

4

Materiais e métodos

Neste capítulo são apresentados e descritos os materiais, reagentes, equipamentos e procedimentos empregados no estudo do processo de bioflotação do mineral hematita utilizando a cepa *Rhodococcus erythropolis*, bem como a metodologia experimental desenvolvida para o estudo em questão. Inicialmente é descrito o procedimento da preparação da amostra mineral e da obtenção do concentrado de células da bactéria. Em seguida são descritas as metodologias experimentais e condições empregadas nos estudos eletrocinéticas, adesão e finalmente microflotação em tubo de Hallimond.

4.1.

Preparação das amostras minerais

No presente trabalho utilizaram-se amostras do mineral de hematita, o mineral foi fornecido pela empresa MINERAÇÃO ZÉ DA ESTRADA INDÚSTRIA E COMERCIO LTDA de Araçuaí em Minas Gerais - Brasil.

A caracterização e composição mineralógica da amostra mineral utilizada neste trabalho foram determinadas fazendo uso da difração de raios X (DRX) e fluorescência de raios X. Também foi usado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) para obter uma imagem da estrutura das frações granulométricas de (53 - 38 μm) e a técnica espectroscopia de energia dispersiva (EDS) de uma partícula de hematita (com diâmetro em torno de 40 μm) para análises qualitativas de seus elementos.

A Figura 16, mostra o procedimento de redução da amostra mineral até o seu tamanho adequado para uso nos ensaios experimentais, sendo necessárias operações de britagem, moagem, homogeneização, classificação e logo após as amostras foram lavadas com água deionizada e separadas em sete frações

granulométricas, das quais quatro foram usadas no decorrer da pesquisa (Tabela 13).

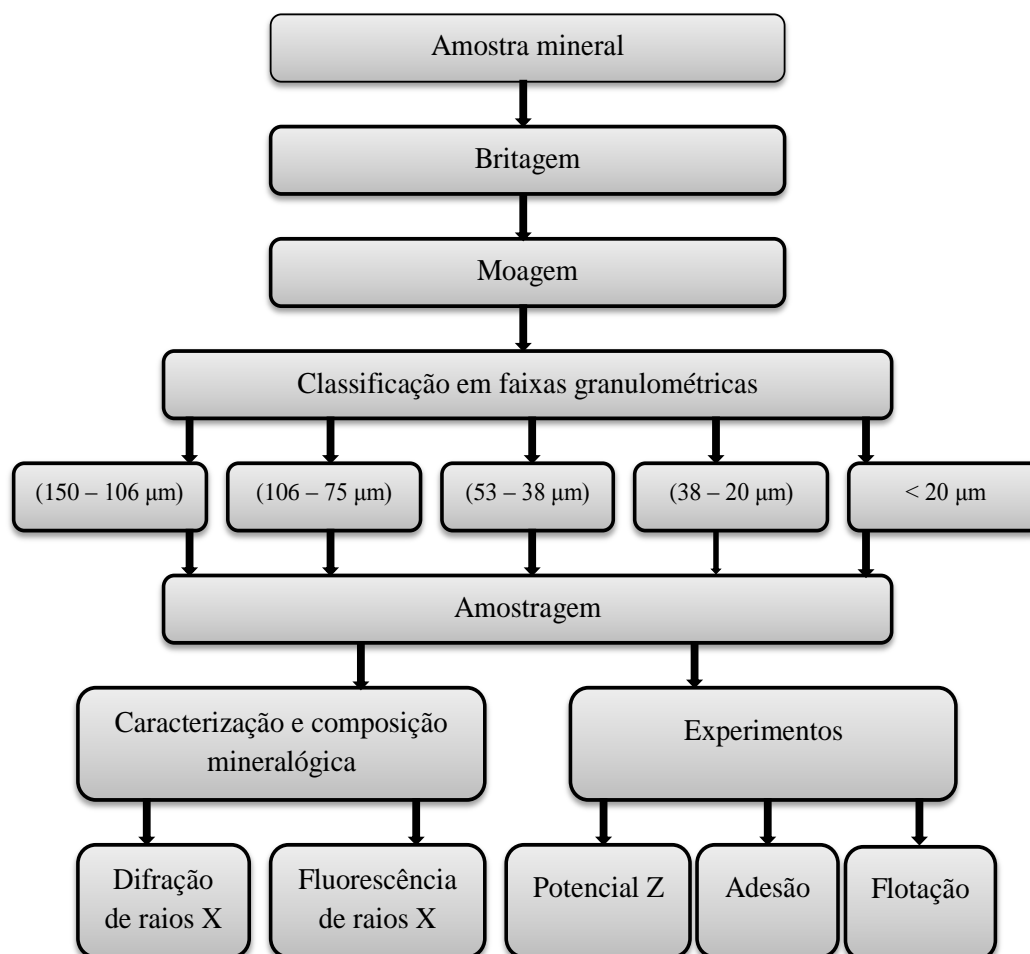


Figura 16. Esquema gráfico da preparação da amostra mineral de hematita.

