



LISA MARINHO DO ROSÁRIO

Bioflotação de apatita: Análise comparativa entre o uso da estirpe microbiana *Rhodococcus erythropolis* e do seu biossurfactante.

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 da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Mauricio Leonardo Torem

Rio de Janeiro

Agosto de 2017



LISA MARINHO DO ROSÁRIO

**Bioflotação de apatita: Análise comparativa entre o uso da
estirpe microbiana *Rhodococcus erythropolis* e do seu
biossurfactante.**

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

Prof. Brunno Ferreira dos Santos

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC Rio

Dra. Flávia Paulucci Cianga Silvas

Instituto Tecnológico Vale

Prof. Márcio da Silveira Carvalho

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico – PUC Rio

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2017

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

Lisa Marinho do Rosário

Lisa Marinho do Rosário é bacharel em Engenharia de minas pela Universidade Federal da Bahia (2015). Em 2013 foi estagiária da Civil Pedreiras acompanhando as atividades de lavra e elaborando cróquis de plano de fogo. Em 2014 lecionou no curso técnico de mineração Santa Edwiges. De 2014 a 2015, foi selecionada para estágio na Vale Fertilizantes no setor de processos minerais. De 2015 a 2017, se juntou ao grupo de pesquisa de Flotação Mineral e Biotecnologia-PUC.

Ficha Catalográfica

Rosário, Lisa Marinho do

Bioflotação de apatita : Análise comparativa entre o uso da estirpe microbiana *Rhodococcus erythropolis* e do seu biossurfactante / Lisa Marinho do Rosário ; orientador: Mauricio Leonardo Torem. – 2017.

120 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química e de Materiais, 2017.

Inclui bibliografia

1. Engenharia de Materiais – Teses. 2. Engenharia Química – Teses. 3. Flotação. 4. Biossurfactantes. 5. Apatita. I. Torem, Mauricio Leonardo. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Engenharia Química e de Materiais. III. Título.

CDD: 620.11

Agradecimentos

Sou grata a Deus por tudo que me proporciona.

À minha família:

- Minha mãe, Maria Angélica Marinho do Rosário,
- Meu pai, Marcos Alves do Rosário,
- Meus irmãos, Elis M. do Rosário e Marcos A. do Rosário Filho, e
- Meu noivo, Vinícius de Jesus Sacramento,

Agradeço pela compreensão, amor e apoio para mais esta conquista.

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

Aos professores do departamento de Engenharia Química e de Materiais da Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro – PUC-Rio pela oportunidade de estar no programa e, em especial, ao professor Doutor e orientador Mauricio Leonardo Torem pelo apoio, carinho, incentivo e confiança no trabalho desenvolvido.

Ao professor Dr. Bojan Marinkovic pela análise de difração de raios-x, à professora Dra. Maria Isabel Pais da Silva pela realização da análise de fluorescência de raios-x, e ao companheiro de laboratório Ronald Hacha e ao laboratório de tecnologia mineral do CETEM pelas micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV); a estes agradeço pelo auxílio na realização de análises fundamentais para este trabalho.

Ao Instituto Tecnológico Vale (ITV) por me selecionarem e terem incentivado e investido no trabalho.

A toda equipe do laboratório de caracterização e biotecnologia mineral, em especial aos amigos Thiago da Silva Ribeiro e Vinicius Towesend de Jesus, companheiros

desde o início desta jornada me apoiando com carinho, competência, amor, paciência, verdade e gentileza.

Sem todos esses não seria possível a realização deste trabalho.

Resumo

Rosário, Lisa Marinho do; Torem, Maurício Leonardo. **Bioflotação de apatita: Análise comparativa entre o uso da estirpe microbiana *Rhodococcus erythropolis* e do seu biossurfactante.** Rio de Janeiro, 2017. 120 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O principal método de beneficiamento da rocha fosfática para concentração da apatita é a flotação. A flotação da apatita com baixo teor costuma utilizar surfactantes sintéticos, que apesar de caros apresentam boa seletividade. A fim de reduzir custo sem perder eficiência, surgiram pesquisas com o intuito de substituir estes surfactantes convencionais por biossurfactantes. Esta rota de bioprocessamento mineral revela-se atrativa sob o aspecto comercial, visto que além de apresentar baixo custo é ambientalmente aceitável, pois ao utilizar microrganismos não patogênicos cria-se uma nova classe de reagentes biodegradáveis, modificando o cenário da flotação convencional. Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso da estirpe bacteriana *Rhodococcus erythropolis* e do biossurfactante extraído desta na bioflotação da apatita. Foram realizados ensaios de bioflotação utilizando tubo de *Hallimond*, na faixa de pH entre 3 e 11, faixa granulométrica da apatita entre 75 e 106µm, com solução de 10⁻³M de NaCl, diferentes concentrações dos biorreagentes e tempo de flotação igual a 2, 5 e 7 minutos. O biossurfactante apresentou melhor desempenho, quando comparado com a biomassa. Em todos os casos, observou-se um incremento da flotabilidade em valores de pH menor que 7, no entanto, a maior flotabilidade apresentou-se em pH igual a 4 com a utilização de 140 mg/L de biossurfactante.

Palavras-chave

Flotação; biossurfactantes; apatita.

Abstract

Rosário, Lisa Marinho do; Torem, Maurício Leonardo (Advisor). **Bioflotation of Apatite: Comparative analysis between *Rhodococcus erythropolis* strain and its biosurfactant.** Rio de Janeiro, 2017. 120 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The main method of processing phosphate rock, for apatite concentration, is flotation. The flotation of apatite with low content usually uses synthetic surfactants, which are expensive, but present good selectivity. In order to reduce costs without losing efficiency, research has emerged with the purpose of replacing these conventional surfactants by biosurfactants. This mineral bioprocessing route is attractive in the commercial aspect, since low cost and environmentally friendly, when using non-pathogenic microorganisms, creating a new class of biodegradable reagents and modifying the conventional flotation scenario. This work aims to evaluate the use of bacterial strain *Rhodococcus erythropolis* and the biosurfactant extracted from in apatite bioflotation. Bioflotation tests were performed using a *Hallimond* tube in the pH range of 3 to 11, apatite granulometric range between 75 and 106 μ m in a solution of 10⁻³M NaCl, different concentrations of the bioreagents and flotation time equal to 2, 5 and 7 minutes. The biosurfactant presented better performance, recovering more apatite than the biomass. In all cases an increase in flotability was observed at pH bigger than 7, however, the highest flotability was at pH to be 4 with 140 mg/L of biosurfactant.

Keywords

Flotation; biosurfactants; apatite.

Sumário

1 Introdução	15
2 Revisão do estado da arte	18
2.1. Fósforo	18
2.2. Rocha fosfática	19
2.3. Minerais de apatita	24
2.4. Flotação mineral com ênfase na apatita	25
2.5. Bioflotação: uso de microrganismos e biossurfactantes no processo de flotação mineral	27
2.6. Biossurfactantes	35
2.7. Rhodococcus erythropolis	43
2.8. Dupla Camada elétrica no estudo da flotação mineral	47
Potencial Zeta (ζ) no estudo da flotação mineral	50
3 Objetivos e relevâncias do trabalho	54
3.1. Objetivo geral	54
3.2. Objetivos específicos	54
3.3. Relevância do trabalho	55
4 Materiais e métodos	56
4.1. Amostras minerais	56
4.2. Preparação do concentrado bacteriano e condições de cultivo	57
4.3. Produção do biossurfactante	58
4.4. Ensaios de espectrofotometria de infravermelho	60
4.5. Estudo de Potencial Zeta	60
4.6. Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação apatita-bactéria	61

4.7. Ensaio de bioadesão bacteriana	62
4.8. Ensaio de Microflotação	62
5 Resultados e discussões	66
5.1. Preparação e caracterização da apatita	66
5.2. Produção de concentrado bacteriano e biossurfactante	69
5.3. Análises de espectrofotometria de infravermelho	71
5.3.1. Análises de espectrofotometria de infravermelho da bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> e do biossurfactante	71
5.3.2. Análises de espectrofotometria de infravermelho do mineral apatita antes e depois da interação com os biorreagentes	73
5.4. Estudo de potencial Zeta das amostras	76
5.4.1. Medidas de potencial zeta da bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i>	76
5.4.2. Medidas de potencial zeta da apatita antes e depois do contato com a bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> e com o biossurfactante	78
5.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação apatita-bactéria	81
5.6. Comportamento da bactéria <i>R. erythropolis</i> como bioespumante	83
5.7. Microflotação da apatita usando a bactéria e o biossurfactante como biorreagente	85
5.8. Ensaio de bioadesão da bactéria	95
5.9. Influência do tempo na flotação	98
6 Conclusões	105
7 Recomendações para futuros trabalhos	108
8 Referências bibliográficas	110
Apêndices	120

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita	25
Figura 2 - Estruturas químicas de biossurfactantes produzidos por: (a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (b) <i>Rhodococcus erythropolis</i> (c) <i>Candida bombicola</i> (d) <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> e (e) <i>Bacillus subtilis</i>	40
Figura 3 - Curvas de potencial zeta para <i>Rhodococcus erythropolis</i> , hematita, quartzo, apatita e caulim.....	44
Figura 4 - Curvas de potencial zeta de hematita, quartzo, apatita, caulim após da interação com <i>Rhodococcus erythropolis</i>	45
Figura 5 - Organização do envelope celular da <i>Rhodococcus</i> : representação esquemática de um modelo proposto.....	46
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica de acordo com a teoria de Stern	50
Figura 7 – Fluxograma do processo de cominuição, frações granulométricas e caracterização mineral	56
Figura 8 - Fluxograma de extração do biossurfactante	59
Figura 9 - Sistema utilizado para realização da microflotação	64
Figura 10 - Análise qualitativa da amostra (DRX)	68
Figura 11 – Amostras de biossurfactante (esquerda) e do concentrado bacteriano (direita)	70
Figura 12 – Espectrograma de Infravermelho da bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> e principais bandas de absorbância.....	73
Figura 13 - Espectrograma de Infravermelho do biossurfactante e principais bandas de absorbância	73
Figura 14 - Espectrograma de Infravermelho do mineral apatita e principais bandas de absorbância	75
Figura 15 - Espectrograma de Infravermelho do mineral apatita antes (em vermelho) e depois da interação com a bactéria (em azul) e principais bandas de absorbância. (em roxo: perfil da bactéria <i>R. erythropolis</i>).....	75

Figura 16 - Espectrograma de Infravermelho do mineral apatita antes (em vermelho) e depois da interação com o biossurfactante (em roxo) e principais bandas de absorbância. (em azul: perfil do biossurfactante).....	75
Figura 17 - Potencial zeta da bactéria <i>R. erythropolis</i> em função do pH em diferentes concentrações do eletrólito suporte	77
Figura 18 - Potencial zeta do mineral apatita antes e depois da interação com a bactéria <i>R. erythropolis</i> (eletrólito, NaCl : 10^{-4} mol/L).	80
Figura 19 - Potencial zeta do mineral apatita com as células da bactéria <i>R. erythropolis</i> e com biossurfactante em comparação com o comportamento da bactéria. (eletrólito, NaCl : 10^{-4} mol/L)	81
Figura 20- Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação apatita com células da bactéria <i>R. erythropolis</i>	82
Figura 21 - Espuma gerada pela bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> em diferentes valores de pH. a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7, d) pH 9, e) pH 11, Concentração bactéria, 125 mg/L.	85
Figura 22. Flotabilidade da apatita em função da concentração da biomassa.....	87
Figura 23 - Flotabilidade da apatita em função da concentração do biossurfactante.....	87
Figura 24 - Flotabilidade da apatita com biossurfactante em função do pH.....	89
Figura 25 - Flotabilidade da apatita com bactéria em função do pH	89
Figura 26 - a) Superfície de resposta 3D da flotabilidade de apatita em função do pH e concentração da bactéria. b) Gráfico de contorno 3D da flotabilidade da apatita.....	91
Figura 27 - a) Superfície de resposta 3D da flotabilidade de apatita em função do pH e concentração do biossurfactante. b) Gráfico de contorno 3D da flotabilidade da apatita	93
Figura 28 - Flotabilidade da apatita em função da concentração da bactéria	94
Figura 29 - Flotabilidade da apatita em função da concentração do biossurfactante	95
Figura 30 - Influência do pH na adsorção da bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> sobre a superfície da apatita.....	97

Figura 31 - Flotabilidade da apatita em função da concentração da bactéria (teste de flotação em pH igual a 2)	98
Figura 32 - Flotabilidade da apatita com bactéria em função da concentração.....	100
Figura 33 - Flotabilidade da apatita com biossurfactante em função da concentração.....	100
Figura 34 - Comparativo global de flotabilidade	101

Lista de tabelas

Tabela 2-1 - Reservas e produção mundial de rocha fosfática (USGS, 2017).	21
Tabela 2-2 – Bactérias usadas no beneficiamento mineral. Adaptado de (MERMA, 2012; OLIVERA, 2015)	32
Tabela 2-3. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos. Adaptado de NITSCHKE & PASTORE (2002) apud (BUENO, 2008)	39
Tabela 2-4. Tensão superficial e concentração micelar crítica dos biossurfactantes e dos surfactantes sintéticos. (BUENO, 2008)	42
Tabela 2-5. Toxicidade dos biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos (BUENO, 2008)	42
Tabela 4-1. Resumo do experimento fatorial.....	63
Tabela 5-1. Análise química da amostra mineral (Fluorescência de raios-x)	67
Tabela 5-2 - <i>Coeficientes da regressão polinomial da flotação da apatita com a bactéria</i>	92
Tabela 5-3 <i>Coeficientes da regressão polinomial da flotação da apatita com biossurfactante</i>	93

Lista de símbolos

DCE - Dupla Camada Elétrica (DCE)

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral

DRX - Difração de Raios-X

EBP - *Extracellular bacterial proteins*, em português, proteínas bacterianas extracelulares

EPS - Substâncias poliméricas extracelulares

ETR - Elementos de terras-raras

EUA – Estados Unidos da América

MEOR - *microbial enhanced oil recover*, em português seria “recuperação avançada de óleo utilizando microrganismos”

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

P₂O₅ - pentóxido de fósforo (Expressa a percentagem de fosfato)

PCZ – ponto de carga zero

PIE – ponto isoelétrico

ROM – *run of mine*, em português seria o mineral extraído direto da mina sem passar por nenhum processo de caracterização ou beneficiamento

SGC - Dupla Camada de Stern-Gouy-Chapman

USGS – *United States Geological Survey* (serviço geológico dos Estados Unidos)

UV – Ultravioleta

1

Introdução

Com a crescente demanda por minerais e o esgotamento de depósitos com altos teores, a pesquisa mineral está cada vez mais focada no beneficiamento de minérios de baixa qualidade e alta complexidade para atender a um mercado global a custos competitivos. Dentre estes minérios com mineralogia complexa encontram-se as rochas fosfáticas, comumente ricas em apatita, que em quantidade e concentração suficientes, formam depósitos de valor econômico e podem então ser utilizadas, após beneficiamento, na manufatura de produtos comerciais, sendo sua principal aplicação na agricultura, como fertilizante.

O principal método de beneficiamento para concentração da apatita é a flotação. A flotação da apatita com baixo teor costuma utilizar coletores (surfactantes) sintéticos, que são mais caros, porém apresentam melhor seletividade. Objetivando conseguir redução de custo sem perder a eficiência, surgiram pesquisas com o intuito de substituir estes surfactantes convencionais por biorreagentes.

Além das considerações econômicas e de recursos, o foco da indústria em cumprir a estrita legislação ambiental, reduzindo impactos ambientais da lavra e do beneficiamento na mineração, foi crucial para incentivar a realização de inúmeras pesquisas em tecnologias ambientalmente amigáveis. Emergindo assim, a bioflotação, tecnologia na qual os microrganismos, ou os subprodutos metabólicos destes, podem ser utilizados como reagentes de flotação, denominados biorreagentes, sendo coletores, depressores, ativadores ou outros modificadores de superfície, que permitem a separação seletiva de minerais, com, em alguns casos, maior eficiência e menor toxicidade.

A rota biotecnológica de processamento mineral apresenta-se

atrativa sob o aspecto comercial, visto que oferece baixo custo e ambientalmente aceita, quando microrganismos não patogênicos são utilizados. Os bioreagentes são capazes de substituir, total ou parcialmente, certos reagentes convencionais de flotação em operações de processamento mineral, permitindo separações seletivas de minerais através de alterações na química de suas superfícies.

A presença de grupos funcionais apolares (cadeias hidrocarbônicas) e grupos polares (carboxilas, fosfatos, hidroxilas) na superfície celular microbiana (parede celular, capsulas, envoltórios), conferem a alguns microrganismos características similares às de moléculas de surfactantes. Diversos microrganismos são capazes de produzir biosurfactantes, compostos anfifílicos que atuam na interface das emulsões, contendo partes hidrofóbicas e hidrofílicas e que, em termos de tensão superficial, estabilidade à temperatura e pH, são comparáveis, ou superiores, aos surfactantes sintéticos. Estes biosurfactantes são produzidos por diferentes estipes de microrganismos vivos, como bactérias, leveduras e fungos, como é o caso da bactéria *Rhodococcus erythropolis*, capaz de sintetizar compostos com propriedades surfactantes como subprodutos metabólicos.

É essencial compreender os mecanismos e as consequências resultantes de interações entre microrganismos e minerais antes que seja estabelecida a utilidade do microrganismo no processamento mineral. Deve-se entender a relação hidrofobicidade / hidrofiliabilidade da superfície de minerais e, a adsorção e adesão das células bacterianas e produtos metabólicos sobre superfícies minerais. Além disso, os problemas que devem ser resolvidos antes que tais microrganismos ou produtos deles sejam utilizados em operações comerciais, incluem a cultura dos organismos com baixo custo e redução de doses requeridas para realização das inúmeras etapas de flotação realizadas industrialmente.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso de biorreagentes produzidos a partir da estirpe bacteriana *Rhodococcus erythropolis*,

analisando o seu desempenho, como agentes coletores e/ou espumantes, na bioflotação da apatita.

2

Revisão do estado da arte

2.1.

Fósforo

O fósforo ('P') é considerado um dos três macronutrientes principais para os seres vivos, pois, juntamente com o nitrogênio e o potássio, é fundamental no processo de conversão da energia solar em alimento, fibra e óleo pelas plantas, desempenha função chave na fotossíntese, no metabolismo de açúcares, no armazenamento e transferência de energia, na divisão celular, no alargamento das células e na transferência da informação genética (POTAFOS, 2005). O ciclo de suprimento do fósforo é indispensável à vida porque entra na composição do núcleo das células de todos os seres vivos, iniciando-se nos fosfatos naturais, passa para o solo por solubilização e após ser absorvido pelas plantas, entra na vida animal pela alimentação dos herbívoros e onívoros, havendo, porém, forte decaimento no seu retorno normal ao solo. Se a vegetação, natural ou de cultura, for constantemente removida (plantio - colheitas), é necessário compensar a perda de fósforo pelo emprego de fertilizantes (LUZ & LINS, 2008).

É predominantemente encontrado nas rochas fosfáticas, e se dissolve com a água da chuva, sendo levado até os rios e mares. A rocha fosfática é composta por minerais ricos em fósforo denominados fosfatos. São rochas naturais que se formam em ambientes geológicos variados, sendo de origem sedimentar ou ígnea (ROSÁRIO, 2015; LUZ & LINS, 2008).

