interagir com *B. subtilis* BAM, entretanto, a variação de ângulo de contato foi menos pronunciada.

Para o quartzo, os resultados de ângulo de contato também mostraram modificação de superfície do mineral. As variações de ângulo observadas para este mineral foram inferiores às variações quando comparadas com hematita após condicionamento com as cepas. A mudança no valor do ângulo de contato do quartzo, na presença e na ausência das cepas, foi menor, passando de $13,91^\circ$ para $23,24^\circ$ (com *B. subtilis* BAM) e $26,04^\circ$ (com *B. subtilis* GLI).

Outros autores também observaram a modificação da superfície mineral provocada por células bacterianas. Os resultados de MERMA et al. (2013) apresentaram uma variação do ângulo de contato de 30° para a superfície da apatita posterior à interação com a bactéria *Rhodococcus opaccus* e de 13° pós interação do quartzo com a mesma cepa. Já SHARMA (2001), observou que os minerais sulfetados estudados apresentaram uma maior hidrofobicidade após contato com a cepa *Paenibacillus polymyxa*. Seus resultados mostram que a cepa modificou as superfícies de pirita variando o ângulo de 70° para 20° e de calcopirita de 70° para 16°.

Neste estudo, a interação das cepas de *B. subtilis* com os minerais foi avaliada pelos estudos de flotabilidade, realizados em tubo de Hallimond modificado. Os resultados de flotabilidade isolada dos minerais de quartzo e da hematita conduzidos com a cepa *B. subtilis* GLI são apresentados nas Figuras 6.9 e 6.10.

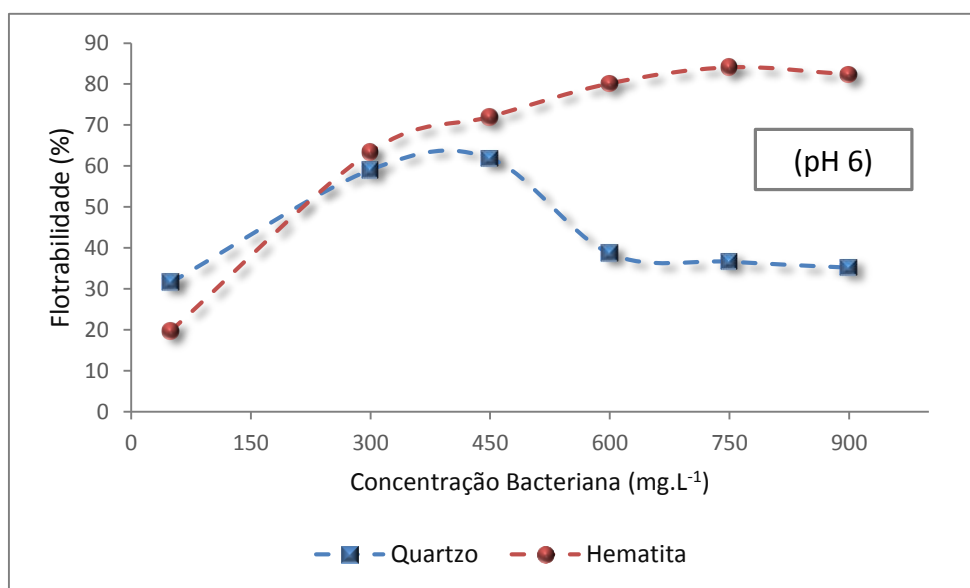


Figura 6.9 - Curvas de flotabilidade para hematita e quartzo em função do biorreagente e a pH 6.

A Figura 6.9 mostra que a curva da flotação de quartzo apresenta um crescimento até a concentração de 450 mg.L⁻¹ da cepa. A partir desta última concentração, há um decaimento na curva, estabilizando em 30 % de recuperação de quartzo flotado. Em relação à flotabilidade da hematita, observa-se um crescimento até que seja atingida uma flotabilidade máxima (85%), para uma faixa de concentração da cepa de 750 mg.L⁻¹.

A partir desses dados estipulou-se o valor da concentração celular a ser utilizada para a realização do estudo de efeito do pH em função da flotabilidade isolada do quartzo e da hematita. As curvas de flotabilidade são mostradas na Figura 6.10. Observa-se que os melhores valores de flotabilidade encontrados para hematita foram em pH 5 e 6, com cerca de 85%. Para o valor de pH 6, o quartzo apresentou um dos menores valores de flotabilidade, com aproximadamente 40% de material flotado.

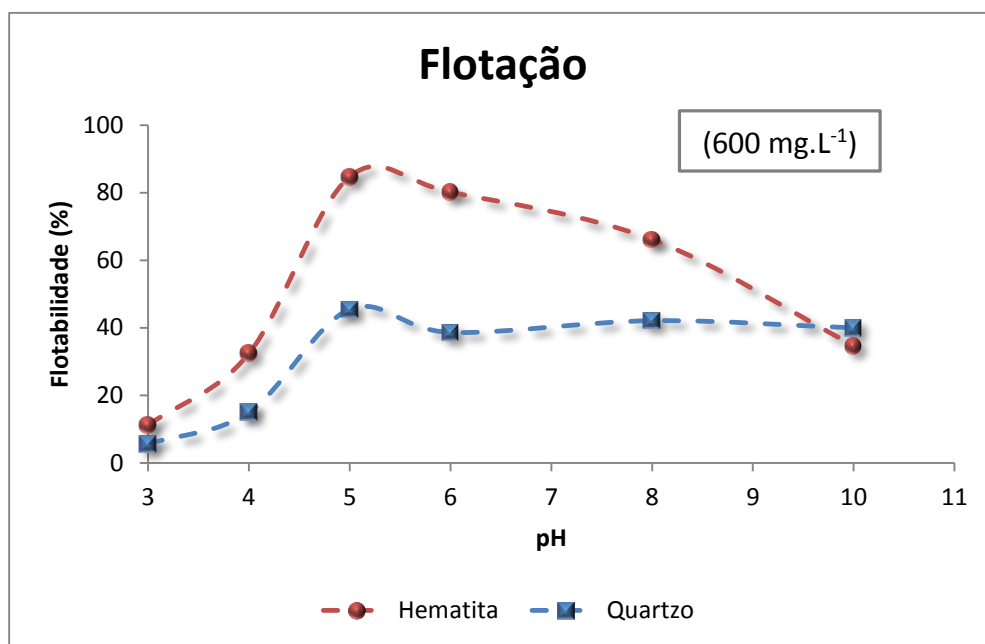


Figura 6.10 - Curvas de flotabilidade para hematita e quartzo em função do pH.

Foram realizadas micrografias a partir de microscopia eletrônica de varredura com o intuito de observar células bacterianas aderidas à superfície mineral. Na Figura 6.11 apresentam-se micrografias das partículas de hematita e quartzo recolhidas na espuma mineralizada após os ensaios de microflotação. As micrografias foram realizadas para os minerais flotados nas condições de pH e na concentração de biorreagente onde o melhor resultado de flotabilidade para hematita foi atingido (pH 6 e 600 mg.L⁻¹ de concentrado celular). A partir das micrografias mostradas na Figura 6.11, é possível observar a presença de células de *Bacillus subtilis* GLI aderida às superfícies de hematita e quartzo. Segundo a discussão proposta por MERMA et al. (2013), os resultados de flotação e as micrografias sugerem que diferentes mecanismos estariam envolvidos no processo de adesão à superfície de quartzo e apatita, uma vez que, a superfície de apatita adquiriu maior grau de hidrofobicidade em relação ao quartzo.