Tabela 13. Ensaios e frações granulométricas

Experimento	Tamanho de Partícula
Testes de potencial Zeta	< 38 µm
Experimentos de adesão	(53 – 38 µm)
Experimentos de microflotação	(150 – 106 µm)
	(106 – 75 µm)
	(53 – 38 µm)

As amostras de hematita foram desmagnetizadas de maneira manual com um pequeno ímã e submetidas a lavagens com água deionizada várias vezes, para logo serem secadas e guardadas num dessecador até o momento de serem usados nos ensaios experimentais.

4.2.

Cultivo e crescimento da bactéria *Rhodococcus erythropolis*

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

Para o cultivo e propagação da bactéria e meio sólido, utilizaram-se placas de Petri e erlenmeyer esterilizados. Para obter essas condições de esterilização o material de vidro e soluções de meios de cultura foram autoclavados a 1,2 atm de pressão, durante 20 min. As placas de Petri com as bactérias propagadas foram estocadas na geladeira para conservação. Os meios de cultura empregados para a propagação das bactérias pode-se observar na Tabela 14 e Tabela 15.

Tabela 14. Meio de cultura YMA utilizado para o crescimento da cepa bacteriana *Rhodococcus erythropolis*.

Componente	Sólido (g/L)	Líquido (g/L)
Glicose	10	10
Peptona	5	5
Extrato de malte	3	3
Extrato de levedura	3	3
CaCO ₃	-	-
Agar	20	-
pH	-	6.6

Tabela 15. Meio de cultura TSB utilizado para o crescimento da cepa bacteriana *Rhodococcus erythropolis*.

Componente	Sólido (g/L)	Líquido (g/L)
Peptona de caseína-digestão pancreática	17	17
Peptona de farinha de soja	3	3
Cloreto de sódio	5	5
Fosfato de potássio bibásico	2.5	2.5
Glicose	2.5	2.5
Agar	20	-
pH	-	7.2

A partir das placas Petri se faz outro subcultivo em frascos Erlenmeyer de 500 mL, este procedimento foi realizado em uma capela para evitar que durante a manipulação outros microrganismos ingressem e cresçam no meio de cultivo. Depois os frascos são levados a um shaker durante 60 ou 70 horas, a uma temperatura de 28°C e 150 rpm, para atingir o crescimento máximo.



Figura 17. Colônias da bactéria *Rhodococcus erythropolis* em placa de petri.

Ao atingirem o crescimento máximo, as bactérias presentes nos frascos erlenmeyer foram centrifugadas durante 8 minutos a 4000 rpm, logo após descartando a parte líquida foi feito um concentrado com a parte sólida do

processo de centrifugação, para logo ser lavado três vezes com água deionizada nas mesmas condições de centrifugação. Este concentrado foi levado à autoclave nas mesmas condições de esterilização (1,2 atm durante 20 minutos), com a finalidade de evitar a contaminação além de tornar inativas as bactérias. Depois de atingir a temperatura ambiente o concentrado foi guardado na geladeira.



Figura 18. Crescimento bacteriano em incubadora Shaker (Cientec-CT712T)

O método do peso seco da bactéria foi utilizado para determinar a concentração celular, onde o peso seco da biomassa foi determinado após filtração em sistema Millipore a vácuo utilizando-se membrana de celulose de 0,45 μm e finalmente seco na estufa a 60°C.

4.3.

Caracterização da bactéria *Rhodococcus erythropolis*

Para determinar o comportamento e características da bactéria *Rhodococcus erythropolis* foi construída uma curva de crescimento em função do tempo sendo também realizadas análises da composição da parede bacteriana. Outras técnicas para caracterizar a bactéria como a determinação do ponto isoelétrico (PIE), e Microscopia eletrônica de varredura MEV serão descritas em procedimentos posteriores.

4.3.1.