Existe mais de um tipo de fosfato, sendo os mais comuns os fosfatos de cálcio do grupo da apatita, que, quando em quantidade e concentração suficientes, formam depósitos com valor econômico. Estes minérios podem ser utilizados diretamente, ou após beneficiamento, na

manufatura de produtos comerciais. Da mina (rochas fosfatadas) até aos produtos industriais (ácido fosfórico e seus derivados) e aos campos de cultivo (fertilizantes), o fósforo segue vários caminhos em função da tipologia do minério, da distribuição geográfica das jazidas e centros de consumo, das substâncias fabricadas, das características do parque industrial e da recuperação de subprodutos com valor comercial a que se associa e redução/eliminação de agentes causadores de impactos ambientais, nomeadamente metais pesados e elementos radioativos (LUZ, SAMPAIO, & FRANÇA, 2010).

O ritmo de produção necessário para suprir a alimentação vital da população, que aumenta explosivamente, passou a exigir o crescente emprego do fósforo na agricultura. A carência de fertilizantes fosfatados nos terrenos de cultura traduz-se em atraso de crescimento e lãguído desenvolvimento das plantas, resultando em baixos rendimentos (LAPIDO-LOUREIRO & NASCIMENTO, 2003).

Porém, infelizmente, o fósforo, como muitos outros recursos importantes – água, petróleo e energia- é limitado. Não há substituto para o fósforo e seus estoques estão em declínio. A comunidade internacional, enfrentando tantos problemas insidiosos, fez esse detalhe parecer trivial; No entanto, a diminuição de fósforo é de fato importante para a segurança nacional, pois sendo uma das substâncias essenciais para a produção global de alimentos, torna-se crucial para o crescimento populacional sustentável (SIM, 2016), forçando as mineradoras e diversas outras indústrias a pesquisarem, cada vez mais, novas tecnologias para obtenção, concentração e reaproveitamento deste.

2.2. Rocha fosfática

O principal uso (68%) da rocha fosfática no Brasil é na indústria de fertilizantes, mas apresenta também um conjunto grande de outras aplicações, como na alimentação animal e nas indústrias químicas (MME,

2009). O produto do beneficiamento da rocha que é comercializável refere-se a uma mistura de fosfato com conteúdo de pentóxido de fósforo (P_2O_5) adequado para produção de ácido fosfórico ou de fósforo elementar (DNPM, 2015; USGS, 2017).

Trata-se de um recurso mineral bem distribuído no globo terrestre e sem perspectivas de exaustão das jazidas, porém é importante destacar que, considerando as atuais tecnologias disponíveis, apesar de abundante no globo terrestre, nem todo fosfato permite a extração, concentração e posterior comercialização do fósforo, apenas os fosfatos primários de apatita são fontes reais de fósforo (ROSÁRIO, 2015; LAPIDO-LOUREIRO & NASCIMENTO, 2003).

Atualmente, o principal país beneficiador de rocha fosfática é os Estados Unidos da América. Outros projetos importantes de lavra e beneficiamento devem começar até 2020 na Argélia, Brasil, Egito, Jordânia, Cazaquistão, Peru, Rússia e Senegal. O crescimento contínuo da população exigirá uma oferta crescente desta rocha para produzir fertilizantes para culturas, suplementos alimentares para animais e aplicações industriais. O consumo mundial de P_2O_5 contido em todos os usos deve aumentar, gradualmente, para mais 48,9 milhões de toneladas até 2020. Em 2016 este consumo foi de 44,5 milhões de toneladas (USGS, 2017).

Os últimos dados disponibilizados pelo Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) indicam que a produção de rocha fosfática em 2014 foi inferior à de 2013, devido, principalmente, à exaustão da mina do Barreiro, em Araxá (MG) (DNPM, 2015), entrando em seu lugar a mina F4 constituída por minério de menor economicidade e maior complexidade. Os dados atuais, dos anos de 2015 e de 2016, foram obtidos através do *U.S. Geological Survey* (Tabela 2-1).

Tabela 2-1 - Reservas e produção mundial de rocha fosfática (USGS, 2017).

Discriminação	Reservas (10 ³ t P ₂ O ₅)	Produção (10 ³ t)	
Países	2016 ^a	2015	2016
Brasil ⁽¹⁾	320.000	6.100	6.500
China	3.100.000	120.000	138.000
Marrocos (inclui Saara Ocidental)	50.000.000	29.000	30.000
EUA	1.100.000	27.400	27.800
Rússia	1.300.000	11.600	11.600
Jordânia	1.200.000	8.340	8.300
Egito	1.200.000	5.500	5.500
Tunísia	100.000	2.800	3.500
Israel	130.000	3.540	3.500
Arábia Saudita	680.000	4.000	4.000
Peru	820.000	3.880	4.000
Outros países	8.050.000	18.840	18.300
TOTAL	68.000.000	241.000	261.000

(1) Nutrientes em P₂O₅.

As principais mineradoras de fosfato brasileiras estão localizadas: no Estado de Minas Gerais, nos municípios de Tapira (que abriga a maior mina do país) e Araxá (mina do Barreiro e mina F4), sendo essas três minas operadas pela Vale; no Estado de Goiás, nos municípios de Catalão e Ouidor, as empresas Vale e Anglo American operam duas minas. Somadas, as cinco minas de MG e GO citadas, foram responsáveis, em 2014, por 82% da produção nacional (DNPM, 2015). Dessa forma, a Vale foi responsável por 71% da produção nacional em 2014, a Anglo American por 21%, sendo a produção restante completada por Galvani, Socal, Mbac e Fosfatar. Todas essas operações movimentaram 40 Mt de minério ROM com cerca de 10% de P₂O₅, que, após beneficiadas em usinas das próprias empresas extratoras resultaram em 6,5 Mt com teor de 35% de P₂O₅ (DNPM, 2015; USGS, 2017).

O Brasil é o 4º maior consumidor mundial, sendo que, em termos regionais, o leste da Ásia consome cerca de 40% de toda rocha fosfática produzida, tendo este bloco apresentado uma taxa média de crescimento

de 8% ao ano, nos últimos cinco anos. O consumo de fertilizantes no Brasil tem crescido mais do que a produção agrícola nas últimas décadas como resultado tanto da intensificação do processo produtivo no campo, quanto, mais recentemente, do aumento da produção de biocombustíveis (USGS, 2017).

As rochas fosfáticas podem ser de origem ígnea ou sedimentar, sendo que cerca de 85% da produção mundial vem de rochas sedimentares. Rochas de origem sedimentar apresentam maior facilidade de lavra e beneficiamento que as rochas de origem ígnea. Essas rochas possuem, em geral, carbonatos na rede apatítica, reagindo rapidamente com o ácido mineral no processo de produção de ácido fosfórico e o CO_2 liberado ajuda no rompimento da rede cristalina, formando grãos pequenos mais reativos (a solubilização é muito rápida). Já as rochas ígneas, praticamente, não têm carbonatos na rede, e com isso a dissolução é mais lenta. As rochas fosfáticas brasileiras são, essencialmente, de origem ígnea e apresentam baixos teores de P_2O_5 e elevados teores de contaminantes (SOUZA, 2012).

Devido a estas peculiaridades, o beneficiamento da rocha fosfática nacional exigiu a definição de esquemas de reagentes específicos, visto que os adotados inicialmente em todas as empresas considerava o uso de tall oil como coletor de apatita e amido de milho convencional como depressor de minerais de ganga. O amido é o principal reagente utilizado na indústria mineral brasileira e é empregado na flotação de fosfatos (LUZ, SAMPAIO, & FRANÇA, 2010).

Os minérios brasileiros de fosfato têm como mineral a apatita e como minerais de ganga, calcita, magnetita, micas e argilas. O circuito de beneficiamento deve, portanto prever a moagem até a malha de liberação (geralmente em torno de 65 malhas Tyler), a eliminação da magnetita por separação magnética e a flotação da apatita. A presença de lamas afeta significativamente a recuperação do fosfato (expressa em termos de % P_2O_5); por isso os circuitos de usinas brasileiras têm operações de

deslamagem mais ou menos complexas (LUZ & ALMEIDA, 1989; SCHNELRATH *et al.*, 2001).

A produção brasileira de rocha fosfática está concentrada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, próxima aos principais mercados consumidores. Novas minas e projetos estão em estudo ou início de produção nas regiões Nordeste e Sul, porém não se prevê a descentralização da oferta, pois estas jazidas não são de grande envergadura. O parque produtivo compõe-se de onze minas e nove usinas, com capacidades de produção predominantemente de portes grande e médio (BARROS, LEAL FILHO e PERES, 2001; DNPM, 2015; LAPIDO-LOUREIRO & NASCIMENTO, 2003; USGS, 2017).

A Vale possui diversas áreas nos municípios de Serra do Salitre e Patrocínio (MG) já aprovadas pelo conselho de administração para o início da produção. O Projeto Salitre, por exemplo, constitui uma das maiores reservas do Brasil. A Galvani possui dois projetos em andamento. Em Minas Gerais, nos municípios de Serra do Salitre e Patrocínio, foi concedida pelo DNPM, no 2º semestre de 2014, a concessão de lavra, que autorizou o início da extração. O outro projeto é no Estado do Ceará, município de Santa Quitéria, cujo beneficiamento do minério é de maior complexidade, pela presença de urânio, exigindo um consórcio com a Indústrias Nucleares do Brasil (INB). O início da lavra está previsto para o primeiro semestre de 2018. Em escala mundial, foram anunciados projetos que, se implementados, acrescentarão, no médio prazo, 57,4 milhões de toneladas à capacidade mundial de rocha fosfática, um aumento de 35% (SILVEIRA, 2014; DNPM, 2015; MME, 2009). A expectativa é que novos processos de beneficiamento mostrem que a pilha de rejeitos de hoje é a reserva de amanhã, (MEW, 2015).

2.3.

Minerais de apatita

Dentre os mais de 370 minerais com teores de fósforo acima de 10%, apenas 96 apresentam valores superiores aos da apatita (em média, 18,43 % de P_2O_5) (LUZ, SAMPAIO, & FRANÇA, 2010). Porém, deve ser acentuado que a grande maioria tem apenas significado científico-mineralógico e que só os da série da apatita, com fosfatos primários, constituem minerais de minério. As variedades mais comuns existentes no Brasil, logo de origem ígnea, são:

- Fluorapatita $[Ca_5(PO_4,CO_3,OH)_3.(F,OH)]$,
- Hidroxiapatita (Figura 1) $[Ca_5(PO_4)_3.(OH,F)]$ e, mais raramente,
- Clorapatita $[Ca_5(PO_4)_3.(Cl,OH)]$.

Já na maioria dos depósitos sedimentares, localizados nos Estados Unidos, sudeste do México, Marrocos, noroeste do Saara e Oriente Médio, predominam as variedades de carbonatoapatita $[Ca_5(PO_4,CO_3)_3.(OH,F)]$ e carbonato-fluorapatita $[Ca_5(PO_4,CO_3)_3.(F,OH)]$ (MC CLELLAN & KAUWENBERG, 1990; ZAPATA & ROY, 2004)

A apatita, de fórmula geral $M_{10}(YO_4)_6(X_2)_5$, comumente apresentada como $Ca_5(PO_4)_3(F,OH,Cl)$, juntamente com as suas variedades, forma um importante grupo de minerais. O Ca^{2+} pode ser substituído, em parte, por íons positivos tais como: ETR (elementos de terras-raras), principalmente céricas nas apatitas ígneas, e cérico-ítricas nas de origem sedimentar marinha e por urânio e chumbo. O radical PO_4^{3-} pode também ser substituído, em parte, por pequenas quantidades de UO_4^{2-} , AsO_4^{2-} , ou SiO_4^{4-} (LUZ & LINS, 2008).

A principal aplicação da apatita é na fabricação de ácido fosfórico para fertilizantes que, tanto em escala mundial quanto nacional, consome cerca de 90% da sua produção; portanto apenas 10% se destinam a outras aplicações. Dos fertilizantes fosfatados, 90% são obtidos por via química,

2% por via térmica e 6% são aplicados sob a forma natural (LUZ & LINS, 2008).

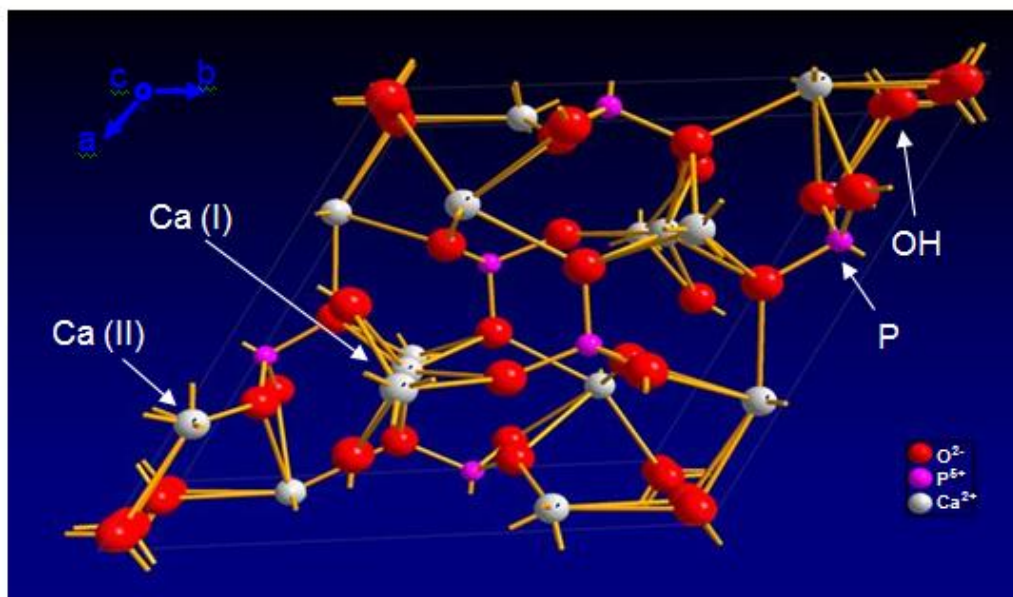


Figura 1 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita (RIVERA-MUÑOZ, 2011)

2.4.

Flotação mineral com ênfase na apatita

A flotação é, sem dúvida, a técnica mais importante e versátil de concentração mineral. Originalmente, permitiu a lavra de minérios complexos e de baixa qualidade que, de outra forma, teriam sido considerados não econômicos. Na prática antiga, grande parte dos rejeitos tinham teor superior aos minérios tratados em muitas plantas de flotação modernas. (FUERSTENAU & CHANDER, 1986; WILLS & NAPIER-MUNN, 2006).

A flotação é um processo de separação físico-químico que utiliza a diferença nas propriedades superficiais dos minerais de minério e dos minerais de ganga indesejados. A teoria é complexa, envolvendo três fases (sólidos, água e espuma) com muitos subprocessos e interações. Neste processo ocorre a fixação da partícula mineral às bolhas de ar dentro da polpa em agitação. Para tanto, na maioria das vezes, necessário o uso de vários reagentes (coletores, depressores, ativadores, modificadores de pH,

etc.) dessa forma, é possível tornar os minerais de interesse mais hidrofóbicos, aumentando a interação das partículas minerais com as bolhas, e os minerais de ganga mais hidrofílicos. Isso resultará em separação por transferência dos minerais valiosos para as bolhas de ar que, no caso da flotação direta, formam uma espuma mineralizada e é coletada na superfície da polpa (KELLY & SPOTTISWOD, 1982; WILLS & NAPIER-MUNN, 2006).

No caso das apatitas provenientes das rochas ígneas, caso da grande maioria dos minérios fosfáticos brasileiros, o desenvolvimento de reagentes químicos capazes de separar o mineral apatita, a partir de um minério com diferentes minerais de ganga, principalmente de minerais carbonáticos, foi o grande marco do desenvolvimento da tecnologia mineral no Brasil na década de 60. Nesse período o processo de concentração de apatita a partir do uso de ácido graxo como coletor de apatita e da utilização de amido de milho como depressor dos minerais de ganga (LEAL FILHO, 1995). Estava assim, iniciado, em caráter inédito, o desenvolvimento de processo, para o aproveitamento dos minérios fosfáticos brasileiros de baixo teor de fósforo (CHAVES, A.P., 2009).

Desde essa época, diversos pesquisadores têm-se dedicado à pesquisa de desenvolvimento de reagentes, pois, os minérios fosfáticos passaram a apresentar problemas bastante particulares, em face de sua complexidade mineralógica, sendo que alguns minerais de ganga mostram propriedades superficiais bastante similares às da apatita. Esses minerais possuem substituições e modificações químicas e cristalográficas que alteram suas características físicas e químicas e, como consequência, suas propriedades superficiais, respondendo diferentemente, às variáveis de processo e às características dos ácidos carboxílicos utilizados (BARROS, LEAL FILHO & PERES, 2001), tornando difícil atingir às especificações do mercado de, aproximadamente, 30 a 34% de recuperação de apatita (ROSÁRIO, 2015).

2.5.

Bioflotação: uso de microrganismos e biossurfactantes no processo de flotação mineral

Conseguir separar minerais de minério de minerais indesejados tem sido uma das questões fundamentais da engenharia. Para separar minerais, várias técnicas foram desenvolvidas, destas técnicas a flotação tem sido a mais utilizada porque é barata e eficiente (AHMED, IBRAHIM, & HASSAN, 2007; MATIS, 1994). No entanto, apesar das muitas vantagens da flotação, como boa seletividade e baixo custo, alguns reagentes químicos utilizados convencionalmente na indústria são considerados danosos ao homem e/ou meio ambiente, por isso, tentativas estão sendo feitas visando a substituição destes reagentes por outros menos danosos (GUO *et al.*, 2010; DWYER *et al.*, 2012; MERMA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que a o uso de biorreagentes pode ser uma solução alternativa para evitar problemas ambientais (BAPTISTA, 2007; SILVA, 2011; RAO, VILINSKA, & CHERNYSHOVA, 2010). Os microrganismos, como, por exemplo, bactérias, algas, fungos e leveduras, estão sendo estudados como possíveis biorreagentes no processo de flotação, devido à sua abundância na natureza(VILINSKA & RAO, 2008; RAO, VILINSKA, & CHERNYSHOVA, 2010; KIM *et al.*, 2015; MERMA, HACHA, & TOREM, 2017).

Essencialmente, o papel das bactérias é efetuar mudanças na química superficial dos minerais para conseguir a separação eficiente. Isso pode ser de particular importância para as indústrias de mineração e siderurgia, onde a crescente demanda global por matérias primas e o esgotamento de recursos de minérios de maior qualidade obrigam a lavra de depósitos com minerais de menor teor e maior complexibilidade para atender a demanda do mercado (MERMA *et al.*, 2013).

No processo de bioflotação o comportamento hidrofóbico da estirpe bacteriana é a força motriz do processo. A presença de grupos apolares (cadeias hidrocarbônicas) e grupos polares (carboxilas, fosfatos, hidroxilas)

na parede celular microbiana possibilitam o uso de algumas espécies bacterianas e dos seus produtos metabólicos (proteínas e polissacarídeos) como agentes coletores e modificadores na flotação de sistemas minerais (RAO, VILINSKA & CHERNYSHOVA, 2010; VILINSKA & RAO, 2008). Da mesma forma, estes grupos funcionais presentes na parede celular, quando ionizados, formam sítios ativos capazes de adsorver espécies iônicas presentes no sistema, mediante vários mecanismos de adsorção (específicos e não específicos), como: troca iônica, ligações químicas e interações eletrostáticas (OLIVEIRA., 2015).