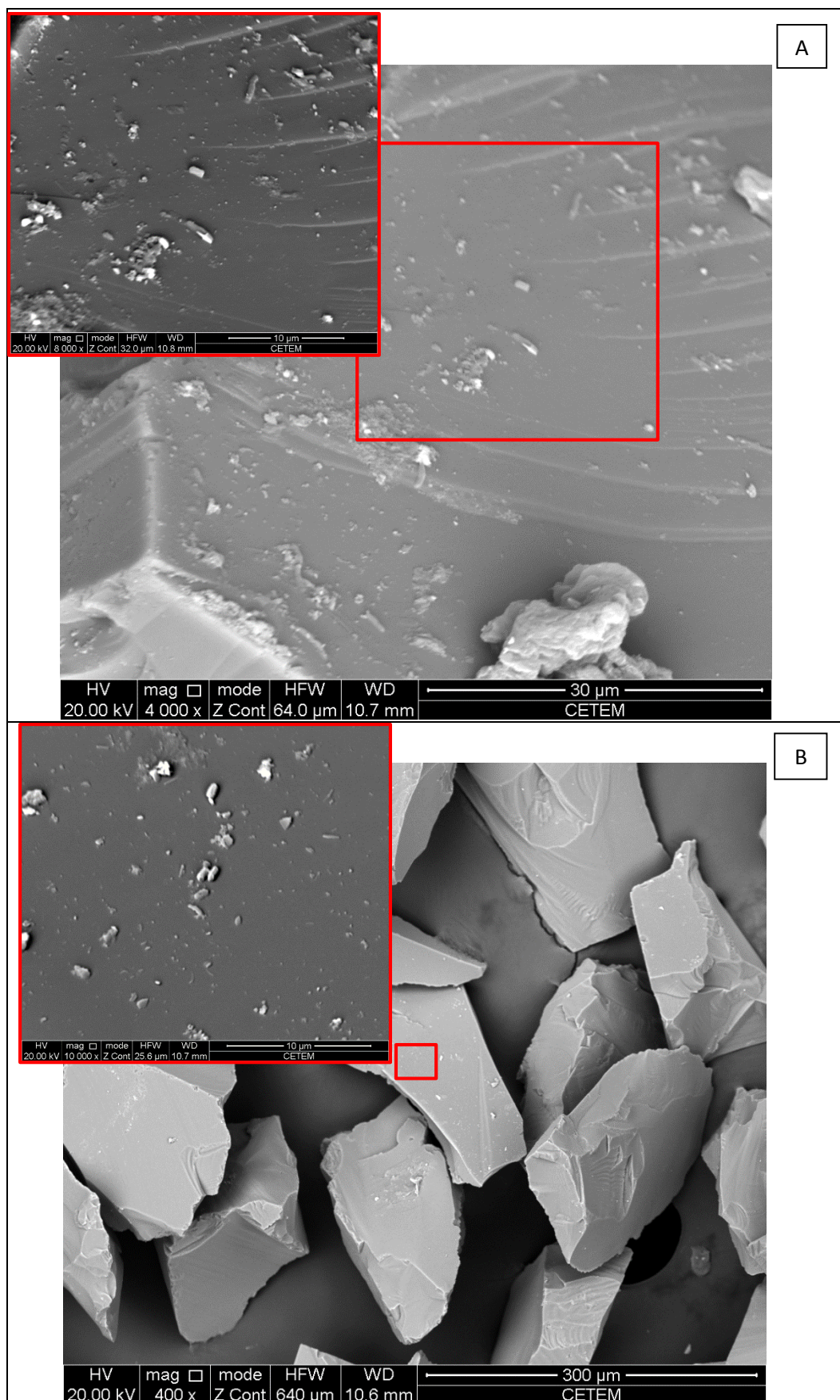


Figura 6.11 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura da cepa *B. subtilis* aderida às superfícies de hematita (a) e quartzo (b). As micrografias contornadas em vermelhos possuem marcação de 10 µm.

A Tabela 6.6 apresenta os melhores resultados de flotabilidade, compilados da literatura, para hematita e quartzo, utilizando uma bactéria como biorreagente no beneficiamento.

Tabela 6.6 - Valores de flotabilidade para hematita e quartzo encontrados na literatura em trabalhos que utilizaram uma estirpe bacteriana como reagente de flotação.

Flotabilidade (%)			
Hematita	85	75	90
Quartzo	35	-	40
pH	6	6	3
Concentração	40 mg.L ⁻¹	16 mg.L ⁻¹	600 mg.L ⁻¹
Ref.	YANG et al. (3013)	YANG et al. (2007)	MESQUITA et al. (2003)

Uma mistura sintética de quartzo e hematita (na proporção 1:1 em massa) foi utilizada para o estudo de seletividade na flotação, conduzida na presença de 600 mg.L⁻¹ da cepa *B. subtilis* GLI e em pH 6. Nestas condições de ensaio, foram obtidas recuperações de hematita de 74% no concentrado flotado.

6.3 Identificação das Espécies Adsorvidas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (IVTF)

Os ensaios de adsorção das cepas *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, em superfícies de hematita e quartzo, foram realizados, objetivando identificar as espécies adsorvidas na superfície dos minerais em estudo. As Figuras 6.12 e 6.13 apresentam os espectros da hematita na presença e na ausência das cepas GLI e BAM, respectivamente.

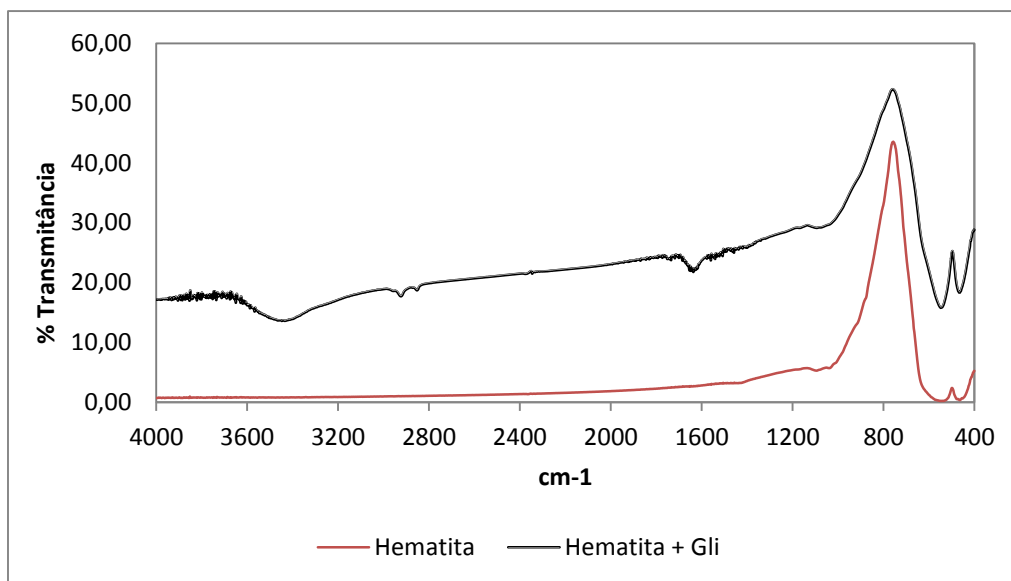


Figura 6.12 - Espectro de infravermelho para hematita e posterior condicionamento com *B. subtilis* GLI.

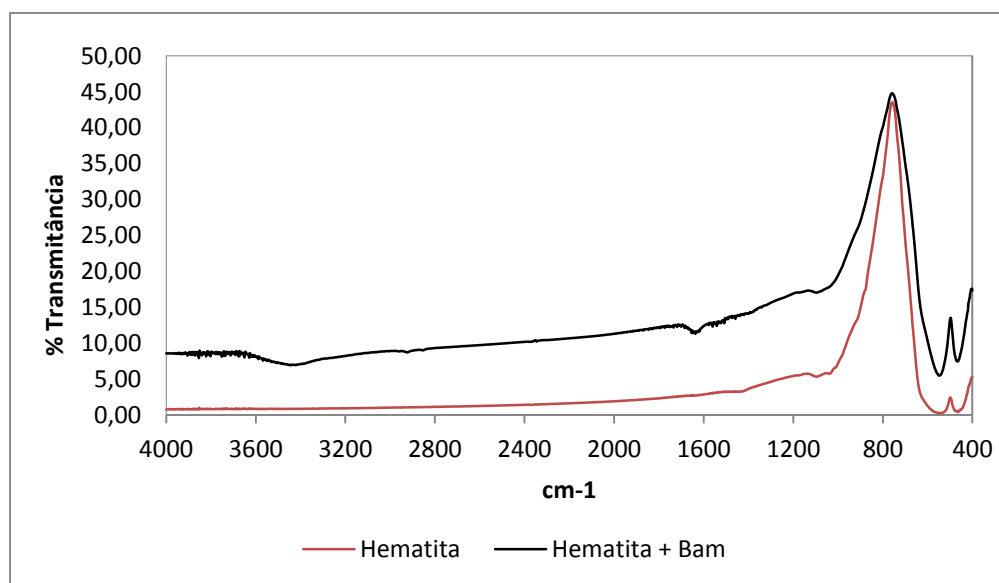


Figura 6.13 - Espectro de infravermelho para hematita e posterior condicionamento com *B. subtilis* BAM.

O espectro da hematita natural é relatado na literatura. Segundo CHERNYSHOVA et al. (2007), os modos simétricos da hematita são ativos em Raman e os assimétricos são identificáveis em espectros de infravermelho (IR). CHERNYSHOVA et al. (2007) mediram duas bandas de absorção próximas a 550 e 460 cm^{-1} . GADSDEN (1975) também observou as mesmas bandas no espectro obtido para este mineral.

A região do espectro que apresenta pouca ou nenhuma porcentagem de transmitância é referente à região de frequência onde não se espera absorção nos grupos octaédricos de Fe–O.