Determinação da curva de crescimento da bactéria *Rhodococcus erythropolis*

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

Para a curva de crescimento bacteriano, foi preparado 200 mL de meio de cultura líquido num erlenmeyer, logo após de atingir as bactérias a seu crescimento máximo, determinou-se a concentração celular de um inóculo de 1 mL de solução bacteriana usando o método de peso seco, e esse inóculo foi propagado para todos os erlenmeyer contendo o mesmo volume de meio líquido. O monitoramento da curva de crescimento bacteriano foi feito tomando por duplicata 30 mL de amostra em diferentes horas até chegar às 75 horas para o meio de cultura TSB e 85 horas para o meio de cultura YMA. Cada uma das amostras foi filtrada e logo após foram levadas para a estufa a 60 °C e assim determinar seu peso seco. A concentração celular foi obtida em g/L para cada tempo de ensaio.

Este procedimento de determinar a curva de crescimento da bactéria foi feito para os ambos meios de cultura (YMA e TSB).

4.3.2.

Determinação de proteínas e carboidratos associados ao concentrado bacteriano.

A determinação da composição do material pertencente à parede celular permite estabelecer relações e comportamentos da bactéria com a superfície dos minerais, com o objetivo de garantir que o material celular medido fizesse parte da parede celular da bactéria *Rhodococcus erythropolis*.

Para as análises químicas (carboidratos e proteínas), o concentrado bacteriano obtido após do processo de centrifugação e lavagem, foi diluído com água deionizada e mantido em frascos de vidro hermeticamente fechados e, em seguida, foi levado para o laboratório de química para os seus respectivos análises.

Os carboidratos associados à parede celular foram quantificados usando o método da antrona, proposto por Yemm & Willis em 1954, usando reagente antrona como padrão e uma curva padrão de absorvância (620nm) vs açúcares solúveis totais (mg / mL). A curva padrão para carboidratos é mostrada no anexo 9.2 (Figura 56).

A dosagem de proteínas associadas à parede celular foi quantificada pelo método de biureto (Stickland, 1951), usando caseína como padrão e fazendo a curva padrão de absorvância (540 nm) vs proteínas (mg / mL). A curva padrão para proteínas é mostrada no anexo 9.2 (Figura 57).

4.4.

Comportamento do mineral hematita antes e após interação com a bactéria *Rhodococcus erythropolis*

4.4.1.

Medidas de potencial zeta

As medidas de potencial zeta para a bactéria *Rhodococcus erythropolis* assim como para o mineral hematita foi determinado num equipamento de micro eletroforese do tipo Zeta Meter System +4.0 (Figura 19). O equipamento permite determinar o valor de potencial zeta baseado da velocidade da partícula submetida a uma diferença de voltagem entre dois eletrodos.



Figura 19. Zeta-Meter +4.0.

Para avaliar o Ponto Isoelétrico (PIE) de cada uma das amostras, foram preparadas, separadamente, suspensões de *Rhodococcus erythropolis* e hematita de 50 e 70 mg / L respectivamente, em soluções de eletrólito de suporte de 0,1 M.; 0,01 M. e 0.001 M. de KCl e NaCl respectivamente. As medições do potencial foram feitas em função do pH e estes valores foram ajustados com alíquotas de NaOH e HCl. Para garantir uma medição confiável, tomou-se a média de 20 valores e o valor do desvio padrão.

Para avaliar a influência da interação das bactérias com a superfície mineral foram realizadas também medidas de potencial zeta. Em um balão volumétrico foram misturadas concentrações conhecidas de bactéria e mineral. Agitou-se a solução e se deixou em repouso durante 10 minutos. Após o repouso o sobrenadante da solução foi introduzido na célula acrílica do Zeta Meter +4.0 para realizar as medidas. Utilizou-se diferentes valores de pH e um eletrólito de suporte de NaCl 0.001M.

4.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com a finalidade de obter uma boa imagem para observar o fenômeno de adesão de células de bactéria *Rhodococcus erythropolis* na superfície do mineral, a amostra foi metalizada e logo levada para um microscópio eletrônico de varredura. A metalização consiste em um recobrimento em ouro, em um sistema a vácuo do tipo BAL-TEC, com a finalidade de possibilitar a condução da corrente elétrica em espécimes sólidos não condutivos e melhorar o contraste (Moran, 2012).

Antes de realizar a metalização com ouro da amostra de concentrado bacteriano, foi necessária uma preparação; primeiro a amostra desidratou-se ao ser mergulhado em diferentes percentagens de solução de acetona desde 15% (v/v) até 100% (v/v), para logo ser transferida para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico de CO₂.