Microrganismos e/ou seus produtos metabólicos podem modificar a superfície mineral, tanto direta como indiretamente. O mecanismo direto envolve a adesão direta das células microbianas às partículas minerais, enquanto o mecanismo indireto refere-se aos produtos do metabolismo ou frações solúveis da célula que agem como reagentes ativos na superfície. Ambas as interações levam a alterações na superfície mineral, tornando-a hidrofílica ou hidrofóbica devido à presença de grupos apolares e polares na parede celular ou nos produtos metabólicos (MERMA, 2012; MERMA *et al.*, 2013).

Um microrganismo que apresente um perfil hidrofóbico e que seja capaz de se aderir à superfície de um mineral tornando-a total ou parcialmente hidrofóbica poderá promover a flotação do mineral, atuando como um coletor convencional ou, caso o microrganismos tenha um caráter hidrofílico, pode atuar como um reagente modificador depressor da flotação do mineral. A depressão pode resultar da oxidação da bactéria ou por modificação complementar da superfície, ou seja: uma vez que o biorreagente esteja aderido, o mesmo impede parcial ou totalmente uma subsequente adesão do coletor (ZHENG, ARPS & SMITH, 2001)

Em particular, as bactérias hidrofóbicas, como é o caso da *Rhodococcus erythropolis*, têm sido utilizadas como coletores porque facilitam a adsorção mineral a uma interface gás / líquido (DWYER *et al.*, 2012; RAO & SUBRAMANIAN, 2007). Além disso, algumas bactérias podem melhorar a adesão a minerais específicos, permitindo assim que a

flotação seletiva seja realizada (BOTERO, TOREM & MESQUITA, 2008; MESQUITA, LINS & TOREM, 2003; DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015; MERMA, HACHA & TOREM, 2017) tornando possível coletar o mineral de interesse e deprimir os minerais de ganga.

Estudos anteriores sugerem que os vários tipos de química superficial das bactérias podem ser usados para tornar a bioflotação efetiva para uma variedade de minerais. A eficiência dos processos de tratamento de minérios convencionais é altamente dependente da composição e natureza do minério, o que significa que um processo particular pode não ser, necessariamente, universalmente aplicado a todos os demais depósitos minerais (PUELLES, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Embora, ao longo do tempo, algumas capacidades das bactérias tenham sido descobertas e estudadas no processo de flotação, a adesão bacteriana e os mecanismos de desprendimento dos minerais ainda não são totalmente conhecidos. O fenômeno da “*biomodificação*” da superfície sólida ainda é um problema que não foi totalmente solucionado (RAO, VILINSKA & CHERNYSHOVA, 2010). Os autores descrevem este fenômeno como uma ação complexa que pode acontecer de três formas: pela ligação de células microbianas ao substrato sólido, em que os microrganismos, ou seus produtos metabólicos, aderem à superfície de um minério e alteram suas características superficiais; pelas reações de oxidação e adsorção; e / ou por reações químicas com os produtos de metabolitos produzidos pelos microrganismos (FAZAEIPOOR, KHOSHDAST & RANJBAR, 2010; BUENO, 2008).

Na literatura pode ser encontrada uma grande quantidade de artigos referentes à bioflotação de minerais, dentre deles a maior parte são relacionados com sulfetos. A adesão de células bacterianas à superfície mineral altera o comportamento da flotação dos minerais, como foi o caso da investigação do efeito da *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium phlei* no sistema apatita – dolomita (ZHENG, ARPS & SMITH, 2001); do sistema apatita-quartzo utilizando a *R. opacus* (MERMA, 2012; MERMA *et al.*, 2013; MERMA, HACHA & TOREM, 2017) e da aplicação de bactérias

quimiolitotróficas¹ como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus Thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* para bio-oxidação de minerais de sulfato (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Outros exemplos podem ser dados, como no caso da depressão da pirita devido à modificação da energia livre de superfície atribuída à adesão e a bio-oxidação das bactérias *Leptospirillum ferrooxidans* na superfície da pirita, causando floculação em todos os valores de pH. (MEHRABANI *et al.*, 2010). Neste caso, os biopolímeros produzidos pelas bactérias foram responsáveis pela ligação com as partículas minerais e, também, foram responsáveis pela biofloculação.

Em outra pesquisa, as proteínas bacterianas extracelulares (*em inglês EBP - extracellular bacterial proteins*) isoladas da *Paenibacillus polymyxa* foram utilizadas no sistema contendo pirita, calcopirita, quartzo, esferalerita e galena com o intuito de conseguir realizar uma separação seletiva no sistema para concentrar pirita e calcopirita (PATRA & NATRAJAN, 2008). As experiências de floculação mostraram que, na presença de proteínas (EBP), a pirita e a calcopirita apresentaram maior taxa de sedimentação (FORNASIERO & RALSTON, 2005), com isso foi possível realizar a flotação inversa.

A interação de células da bactéria hidrofóbica *Rhodococcus opacus* com a superfície mineral também foi investigada em um sistema de flotação de quartzo-hematita (MESQUITA, LINS & TOREM, 2003) e em outro de quartzo-apatita (MERMA, 2012). Nos dois casos, foi comprovado que as células da *Rhodococcus opacus* contêm alguns polissacarídeos que interagem com a superfície mineral (MERMA, 2012; DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015)

¹ A quimiolitotrofia é um tipo de metabolismo encontrado em procariontes, em que a energia é obtida a partir da oxidação de compostos inorgânicos. Estes organismos podem usar hidrogênio, compostos reduzidos de enxofre (como sulfuretos, ácido sulfídrico e tiosulfato), óxidos de ferro (II), ou amoníaco como fontes de agentes redutores, ganhando energia a partir da oxidação destes compostos ao aceitar elétrons como o oxigênio ou o nitrito (WEBER, ACHENBACH & COATES, 2006; FRIEDRICH & SCHWARTZ, 1993).

O bom desempenho dessas cepas na bioflotação mineral levou os pesquisadores a aprofundar mais na parte biológica das bactérias, assim, além de usar os Microrganismos no processo de bioflotação tornou-se possível utilizar os seus produtos metabólicos extraídos. Dentre deles, diferentes tipos de bioproteínas e polissacarídeos. Os quais seriam os verdadeiros responsáveis por fornecer o caráter hidrofóbico ou hidrofílico aos minerais (MERMA, 2012)

Os recentes desenvolvimentos em biotecnologia têm prometido não só contribuir com as operações químicas, minerais e hidrometalúrgicas, mas também fornecer meios para a biorremediação de problemas ambientais gerados pelas indústrias minerais. Estes estudos mostram que o uso de microrganismos é potencialmente possível nas áreas de floculação e flotação de minerais, onde a adesão de bactérias e/ou substâncias poliméricas extracelulares (EPS) induz uma alteração nas propriedades da superfície mineral (SILVA, 2011; DALTIM, 2011).

As pesquisas em biobeneficiamento vêm apresentando resultados promissores (MEHRABANI *et al.*, 2010; BAPTISTA, 2007) onde várias cepas microbianas (Tabela 2-2) são utilizadas como biorreagentes (coletores, depressores, floculantes e espumantes) no processamento de minerais. Estes estudos são focados na viabilidade do uso destes biorreagentes, ambientalmente amigáveis, no processamento mineral e desta forma poder substituir total ou parcialmente os reagentes convencionais.

Tabela 2-2 – Bactérias usadas no beneficiamento mineral. Adaptado de (MERMA, 2012; OLIVERA, 2015)

Biorreagente	Sistema	Função	Autor
<i>M. phlei</i>	Hematita	Coletor	DUBEL <i>et al.</i> , 1992
	Apatita - Dolomita	Coletor	ZHENG <i>et al.</i> , 1997, 1998, 2001
	Finos de hematita	Coletor e Floculante	YANG <i>et al.</i> , 2007
	Finos de Carvão	Coletor e Floculante	RAICHUR <i>et al.</i> , 1996
<i>B. subtilis</i>	Finos de carvão	Floculante	VIJAYALAKSHMI & RAICHUR, 2003
<i>A. ferroxidans</i>	Carvão	Depressor de Pirita	AMINI <i>et al.</i> , 2009
<i>B. lichenformis</i> ,	Apatita - Dolomita	Depressor de Apatita	SMITH & MIETTINEN, 2006
<i>B. carnosus</i>	Apatita-calcita-Quartzo	Coletor de apatita	SMITH & MIETTINEN, 2006
<i>B. firmus</i>	Apatita-calcita-Q	Coletor de apatita	SMITH & MIETTINEN, 2006
<i>T. ferrooxidans</i>	Pirita- Calcopirita	Depressor de pirita	HOSSEINI <i>et al.</i> , 2005
<i>L. ferrooxidans</i>	Pirita-chalcopirita	Depressor de calcopirita	VILINSKA & RAO, 2008
<i>T. thiooxidans</i>	Galena-Esfalerita	Coletor de esfalerita	SANTHIYA <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli</i>	Quartzo	Coletor	FAHARAT <i>et al.</i> , 2008
<i>S.cerevisiae</i>	Quartzo-calcita	Coletor de quartzo	PADUKONE & NATARAJAN, 2011
<i>R. opacus</i>	Calcita-Magnesita	Coletor	BOTERO, TOREM & MESQUITA, 2007; 2008
	Apatita-quartzo	Coletor	MERMA, 2012; MERMA, HACHA & TOREM, 2017
<i>R. erythropolis</i>	Hematita-Quartzo	Coletor de hematita	MESQUITA, LINS & TOREM, 2003;
	Hematita		OLIVERA, 2015
<i>P. polymyxa</i>	Hematita, coríndon, calcita, quartzo.	Ativador de quartzo	NAMITA & NATARAJAN, 1997, 2001
	Pirita-esfalerita	Depressor de pirita	PATRA & NATARAJAN, 2004
Proteínas e Polisacarídeos da <i>P. polymyxa</i>	Quartzo, esfalerita, pirita, calcopirita, galena.	Depressor de pirita e calcopirita./ Coletor de galena e quartzo	PATRA & NATARAJAN, 2008

	Calcopirita, galena	Ativador de galena	PATRA & NATARAJAN, 2008
	Galena-esfarelita	Depressor de galena	SUMBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2003

As bactérias mais citadas na literatura são a *Mycobacterium phlei* e a *Bacillus polymyxa*. Dependendo do sistema em estudo e das condições de cultura, os microrganismos podem atuar como coletores ou depressores de um determinado mineral. No entanto, o seu comportamento hidrofóbico pode ser alterado modificando as condições de cultura produzindo, desta forma, componentes hidrofóbicos (proteínas) ou hidrofílicos (polissacarídeos), os que inclusive podem ser extraídos para serem avaliados no processamento mineral (YANG, ZHANG & JIANG, 2007; NATARAJAN, 2006; MERMA, 2012).

Segundo Mesquita *et al.* (2003) a bactéria *Mycobacterium phlei* é um exemplo de atuação depressora e coletora, dependendo do sistema mineral em estudo. Esse microrganismo, além de negativamente carregado, possui uma superfície altamente hidrofóbica, com ângulo de contato próximo de 70°. Essas propriedades surgem, em grande parte, devido à presença de ácidos graxos em sua superfície. Os principais componentes da parede celular do microrganismo *Mycobacterium phlei* são glicolipídeos, fosfolipídios e lipídeos livres. Espectros de infravermelho mostraram a presença de grupos funcionais na superfície do tipo COOH, NH₂, OH, CH₂, CH₃, e (RO)₂HO-P=O, que são, principalmente, grupos polares e apolares. A presença dos grupos polares irá atribuir um caráter negativo à superfície, enquanto os grupos apolares tornarão a superfície hidrofóbica (MERMA, 2012; MESQUITA, LINS & TOREM, 2003).

A estrutura celular de um microrganismo é complexa, sendo constituída por diversos compostos químicos e grupos funcionais; deste modo, acredita-se que as bactérias apresentem problemas de seletividade mineral, especialmente quando se trata de minerais muito similares. Assim, com a intenção de diminuir este problema de heterogeneidade, têm sido desenvolvidos trabalhos que visam à extração e o uso de substâncias

produzidas pela bactéria: bioproteínas, biossurfactantes, biopolissacarídeos, etc. (NATARAJAN, 2006; PATRA & NATRAJAN, 2008; SUBRAMANIAN, SANTHIYA & NATARAJAN, 2003).

A interação superficial de bactérias com minerais é fundamentalmente diferente da dos surfactantes: a interação superfície-superfície torna-se mais importante para bactérias de tamanho micrométrico, enquanto a interação do surfactante com minerais é principalmente interação ponto-ponto. Em outras palavras, os coletores típicos de tamanho nanométrico são anexados a uma superfície mineral no ponto por reações químicas ou físicas, enquanto os coletores compostos por células bacterianas são unidos por interações superfície-superfície, na qual a superfície da bactéria adere à superfície mineral. Esses tipos de interação fundamentalmente diferentes de um processo típico de flotação exigem um exame minucioso da interação bactéria-mineral (DALTIM, 2011; KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2015).

2.6.

Biossurfactantes

Os tensoativos ou surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em vários setores de diferentes tipos de indústrias onde encontram aplicação em uma larga variedade de processos industriais. Estas moléculas possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e são produzidas química ou biologicamente. Por possuírem uma parte polar e outra apolar, são também conhecidos como substâncias anfífilas (DALTIM, 2011; KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2015; MULLIGAN, SHARMA & MUDHOO, 2014).

A palavra anfífila tem origem latina: *amphi* significa dualidade e *philos* significa atração. As substâncias tensoativas são classificadas em aniônicas, não iônicas ou anfóteras, e catiônicas, de acordo com a carga exibida pela porção polar da molécula. A parte hidrofóbica é composta geralmente por um hidrocarboneto linear ou ramificado, apresentando ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos. Os íons têm uma forte afinidade pela água devido às atrações eletrostáticas entre a carga do íon

e os dipolos da água. Além disso, são capazes de carregar longas cadeias carbônicas (parte apolar) para dentro da solução (BANAT, MAKKAR & CAMEOTRA, 2000; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; MESQUITA, 2004; BUENO, 2008).

As moléculas surfactantes possuem duas propriedades fundamentais: são capazes de se deslocar na solução e se posicionar nas interfaces (ex: ar/Líquido, líquido/Líquido) com orientação específica, também conhecida como adsorção; e formam agregados orientados, também conhecidos como micelas. A formação de micelas em solução conferirá as propriedades de detergência e solubilização (SILVA, 2011; DALTIM, 2011).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo. Nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica. Porém, o aumento da preocupação ambiental e as novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por biossurfactantes como alternativa aos sintéticos existentes (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; SILVA, 2011; MULLIGAN, SHARMA & MUDHOO, 2014).

A tendência de substituição dos surfactantes sintéticos pelos biossurfactantes é motivada pela necessidade da diminuição de produtos não biodegradáveis por substâncias mais específicas e menos agressivas ao ambiente. Os microrganismos sintetizam compostos com propriedades surfactantes como subprodutos metabólicos, sendo neste caso denominados biossurfactantes. Estes são também moléculas anfifílicas que atuam na interface das emulsões e em termos de tensão superficial, estabilidade à temperatura e pH, são comparáveis aos surfactantes sintéticos (BAPTISTA, 2007; KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2015).

Os biossurfactantes exibem propriedades específicas, podendo atuar como reagentes emulsificantes, espumantes, de dispersão e de ativação da superfície; têm ampla aplicação em diferentes ramos industriais, incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos, na indústria

mineral, na agricultura e MEOR (microbial enhanced oil recovery, “recuperação avançada de óleo utilizando microrganismos”) (MERMA, 2012; BAPTISTA, 2007).

Vários microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes; No entanto, o tipo de polímero produzido é influenciado pela origem do micróbio. As cepas de *Bacillus*, por exemplo, produzem diferentes surfactantes com diferentes propriedades de superfície ativa. *B. pumilus* é relatado como produtor de família de surfactina do tipo lipoproteína. Este polímero é particularmente interessante porque possui uma alta atividade superficial e pode ser usado em grandes setores industriais (OLIVEIRA & GARCIA-CRUZ, 2013).

Os componentes microbianos que exibem alta atividade de superfície e atividade emulsificante são classificados como biossurfactantes. Estes podem ser sintetizados como produtos metabólicos por diferentes microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos utilizando vários substratos de baixo custo incluindo açúcares, óleos, alcanos, resíduos industriais e agrícolas. Os biossurfactantes podem ser obtidos por procedimentos relativamente simples como, por exemplo, processos fermentativos e podem apresentar estruturas químicas diversas (BANAT, MAKKAR & CAMEOTRA, 2000; RUFINO, LUNA & SARUBBO, 2003; MESQUITA, 2004; HABA *et al.*, 2000).

Em geral, a estrutura dos biossurfactantes inclui uma porção hidrofílica que consiste de aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions; mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica consistindo de ácidos graxos saturados ou insaturados (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Biossurfactantes produzidos por microrganismos procariontes ou eucariontes possuem diversas estruturas químicas que podem ter baixo ou alto peso molecular. Os de baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos contendo os açúcares ramnose, soforose e trealose e lipopeptídeos que consistem de polipeptídios curtos e os de alto peso molecular como os biopolímeros que incluem lipoproteínas, complexos

lipopolissacarídeo-proteína e complexos polissacarídeo-proteínas-ácidos graxos. Os biossurfactantes de alto peso molecular estão associados à produção de emulsão (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; LANG & PHILP, 1998; LANG, 2002; BUENO, 2008).

A classificação dos surfactantes sintéticos tem como base os grupamentos polares, já os biossurfactantes são classificados com base na natureza bioquímica do composto e podem ser classificados em cinco categorias segundo MESQUITA (2004) e BUENO(2008):

- **Glicolipídeos:** são geralmente carboidratos combinados com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos alifáticos hidroxilados (ex: trealolipídeos, soforolipídeos e ramnolipídeo). Eles estão envolvidos na entrada de hidrocarbonetos de baixa polaridade em células microbianas;
- **Lipossacarídeos:** um exemplo desse tipo de bioemulsificante extracelular é o *emulsan* com alto peso molecular e solúvel em água produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*;
- **Lipopeptídeos:** são bastante eficazes na redução de tensão superficial e interfacial; a surfactina, produzida pela *Bacillus subtilis*, é o biossurfactante mais potente já relatado;
- **Fosfolipídeos:** embora estejam presentes em todos os microrganismos, existem poucos exemplos de produção extracelular. Os mais conhecidos são produzidos por *Corynebacterium lepus*;
- **Ácidos graxos e lipídeos neutros:** são proteínas hidrofóbicas, como o ácido ustilágico e os ácidos corinomicólicos.

Bactérias produtoras de surfactantes incluem: *Pseudomonas aeruginosa* (mono- di-ramnolipídeos), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos glicolipídeos, etc.) *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem as leveduras *Torulopsis* sp (soforolipídeos) e *Candida* sp (liposan e fosfolipídeos) (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Os microrganismos produtores de biossurfactantes mais conhecidos estão listados na Tabela 2-3, assim como alguns exemplos das estruturas destes estão apresentados na Figura 2.