Para o espectro de interação com a cepa *B. subtilis* GLI foram encontradas as janelas W1, W2 e W5 (ver Tabela 6.2), referentes a ácidos carboxílicos, amidas e impressão digital da estirpe. Segundo PAVIA et al. (2010), a banda próxima a 750 cm^{-1} refere-se ao estiramento de P–O e está relacionado com o grupamento fosfato. Observa-se um deslocamento da banda C=O que antes de interagir com o mineral era em 1650 cm^{-1} e posterior interação passou para 1636 cm^{-1} , bem como o estiramento assimétrico de CH_2 e simétrico CH_3 que passaram de 2925 cm^{-1} para 2905 cm^{-1} e 2872 cm^{-1} para 2840 cm^{-1} , respectivamente. Esses deslocamentos comprovam a adesão da estirpe com a hematita.

DEO et al (2001) estudaram a interação de hematita e *P. polymyxa* por espectroscopia de infravermelho. A análise do espectro da hematita com interação da bactéria encontra-se em concordância com as janelas das bandas observadas por DEO et al. (2001).

Segundo YANG et al. (2013), os resultados de infravermelho demonstraram que ocorre adsorção de *B. subtilis* na superfície da hematita, principalmente, por adsorção química, incluindo as interações do grupo carboxílico e do grupo fosfato com a superfície do mineral.

Mais adiante serão discutidos os resultados da aproximação termodinâmica e de interações ácido-base, que caracterizaram associação hidrofóbica entre *B. subtilis* GLI e as partículas de hematita. Essa adsorção química e hidrofóbica na superfície do mineral influencia positivamente na sua flotabilidade, como observado nos resultados de flotação deste trabalho, e para a separação de Fe_2O_3 de minérios hematíticos.

Os espectros para o quartzo na presença e na ausência das cepas *subtilis* são visualizados nas Figuras 6.14 e 6.15. Pelo espectro de infravermelho da amostra de quartzo, na ausência das bactérias, observa-se bandas distintas características desse mineral, como descrito na Tabela 6.7. Diversos autores confirmam as bandas encontrados para SiO_2 , como por exemplo, a banda em 460 cm^{-1} pode ser atribuída

à vibração de flexão do Si–O–Si (CHEN et al., 2013; LEGODI e WAAL, 2007). Segundo SARAVANAN et al. (2013), a banda em 778 e 796 cm^{-1} representam estiramento de Si–O–Si e Si–O, respectivamente, e a banda em 1080 cm^{-1} representa estiramento perpendicular ao plano (SATHYA et al., 2012). A presença da banda larga em torno de 3440 cm^{-1} juntamente com a banda fraca por volta de 1640 cm^{-1} é devida a presença de água absorvida na amostra, representados pela vibração de alongamento de diferentes tipos de interação entre o grupo hidroxila e a água e a outra banda pode ser atribuída à vibração de flexão da molécula de água, respectivamente (CHEN et al., 2013; SARAVANAN et al., 2013).

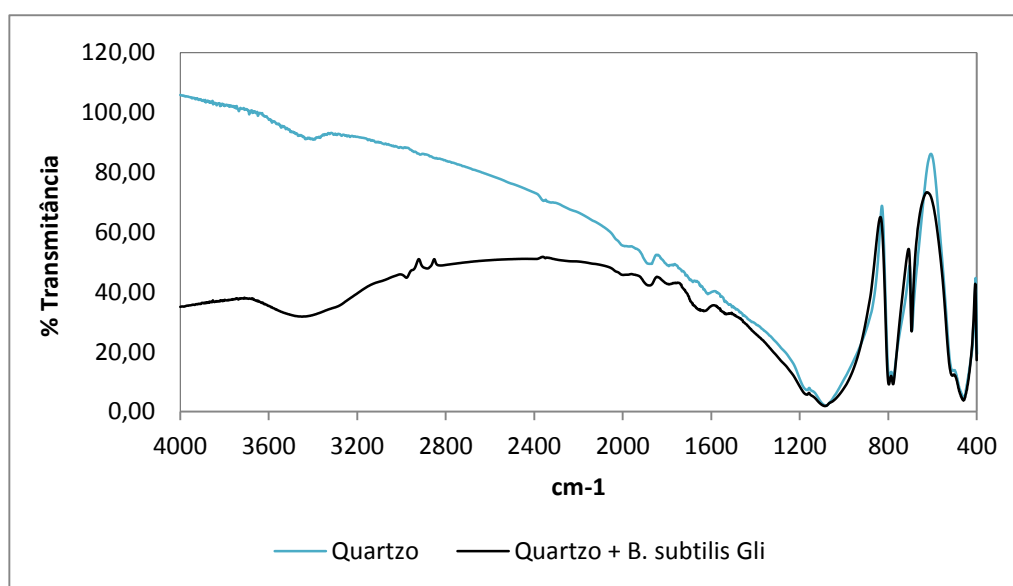


Figura 6.14 - Espectro de infravermelho para quartzo e posterior condicionamento com *B. subtilis* GLI.

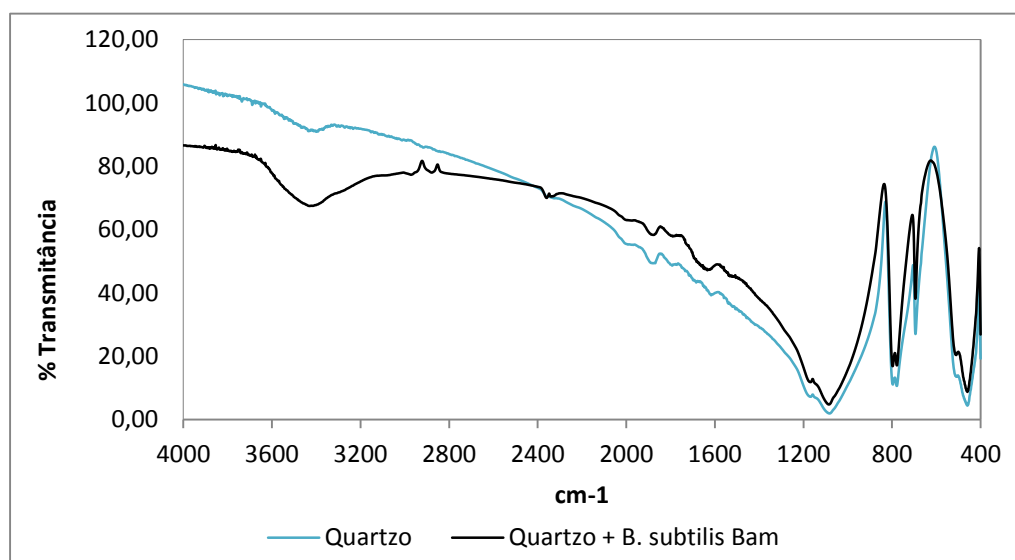


Figura 6.15 - Espectro de infravermelho para quartzo e posterior condicionamento com *B. subtilis* BAM.

Tabela 6.7 – Resumo dos valores obtidos por IVTF da amostra de quartzo e respectivos autores que referenciam tais bandas.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Ref.
460	GADSDEN, 1975; LEGODI and WAAL, 2007; CHEN et al., 2013; SARAVANAN et al., 2013;
500	GADSDEN, 1975;
694	GADSDEN, 1975; SATHYA et al., 2012; SARAVANAN et al., 2013;
778	GADSDEN, 1975; SATHYA et al., 2012; SARAVANAN et al., 2013;
796	GADSDEN, 1975; SATHYA et al., 2012;
1080	GADSDEN, 1975; CHEN et al., 2013; SARAVANAN et al., 2013;
1170	GADSDEN, 1975;

6.4 Estudos de Interação Microbiana com as Superfícies Minerais a Partir de Modelos Matemáticos

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para o cálculo das componentes da tensão superficial a partir das medidas experimentais de ângulo de contato, com diferentes líquidos. A Tabela 6.8 apresenta os valores de ângulos de contato obtidos para os líquidos polares glicerol e água, e o líquido apolar diiodometano.

Tabela 6.8 – Ângulos de contato das superfícies de hematita, quartzo, *B. subtilis* GLI, *B. subtilis* BAM para cada um dos líquidos (água, glicerol e diiodometano)

	Água	Glicerol	Diiodometano
Quartzo	$13,91^\circ \pm 4,08$	$26,96^\circ \pm 3,21$	$54,51^\circ \pm 2,16$
Hematita	$27,4^\circ \pm 7,55$	$22,63^\circ \pm 2,27$	$60,15^\circ \pm 2,33$
BAM	$32^\circ \pm 3,10$	$86,3^\circ \pm 3,04$	$50,95^\circ \pm 2,85$
GLI	$41^\circ \pm 3,23$	$78^\circ \pm 2,57$	$52,04^\circ \pm 2,90$

A partir dos ângulos de contato, medidos experimentalmente, foram calculadas as energias ou tensões superficiais dos sólidos, ou seja, componente de superfície apolar (LW)⁸, de ácido-base (AB)⁹, esta última subdividida em doação de elétrons (γ^-)¹⁰ e acepção de elétrons (γ^+)⁵. Os valores calculados são mostrados na Tabela 6.9.