4.4.3.

Análise no espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.

Os espectros de infravermelho foram usados para comparar os grupos funcionais presentes na superfície do mineral hematita, antes e após da interação com as células de *Rhodococcus erythropolis*.

A fração de tamanho mais fina de mineral (<20 μ m) foi utilizado para os estudos de FTIR. Foram registrados os espectros do mineral hematita, da biomassa *Rhodococcus erythropolis* e do sistema de interação hematita-*Rhodococcus erythropolis*. Para o espectro do mineral, a amostra foi lavada com água deionizada; para o espectro da biomassa, a amostra foi mergulhada em solução de acetona para desidratar; e para a interação mineral-bactéria, a amostra de mineral foi condicionada numa concentração celular de 200 mg / L durante 10 minutos, no valor de pH 6 e agitação constante. Todas as amostras foram lavadas e secas separadamente a 60 °C numa estufa durante 24 horas, e logo foram armazenadas na câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico de CO₂. O pó resultante da secagem de cada amostra foi apropriadamente misturado com uma matriz de brometo de potássio (KBr) numa relação de 1% (w/w). As medições dos espectros do mineral, da bactéria e da interação mineral-bactéria foram feitas com 32 varreduras, utilizando um espectrofotômetro FTIV Nicolet (Figura 20).



Figura 20. Espectrofotômetro Nicolet FTIV.

4.5.

Provas de adsorção.

As provas de adsorção foram realizadas para determinar o efeito da concentração bacteriana, o pH e o tempo de adsorção sobre a velocidade de adesão da bactéria *Rhodococcus erythropolis* à superfície do mineral de hematita.

Para as experiências de adesão celular, foi utilizado 0,25 g de amostra mineral de (53 – 38 μm) e água deionizada, em soluções de 35 mL, com diferentes concentrações de biomassa (50, 100, 150 e 200 mg / L) e, condicionadas durante 5 minutos depois de se ajustar o pH (2, 3, 5, 7 e 9) a 23 ° C. Para determinar o maior tempo no condicionamento (1, 2, 5, 10 e 20 min), foram preparadas soluções de 150 e 200 mg / L em pH 2. Após o condicionamento, as soluções preparadas foram deixadas em repouso até que as partículas de mineral sejam sedimentadas e logo foram feitas as medições de absorvância de UV (Espectrofotômetro Shimadatu) de cada amostra solução, foram realizadas com 3.5 mL do sobrenadante, a fim de estimar a quantidade de concentrado bacteriano aderido na superfície mineral.

Para a determinação da quantidade de gramas de concentrado bacteriano aderido na superfície mineral, foi calculado por diferencia entre as medições de absorvância da concentração de bactéria e o sobrenadante da solução mineral-bactéria. A curva de calibração das absorvâncias para diferentes concentrações de concentrado bacteriano é mostrada no anexo 9.2 (Figura 58).

4.6.

Ensaio de microflotação.

Os ensaios de microflotação foram conduzidos em tubo de Hallimond modificado. Para tal precisou-se de um rotâmetro para medir a vazão de ar, um bolhometro para calibrar o rotâmetro, um agitador magnético para manter as partículas minerais em suspensão, uma bomba de vácuo-compressor para fornecer o ar necessário e o tubo de Hallimond. A Figura 21 mostra o sistema usado neste processo.