Tabela 2-3. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos. Adaptado de NITSCHKE & PASTORE (2002) apud (BUENO, 2008)

Tipos de biossurfactantes		Microrganismos
Glicolipídeos	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas</i> , <i>Lipobacillus sp</i>
	Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
	Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Ornitina	<i>Pseudomonas sp</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos Graxos, lipídeos neutros, e fosfolipídeos	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Clostridium sp</i>
	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Manama-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Ácidos corinemicólicos		<i>Corynebacterium sp</i>
Surfactantes particulados	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Células	Várias bactérias

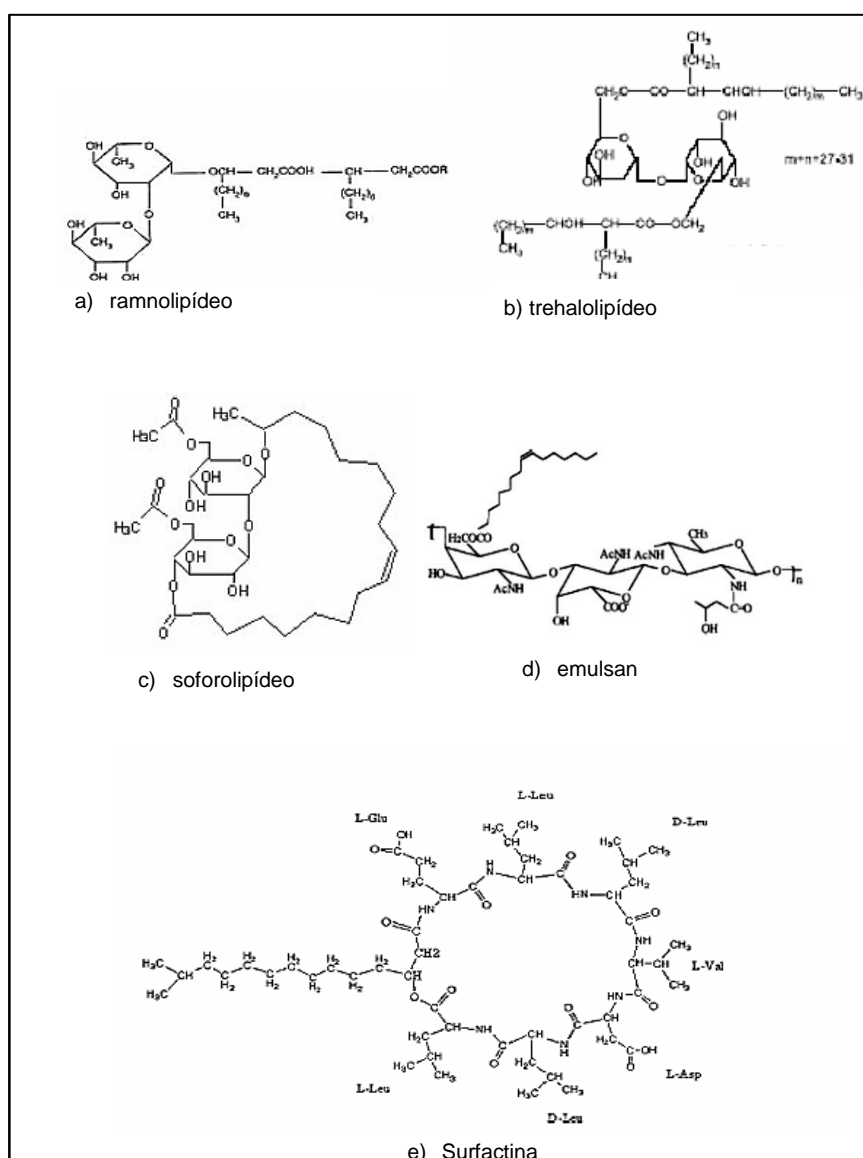


Figura 2 - Estruturas químicas de biossurfactantes produzidos por: (a) *Pseudomonas aeruginosa*, (b) *Rhodococcus erythropolis* (c) *Candida bombicola* (d) *Acinetobacter calcoaceticus* e (e) *Bacillus subtilis*. (BUENO, 2008)

Existem várias técnicas usadas para a extração destes biossurfactantes, dentre elas: ultracentrifugação, dialise e nanofiltração, precipitação ácida e extração por solventes (DESAI & BANAT, 1997; FINNERTY, 1994; FAZAELOPOOR, KHOSHDAST & RANJBAR, 2010; MULLIGAN, SHARMA & MUDHOO, 2014). Puelles (2016) utilizou a extração por solvente obtendo bons resultados de recuperação mineral, logo após testes laboratoriais, foi constatado que esta também seria a

melhor técnica a ser aplicada neste trabalho, pois, além de não implicar em altos custos, adequava-se aos equipamentos laboratoriais já existentes e, por fim, o biossurfactante resultante apresentava boa concentração e função coletora e espumante satisfatórias.

Os biossurfactantes devido à sua diversidade, quando comparados com os surfactantes sintéticos convencionais, apresentam algumas vantagens: como maior biodegradabilidade, baixa concentração micelar crítica (CMC) (Tabela 2-4), menor toxicidade, em alguns casos, (Tabela 2-5), maior habilidade para complexar metais pesados, melhor capacidade espumante, atividade antibiótica, emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos; características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência além de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis, fator importante à medida que o preço do petróleo aumenta (KIM *et al.*, 2015; BANAT, MAKAR & CAMEOTRA, 2000; OLIVEIRA & GARCIA-CRUZ, 2013; BUENO, 2008).

A tensão superficial está correlacionada com a concentração micelar crítica (CMC). Surfactantes eficientes possuem uma baixa CMC, isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial (MULLIGAN, 2005; BUENO, 2008). A concentração micelar crítica varia na solução aquosa em função da estrutura do tensoativo, temperatura da solução, pH, presença de eletrólitos e compostos orgânicos. O tamanho da fração apolar da molécula de tensoativo é um fator importante e, geralmente, a CMC decresce com o aumento da hidrofobicidade da molécula isto é, quanto maior a cadeia carbônica da fração apolar do tensoativo, maior a tendência das moléculas de se adsorverem entre a interfase ar-água, diminuindo assim a tensão superficial da solução (MESQUITA, 2004; BUENO, 2008; SHAW, 1992).

Tabela 2-4. Tensão superficial e concentração micelar crítica dos biossurfactantes e dos surfactantes sintéticos (BUENO, 2008)

Natureza do surfactante	Surfactante	Tensão superficial (mN/m)	CMC (mg/L)
Biológico	<i>R. ruber</i> AC 235 - glicolípideo	26,8	54
Biológico	<i>R. erythropolis</i> – trealose dicorinomicolato	36	4
Biológico	<i>R. erythropolis</i> – trealose tetraester	26	15
Biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ramnolióideo	29	50-200
Biológico	<i>Torulopsis bombicola</i> - soforolípideos	33	82
Biológico	<i>Bacillus subtilis</i> - surfactina	27	23
Sintético	Dodecil Sulfonato de Sódio (DSS)	37	2120
Sintético	Brometo de Cetiltrimetilamônio	30	1300
Sintético	Tween 20	30	600
Sintético	n – Alquil Benzeno Sulfonato	47	590

Tabela 2-5. Toxicidade dos biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos (BUENO, 2008)

Natureza do surfactante	Surfactante	*CE ₅₀ (mg/L)
biológico	<i>R. ruber</i> AC 235- glicolípideo	650
biológico	<i>R. erythropolis</i> – trealose dicorinomicolato	49
biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ramnolióideo	50
sintético	Finasol OSR-5	7
sintético	Inipol EAP 22	0,004

*CE₅₀ – concentração efetiva onde 50% dos microrganismos morrem.

Por outro lado, uma das desvantagens na produção de biossurfactantes é a pouca quantidade de biomoléculas produzidas em nível industrial. A maioria dos biossurfactantes encontram-se ainda na

escala laboratorial, logo é necessária a viabilização deste processo em um ponto de vista industrial (BANAT, MAKKAR & CAMEOTRA, 2000; BAPTISTA, 2007; BELL *et al.*, 1998; BOTERO, TOREM & MESQUITA, 2007; DESAI & BANAT, 1997; RAO, VILINSKA & CHERNYSHOVA, 2010; PUELLES, 2016).

2.7.

Rhodococcus erythropolis

A *R. erythropolis* é um microrganismo não patogênico encontrado amplamente na natureza, tem sido utilizado para a biorremediação de água e solo contaminados por óleo e para bioflotação mineral (YANG *et al.*, 2013; OLIVEIRA., 2015; BAPTISTA, 2007; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). Em estudos de bioflotação a bactéria mostrou ter seletividade e ser um potencial espumante e/ou coletor e em estudos de biorremediação os poluentes do óleo foram removidos e recuperados pela bactéria através da formação de bioflocos de óleo (YANG *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

As células desta bactéria contêm um conjunto de enzimas que permitem a realização de bioconversões e degradações; como oxidações, desidrogenações, epoxidações, hidrólises, hidroxilações, deshalogenações e dessulfurizações. Esta variedade de enzimas justifica a aplicação prospectiva desta bactéria na biotecnologia (CARVALHO, 2012).

As funções de floculação-flotação das células da *R. erythropolis* para o processamento de minérios de hematita refratários, predominantes em reservas de minério da China, foram investigadas por Yang *et al.* (2013). Os quatro principais minerais que estão presentes em minérios de hematita (hematita, quartzo, caulinita e apatita) foram testados para determinar a viabilidade de usar *Rhodococcus erythropolis* como um coletor de hematita. Neste estudo a superfície da bactéria *Rhodococcus erythropolis* foi carregada negativamente entre os valores de pH 2 e 10. Os pontos isoelétricos (Figura 3) corresponderam a valores de pH de, aproximadamente, 5,2 para hematita, 3,0 para quartzo, 3,3 para caulim e

3,0 para apatita.

As interações entre a bactéria e os minerais resultaram em mudanças significativas na carga das superfícies minerais (Figura 4). Depois da interação, o ponto isoelétrico (PIE) da apatita, assim como o do caulim e do quartzo, não foram identificados para valores de pH entre 3 e 11, apenas o PIE da hematita foi verificado, aumentando de pH igual a 5,2 para pH igual a 5,6. Indicando que a adsorção das células de *Rhodococcus erythropolis* sobre superfícies minerais depende tanto das propriedades bacterianas quanto das propriedades da superfície mineral. As mudanças nas propriedades da superfície dos quatro minerais puros indicaram que a bactéria interagiu com todos eles, existindo, assim, viabilidade de estudo da bactéria como reagente de flotação para cada um deles (YANG *et al.*, 2013).

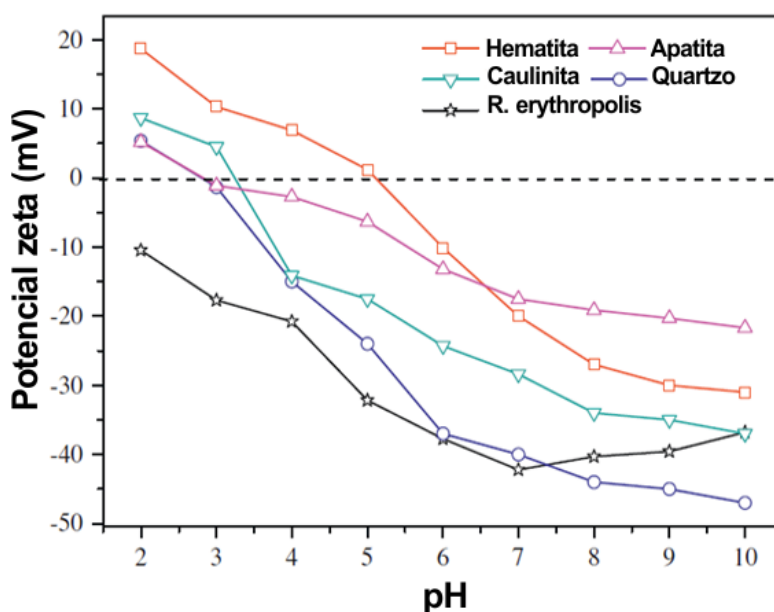


Figura 3 - Curvas de potencial zeta para *Rhodococcus erythropolis*, hematita, quartzo, apatita e caulim (YANG *et al.*, 2013).

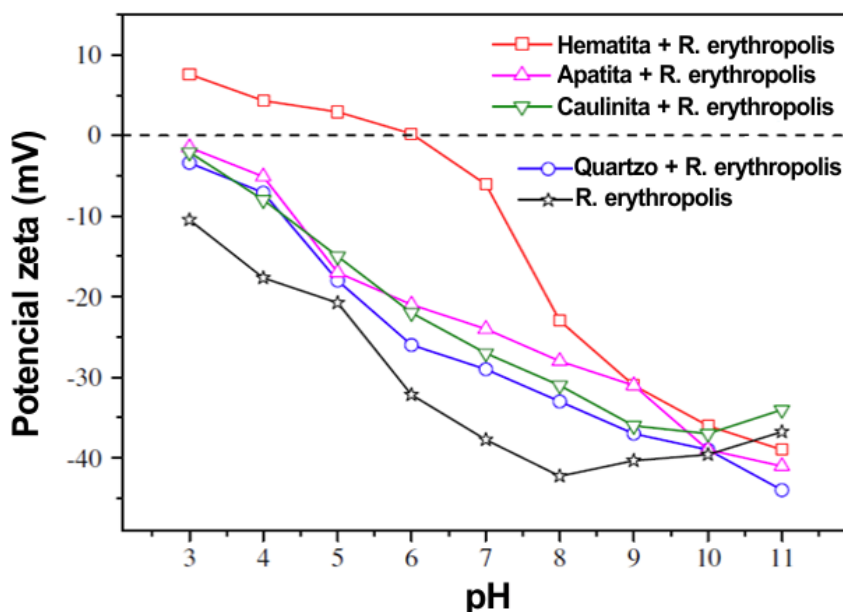


Figura 4 - Curvas de potencial zeta de hematita, quartzo, apatita, caulim após da interação com *Rhodococcus erythropolis* (YANG *et al.*, 2013).

De maneira geral, as bactérias do gênero *Rhodococcus* são actinobactérias aeróbias, apresentam uma única e espessa camada de peptidoglicanos, são Gram-positivas, com alto conteúdo de guanina e citosina contido em seu DNA. Estes microrganismos apresentam ciclo de vida alternante entre cocos e bastonetes, algumas vezes mostrando projeções filamentosas (CIAPINA, 2008; OLIVEIRA, 2015). São amplamente distribuídas no ambiente e habitam em uma grande variedade de fontes como os ambientes marinhos, solos Alpinos, Ártico, Antártica, águas subterrâneas, excretas de animais, intestinos de insetos e em plantas (CARVALHO & FONSECA, 2005; WHYTE *et al.*, 2002; MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2009).

A característica predominante do modelo esquemático da organização da parede celular da *Rhodococcus* é a complexidade da estrutura na qual o peptidoglicano está ligado por meio de unidades ligantes às arabinogalactanas que estão unidas ao ácido micólico (Figura 5). Estes ácidos micólicos formam a base da barreira lipídica externa (seta A) que apresenta ainda dimicolatos de trealose e lipídeos monomicolatos. Esta barreira externa também contém lipídeos anfifílicos (B). Outros componentes são as porinas, lipoproteínas e lipoglicanas (OLIVEIRA,

2015).

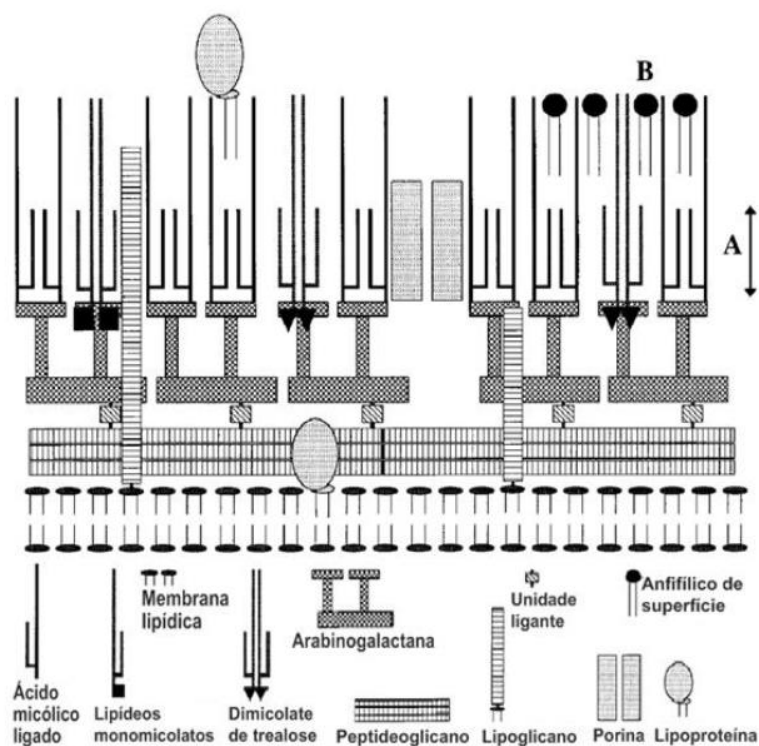


Figura 5 – Representação do modelo esquemático proposto da parede celular da espécie *Rhodococcus*: (A) barreira lipídica externa formada por ácidos micólicos e (B) lipídeos anfifílicos (OLIVEIRA, 2015).

O potencial comercial da espécie *Rhodococcus* é cada vez mais reconhecido. A vasta gama de produtos químicos transformados ou degradados pelas *Rhodococcus* as torna úteis na biotecnologia ambiental e industrial, assim como sua capacidade de sintetizar vários produtos, como surfactantes, flocculantes, amidas e polímeros. Esse crescente interesse se reflete, inclusive, em patentes (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2009; BANAT, MAKAR & CAMEOTRA, 2000; KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2015; DESAI & BANAT, 1997).

Os traços fenotípicos úteis das espécies *Rhodococcus* podem ser transferidos para outros organismos por manipulação genética. Nos últimos anos, o desenvolvimento de vetores de clonagem melhorados permitiram a transferência de genes entre diferentes espécies de *Rhodococcus* e entre *Rhodococcus* e *Escherichia coli* (BACK *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes produzidos pela *Rhodococcus erythropolis* tem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial em níveis observados nos surfactantes sintéticos, além de possuir baixa CMC (Tabela 2-4 na página 40). Esta capacidade pode ser comercial e industrialmente importante. Além de também produzir glicolipídeos com propriedades antiviral e antifúngica (LANG & PHILP, 1998; OLIVEIRA, 2015).

A ação das moléculas biossurfactantes ocorre da seguinte forma: primeiro as partículas surfactantes, como os ácidos micólicos, causam a aderência da *Rhodococcus erythropolis* às fases hidrofóbicas em sistemas de duas fases. Posteriormente, os surfactantes diminuem a tensão interfacial entre as fases, facilitando a entrada de células hidrofóbicas nas células microbianas e, finalmente, os surfactantes extracelulares dispersam compostos hidrofóbicos, aumentando assim a área de superfície para ataque microbiano (FINNERTY, 1992; FINNERTY, 1994; BELL *et al.*, 1998).

2.8.

Dupla Camada elétrica no estudo da flotação mineral

A teoria da Dupla Camada Elétrica (DCE) trata da distribuição de íons, e, portanto, da intensidade dos potenciais elétricos que ocorrem na superfície carregada. Esta é uma primeira etapa necessária para compreender muitas observações experimentais referentes a propriedades eletro-cinéticas e estabilidade de sistemas coloidais com partículas carregadas (SHAW, 1992).