Observa-se que a tensão superficial total γ^{Total} para cada uma das cepas bacterianas é maior que as respectivas tensões dos minerais. Todas as superfícies apresentaram valores da componente apolar de doação de elétrons superior a 28,3 e parecem se comportar como fases polares.

⁸ A partir da Equação V.1: $\gamma_{LG}(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{(\gamma_s^{LW}\gamma_L^{LW})}$

⁹ A partir da Equação V.5: $\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+\gamma_L^-}$

¹⁰ A partir da Equação V.4: $\gamma_{LG}(1 + \cos\theta) = 2\left(\sqrt{(\gamma_s^{LW}\gamma_L^{LW})} + \sqrt{(\gamma_s^+\gamma_L^-)} + \sqrt{(\gamma_s^-\gamma_L^+)}\right)$

Tabela 6.9 - Valores das componentes de tensão superficial para os respectivos minerais e cepas bacterianas.

Superfície	Energia de Superfície (mJ.m ⁻²)				
	γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
Hematita	58,33	28,43	29,92	5,62	39,83
Quartzo	57,26	31,66	25,60	3,13	52,33
<i>B. subtilis</i> GLI	63,15	33,06	30,09	2,79	81,13
<i>B. subtilis</i> BAM	93,12	33,67	59,45	7,67	115,21

Quando uma partícula apresenta um valor igual ou superior a 28,3 mJ.m⁻² para a componente γ^- , significa dizer que a partícula tem caráter hidrofílico (van OSS, 1994). Logo, os dados obtidos indicam que tanto os minerais quanto as bactérias estudadas apresentam caráter hidrofílico.

Os testes preliminares de flotação individual para hematita e quartzo sem nenhum tipo de reagente resultaram em no máximo 2% de material flotado. Este fato é um indício de que os minerais possuem caráter hidrofílico. Tal indício pode ser corroborado pelos resultados encontrados de γ^- .

FARAHAT et al. 2009 confirmaram os valores da componente de superfície γ para as partículas minerais. Bem como, VIJAYALAKSHMI e RAICHUR (2003) e HARIMAWAN et al. (2013) confirmaram o valor superior a 28,3 mJ.m⁻² para a bactéria *B. subtilis* GLI. Estes autores também confirmaram o resultado encontrado, neste trabalho, para a tensão de superfície apolar.

A partir das componentes da energia de superfície calculadas, foram obtidos os valores das constantes de Hamaker¹¹ (Tabela 6.10). Todas as constantes de Hamaker efetivas calculadas apresentaram valores positivos, o que indica que há uma atração de Lifshitz-van der Waals para cada um dos sistemas avaliados:

¹¹ A partir das Equações V.2: $A_{11} = 24\pi\gamma_s^{LW}(d_o)^2$ e, V.3: $A_{132} = (\sqrt{A_{11}} - \sqrt{A_{33}})(\sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{33}})$

hematita-GLI; hematita –BAM e quartzo-GLI e quartzo-BAM. A constante de Hamaker tem uma relação diretamente proporcional à tensão de superfície apolar. Ao longo da evolução das teorias de cálculo da constante de Hamaker, alguns autores estudaram estas constantes tanto da hematita quanto do quartzo.

Tabela 6.10 - Valores da constante de Hamaker individual e efetiva.

Superfície sólida	Constante de Hamaker (10^{-20}J)		
	(A_{11})	(A_{132}) BAM	(A_{132}) GLI
Hematita	5,83	3,55	3,40
Quartzo	6,49	4,50	4,30
BAM	6,90		
GLI	6,78		

LINS (1995) utilizou a teoria microscópica de Hamaker e encontrou um valor de $25,0 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ para A_{11} de hematita. DRZYMALA (1994) realizou estudos de adsorção com n-heptano e encontrou $23,2 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ para a constante. Já FOWKES (1964), também por estudos de adsorção com n-heptano, encontrou a tensão de superfície apolar de Fe_2O_3 e, embora não tenha apresentado o valor da constante de Hamaker, seu cálculo pela mesma equação utilizada neste trabalho mostrou o valor de $21,9 \cdot 10^{-20} \text{ J}$.

Os valores de Hamaker encontrados para a hematita neste presente estudo foram inferiores aos calculados pelos citados autores. A diferença encontrada nos valores da Hamaker da hematita provém da metodologia utilizada. Neste trabalho, as medidas experimentais dos ângulos de contato realizadas foram usadas para o cálculo da constante de Hamaker. Este seria a principal razão dos valores finais encontrados.

Por outro lado, um trabalho mais recente, realizado por PLAZA et al. (1998), utilizando a mesma metodologia deste presente estudo, encontrou um valor para γ^{LW} de $23,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ ou seja, a tensão apolar da superfície de hematita. O valor encontrado neste estudo (ver Tabela 6.9) foi de $28,43 \text{ mJ.m}^{-2}$.

Da mesma forma, o valor da constante de Hamaker, encontrado pelo autor foi de $4,88 \cdot 10^{-20}$ J. Dessa forma, Plaza *et al.* (1998) utilizaram a mesma metodologia deste trabalho e seus resultados são semelhantes aos encontrados aqui.

Resultados para o cálculo da constante de Hamaker do quartzo também foram encontrados na literatura, 5×10^{-20} J e $8,8 \times 10^{-20}$ J. (FARAHAT *et al.* 2009; HOUGH e WHITE, 1980; ISRAELACHVILI e TABOR, 1972; ISRAELACHVILI, 1989; LINS, 1995). Os valores calculados para as componentes de tensão e da constante de Hamaker do quartzo estão condizentes com os encontrados na literatura.

Os autores VIJAYALAKSHMI e RAICHUR (2003) e HARIMAWAN *et al.* (2013) confirmam os resultados encontrados para a constante de Hamaker individual para *B. subtilis*.

Para os valores positivos da constante de Hamaker efetiva, as partículas que estão em interação se atraem por força de van der Waals (ISRAELACHVILI, 1989). Por esse motivo, as curvas de G^{LW} foram todas negativas. Ou seja, a constante de Hamaker encontrada foi positiva para todos os sistemas estudados. Todos os resultados de A_{132} para as partículas minerais quando interagem com as cepas, pela teoria, são características de atração por forças de Lifshitz-van der Waals.

Assim como as partículas minerais, as células bacterianas também apresentaram caráter hidrofílico pelo valor encontrado de γ . Entretanto, quando *B. subtilis* GLI interage com hematita em meio aquoso a energia livre de adesão total obtido pelos cálculos foi menor que zero. Ou seja, as células das duas cepas de *B. subtilis* quando interagem com as superfícies de hematita e quartzo são atraídas por uma força hidrofóbica interfacial (van OSS, 1994).

De acordo com a teoria termodinâmica, um sistema sofre espontaneamente uma mudança de estado A para o estado B, se a mudança caminhar para um estado de energia menor. No caso de adesão mineral, o estado A representa partículas minerais com células dispersas na fase líquida, enquanto que no estado B aparece uma nova fase, as bactérias adsorvidas nos minerais. Essa adesão será espontânea somente se o estado energético do sistema B for menor do que do A (VILINSKA, 2007). Os resultados da aproximação termodinâmica são observados na Tabela 6.11.

Tabela 6.11 – Resultados da aproximação termodinâmica. Onde, encontram-se as contribuições polar e apolar.

Superfície	Energia Livre de Adesão (mJ.m ⁻²)		
	ΔG_{adh}^{Total}	ΔG_{adh}^{LW}	ΔG_{adh}^{AB}
Hematita e GLI	-6,97	-1,43	-5,54
Hematita e BAM	-8,89	-4,85	-4,04
Quartzo e GLI	-8,96	-2,07	-6,89
Quartzo e BAM	-6,44	-4,06	-2,38

A partir da Tabela 6.11 observa-se que todos os sistemas apresentaram energia livre de adesão negativa. O resultado para interação de *B. subtilis* BAM com hematita exibiu um valor mais negativo quando comparado à interação com a cepa *B. subtilis* GLI. Já para interação com quartzo, os resultados refletem o inverso.

Quando comparada com a cepa *B. subtilis* GLI, a estirpe *B. subtilis* BAM apresentou valor de ΔG^{Total} superior para o quartzo em relação ao encontrado para hematita. Logo, a aproximação termodinâmica induz que o sistema hematita-*B. subtilis* BAM teria maior possibilidade de interação e, por conseguinte, de flotabilidade. Entretanto, para todos os sistemas ocorreria uma adsorção/adesão espontânea.