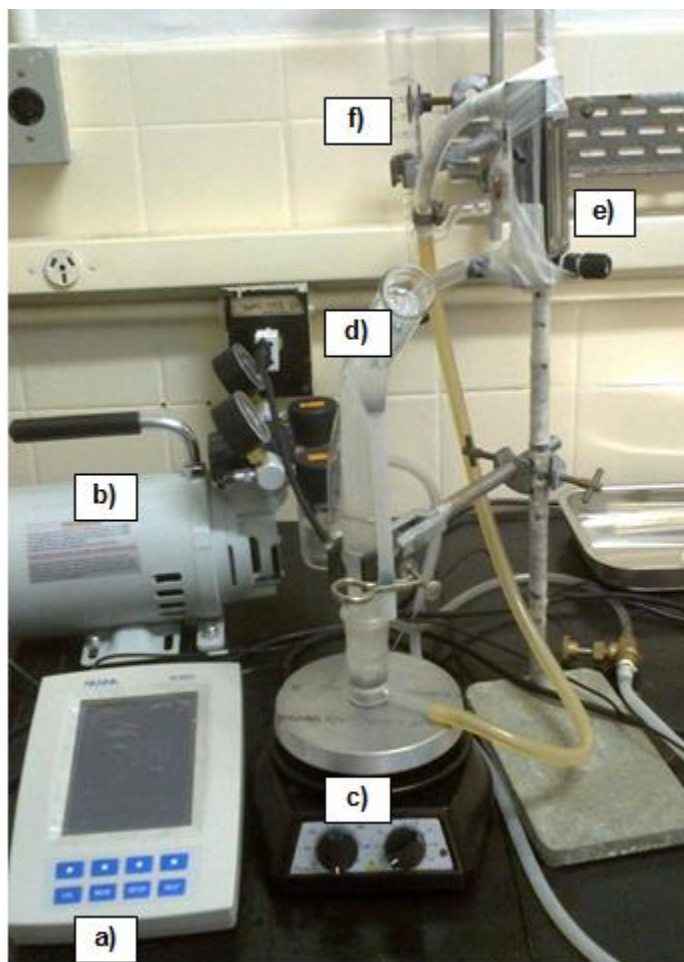


Figura 21. Sistema de microflotação em tubo de Hallimond, a) pH-metro, b) Bomba de vácuo-compressora, c) Agitador magnético, d) Tubo de Hallimond, e) Rotâmetro e f) Bolhometro.

Antes de realizar os ensaios o rotâmetro foi calibrado para garantir uma vazão de ar de $23 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A curva de calibração rotâmetro é mostrada no anexo 9.2 (Figura 59). Todos os testes de microflotação foram realizados em duplicata, utilizando água deionizada e 1 g de amostra mineral, o pH da solução (160 mL) foi ajustado com alíquotas de soluções diluídas de NaOH e HCl.

Para avaliar a flotabilidade do mineral, inicialmente foi estudada a facultade espumante apresentada pela bactéria *Rhodococcus erythropolis*, posteriormente foi estudada a flotabilidade do mineral em função do pH. Em seguida foram realizados os ensaios para determinar o comportamento da bactéria na flotabilidade do mineral, primeiro foi determinado o efeito do pH em 50 mg / L de

concentração bacteriana, logo a influência da concentração bacteriana no melhor pH de flotabilidade, e a influencia do pH para diferentes concentrações bacterianas.

O tempo de condicionamento usado para todos os testes de flotação foi de 5 min, posteriormente foi realizada a flotação do mineral com vazão de ar equivalente a 23 mL min^{-1} , durante 2 minutos. Na Tabela 16 são apresentadas as condições experimentais dos ensaios realizados.

Tabela 16. Condições empregadas na microflotação mineral.

PARAMETRO	Hematita (150 – 106 μm)	Hematita (106 – 75 μm)	Hematita (53 – 38 μm)
Vol. Solução (mL)	160	160	160
Massa Mineral (g)	1	1	1
Conc. Biomassa (mg / L)	30; 70; 110; 150; 190; 230	30; 70; 110; 150; 190; 230	30; 70; 110; 150; 190; 230
Vazão (mL.min^{-1})	23	23	23
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	23±2	23±2	23±2
pH	3; 5; 6; 7; 9; 11	3; 5; 6; 7; 9; 11	3; 5; 6; 7; 9; 11
Tempo de flotação (min)	2	2	2

Os minerais flotados e não flotados foram recolhidos separadamente, lavados e posteriormente colocados na estufa para secagem. A porcentagem de flotabilidade foi calculada como a relação de peso entre o material flotado e a massa inicial do material.

Para determinar a cinética da flotação da amostra mineral nas três faixas granulométricas usando a bactéria *Rhodococcus erythropolis* como bioreagente, foram realizados os ensaios em função do tempo. Os parâmetros utilizados nestes ensaios podem ser vistos na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros utilizados na determinação da cinética de microflotação mineral usando a bactéria *Rhodococcus erythropolis* como bioreagente.

PARAMETRO	Hematita (150 – 106 µm)	Hematita (106 – 75 µm)	Hematita (53 – 38 µm)
Vol. Solução (mL)	160	160	160
Massa Mineral (g)	1	1	1
Conc. Biomassa (mg / L)	200	200	200
Vazão (mL.min⁻¹)	23	23	23
Temperatura (°C)	23±2	23±2	23±2
pH	6	6	6
Tempo (min)	0,5; 1; 2; 3; 6; 10	0,5; 1; 2; 3; 6; 10	0,5; 1; 2; 3; 6; 10