Para que ocorra a migração do surfactante e de outras espécies presentes na solução para a superfície da partícula é necessária a existência de algum tipo de atração pela superfície em questão. Podem-se ter ações elétricas ou eletrostáticas e, ainda, de forças moleculares de van der Waals, de hidratação ou ligação. De maneira geral, os íons presentes na solução podem ser atraídos para as vizinhanças das partículas apenas

por forças eletrostáticas. Quando o íon apresenta uma afinidade especial pela superfície, com exceção da contribuição de natureza eletrostática, considera-se que a adsorção é do tipo específico. Os fenômenos que ocorrem na interface sólido-líquido podem ser avaliados por meio dos efeitos eletrocinéticos das partículas em suspensão (DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015; PUELLES, 2016; SHAW, 1992; FARAHAT, HIRAJIMA & SASAKI, 2010).

Segundo Shaw (1992), a maioria das substâncias adquire carga elétrica superficial quando postas em contato com um meio polar (por exemplo, aquoso); os possíveis mecanismos de criação destas cargas são ionização, adsorção de íons e dissolução de íons da superfície. Esta carga superficial influencia a distribuição de íons nas proximidades no meio polar. Os íons de carga oposta (contra-íons) são atraídos para a superfície e os íons de carga similar (co-íons) são repelidos para longe da superfície. Isto, juntamente com a tendência de mistura do movimento térmico, leva à formação de uma dupla camada elétrica composta pela superfície carregada e um excesso neutralizante de contra-íons sobre co-íons distribuídos de forma difusa no meio polar (DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015; VAN DER WAL *et al.*, 1997; SHAW, 1992).

A ionização da superfície ocorre quando, por exemplo, as proteínas adquirem suas cargas principalmente através da ionização dos grupos carboxila e amino, formando íons COO^- e NH_3^+ . A ionização desses grupos, e, portanto, a carga elétrica total, depende em grau acentuado do pH da solução. Em valores baixos de pH uma proteína apresentará carga positiva, e em valores elevados de pH apresentará carga negativa. O pH no qual a carga total (e eletroforética) é nula é chamado *ponto isoelétrico (PIE)* (LUZ, SAMPAIO & FRANÇA, 2010).

Independente do mecanismo de formação, a resultante desta carga superficial irá influenciar a distribuição no meio polar dos íons próximos a ela, de forma que íons de carga oposta (*contra-íons*) são atraídos pela superfície e íons de carga de mesmo sinal (*co-íons*) são repelidos para mais longe da superfície. Este fato, mais a tendência à mistura provocada pela

agitação térmica, leva à formação de uma dupla camada elétrica (DCE), constituída por duas partes, uma superfície carregada e um meio polar em que se distribuem, de maneira difusa, contra-íons (estes em excesso para manter a neutralidade elétrica) e co-íons (SHAW, 1992).

A dupla camada difusa

A dupla camada elétrica pode ser encarada geralmente como constituída por duas regiões, isto é, uma região interna, que pode incluir íons adsorvidos e uma região difusa, na qual os íons se encontram distribuídos de acordo com a influência de forças elétricas e do movimento térmico. O tratamento quantitativo mais simples da parte difusa da dupla camada é o tratamento desenvolvido por Gouy e Chapman (SHAW, 1992).

No começo do século XX, Gouy e Chapman propuseram a ideia da camada difusa para interpretar o comportamento da interface entre um eletrodo (semelhante a um capacitor) e os íons de uma solução de eletrólito, ao invés do modelo de camada de cargas elétricas fixas, desenvolvido anteriormente por Helmholtz. No modelo da dupla camada difusa, os íons na solução são atraídos eletrostaticamente para a superfície do sólido, sendo essa atração contrabalançada pelo movimento dos contra-íons, necessários à equalização da concentração de cargas ao longo da interface (LUZ, SAMPAIO & FRANÇA, 2010).

A Dupla Camada de Stern-Gouy-Chapman (SGC)

Uma das mais importantes contribuições da teoria de Stern foi considerar os efeitos da adsorção específica, isto é, os íons poderiam ser adsorvidos na superfície por forças de caráter não eletrostático. Segundo o modelo de Stern, nas vizinhanças da superfície uma primeira camada estacionária seria formada por íons adsorvidos à superfície por adsorção específica ou forças eletrostáticas. O restante dos íons, de carga oposta àquela da superfície e necessários à neutralização, estariam espalhados por efeito da agitação térmica, decrescendo exponencialmente sua concentração, de acordo com a teoria de Gouy-Chapman (LUZ, SAMPAIO

& FRANÇA, 2010). A Figura 6 apresenta uma representação esquemática da distribuição do potencial eletrostático de acordo com o modelo SGC.

O modelo SGC é sem dúvida o mais utilizado para descrever a estrutura da dupla camada elétrica em sistemas coloidais e considera a influência dos eletrólitos na carga superficial da partícula (LUZ, SAMPAIO, & FRANÇA, 2010).

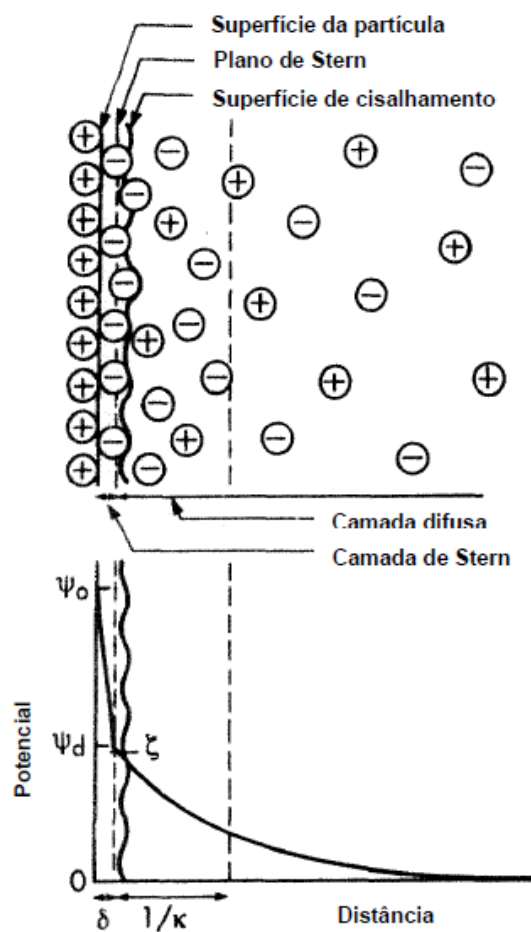


Figura 6 - Estrutura da dupla camada elétrica: representação esquemática da de acordo com a teoria de Stern (adaptado de SHAW, 1992).

Potencial Zeta (ζ) no estudo da flotação mineral

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: eletroosmose, potencial de sedimentação, potencial de escoamento e eletroforese. Sendo esta última a mais usada na determinação do potencial ζ , pois além de ser a mais extensamente estudada, é a que apresenta maior aplicação prática. O plano de Stern é considerado por alguns autores como o plano de cisalhamento onde são efetuadas as determinações eletrocinéticas do potencial zeta (LUZ, SAMPAIO & FRANÇA, 2010).

A técnica de eletroforese consiste em medir a mobilidade eletroforética das partículas carregadas em uma suspensão aquosa (as partículas eletricamente carregadas, suspensas em uma polpa, movimentam-se sob a ação de um campo elétrico aplicado). Na prática, efetuam-se várias medidas da mobilidade eletroforética das partículas dispersas em solução aquosa (SHAW, 1992).

Para uma maior seletividade na separação por flotação de minerais valiosos, é importante identificar os mecanismos principais de geração de carga na interface mineral–solução aquosa. A determinação do potencial zeta das partículas minerais leva a uma melhor compreensão, em muitos dos seus aspectos fundamentais, dos mecanismos de adsorção de surfatantes na superfície dos minerais (DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015; FARAHATA *et al.*, 2009; FARAHAT, HIRAJIMA & SASAKI, 2010; LUZ, SAMPAIO & FRANÇA, 2010).

Inicialmente, é necessário identificar as espécies iônicas responsáveis pela geração de carga na superfície do mineral (*íons determinantes do potencial*), por determinações do potencial eletrocinético dessas partículas na presença desses íons. Dessa forma, torna-se possível identificar as espécies iônicas que afetam o potencial zeta e a extensão da dupla camada elétrica, sem as interações específicas dos compostos iônicos com a superfície. A identificação dos efeitos relacionados às espécies de eletrólitos simples permite ainda examinar o comportamento eletrocinético das partículas na presença de solutos mais complexos, tais

como, hidroxicomplexos de metais, surfatantes, polieletrólitos, polímeros entre outros. Logo, o estudo detalhado das propriedades eletrocinéticas facilita a compreensão dos mecanismos de flotação para muitos minerais (ZHENG, ARPS & SMITH, 2001; YANG *et al.*, 2013; PUELLES, 2016; SHAW, 1992).

O ponto correspondente à atividade dos íons determinantes do potencial em que a carga superficial é zero é denominado *ponto de carga zero* (p.c.z.), que é um dos parâmetros importantes no estudo da flotação dos minerais, pois indica, entre outros, o tipo de surfactante que deverá ser usado no processo bem como as condições químicas de dispersão da polpa (LUZ, SAMPAIO, & FRANÇA 2010; CHAVES, 2009; SHAW, 1992).

Em solução existem íons que interagem com a superfície mineral, atribuindo carga. Estes íons são chamados íons determinantes de potencial (i.d.p.). Íons que não interagem com a superfície são chamados íons indiferentes. Entre estes extremos, existem íons que interagem de alguma maneira especial com a superfície, chamados íons de adsorção específica. Por exemplo, Ba^{2+} e SO_4^{2-} são, comumente, íons determinantes de potencial para a barita e H^+ , OH^- para óxidos. Íons como K^+ , Na^+ , CaI^- e NO_3^- são íons indiferentes para Fe_2O_3 . Para a apatita, os íons determinantes de potencial, comumente citados, são: H^+ , OH^- , Ca^{2+} , $CaOH^+$, PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$ e F^- (NGUYEN & SCHULZE, 2004; MONTE & PERES, 2002; BORTOLOTTI *et al.*, 2009).

Para sólidos iônicos (CaF_2 , $AgCl$, $BaSO_4$) , os íons dos átomos que os compõem, em geral, são determinantes do potencial e, por conseguinte, existirá uma determinada concentração de i.d.p. na qual a carga da superfície é zero. O ponto de carga zero é determinado experimentalmente pela medida dos valores do potencial zeta em função da concentração de i.d.p. No caso de minerais de composição mais complexa, como a fluorapatita, todos os cátions e ânions presentes no sistema (H^+ , OH^- , Ca^{+2} , $CaOH^+$, PO_4^{-3} , F^- , HPO_4^{-2} , $H_2PO_4^-$, etc.) contribuem para a determinação do potencial, sem que se possa precisar um par definido de i.d.p. Mesmo nessas condições, a carga elétrica das partículas depende do

valor de pH da solução, sendo possível a determinação do valor de pH que anule o potencial zeta, sendo este denominado ponto isoelétrico (p.i.e.) (CHAVES, 2009).

O p.i.e. constitui uma característica especial de um sistema mineral-solução, uma vez que a adsorção de surfactantes na DCE pode ocorrer no plano de cisalhamento e, portanto, o sinal e o valor do potencial ζ exerce influência significativa no processo de adsorção (CHAVES, 2009; LUZ, SAMPAIO & FRANÇA, 2010; SHAW, 1992; NGUYEN & SCHULZE, 2004).

3

Objetivos e relevâncias do trabalho

3.1.

Objetivo geral

Estudar a flotação do mineral apatita usando como biorreagentes a bactéria *Rhodococcus erythropolis* e o seu biossurfactante.

3.2.

Objetivos específicos

- Caracterizar e avaliar as propriedades físicas e químicas da amostra mineral, do concentrado bacteriano e do biossurfactante realizando ensaios de difração de raios X, fluorescência de raios X e espectrofotometria de infravermelho.
- Avaliar as propriedades superficiais do mineral antes e após interação com a bactéria *R. erythropolis* e com o biossurfactante com estudos de mobilidade eletroforética.
- Estudar o fenômeno de adesão da bactéria *R. erythropolis* sobre a superfície do mineral apatita com ensaios de bioadesão e imagens de microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a formação de espuma para diferentes valores de pH.
- Comparar o efeito da variação do pH e da concentração na flotabilidade da apatita usando a bactéria *R. erythropolis* e o biossurfactante.
- Identificar qual o melhor tempo de incubação da bactéria para produção do biossurfactante, levando em consideração o desempenho, volume e concentração do biossurfactante obtido.
- Identificar a função coletora ou espumante que a bactéria e o biossurfactante exercem como biorreagentes na flotação da apatita.

3.3. Relevância do trabalho

Este estudo é um esforço significativo no campo da bioflotação e do bioprocessamento da apatita, considerando a alta demanda por alimentos no mundo, a necessidade da concentração de apatita para fabricação de fertilizantes fosfatados, além da importante missão de buscar novas fontes de tecnologia renováveis e ambientalmente amigáveis.

A introdução da bioflotação com caráter multidisciplinar nos campos da bioquímica e da mineração trará uma nova perspectiva dos mecanismos de interação da bactéria *Rhodococcus erythropolis* com os minerais de apatita, podendo estender estes conhecimentos para aplicações em outros minerais e bactérias.

A *R. erythropolis* é um microrganismo com ampla gama de utilização. Apenas no acesso remoto da biblioteca PUC-Rio (DIVISÃO DE BIBLIOTECAS E DOCUMENTAÇÃO), que tem como banco de dados, além do catálogo da PUC, nomes de referência na área acadêmica, como Science direct, Maxwell, Capes, Academic Search, etc., ao buscar "*Rhodococcus erythropolis*" é possível encontrar 6275 documentos, do ano 1990 a 2017, entre artigos, dissertações, teses, livros, revistas, relatórios e patentes, sendo a grande maioria na área de biorremediação, medicina, genética, microbiologia e aplicações na indústria de petróleo. Apenas 130 destes documentos se referem ao estudo e aplicação de biossurfactantes. Isto prova que, apesar do importante potencial do uso deste biossurfactante no campo da bioflotação mineral, ainda existem poucas pesquisas desenvolvidas nesta área.

O uso de biossurfactantes mais eficientes do que os reagentes sintéticos será revolucionário aos conhecimentos na área do tratamento de minérios, principalmente no campo da concentração de minérios de baixo teor e maior complexidade.

4 Materiais e métodos

4.1. Amostras minerais

As amostras de apatita utilizadas nesta pesquisa foram obtidas junto a Mineração “Zé da Estrada” (Minas Gerais). Estas já haviam sido cominuídas e caracterizadas no CETEM, como descrito no fluxograma da Figura 7, para obtenção das frações granulométricas utilizadas nos ensaios experimentais.

Posteriormente, estas amostras foram caracterizadas quanti e qualitativamente por: análise mineralógica por difração de raios X para determinação das espécies e fases minerais e análise semiquantitativa por Fluorescência de raios X para determinação da pureza da amostra mineral. Por último, foi feita uma análise superficial da amostra mineral por estudos de mobilidade eletroforética realizado no Zetasizer Nano SZ da Malvern, a qual tem como objetivo determinar o potencial zeta da espécie em estudo.

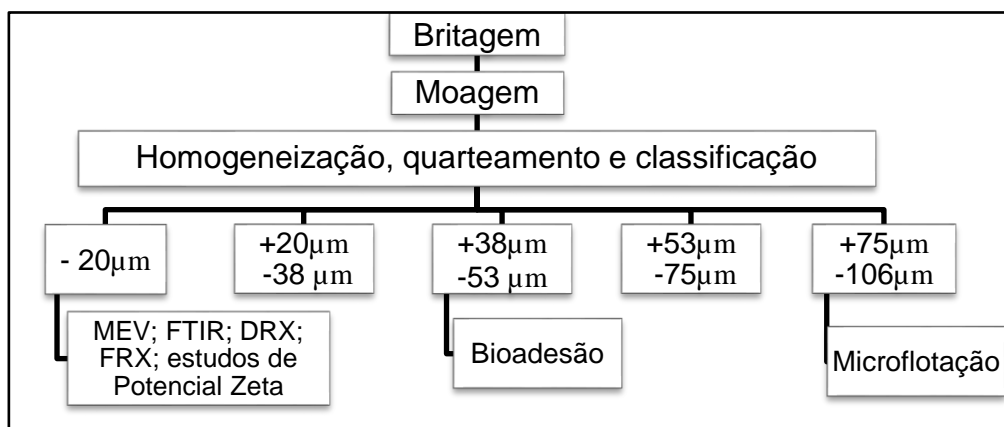


Figura 7 – Fluxograma do processo de cominuição, frações granulométricas e caracterização mineral.

Para cada ensaio a faixa granulométrica foi selecionada de acordo com as especificações do equipamento utilizado ou baseando-se em pesquisas semelhantes realizadas anteriormente por outros autores (OLIVEIRA, 2015; PUELLES, 2016; MERMA, 2012; BUENO, 2008)

4.2.

Preparação do concentrado bacteriano e condições de cultivo

Uma cepa de *R. erythropolis* obtida da Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais (CBMAI-UNICAMP) foi utilizada neste estudo. O meio sólido de manutenção foi feito utilizando 20,0 g/L de ágar e 30,0 g/L de *Tryptic Soy Broth* (TSB), em português caldo de soja tríptico, composto por 17,0 g/L de peptona de caseína-digestão pancreática, 3,0 g/L de peptona de farinha de soja, 2,5 g/L de glicose, 5,0 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 2,5 g/L de fosfato dipotássico (K₂HPO₄) e pH de 7,2. Além disso, a composição do meio líquido era a mesma que o meio sólido com a ausência de ágar e pH de 7,2. O TSB é um produto resultante da digestão da caseína do feijão de soja que fornece às células bacterianas compostos que funcionam como fontes de C (Carbono) e de N (Nitrogênio) (OLIVEIRA., 2015).

Após preparo das soluções do meio de cultivo utilizou-se dois tipos de vidrarias: placas de Petri (meio sólido) e Erlenmeyers (meio líquido) que foram esterilizados em uma autoclave a 1,2 atm de pressão, durante 20 minutos. O procedimento de incubação da bactéria nas vidrarias foi realizado em uma câmara de fluxo laminar para evitar contaminação durante a manipulação. Com as bactérias replicadas, as placas de Petri foram estocadas sob temperatura de $\pm 7^{\circ}\text{C}$ na geladeira para conservação e os Erlenmeyers, usados para crescimento bacteriano, foram incubados em agitadores rotativos a 150 rpm e temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ por 4 dias para produção de concentrado bacteriano e por 5 ou 6 dias para produção de biossurfactante (PUELLES, 2016; MERMA, 2012; OLIVEIRA, 2015).

Ao atingirem o tempo necessário de maturação, o caldo fermentado contido nos Erlenmeyers foi centrifugado durante 10 minutos a 4000 rpm, separando-se as bactérias do caldo de cultivo que foi descartado em seguida, obtendo-se o concentrado bacteriano. Este foi lavado duas vezes com água deionizada nas mesmas condições de centrifugação. Este concentrado foi levado à autoclave nas mesmas condições de esterilização das vidrarias (1,2 atm durante 20 minutos), com a finalidade de evitar a contaminação e de inativar as bactérias. Depois de atingir a temperatura ambiente o concentrado foi armazenado sob a temperatura de 7 °C..