Dessa forma, os resultados de ΔG^{Total} encontrados explicam a maior porcentagem de flotabilidade da hematita e a flotabilidade, em menor porcentagem, de quartzo.

A estimativa da energia de interação em função da distância foi aplicada pelas teorias DLVO e X-DLVO. Os gráficos, a seguir, apresentam as curvas de potencial eletrostático, potencial de Lifshitz-van der Waals e potencial ácido-base. A curva de interação DLVO é dada pelo somatório do potencial eletrostático e de Lifshitz-van der Waals. Já a curva de interação X-DLVO é construída pelo somatório de todos os potenciais.

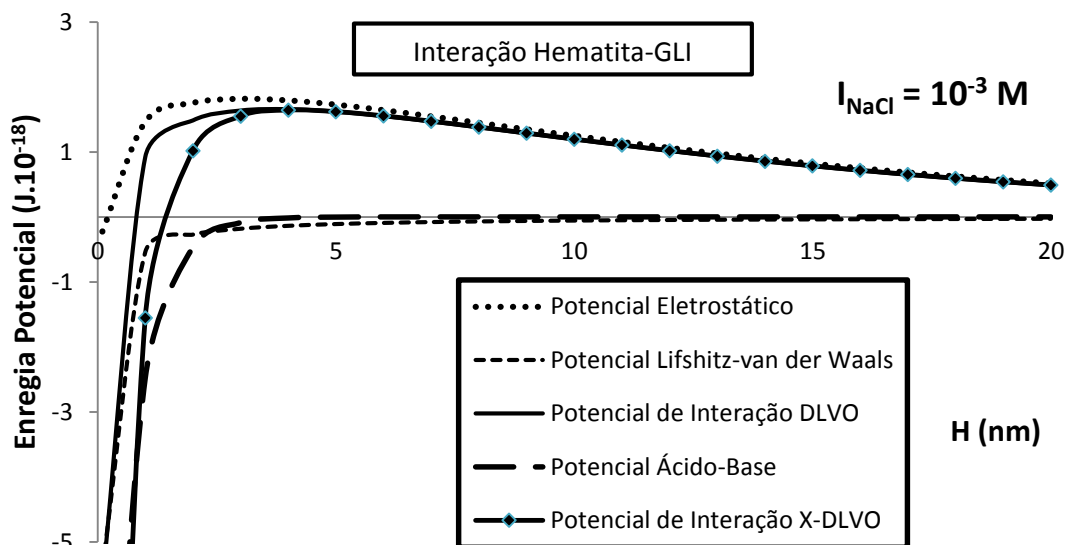


Figura 6. 16 - Curva de energia em função da distância para o sistema hematita-*B. subtilis* GLI em pH 6.

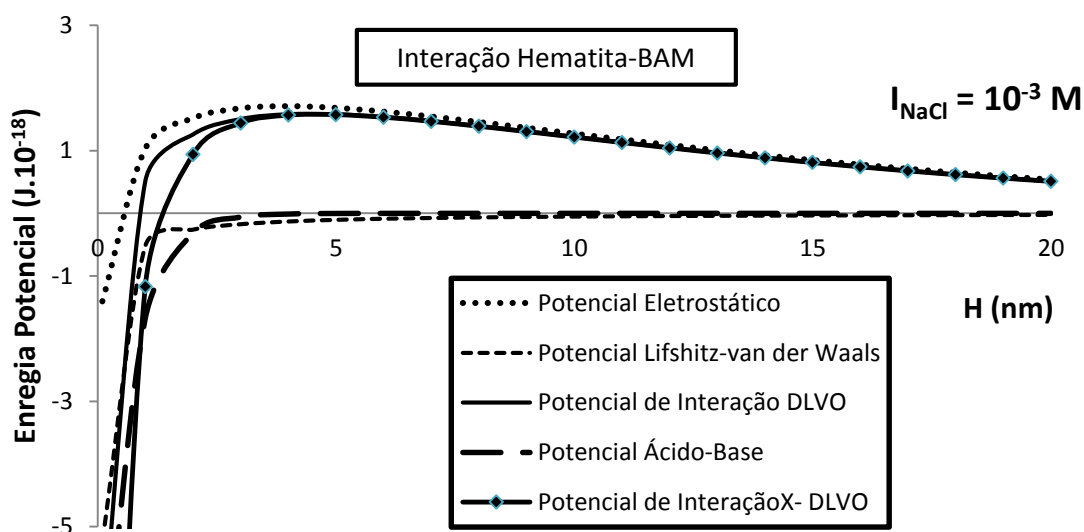


Figura 6.17 - Curva de energia em função da distância para o sistema hematita-*B. subtilis* BAM em pH 6.

As Figuras 6.16 e 6.17 apresentam as curvas de potenciais para a interação de hematita com *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, respectivamente. Observa-se que a força de adesão ocorre em distâncias próximas a 1 nm para interação com as duas cepas. Entretanto, hematita e *B. subtilis* GLI apresentou um pico primário de energia mais negativo.

As Figuras 6.18 e 6.19 apresentam as curvas para interação de quartzo com as cepas *B. subtilis* GLI e *B. subtilis* BAM, respectivamente.

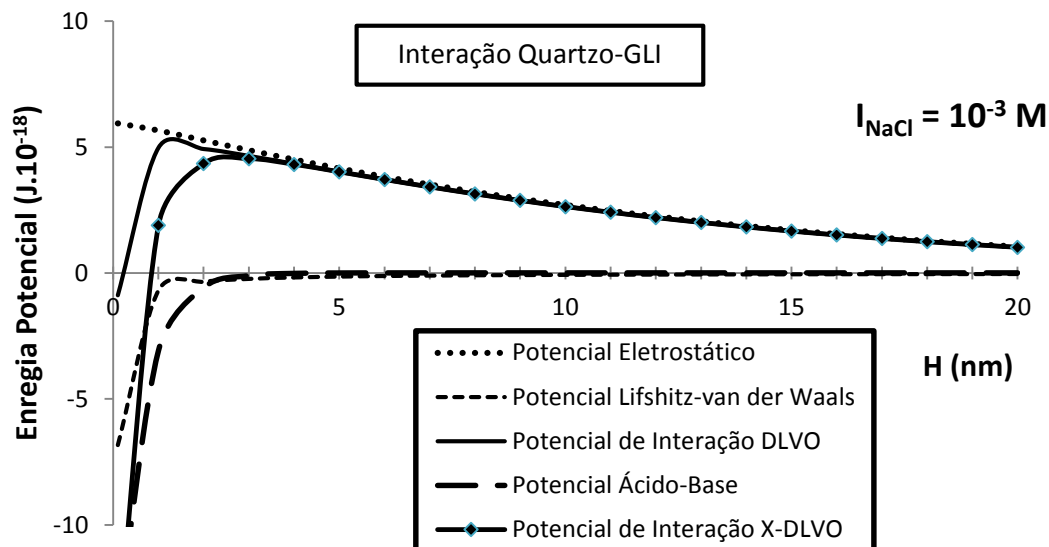


Figura 6.18 - Curva de energia em função da distância para o sistema quartzo-*B. subtilis* GLI em pH 6.

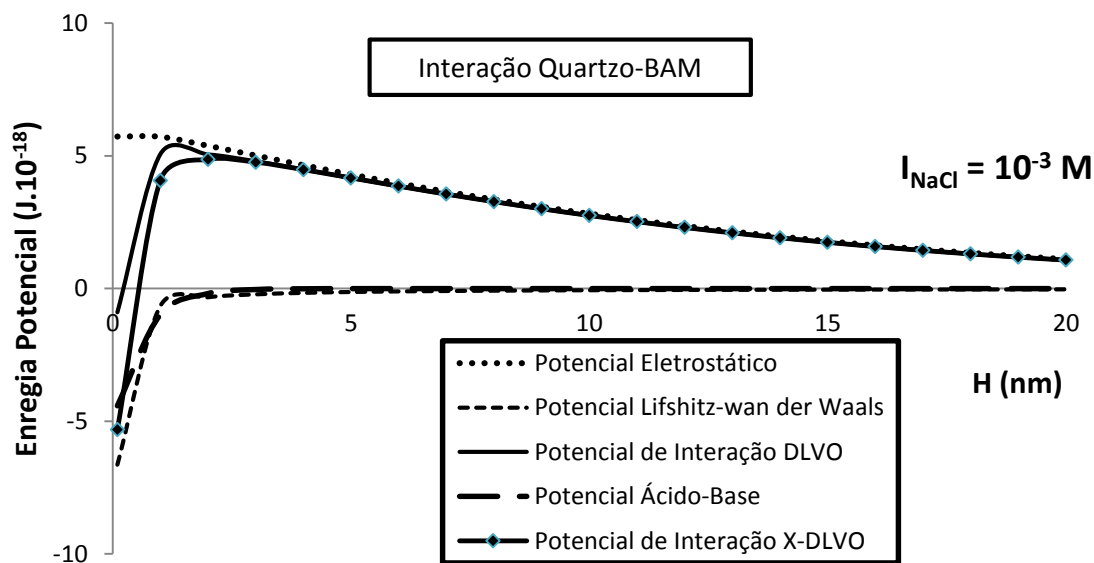


Figura 6.19 - Curva de energia em função da distância para o sistema quartzo-*B. subtilis* BAM em pH 6.

Observa-se que *B. subtilis* GLI apresenta valores de adesão ao quartzo mais significativos quando comparados com a cepa *B. subtilis* BAM. Esta exibiu valores de energia mais positivos a curtas distâncias.

A partir dos gráficos de energia X-DLVO, todos os sistemas podem ter suas partículas aderidas umas nas outras, se vencerem a barreira energética existente.

Entretanto, levando em consideração a interação dos minerais com as duas cepas de *B. subtilis*, a barreira energética que o quartzo precisa superar é mais que o dobro que a barreira da hematita. Assim, mais uma vez, os resultados teóricos explicam os resultados da flotação.

7. Conclusão

- A projeção das curvas de potencial zeta das cepas de *Bacillus subtilis* indicam ponto isoelétrico (PIE) próximo (0,5).
- Os resultados dos ensaios eletrocinéticos indicaram que o NaCl é um eletrólito indiferente para as cepas e que o efeito exercido pela variação de pH, nos valores de potencial zeta, sugere que H^+ e OH^- são íons determinadores de potencial.
- Os resultados do tamanho das células das bactérias e da forma de crescimento (em bastonete) encontrados foram coerentes com os apresentados na literatura.
- Foi identificado que a cepa *B. subtilis* GLI exibiu caráter mais hidrofóbico que *B. subtilis* BAM, em virtude do ângulo de contato encontrado para as cepas ser de 41° e 32°, respectivamente. Ou seja, a princípio, *B. subtilis* GLI possui maior potencial para tornar a superfície mineral hidrofóbica.
- A partir da análise dos espectros de infravermelho, as duas cepas de *B. subtilis*, BAM e GLI, apresentaram os mesmos grupos funcionais orgânicos.
- O valor de PIE para o quartzo ocorreu ao redor de 1,8 e para hematita ao redor de 4,0.
- As curvas de potencial zeta obtidas, após adaptação bacteriana, indicaram mudança no perfil da curva da hematita, com deslocamento em direção aos valores de potencial zeta das cepas. Tais observações indicam adesão das cepas à hematita. Entretanto, o mesmo não foi encontrado para interação de quartzo com as cepas bacterianas.
- Os ensaios de ângulo de contato, posterior à adaptação bacteriana, revelaram que tanto quartzo quanto hematita tiveram suas propriedades físico-químicas de superfície alteradas. A hematita quando adaptada à

cepa *B. subtilis* GLI obteve seu ângulo alterado de 27,4° para 46,0° e o quartzo de 13,9° para 23,2°.

- O aumento da concentração de biorreagente favoreceu a flotabilidade de hematita. Entretanto, as concentrações acima de 450 mg.L⁻¹ da cepa proporcionaram um decaimento na flotabilidade de quartzo.
- Foi observado experimentalmente que a cepa *B. subtilis* GLI, além de se comportar como coletor para hematita, também se comportou como espumante de flotação.
- Os estudos de flotabilidade isolada, na faixa de pH entre 3 e 12, e à 600 mg.L⁻¹, demonstraram a seletividade de *B. subtilis* GLI para a separação da hematita do quartzo. Foi alcançando valores próximos a 85% de flotabilidade em pH 5 e 6, à 600 mg.L⁻¹. Por outro lado, o quartzo apresentou flotabilidade próxima a 40% nestas mesmas condições.
- O experimento de flotação, para o sistema mineral 1:1 (em massa), conduzida com 600 mg.L⁻¹ de biorreagente e em pH 6, resultou em uma recuperação de 74% de hematita e de 26% de quartzo.
- A partir das componentes da energia de superfície calculadas pela equação completa de Young-Dupré, foram obtidos os valores das constantes de Hamaker efetiva para os sistemas, em meio aquoso, hematita-*B. subtilis* GLI (3,40.10⁻²⁰J), hematita- *B. subtilis* BAM (3,55.10⁻²⁰J), quartzo- *B. subtilis* GLI (4,3.10⁻²⁰J) e quartzo- *B. subtilis* BAM (4,5.10⁻²⁰J). Esses resultados indicam que há uma atração de Lifshitz-van der Waals para cada um desses sistemas.
- De acordo com a teoria termodinâmica, observa-se que os sistemas hematita- *B. subtilis* GLI (-6,97. mJ.m⁻²), hematita- *B. subtilis* BAM (-8,89 mJ.m⁻²), quartzo- *B. subtilis* GLI (-8,96. mJ.m⁻²) e quartzo- *B. subtilis* BAM (-6,44. mJ.m⁻²) apresentaram energia livre de adesão total negativa, indicando atração entre as superfícies envolvidas.
- As curvas de interação DLVO e X-DLVO entre a hematita e a cepa *B. subtilis* GLI, à uma constante iônica de 10⁻³ mol.L⁻¹, mostraram que,

embora haja uma forte influência contrária à adesão por forças eletrostáticas, as teorias preveem uma interação entre a cepa e a hematita com adesão irreversível após vencer a barreira energética do mínimo primário.

- A partir da teoria X-DLVO, observou-se que a barreira energética que precisa ser superada para haver adesão entre quartzo e *B. subtilis* GLI foi de aproximadamente 5.10^{-18}J , e para hematita com a mesma cepa foi de $1,5.10^{-18}\text{J}$. Ou seja, a barreira que o quartzo precisa vencer para que haja adesão com *B. subtilis* GLI é mais que o dobro da de hematita

8. Referências Bibliográficas

- ADAMSON, W.A. **Physical Chemistry of Surfaces**. 5.ed. United States of America: Wiley Interscience, 1990.
- ARAUJO, D.M.; YOSHIDA, M.I.; CARVALHO, C.F.; STAPELFELDT, F. Reciclagem de aminas na flotação de minério de ferro. **Revista Escola de Minas**. v.61, n.4, p.455-460, 2008.
- ASALLY, M.; KITTISOPIKUL, M.; RUÉ, P.; DU, Y.; HU, Z.; ÇAGATAY, T.; ROBINSON, A.B.; LU, H.; OJALVO, J.G.; SUEL, G.M. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, n. 46, p. 18891-18896. Nov. 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/109/46/18891.full.pdf+html>>
- ASALLY, M.; KITTISOPIKUL, M.; RUÉ, P.; DU, Y.; HU, Z.; ÇAGATAY, T.; ROBINSON, A.B.; LU, H.; OJALVO, J.G.; SUEL, G.M. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, n. 46, p. 18891-18896. Nov. 2012.
- BEILEN, J.W.A. van. **Molecular physiology of weak organic acid stress in *Bacillus subtilis***. 2013. 142f. Tese (Doutorado). Swammerdam Institute for Life Sciences. University of Amsterdam, 2013.
- BOTERO, A.E.; TOREM, M.L.; MESQUITA, L.M.S. Surface chemistry fundamentals of biosorption of *Rhodococcus opacus* and its effect in calcite and magnesite flotation. **Minerals Engineering**. v.21, issue 1, p.83-92, jan. 2008.
- BOTERO, A.E.C.; TOREM, M.L.; MESQUITA, L.M.S.de. Surface chemistry fundamentals of biosorption of *Rhodococcus opacus* and its effect in calcite and magnesite flotation. **Minerals Engineering**. v.21, issue 1, p.83-92, 2008.
- BRUYN, P.L., AGAR, G.E., 1962, Surface Chemistry of Flotation. In: Fuerstenau, D.W. (Ed.). **Froth Flotation**. Chapter 5, New York, Society of Mining Engineers.
- CASARIN, L.S.; BRANDELLI, A.; CASARIN, F.O.; SOAVE, P.A.; WANKE, C.H.; TONDO, E.C. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. **International Journal of Food Microbiology**. v.191, p.103-108, nov. 2014.
- CHANDRAPRABHA, M.N.; NATARAJAN, K.A.; MODAK, J.M. Selective separation of pyrite and chalcopyrite by biomodulation. **Colloids and Surfaces B**. v. 37, p. 93-100, jun. 2004.
- CHANDRAPRABHA, M.N.; NATARAJAN, K.A.; SOMASUNDARAN, P. Selective separation of pyrite from chalcopyrite and arsenopyrite by biomodulation using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Mineral Processing**. v.75, p. 113-122, ago. 2005.