Para determinação da concentração celular foi utilizado o método do peso seco, no qual o volume de 1 ml do concentrado bacteriano é colocado em um recipiente de massa conhecida e posto para secar na estufa a 50 °C por 24 horas. Após seco, com a massa e o volume conhecido é possível calcular a concentração.

4.3. Produção do biossurfactante

O método para extração do biossurfactante é idêntico ao do concentrado bacteriano até a etapa de lavagem. Após esta etapa é adicionado etanol e o recipiente com este conteúdo é inserido na autoclave para esterilização (pressão de 1,2 atm por um tempo de 20 minutos). Após esterilizado aguarda-se que o conteúdo esfrie até temperatura ambiente, para então novamente centrifugar com o intuito de separar a parte insolúvel (sólida), que é descartada, da parte solúvel (líquida) da qual será então obtido o biossurfactante. Os procedimentos para obtenção deste biossurfactante estão descritos no fluxograma da Figura 8. Este método de extração utilizando etanol foi baseado nos trabalhos de (MOREAU, POWELL & SINGH, 2003; PUELLES, 2016).

O biossurfactante produzido foi armazenado sob refrigeração (± 7 °C) durante, no máximo, 7 dias. Este pressuposto baseou-se nos testes de biodegradabilidade de biossurfactante conduzidos por Baptista

(2007), que avaliou a biodegradabilidade de uma substância orgânica hidrossolúvel e não volátil, permitindo a determinação da biodegradação total (BAPTISTA, 2007; PEI, ZHAN & ZHOU, 2009).

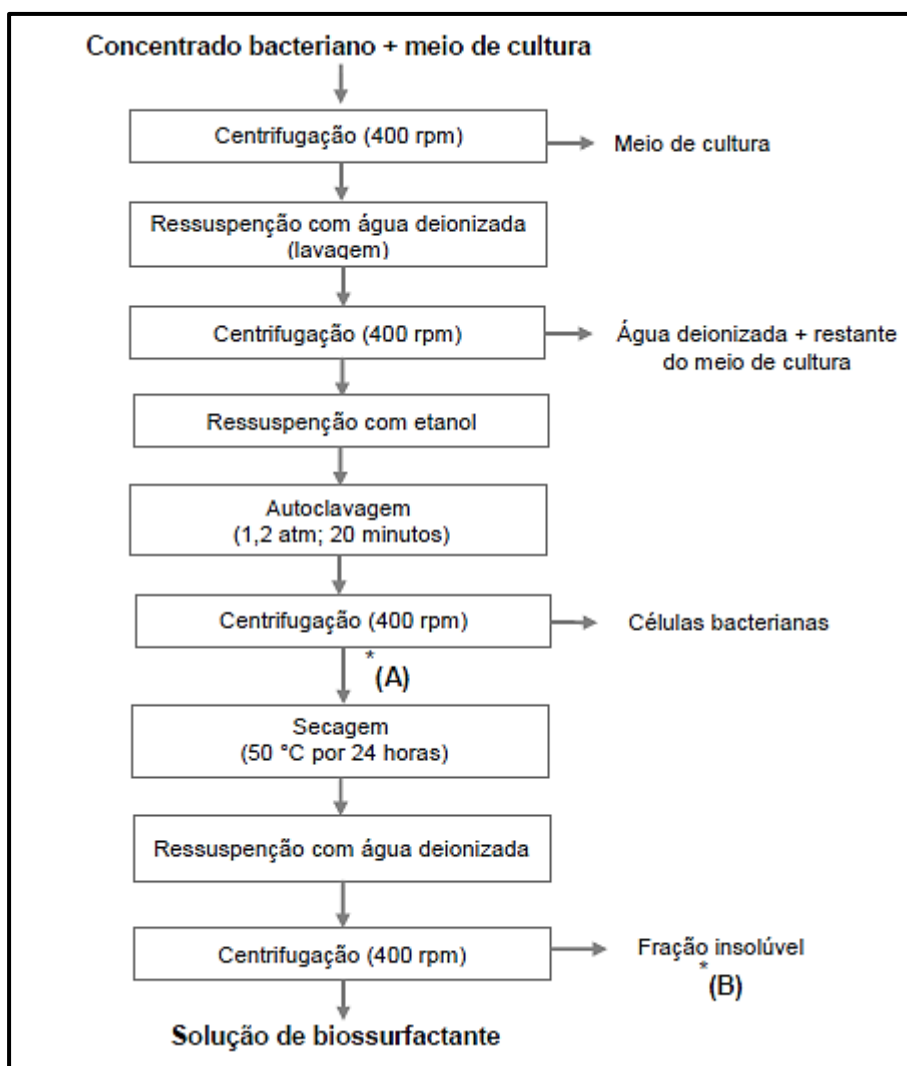


Figura 8 - Fluxograma de extração do biossurfactante

Após a secagem da parte solúvel (A) pesa-se a massa obtida, para que, posteriormente, com a massa do restante insolúvel (B), seja encontrada, por diferença de massa, a concentração do biossurfactante.

Os biorreagentes foram produzidos por lote, em quantidade suficiente para realização de todos os ensaios, incluindo duplicatas e triplicatas, possibilitando análises comparativas entre os resultados

obtidos. Quando havia necessidade de realizar novos ensaios era preparado um novo lote do biorreagente desejado.

4.4.

Ensaios de espectrofotometria de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram usados para identificar os grupos funcionais presentes nos biorreagentes e na superfície do mineral apatita, antes e após a interação com as células bacterianas e com o biossurfactante. Amostras do biossurfactante e do concentrado bacteriano foram secas a 50°C por 24 horas e as perdas das amostras orgânicas não foram significativas. Para a amostra mineral foi utilizada a fração de tamanho mais fina (<20µm). Para obtenção dos espectros da apatita após a interação com os biorreagentes, a amostra mineral foi condicionada em uma solução com concentração de 150 mg/L, para cada biorreagente, durante 10 minutos, no valor de pH igual a 5, com agitação constante. Após o condicionamento, as amostras foram levadas a estufa, separadamente, para secarem a 50 °C durante 24 horas. O pó resultante da secagem de cada amostra foi apropriadamente misturado com uma matriz de brometo de potássio (KBr) numa relação de 1/100.

As análises foram realizadas no espectrofotômetro Nicolet 6700 FTIR. A aquisição dos dados foi realizada no modo absorbância. Os espectros foram coletados numa resolução 4 cm⁻¹ após 120 varreduras.

4.5.

Estudo de Potencial Zeta

As medidas de potencial zeta para a bactéria *R. erythropolis* assim como para o mineral apatita foram determinadas no equipamento de eletroforese Zetasizer Nano da Malvern. O equipamento permite determinar o valor de potencial zeta baseado da velocidade da partícula submetida a uma diferença de voltagem entre dois eletrodos.

Para avaliar o Ponto Isoelétrico (PIE) de cada uma das amostras,

foram preparadas em soluções de eletrólito de suporte de 10^{-2} mol/L, 10^{-3} mol/L e 10^{-4} mol/L NaCl para a bactéria e de 10^{-4} mol/L de NaCl para a apatita, separadamente (concentrações selecionadas levando em consideração estudos anteriores de Puelles (2016), Merma (2012) e Oliveira (2015)), suspensões de *R. erythropolis* (levando em consideração a concentração que apresentou inicialmente maior flotabilidade, 125 mg/L) e de apatita com concentração de 70 mg/L estabelecida após testes, de modo que a concentração não fosse muito baixa para permitir que o equipamento conseguisse identificar as partículas minerais e fizesse as medições e que não causasse entupimento nos tubos de análise, o que acontecia quando eram utilizadas concentrações elevadas. As medições do potencial foram feitas em função do pH e estes valores foram ajustados com soluções de 0,05 mol/L de NaOH e HCl. Para garantir uma medição confiável, tomou-se a média de 20 valores e o valor do desvio padrão.

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 10^{-4} mol/L NaCl.

4.6.

Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação apatita-bactéria

Este ensaio foi realizado com a finalidade de obter uma imagem que permitisse observar o fenômeno de adesão das células de bactéria *Rhodococcus erythropolis* na superfície do mineral. Para tal, foi feito o condicionamento da apatita com a bactéria por 10 minutos. Após o condicionamento as partículas de apatita que sedimentaram foram levadas a estufa para secar por 24 horas a 50°C. O pó resultante da amostra seca foi armazenado em um recipiente bem vedado e levado ao laboratório de tecnologia mineral do CETEM, para lá ser metalizada e levada para um

microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 400. A metalização consiste em recobrimento a amostra em um sistema à vácuo do tipo BAL-TEC, com a finalidade de possibilitar a condução da corrente elétrica em espécimes sólidos não condutivos e melhorar o contraste (OLIVEIRA, 2015).

4.7.

Ensaio de bioadesão bacteriana

Os ensaios de bioadesão foram realizados para determinar o efeito da concentração bacteriana na adesão da bactéria *R. erythropolis* à superfície do mineral de apatita. Nestes ensaios foi utilizado 0,25 g de amostra mineral, de faixa granulométrica entre 38 e 53 μm , fração intermediária resultante da análise granulométrica, e água deionizada, em soluções de 3,5 mL, com diferentes concentrações de concentrado bacteriano (75, 100, 125 e 150 mg/L) e condicionadas durante 5 minutos depois de se ajustar o pH (2, 3, 5, 7 e 9) com soluções de 0,05 M de NaOH e HCl a 25 ° C.

Após o condicionamento, as soluções preparadas foram deixadas em repouso até que as partículas minerais fossem sedimentadas e logo depois foram feitas as medições de absorvância de UV em cada amostra no espectrofotômetro Shimadzu. Para determinar a quantidade de concentrado bacteriano aderido na superfície da apatita, foi calculada a diferença entre as medidas de absorvância do concentrado bacteriano e do sobrenadante da solução mineral-bactéria. A curva de calibração das absorvâncias para diferentes concentrações de concentrado bacteriano é mostrada no anexo B.

4.8.

Ensaio de Microflotação

Levando em consideração que este tópico do trabalho é o principal a ser discutido, já que dele serão obtidos os resultados de flotabilidade da

apatita com cada biorreagente, foi realizado um planejamento fatorial completo, para que fosse possível projetar o número mínimo de ensaios a serem realizados sem prejuízo da qualidade das informações, ou seja, obtendo resultados de boa confiabilidade. Cabe ressaltar que em um planejamento fatorial, as réplicas ou repetições dos experimentos são de fundamental importância e servem para determinar o erro experimental na resposta em estudo.

Dentre os métodos de planejamento experimentais disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que, em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (CUNICO *et al.*, 2008).

O planejamento fatorial foi feito com auxílio do software *Minitab 18*, e foi considerada a realização de duplicatas de para cada ensaio. Portanto os dados obtidos através do software podem ser vistos na Tabela 2-1.

Tabela 4-1. Resumo do experimento fatorial

Experimento fatorial multinível (Resumo do experimento)			
Fatores:	3 (biorreagente; pH e concentração)	Réplicas	2
Ensaios base:	70	Total de ensaios:	140
Nº de níveis: 2 (BS e bactéria); 5 (pH = 3,5,7,9,11); 7 (concentração (mg/L) = { 0,25,50,75,100,125,1			

Dessa forma, deveriam ser realizados, no mínimo, 140 ensaios de microflotação, ao considerar a realização de duplicatas. Estes ensaios foram conduzidos em tubo de *Hallimond* modificado. Para tal foi necessário montar uma linha experimental (Figura 9), composta por um rotâmetro para medir a vazão de ar, um bolhômetro 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* modificado.

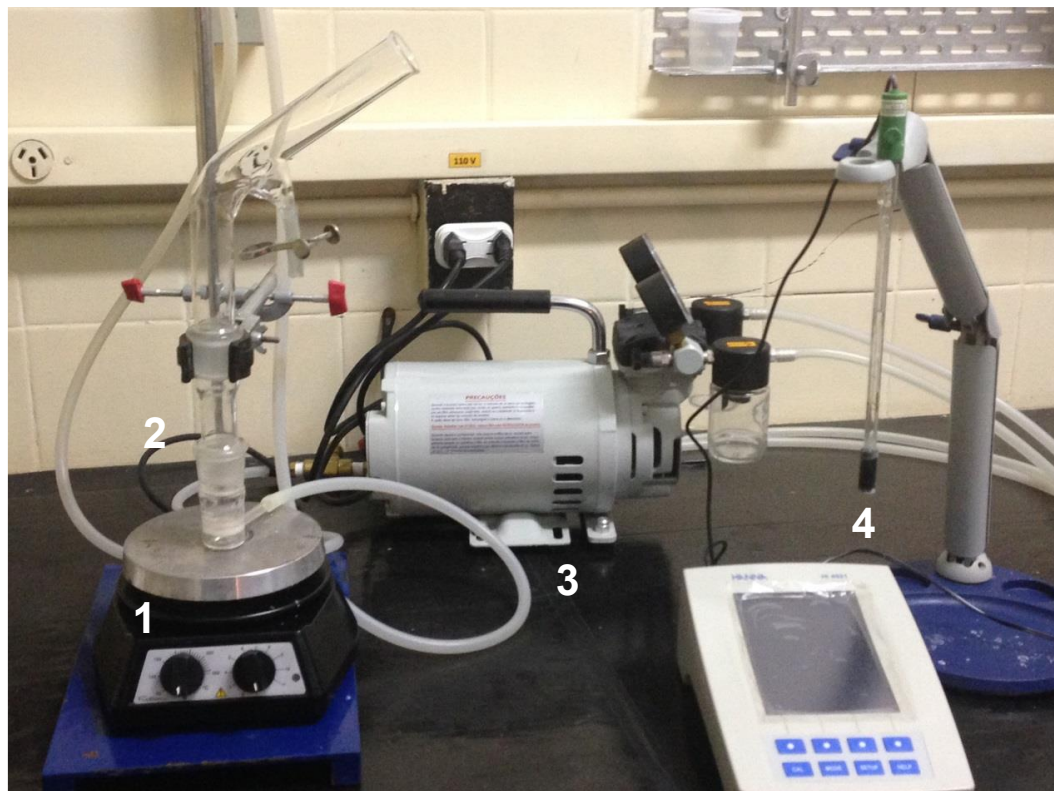


Figura 9 - Sistema utilizado para realização da microflotação: 1. Agitador e aquecedor; 2. Tubo de *Hallimond*; 3. Compressor; 4. Medidor de pH (pHmetro)

Antes de realizar os ensaios, o rotâmetro foi calibrado para garantir uma vazão de ar de $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Foi utilizado água deionizada e 1 g de amostra mineral com granulometria entre $(75 - 106) \mu\text{m}$. A apatita foi condicionada por 2 minutos, tanto com o biorreagente como com o concentrado bacteriano, a diferentes concentrações (valores entre 25 e 150 mg/L) a um valor determinado de pH (valores entre 3 e 11). Os valores de pH foram ajustados com alíquotas de soluções diluídas de NaOH e HCl e, após o condicionamento, foi feita a flotação da apatita, com a bomba de ar ligada, em um tubo de *Hallimond* com volume de 160 mL, durante 2 minutos. A flotabilidade corresponde à porcentagem de massa recuperada.

Foram analisadas as características e propriedades, como bioespumante e biocoletor, da bactéria e do biossurfactante e; posteriormente, foi estudada a flotabilidade da apatita em função do pH

com diferentes concentrações de bactéria e biossurfactante e em função da concentração destes em diferentes valores de pH.

5

Resultados e discussões

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho, referentes à caracterização dos biorreagentes e do mineral, à produção do biossurfactante, aos ensaios de potencial zeta, de bioadesão da bactéria, análises de infravermelho e, finalmente, aos resultados do processo de microflotação, usando a cepa *Rhodococcus erythropolis* e o seu biossurfactante. Concomitante, serão realizadas as discussões destes resultados baseando-se naqueles reportados na literatura.

5.1.

Preparação e caracterização da apatita

O mineral utilizado neste trabalho foi a apatita. Esta já havia, sido exposta a operações de britagem, moagem, homogeneização, quarteamento e classificação, separando a amostra em cinco frações granulométricas, que foram usadas em diferentes tipos de ensaio neste trabalho. Porém, foi percebido que a amostra possuía contaminantes ferromagnéticos, provavelmente, provenientes do moinho de bolas em que foi cominuída.

Foi então necessário retirar, com auxílio de um ímã, estes contaminantes da amostra, além de também ter sido necessário “des-hidrofobizar” as frações granulométricas mais finas com vários banhos de hidróxido de sódio em diferentes concentrações por duas ou mais horas. Após cada banho realizado era feito um teste de microflotação para avaliar a percentagem de apatita que continuava hidrofóbica, até que, no mínimo, 97% da apatita se tornassem hidrofílica. Estas frações de apatita se encontravam hidrofóbicas devido a adição de reagentes utilizados em

experimentos anteriores realizados por outros pesquisadores.

Os componentes que constituíam a amostra mineral, assim como a identificação do tipo de apatita utilizada nesta pesquisa foram determinados por meio da fluorescência de raios X (FRX) e da difração de raios-X (DRX). A Tabela 5-1 mostra os resultados obtidos na FRX.

Tabela 5-1. Análise química da amostra mineral (Fluorescência de raios-x)

Componentes	(%)
P ₂ O ₅	28,34
CaO	64,02
SiO ₂	6,90
Cl	0,25
SO ₃	0,18
Fe ₂ O ₃	0,11
ThO ₂	0,07
SrO	0,05
MnO	0,05
Y ₂ O ₃	0,02
Outros	0,01
Total	100%

A Figura 10 mostra o padrão de DRX obtido com o nosso ajuste (linha vermelha), confirmando que a fase analisada é a apatita pura. Da mesma forma os valores de P₂O₅ e de CaO obtidos na FRX, além confirmar tratar-se do mineral apatita, permitem afirmar, considerando a presença de cloro (Cl) e ausência de flúor (F) e de hidróxido (OH), que, trata-se de uma amostra de cloroapatita ou, também, há possibilidade de que em alguma fase da formação e cristalização do mineral houve a substituição do flúor por cloro. Ao lado superior direito do DRX pode-se ver as informações sobre a célula unitária e o tamanho médio dos cristais da apatita. A relação CaO/P₂O₅ é de, aproximadamente, 2,26.

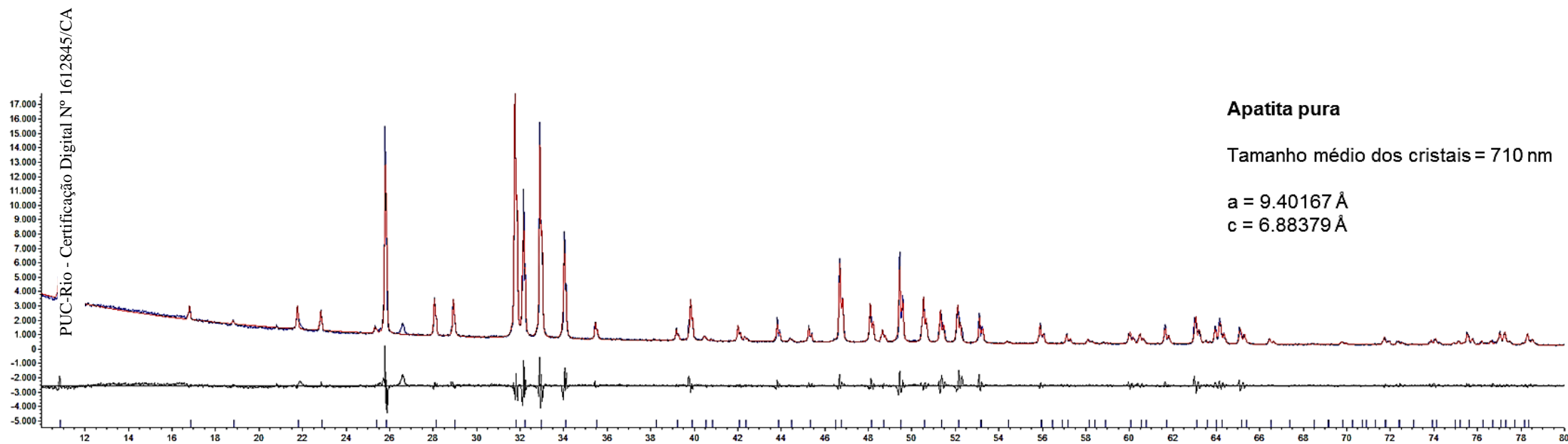


Figura 10 - Análise qualitativa da amostra (DRX)

5.2.

Produção de concentrado bacteriano e biossurfactante

No cultivo de microrganismos deve ser considerado o tempo de adaptação das células assim como as diferentes etapas de crescimento para obtenção de uma maior produção de biomassa (concentrado bacteriano) e, conseqüentemente, de biossurfactante (BOTERO, TOREM & MESQUITA, 2007). O estudo realizado por Oliveira (2015) demonstra que a *R. erythropolis*, em meio de cultura de TSB, atinge a concentração máxima em torno de 60 horas de crescimento, iniciando, em seguida, fase estacionária. Este estudo também relata que no meio de cultura TSB, a composição do concentrado bacteriano é maior em quantidade de proteínas, o que foi essencial para a escolha deste meio de cultura, já que as bactérias que apresentam maior quantidade de proteínas na sua parede celular contribuem com uma característica mais hidrofóbica, enquanto os polissacarídeos presentes na superfície da bactéria fornecem uma característica mais hidrofílica.

Após a obtenção da biomassa (Figura 11), esta foi centrifugada e lavada duas vezes com água deionizada para remover o caldo de cultivo e seguir com as etapas posteriores para produção do biossurfactante (Figura 8 - Fluxograma de extração do biossurfactante, pág. 57). Um protocolo semelhante foi usado por Mesquita *et al.* (2003); Puelles (2016) e Lang & PHilp (1998) que relataram que os surfactantes produzidos por bactérias do gênero *Rhodococcus*, em condições de crescimento ilimitado, possuem, predominantemente, trealolípidos associados às células, portanto supõe-se que biossurfactante estava ligado à membrana celular da bactéria.



Figura 11 – Amostras de biossurfactante (esquerda) e do concentrado bacteriano (direita)

A bactéria foi incubada num agitador rotatório a 125 rpm por 4 dias para produção do concentrado bacteriano. Para determinação do tempo de incubação da bactéria para produção do biossurfactante foram realizados testes variando o tempo em 4, 5, 6 e 7 dias. O período de incubação de 4 dias, semelhante ao tempo de produção da biomassa, foi o primeiro a ser descartado, devido a obtenção de biossurfactantes com baixo volume e concentração, em média 570 ppm. Posteriormente, descartou-se a possibilidade de incubação por 7 dias, tendo em vista que havia maior quantidade de perdas, pois um número considerável de Erlenmeyer, contendo os cultivos, se encontravam na fase de lise celular em que ocorre o processo de destruição ou dissolução das células causada pela ruptura da parede celular bacteriana (FOX, 2016). Dessa forma o cultivo ficava aparentemente deteriorado, apresentando cor variando do marrom escuro ao preto e odor bastante desagradável, sendo necessário descartá-los.

Restando duas possibilidades, 5 e 6 dias, foi observado que para o primeiro obtinha-se um biossurfactante com uma média de concentração menor, em torno de 1.540,56 mg/L, enquanto que, para um tempo de incubação igual de 6 dias a concentração média do biossurfactante produzido era em torno de 3.283,34 mg/L. Porém, com relação ao

desempenho de flotabilidade foi observado que não houve grande diferença nos valores de recuperação mineral, a diferença de flotabilidade entre os dois não ultrapassou 2%, dando margem a escolher entre ganho de tempo e/ou de concentração, dependendo da demanda e disponibilidade de tempo.

Apesar do biossurfactante, produzido após seis dias de incubação da bactéria, apresentar maior concentração, nem mesmo este superou os altos valores de concentração dos concentrados bacterianos produzidos, que apresentaram concentração média em torno de 20.000 mg/L. Outro detalhe importante é a grande quantidade de cultivo necessária, entre 3 e 4,5 litros, para obtenção de um pequeno volume de biossurfactante, entre 100 e 150 ml. Em média a cada litro de cultivo foram produzidos de 1500 a 3000 mg de biossurfactante, situação semelhante foi relatada por Puelles (2016) e Fazaelpoor *et al.* (2010) que precisaram de grande quantidade de cultivo para obtenção de pouco biossurfactante. O produto final, o biossurfactante, foi utilizado nos testes de flotação.

É válido destacar que o biossurfactante pode ser composto de outras substâncias apolares, tais como fosfolípidos, ácidos graxos, aminolípidos, além dos trealolípidos, devido à baixa seletividade do etanol e à lise celular como resultado da alta temperatura e pressão que ocorrem na autoclave. DESAI & BANAT (1997) também relataram baixas recuperações de biossurfactantes extraídos de *R. erythropolis* usando solventes como metanol, éter dietílico, pentano, acetona, clorofórmio e diclorometano.

5.3.

Análises de espectrofotometria de infravermelho

5.3.1.

Análises de espectrofotometria de infravermelho da bactéria *Rhodococcus erythropolis* e do biossurfactante

Os compostos presentes na parede celular estão associados com os grupos funcionais que interagem com as superfícies minerais. A

identificação das espécies que formam a parede celular bacteriana é fundamental para entender o mecanismo de adesão à superfície mineral e as propriedades anfóteras inerentes às bactérias. De acordo com a literatura (GARIP, GOZENB & SEVERCAN, 2009), o espectro de infravermelho encontrado nos ensaios exibem os picos equivalentes a números de onda característicos dos compostos atribuídos aos grupos funcionais encontrados na parede celular da bactéria.

A Figura 12 apresenta o espectrograma de infravermelho da parede da bactéria *R. erythropolis* e os comprimentos de onda mais importantes. Os resultados do espectrograma são comparados com as análises da literatura. Assim segundo SCHMITT *et al.* (1998), SHARMA (2001), GARIP *et al.* (2009) e YANG *et al.* (2013) verifica-se os seguintes números de onda: 2924,59 cm^{-1} e 2854,80 cm^{-1} correspondentes a grupos de estiramento assimétrico CH_2 ; 1650,94 cm^{-1} dos grupos de estiramento $\text{C}=\text{O}$ de aminas primárias na proteína; 1542,61 cm^{-1} atribuídos às vibrações de dobramento NH de amida II na proteína; 1453,58 cm^{-1} dos grupos de dobramento CH_2 de lipídeos; 1401,33 cm^{-1} correspondentes a grupos de vibrações de dobramento de CH_3 ; 1235,74 cm^{-1} dos grupos de estiramento assimétrico PO_2^- , 1070,89,02 cm^{-1} atribuídos a grupos de estiramento simétrico PO_2^- e números de onda de 696,73 cm^{-1} que também podem ser atribuídos a dobramentos $\text{C}=\text{O}$ e dobramentos COO^- dos grupos carboxílicos.

Da mesma maneira, a Figura 13 apresenta o espectrograma de infravermelho do biossurfactante com os comprimentos de onda mais importantes. O comprimento de onda que apresentou maior intensidade, entre 1620 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} , é característico de uma vibração de keynote ($\text{C} = \text{O}$), que são amidas, derivadas de ácidos carboxílicos, também denominadas carboxamidas, (IUPAC, 2017; SHARMA., 2001). A literatura mostra que os comprimentos de onda de 1476,17 cm^{-1} , 2927,62 cm^{-1} e 2855,60 cm^{-1} são correspondentes a grupos de estiramento assimétrico CH_2 ; os de 1311,37 cm^{-1} e 1405,17 cm^{-1} são correspondentes a grupos de vibrações de dobramento de CH_3 ; os de 1079,31 cm^{-1} correspondem a aminas alifáticas (C-N); 3092,07 e 3127,45 cm^{-1} podem ser atribuídos às vibrações de dobramento NH de amida secundárias na proteína; e, por fim,

os comprimentos de onda de $542,35\text{ cm}^{-1}$ são os mais difíceis de distinguir, pois podem ocorrer em um grande número de absorções devido a uma variedade de vibrações do tipo C-X (X = Cl, Br ou I), podendo ser, por exemplo, cloroalcanos, bromoalcanos ou iodoalcanos.

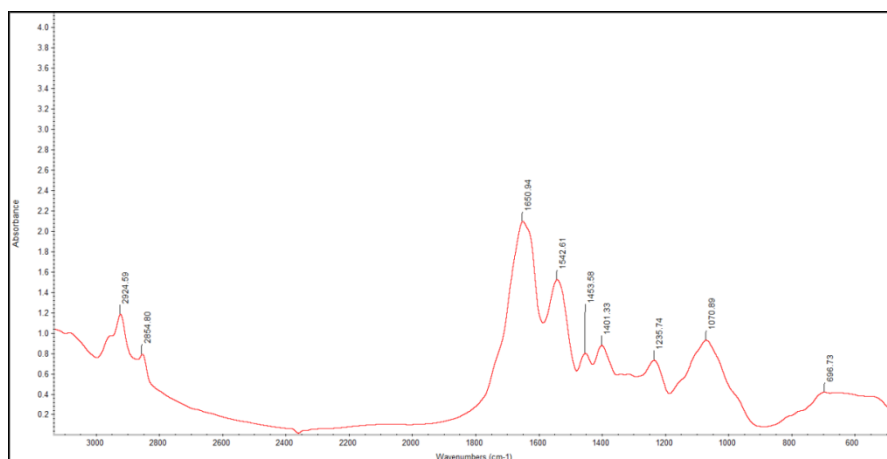


Figura 12 – Espectrograma de Infravermelho da bactéria *Rhodococcus erythropolis* e principais bandas de absorbância

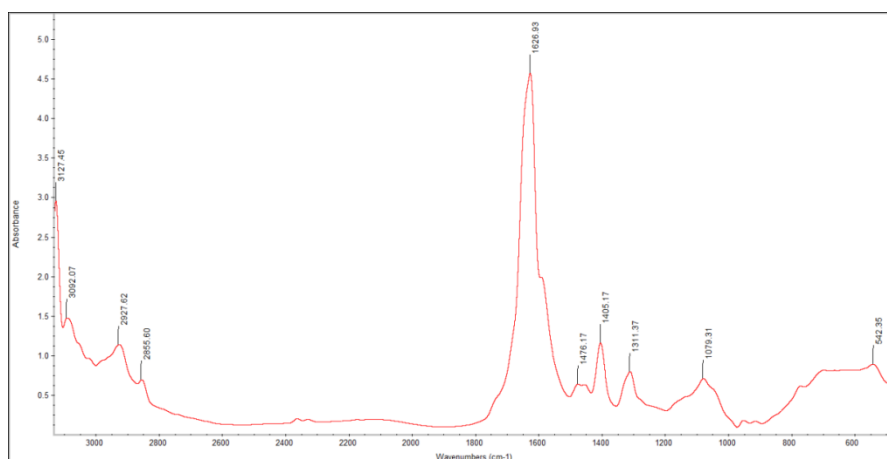


Figura 13 - Espectrograma de Infravermelho do biossurfactante e principais bandas de absorbância

5.3.2.

Análises de espectrofotometria de infravermelho do mineral apatita antes e depois da interação com os biorreagentes

A Figura 14 apresenta o espectrograma de infravermelho do mineral apatita e os comprimentos de onda mais importantes. Os comprimentos de onda de maior intensidade ($1095,25\text{ cm}^{-1}$; $1041,52\text{ cm}^{-1}$, $602,68\text{ cm}^{-1}$;

571,26 cm^{-1}) são os mais difíceis de distinguir, pois ocorrem em um grande número de absorções devido a uma variedade de vibrações do tipo C-X (X = Cl, Br ou I), podendo ser, por exemplo, cloroalcanos, bromoalcanos ou iodoalcanos, porém considerando a análise de fluorescência de raios-X da apatita, pode-se deduzir que são picos de vibração do tipo cloroalcano. Os outros dois comprimentos de onda menores, 2921,91 cm^{-1} e 1997,04 cm^{-1} , são correspondentes a grupos de estiramento assimétrico CH_2 e C-C, respectivamente.

De acordo com DEO & NATARAJAN (1997), devido às interações micróbio-minerais, a química de superfície das células bacterianas e também dos minerais que interagem podem ser significativamente alteradas. Este fenômeno ocorre na superfície da apatita que passa a exibir modificações no espectro de absorbância, apresentando, após a interação, picos característicos da bactéria, dos grupos CH_2 , C-X e álcoois secundários aminas alifático (Figura 15). O mesmo ocorre na interação da apatita com o biossurfactante. A superfície da apatita passa a apresentar picos característicos do biossurfactante, dos grupos CH_2 , CH_3 e do grupo de Keynote. Todos estes grupos estão associados com os compostos presentes na parede celular da bactéria *Rhodococcus erythropolis* e do biossurfactante e estão aderidos, interagindo com a superfície da apatita (Figura 16), através da interação “ponto a ponto” no caso da bactéria ou da interação entre as superfícies como no caso do biossurfactante.

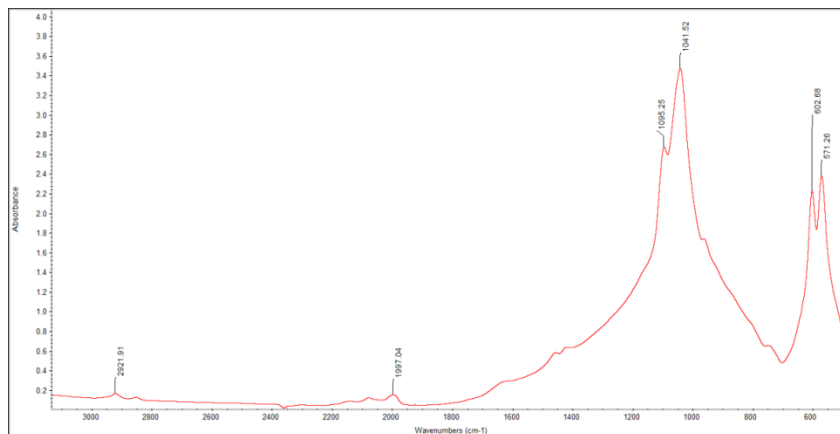


Figura 14 - Espectrograma de Infravermelho do mineral apatita e principais bandas de absorvência

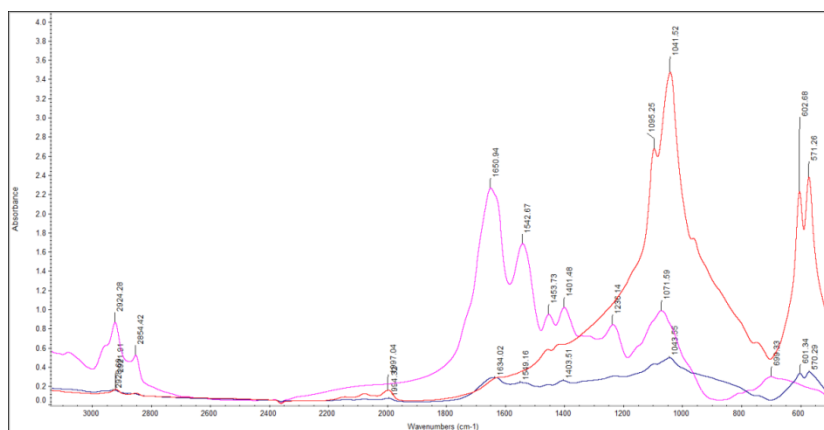


Figura 15 - Espectrograma de Infravermelho do mineral apatita antes (em vermelho) e depois da interação com a bactéria (em azul) e principais bandas de absorvência. (em roxo: perfil da bactéria *R. erythropolis*).

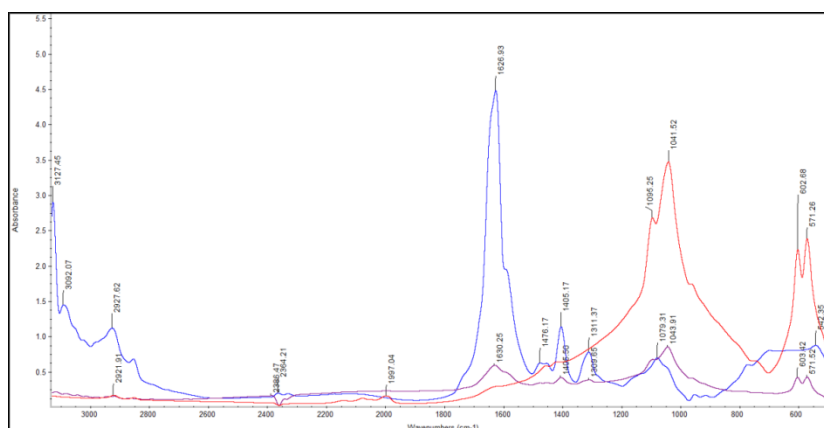


Figura 16 - Espectrograma de Infravermelho do mineral apatita antes (em vermelho) e depois da interação com o biossurfactante (em roxo) e principais bandas de absorvência. (em azul: perfil do biossurfactante).

5.4.

Estudo de potencial Zeta das amostras

5.4.1.

Medidas de potencial zeta da bactéria *Rhodococcus erythropolis*

Com o intuito de avaliar possível variação nas propriedades eletrocinéticas da bactéria *Rhodococcus erythropolis*, foram realizadas medidas de potencial ζ , feitas para suspensão de bactérias inativas. O cloreto de sódio (NaCl) foi escolhido como eletrólito de suporte baseado em estudo anterior (OLIVERA, 2015), em que foi demonstrado que o NaCl apresenta maior estabilidade quando comparado com o KCl (cloreto de potássio). Os valores do potencial zeta encontrados neste trabalho, comprovam este fato, pois demonstraram relativa estabilidade das células em suspensão em um eletrólito de suporte NaCl, em concentrações de 10^{-2} M, 10^{-3} M e 10^{-4} M. Após realizar as medidas de potencial zeta da bactéria inativa (Figura 17) e notar que a concentração do eletrólito suporte não interferia no comportamento das curvas, foi escolhida a menor concentração de NaCl (10^{-4} M) para prosseguir com os ensaios de potencial zeta.

A bactéria *Rhodococcus erythropolis* apresenta superfície celular negativamente carregada, devido, principalmente, à sua composição, na qual são encontrados diversos grupos funcionais negativos como hidroxilas, carboxilas, fosfatos entre outros (MESQUITA, 2000) e esta carga superficial pode ser observada através de medidas de potencial zeta.