CHANDRAPRABHA, M.N.; NATARAJAN, K.A. Surface chemical and flotation behavior of chalcopyrite and pyrite in the presence of *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Hydrometallurgy**. v.83, p. 146-152, maio 2006.

CHEN, X.; JIANG, J.; YAN, F.; TIAN, S.; LI, K. A novel low temperature vapor phase hydrolysis method for the production of nano-structured silica materials using silicon tetrachloride. **Royal Society of Chemistry**. v.4, p.8703, jan 2014.

CHERNYSHOVA, I. V.; HOCELLA, M. F.; MADDEN, A. S. Size dependent structural transformations of hematite nanoparticles. 1. Phase transition. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v.9, p1736-1750, mar 2007.

DEO, N.; NATARAJAN, K.A. Interaction of *Bacillus polymyxa* with some oxides minerals with reference to mineral beneficiation and environmental control. **Minerals Engineering**. v.10, issue 12, p. 1339-1354, 1997.

DEO, N.; NATARAJAN, K.A.; SOMASUNDARAN, P. Mechanisms of adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on hematite, corundum and quartz. **International Journal of Mineral Processing**. v.62, issue 1-4, p.27-39, maio 2001.

DIAL, M.; TARAN, E.; MAHLER, S.; NGUYEN, T.A.H.; NGUYEN, A.V. Quantifying adhesion of acidophilic bioleaching bacteria to silica and pyrite by atomic force microscopy with a bacterial probe. **Colloids and Surfaces B**. v.115, p.229-236, 2014.

DOWHAN, W.; MILEYKOVSKAYA, E.; BOGDANOV, M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1666, issues 1-2, p.19-39, nov. 2003.

DRZYMALA, J.; Hydrophobicity and collectorless flotation of inorganic materials. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.50, p.143-185, maio 1994.

DZIUBA, B.; BABUCHOWSKI, A.; NALECZ, D.; NIKLEWICZ, M. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. **International Dairy Journal**. v.17, issue 3, p.183-189, maio 2007.

EL-MIDANY, A.A.; ABDEL-KHALEK, M.A. Influence of bacteria-coal electrostatic interaction on coal cleaning. **International Journal of Mineral Processing**. v.126, p. 30-34, jan. 2014.

FARAHAT, M.; HIRAJIMA, T.; SASAKI, K.; DOI, K. Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior. **Colloids and Surfaces B**. v.74, p.140-149, 2009.

FARAHAT, M.; HIRAJIMA, T.; SASAKI, K.; DOI, K.; Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior. **Colloids and Surfaces B**. v.74, issue 1, p.140-149, nov. 2009.

FILIP, Z.; HERMANN, S.; KUBAT, J. FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Bacillus subtilis*. **Microbiological Research**. v.159, issue 3, p.257-262, set. 2004.

FOWKES, F.M. Attractive Forces as Interface. **The Interface Symposium**. v.56, n.12, dez. 1964.

FUERSTENAU, D.W. Mineral-water interface and electrical double layer. In: King, R.P. (Ed), **Principles of Flotation**. Chapter 2, South African, Johannesburg: IMM. 1982.

GADSDEN, J.A. **Infrared Spectra of Minerals and Related Inorganic Compounds**. 277f. Butterworths, 1975.

GARRETT, T.A. Research in the Garrett Lab. **Vassar College**. 2012. Disponível em: <<http://faculty.vassar.edu/tegarrett/research.html>>. Acesso em nov. 2014.

GERICKE, Y.; GOVENDER, M. Extracellular polymeric substances (EPS) from bioleaching systems and its application in bioflotation. **Mineral Engineering**. v.24, n.11, p. 1122-1127, set. 2011.

GIDDEN, J.; DENSON, J.; LAY, J.O. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**. v.283, issues 1-3, p.178-184, jun. 2009.

GIRIFALCO, L.A., GOOD, R.J. A theory for the estimation of surface and interfacial energies. I. Derivation and application to interfacial tension. **The Journal of Physical Chemistry**. v.61, p. 904-909, jul. 1957.

GOMES, M.J.P. **Gênero *Bacillus* spp.** 2013. Tópicos em Bacteriologia Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>>. Acesso em nov. 2014.

HARIMAWAN, A.; ZHONG, S.; LIM, C.T.; TING, Y.P. Adhesion of *B. subtilis* spores and vegetative cells onto stainless steel – DLVO theories and AFM spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.405, p.133-142, set. 2013.

HAYHURST, E.J.; KAILAS, L.; HOBBS, J.; FOSTER, S.J. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.105, n.38, set. 2008.

HELM, D.; LABISCHINSKI, H.; NAUMANN, D. Elaboration os a procedure for identification of bactéria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. **Journal of Microbiological Methods**. v.14, issue 2, p.127-142, nov. 1991.

HUNTER, R.J., 1981, **Zeta Potential in Colloid Science**, Chapter 6. New York, Academic Press.

ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3ª impressão. San Diego: Academic Press, 1989.

KAMP, J.A.F.O.; REDAI, I.; DEENEN, L.L.M. van. Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. v.99. n.1, p.298-303, jul. 1969.

KHAN, S.S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. **Colloids and Surfaces B**. v.87, issue 1, p.129-138, out 2011.

KUBOTAA, M.; NAKABAYASHIA, T.; MATSUMOTOA, Y.; SHIOMIA, T.; YAMADAA, Y.; INOA, K.; YAMANOKUCHIA, H.; MATSUIB, M.; TSUNODAC, T.; MIZUKAMIC, F.; SAKAGUCHI, K.; Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites. **Colloids and Surfaces B**. v.64, issue 1, p.88-97, jan 2008.

LEGODI, M.A.; WAAL, D. de. Raman spectroscopic study of ancient South African domestic clay pottery. **Spectrochimica Acta Part A**. v.66, issue 1, p.135-142, jan 2007.

LIMA, E.R.A. Cálculo de propriedades físico-químicas de sistemas coloidais via equação de poisson-boltzmann. 2008. 144f. Tese (Doutorado). Programa de Engenharia Química. COPPE/UFRJ, 2008.

LINS, F.F. 1995. **Uma Metodologia para Cálculo da Constante de Hamaker de Minerais e Aplicação da Teoria X-DLVO à Agregação e Flotação de Talco**. Tese (Doutorado). COPPE/UFRJ; Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, V.; CLARCK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. Ed. São Paulo: Prentice Hall, 2010.

MARIEY, L.; SIGNOLLE, J.P.; AMIEL, C.; TRAVERT, J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**. v.26, issue 2, p.151-159, nov. 2001.

MEHRABANIA, J.V.; NOAPARASTA, M.; MOUSAVIB, S.M.; DEHGHAND, R.; RASOOLIA, E.; HAJIZADEHE, H. Depression of pyrite in the flotation of high pyrite low-grade lead–zinc ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**. v.23, issue 1, p.10-16, jan. 2010.

MERMA, A.G.; TOREM, M.L., MORÁN, J.J.V., MONTE, M.B.M. On the fundamental aspects of apatite and quartz flotation using a Gram positive strain as a bioreagent. **Minerals Engineering**. v.48, p. 61-67, jul. 2013.

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

MESQUITA, L.M.S. de.; LINS, F.F.; TOREM, M.L. **Série Tecnologia Mineral**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2002. 35p. ISSN 0103-7382. (Biobeneficiamento mineral: potencialidades dos microrganismos como reagentes de flotação, n.81).

MONTE, M.B.M. **Propriedades de Superfície do Ouro e da Piritita e Sua Separação por Flotação**. 1998. 109f. Tese (Doutorado). Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. COPPE/UFRJ, 1998.

MONTE, M.B.M.; PERES, A.E.C. (2010) Química de Superfície na Flotação. In: Luz, A.B.L.; Sampaio, J.A.; França, S.C.A. (Eds). **Tratamento de Minérios**. 5. ed. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Centro de Tecnologia Mineral, 2010. Cap. 10, p. 399-461.

NEUMANN, A.W., GOOD, R.J., HOPE, C.J, SEIPAL, M. An Equation-of State Approach to Determine Surface Tensions of Low-energy solids from Contact Angles. **J. Journal of Colloid and Interface Science**. v.49, issue 2, p. 291-304, 1974.

NGUYEN, V.T.; CHIA, T.W.R.; TURNER, M.S.; FEGAN, N.; DYKES, G.A. Quantification of acid-base interactions based on contact angle measurement allows XDLVO predictions to attachment of *Campylobacter jejuni* but not *Salmonella*. **Journal of Microbiological Methods**. v.86, issue1, p89-96, jul. 2011.

NISHIBORI, A.; KUSAKA, J.; HARA, H.; UMEDA, M.; MATSUMOTO, K. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *bacillus subtilis* membranes. **Journal of Bacteriology**. v.187, n.6, p.2163-2174, mar. 2005.

OWENS, D.K., WENDT, R.C. Estimation of the Surface Free Energy of Polymers. **Journal of Applied Polymer Science**. v.13, issue 8, p.1741-1747, ago. 1969.

PATRA, P.; NATARAJAN, K.A. Microbially induced flotation and flocculation of pyrite and sphalerite. **Colloids and Surfaces B**.v.36,p. 91-99, maio 2004.

PATRA, P.; NATARAJAN, K.A. Microbially-induced flocculation and flotation for pyrite separation from oxide gangue minerals. **Minerals Engineering**.v.16, p. 965 – 973, jul. 2003.

PATRA, P.; NATARAJAN, K.A. Role of mineral specific bacterial proteins in selective flocculation and flotation. **Mineral Processing**.v.88, p. 53-58, jun. 2008.

PATRA, P.; NATARAJAN, K.A. Surface chemical studies on selective separation of pyrite and galena in the presence of bacterial cells and metabolic products of *Paenibacillus polymyxa*. **Journal of Colloids and Interface Science**.v.298, p. 720-729, fev. 2006.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.S. **Introdução a Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PLAZA, R.C.; ZURITA, L.; DURÁN, J.D.G.; CABALLERO, F.G.; DELGADO, A.V. Surface thermodynamics of Hematite/Yttrium Oxide Core-Shell Colloidal Particles. **Langmuir**. v.14, p.6850-6854, 1998.

POORTINGA, A.T.; BOS, R.; NORDE, W.; BUSSCHER, H.J. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. **Surface Science Reports**. v.47, p.1-32, jan. 2002.

RAO, K.H.; SUBRAMANIAN, S. Bioflotation and bioflocculation of relevance to minerals bioprocessing. In: DONATI, E.R.; SAND, W. (Eds.). **Microbial Processing of Metal Sulfides**. ed.: Springer Netherlands, 2007. cap.14. p 267-268. ISBN 978-1-4020-5589-8.

REN, M.; PHOON, C.K.L.; SCHLAME, M. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. **Progress in Lipid Research**. v.55, p.1-16, jul. 2014.

REUSCH, W. **Infrared Spectroscopy**. Disponível em <<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/InfraRed/infared.htm>>. Acesso em 25 de set de 2014.

RIJNAARTS, H.H.M.; NORDE, W.; BOUWER, E.J.; LYKLEMA, J.; ZHENDER, A.J.B. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.4, p. 191-197, 1995.

RIJNAARTS, H.H.M.; NORDE, W.; LYKLEMA, J.; ZHENDER, A.J.B. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media on different ionic strengths. **Colloids and Surfaces B**. v.14, p.179, 1999.

RUDGE, T.J.; FEDERICI, F.; STEINER, P.J.; KAN, A.; HASELOFF, J. Cell Polarity-Driven Instability Generates Self-Organized, Fractal Patterning of Cell Layers. **American Chemical Society Synthetic Biology**. n.2, p. 705–714. maio de 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/sb400030p>>

SANTHIYA, D.; SUBRAMANIAM, S.; NATARAJAN, K.T. Surface chemical studies on galena and sphalerite in the presence of *Thiobacillus thiooxidans* with reference to mineral beneficiation. **Minerals Engineering**.v.13, p. 747–763, abr. 2000.

SANTHIYA, D.; SUBRAMANIAM, S.; NATARAJAN, K.T. Surface chemical studies on galena and sphalerite using *Bacillus polymyxa* I. Microbially induced mineral separation. **Journal of Colloid Interface Science**.v.235, p. 289-297, 2001.

SANTOS, I.D.S.; OLIVEIRA, J.F. Utilization of humic acid as a depressant for hematite in the reverse flotation of iron ore. **Minerals Engineering**. v.20, p.1003-1007, 2007.

SARVAMANGALA, H.; NATARAJAN, K.A. Microbially induced flotation of alumina, sílica/calcite from haematite. **International Journal of Mineral Processing**. v.99, issue1-4, p.70-77, maio 2011.

SARVAMANGALA, H.; NATARAJAN, K.A., GIRISHA, S.T.; Microbially induced pyrite removal from galena using *Bacillus subtilis*. **International Journal of Mineral Processing**. v.120, p.15-21, 2013.

SATHYA, P.; VELRAJ, G.; MEYEL, S. Fourier transform infrared spectroscopic study of ancient brick samples from Salavankuppam Region, Tamilnadu, India. **Pelagia Research Library**. v.3, n.2, p.776-779, 2012.

SEWELL, E.W.C.; BROWN, E.D. Taking aim at wall teichoic acid synthesis: new biology and new leads for antibiotics. **The Journal of Antibiotics**. v.67, p.43-51, out. 2013.

SHARMA, P.K. **Surface Studies Relevant to Microbial Adhesion and Bioflotation of Sulphite Minerals**. 2001. 344f. Tese (Doutorado). Department of Chemical and Metallurgical Engineering. Lulea University of Technology, 2001.

SHARMA, P.K.; RAO, K.H. Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: Surface thermodynamics and extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces B**. v.29, Issue1, p.21-38, maio 2003.

SHARMA, P.K.; RAO, K.H. FORSSBERG, K.S.E.; NATARAJAN, K.A. Surface chemical characterization on *Paenibacillus polymyxa* before and after adaptation to sulfite minerals. **International Journal of Mineral Processing**. v.62, issue1-4, p.3-25, maio 2001.

SHASHIKALA, A.R.; RAICHUR, A.M. Role of interfacial phenomena in determining adsorption of *Bacillus polymyxa* onto hematite and quartz. **Colloids and Surfaces B**. v.24, p.11-20, 2002.

SILHAVY, T.J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. doi: 10.1101/cshperspect.a000414, abr. 2010.

SOHLENKAMP, C.; LAGUNAS, C.A.G.; GUAN, Z.; VINUESA, P.; ROBINSON, S.; OATES, J.T.; RAETZ, C.R.H.; GEIGER, O. The Lipid Lysyl-Phosphatidylglycerol Is Present in Membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and Confers Increased Resistance to Polymyxin B Under Acidic Growth Conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.20, p.1421-1430, nov. 2007.

TOLENTINO-BISNETO, R.; BIDOIA, E.D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. **Salusvita**. v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.

VAN OSS, C.J. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. **Colloids and Surfaces A**. v.78, p. 1-49, 1993.

VAN OSS, C.J. **Interfacial Forces in Aqueous Media**. New York: Marcel Dekker, 1994.

VAN OSS, C.J., GOOD, R.J., CHAUDHURY, M.K. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.111, p. 378-390, 1986.

VASANTHAKUMAR, B.; RAVISHANKAR, H.; SUBRAMANIAN, S. Microbially induced selective flotation of sphalerite from galena using mineral-adapted strains of *Bacillus magisterium*. **Colloids and Surfaces B**. v.112, p.279-286, dez. 2013.

VEERAMUTHU, S.K.; RAJAN, K.; KUMAR, V.P.Y. FT-IR spectroscopic analysis of archaeological pottery from Arikamedu. **Scholars Research Library**. v.4, n.5, p.29-31, 2013.

VIJAYALAKSHMI, S.P.; RAICHUR, A.M. The utility of *Bacillus subtilis* as a bioflocculant for fine coal. **Colloids and Surfaces B**. v.29, p.265-275, 2003.

VILINSKA, A. **Bacteria-Sulfide Mineral Interactions with Reference to Flotation and Flocculation**. 2007. 97f. Tese (Doutorado). Departament of Chemical Engineering and GeoSciences. Lulea University of Technology, 2007.

VOET, D., VOET, J. G., 1995, **Biochemistry**. 2 ed., New York, John Willey & sons, Inc.

WEI, X.; FRANG, L.; CAI, P.; HUANG, Q.; CHEN, H.; LIANG, W. RONG, X. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. **Environmental Pollution**. v.159, issue 5, p.1369-1374, maio 2011.

WENG, X.; MEI, G.; ZHAO, T.; ZHU, Y. Utilization of novel ester-containing quaternary ammonium surfactant as cationic collector for iron ore flotation. **Separation and Purification Technology**. v.103, p.187-194, jan. 2013.

YANG, H.; TANG, Q.; WANG, C.; ZHANG, J. Flocculation and flotation response of *Rhodococcus erythropolis* to pure minerals in hematite ores. **Minerals Engineering**. v.45, p. 67-72, fev. 2013.

YANG, H.; ZHANG, Q.; JIANG, Z. Absorbability of *Mycobacterium phlei* on hematite surface. **Journal of University of Science and Technology Beijing**. v.14, n.2, p. 103-106, 2007.

ZHENG, X.; ARPS, P.J.; SMITH, R.W.; Adsorption of *Bacillus subtilis* to minerals: effect on the flotation of dolomite and apatite. **Process Metallurgy**. v.9 p.127-136, 1999.