A Figura 17, apresenta os resultados das curvas de potencial zeta da bactéria *Rhodococcus erythropolis* inativa em função do pH, como pode ser observado, o PIE da bactéria fica em torno de pH igual 2,2. Valor idêntico ao encontrado em trabalhos anteriores realizados com esta bactéria (OLIVERA, 2015) e relativamente próximo dos valores encontrados em outros trabalhos com bactérias do mesmo gênero, como por exemplo, nos estudos de MERMA (2012) e PUELLES (2016) que encontraram PIE em torno de 2,8 e 3,2 nos trabalhos de MESQUITA, LINS & TOREM (2003), BOTERO, TOREM & MESQUITA (2008). A diferença

observada pode ser relacionada a vários fatores, entre eles são, as condições e tipo de cultivo.

Na faixa de pH acima do ponto isoelétrico as células são carregadas negativamente. Tal carga superficial faz com que a superfície da bactéria possa ter interações eletrostáticas com espécies catiônicas, daí a sua importância nos processos de flotação. Vale mencionar que essa faixa de trabalho foi escolhida porque em valores extremos de pH o poder de captação da bactéria é reduzido (PUELLES, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

VAN DER WAL *et al.* (1997) demonstraram que para estes microrganismos os grupos aniônicos dominam os grupos catiônicos. Este parece ser um fenômeno geral e está em concordância com a observação de que a maioria das células bacterianas apresenta pontos isoelétricos em valores de pH abaixo de 4,0; como observado neste trabalho.

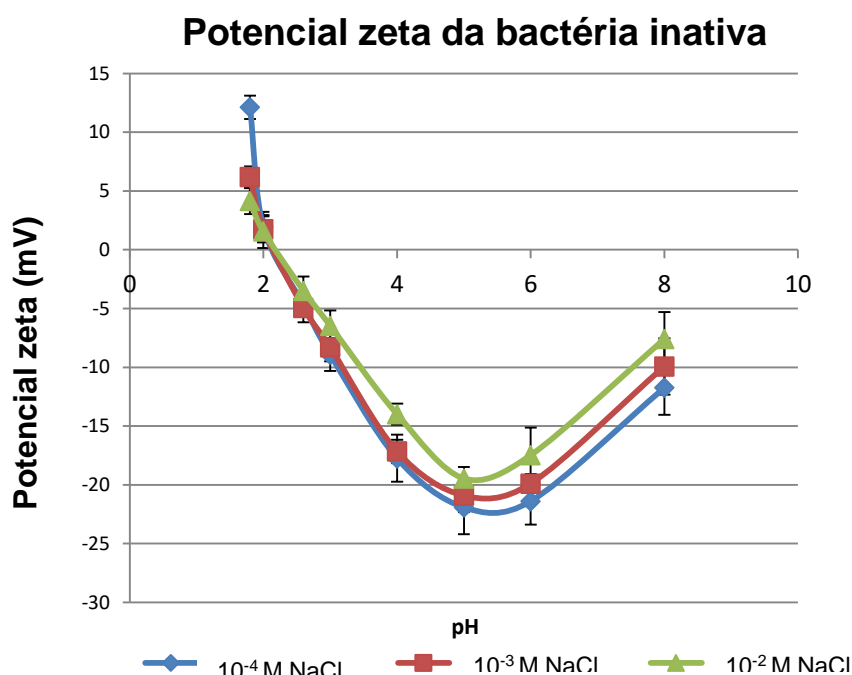


Figura 17 - Potencial zeta da bactéria *R. erythropolis* em função do pH em diferentes concentrações do eletrólito suporte

De maneira geral, todas as células bacterianas são cercadas por uma parede celular que podem ser compostas de peptidoglicano (lipo)

polissacarídeos, (lipo) proteínas, enzimas e ácidos micólicos. A maioria destas macromoléculas tem mostrado grupos funcionais como carboxila, fosfato, sulfato ou grupos amino. Alguns destes grupos apresentaram cargas aniônicas ou catiônicas, assim a parede bacteriana apresenta propriedades anfotéricas (SILVA, 2011), ou seja, dependendo do pH a densidade de cargas pode ser predominantemente positiva ou negativa. Alguns estudos têm sido realizados com o propósito de determinar a concentração de grupos positivos e negativos na parede celular. Todos eles apontam para uma predominância de grupos aniônicos sobre os catiônicos, onde a afinidade química, tanto de prótons como de íons hidróxido, por grupos básicos e ácidos fracos são a força motriz para formação de carga na parede celular bacteriana (MESQUITA, 2000; PUELLES, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017; ZHENG, ARPS & SMITH, 2001; WILLS & NAPIER-MUNN, 2006; VAN DER WAL *et al.*, 1997; OLIVERA, 2015; FARAHAT, HIRAJIMA & SASAKI, 2010; DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015).

5.4.2.

Medidas de potencial zeta da apatita antes e depois do contato com a bactéria *Rhodococcus erythropolis* e com o biossurfactante

Com o motivo de avaliar a possível variação nas propriedades eletrocinéticas da apatita em presença de células da bactéria *Rhodococcus erythropolis* e do biossurfactante extraído desta, foram realizadas medidas de potencial zeta do mineral apatita, antes e após interação com estes.

Sabe-se que quando um mineral é submerso em água este adquire uma carga superficial negativa, devido aos fenômenos de hidratação e dissolução que ocorrem na superfície mineral (MERMA, 2012). Esta carga superficial negativa pode ser comprovada ao observar a Figura 18. Esta figura apresenta os valores de potencial zeta da apatita, podendo ser observado que, neste trabalho, não foi possível encontrar o valor do PIE das amostras de apatita.

Segundo a literatura (BARROS, FERREIRA & PERES, 2008; KOU, TAO & XU, 2010; MERMA, 2012; MERMA, HACHA & TOREM, 2017) o PIE da apatita pode variar dependendo de diversos fatores, entre eles, sua

composição, origem do mineral e o método usado para determinar o potencial zeta, além do tempo de acondicionamento da amostra em solução. Por tal motivo existe uma ampla faixa de valores de pH (de 1,8 a 8) para o PIE deste mineral. Os ensaios foram realizados nessa pesquisa em uma faixa de pH com valores de 2 a 11, assim pode-se dizer que o PIE da apatita em questão encontra-se abaixo de pH 2, estando entre $1,8 < \text{pH} < 2$.

As figuras 18 e 19 apresentam os gráficos com o perfil de potencial zeta do mineral apatita antes e depois do contato com os biorreagentes, em função do pH. Como pode ser observado o PIE do mineral em contato com biossurfactante fica em torno de pH 2,62 e o do mineral com a bactéria fica em torno do pH 2,61, ou seja, pode-se afirmar que o valor de PIE foi praticamente o mesmo quando o mineral esteve em contato com a bactéria ou com o biossurfactante.

Na Figura 18 foi observada uma discreta mudança no perfil do potencial zeta da apatita próximo ao PIE da bactéria. No valor de pH próximo ao PIE da bactéria (pH igual a 2,2) a curva da interação apatita-bactéria apresenta valores semelhantes aos da curva da bactéria, o que sugere que existe maior adesão da bactéria nesta faixa de pH. Este comportamento esta em concordância com os resultados apresentados no tópico 5.8.

Porém, com o incremento dos valores de pH observa-se que a curva de interação da apatita com a bactéria tem comportamento mais próximo à curva do potencial zeta do mineral. Este comportamento sugere que a interação da bactéria com a apatita não é eletrostática, pois se assim fosse, a bactéria com caráter aniônico iria, por comportamento das cargas opostas, se aderir a superfície mineral e tornaria a curva da interação mais negativa. O que ocorreu foi exatamente contrário, a curva da interação ficou mais positiva dando a entender que as partículas minerais e as células de bactéria se repeliram.

Os valores de potencial zeta da amostra mineral depois da interação com a bactéria e da interação com o biossurfactante foram similares. Os

valores de potencial zeta foram próximos em todos os valores de pH. Assim como ocorreu com a curva mineral-bactéria, a curva de interação com o biossurfactante teve valores semelhantes à curva da bactéria no entorno do ponto isoelétrico da bactéria.

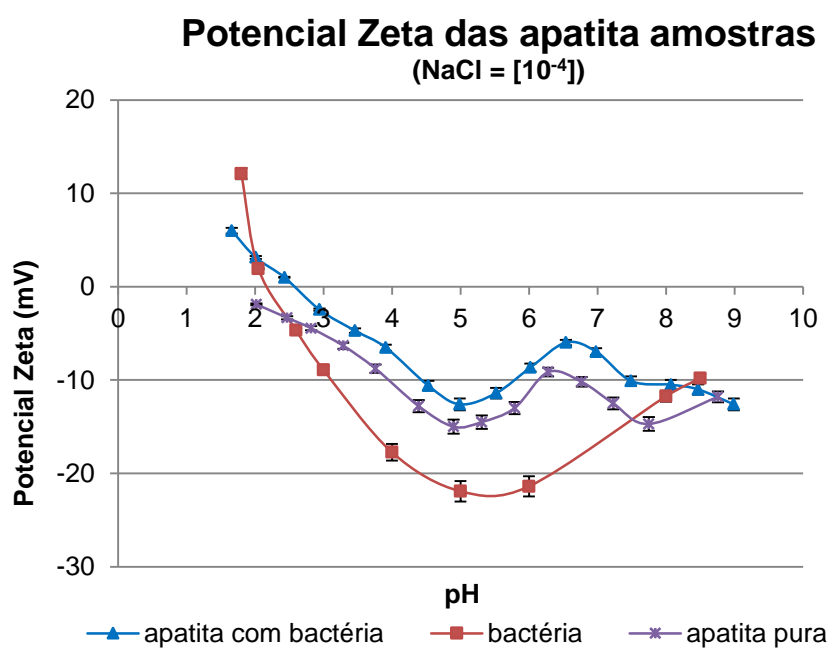


Figura 18 - Potencial zeta do mineral apatita antes e depois da interação com a bactéria *R. erythropolis* (eletrólito, NaCl : 10^{-4} mol/L).

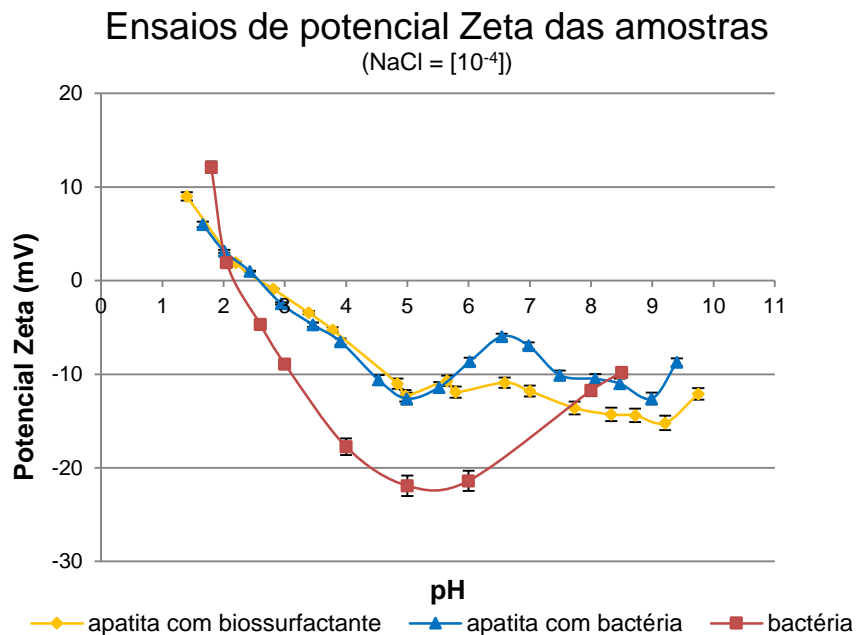


Figura 19 - Potencial zeta do mineral apatita com as células da bactéria *R. erythropolis* e com biossurfactante em comparação com o comportamento da bactéria. (eletrólito, NaCl : 10^{-4} mol/L)

5.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação apatita-bactéria

A Figura 20 apresenta a micrografia obtida através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da apatita após a interação com a *R. erythropolis*. Segundo Bueno (2008), Merma (2012) e Mesquita *et al.* (2003), a bactéria tem forma de bastão na fase exponencial e esférica (coco) na fase estacionária. Sendo assim, pode-se afirmar que o resultado de MEV está em conformidade com a literatura, já que a bactéria apresenta formato de bastonetes e foi coletada após 48 horas de incubação. Esta mesma forma também pode ser observada em micrografias da mesma bactéria ou de bactérias do mesmo gênero, apresentadas no trabalho de outros autores (MERMA, 2012; MERMA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013)

Pode-se observar a presença de grande quantidade de células de *R. erythropolis* recobrendo a superfície mineral, reforçando o fenômeno de bioadesão, na qual o substrato biológico adere na superfície da apatita,

sendo capaz de se manter na superfície por um longo período de tempo através de forças interfaciais, em conformidade com os resultados obtidos nos ensaios de bioadesão e flotação realizados neste trabalho, já que o condicionamento foi realizado em pH menor que 7, faixa de pH em que há maior formação de espuma e adesão da bactéria à superfície mineral. Merma *et al*, (2013) realizaram estudos com bactérias do mesmo gênero e relataram maior adesão bacteriana em pH menor que 7 na superfície da apatita no sistema apatita-quartzo. Nota-se também a microprecipitação bacteriana formada ao lado direito no canto inferior da imagem, provavelmente ocasionada devido à alta concentração de biomassa em que foi condicionado o mineral. É importante destacar que o fenômeno de bioadesão irá ocorrer entre as células bacterianas e as partículas minerais enquanto que a microprecipitação ocorre devido a alta concentração das células bacterianas que se aglutinam, “pesando” e se depositando no fundo da solução.

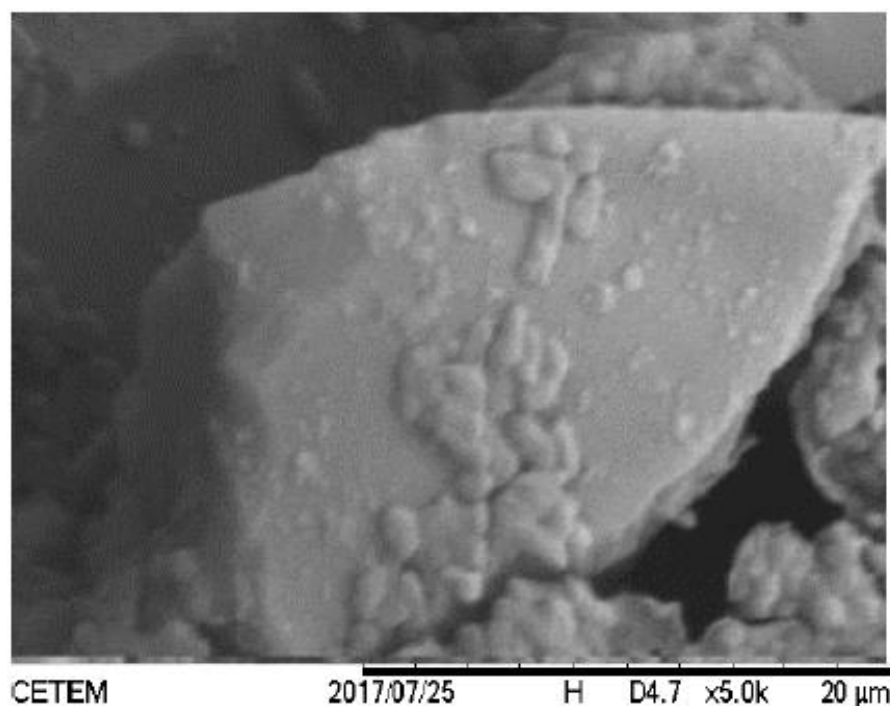


Figura 20- Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interação da apatita com células da bactéria *R. erythropolis*

5.6.

Comportamento da bactéria *R. erythropolis* como bioespumante

O pH da suspensão afeta o desempenho da flotação mineral, ele pode afetar tanto as propriedades da superfície do mineral quanto da superfície da parede celular da bactéria (MERMA, 2012), dessa forma, foram realizados ensaios de microflotação em função do pH, usando uma concentração celular de 125 mg/L, para analisar o comportamento da bactéria como espumante com a variação do pH do meio.

Os valores de pH foram ajustados adicionando alíquotas de HCl e NaOH e o tempo de aeração foi de 30 segundos, mostrando a velocidade com que a bactéria forma espuma. Este teste foi feito apenas com a bactéria porque foi observado que esta tem poder espumante muito maior do que o biossurfactante, que tem maior poder coletor, semelhante aos resultados encontrados por Puelles (2016).

A Figura 21 mostra a formação da espuma em diferentes valores de pH, evidenciando comportamento semelhante aos dos trabalhos desenvolvidos por Merma (2012), Oliveira (2015) e Puelles (2016) com bactérias do mesmo gênero. Ou seja, nota-se que em meio ácido (valores de pH iguais a 3 e 5) há maior formação de espuma, faixa de pH em que também houve maior flotabilidade da apatita. Os ensaios de tensão superficial realizados por Oliveira (2015) para o concentrado bacteriano da *R. erythropolis* mostram que os menores valores de tensão superficial correspondem à faixa de pH com maior densidade de espuma formada, apresentando valores de, aproximadamente, 66 mN/m para valores de pH menor que 7. Enquanto que na faixa de pH maior que 7, foram observados valores de, aproximadamente, 69 mN/m. Dessa forma, pode-se dizer que em valores de pH menor que 7 há maior adsorção do bioreagente na interface líquido/ar e portanto uma maior formação de espuma.

É possível observar que na Figura 21.a), em pH igual a 3, houve maior formação de espuma composta por bolhas menores, após os 30 segundos de aeração. Em pH igual a 5 (Figura 21.b) ainda há uma

considerável quantidade de espuma, porém formada por bolhas maiores. À medida que os valores de pH aumentam a quantidade de espuma diminui e o tamanho das bolhas aumentam gradativamente.

Em valores de pH iguais a 9 e 11, meio alcalino, quase não há formação de espuma, pois as bolhas crescem muito mais rápido do que em pH ácido, a ponto de coalescerem e estourarem imediatamente ao atingirem a superfície. Na Figura 21.d) é registrado o momento em que a bolha se rompe, em pH 9, no instante em que chega a superfície. Além da velocidade com que ela coalesce ser grande, o que a torna instável e diminui a quantidade de bolhas formadas, outro detalhe importante é a espessura do filme formado na interface água-ar; percebe-se que quanto maior o pH, menor a espessura do filme líquido que forma a bolha e menor é a durabilidade desta, pois a água é drenada e o filme se rompe (DALTIM, 2011).

Considerando que um bom espumante, dentre diversas características, precisa, além de produzir uma espuma estável, ser capaz de reduzir a tensão superficial, proporcionando maior tempo de vida à bolha (BUENO, 2008; BAPTISTA, 2007; DALTIM, 2011; DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015; SHAW, 1992; FUERSTENAU & CHANDER, 1986) e que a bactéria *Rhodococcus erythropolis* consegue reduzir a tensão superficial na interface água-ar e produzir, rapidamente, espuma de boa espessura e estabilidade (BUENO, 2008; KHOSHDAST & SAM, 2011; MERMA, 2012; OLIVEIRA, 2015), pode-se afirmar que, em pH menor que 7, a bactéria pode ser utilizada como um potencial bioespumante na flotação de apatita. Porém em valores altos de pH (pH igual a 11) a bactéria praticamente não forma espuma (Figura 21.e).

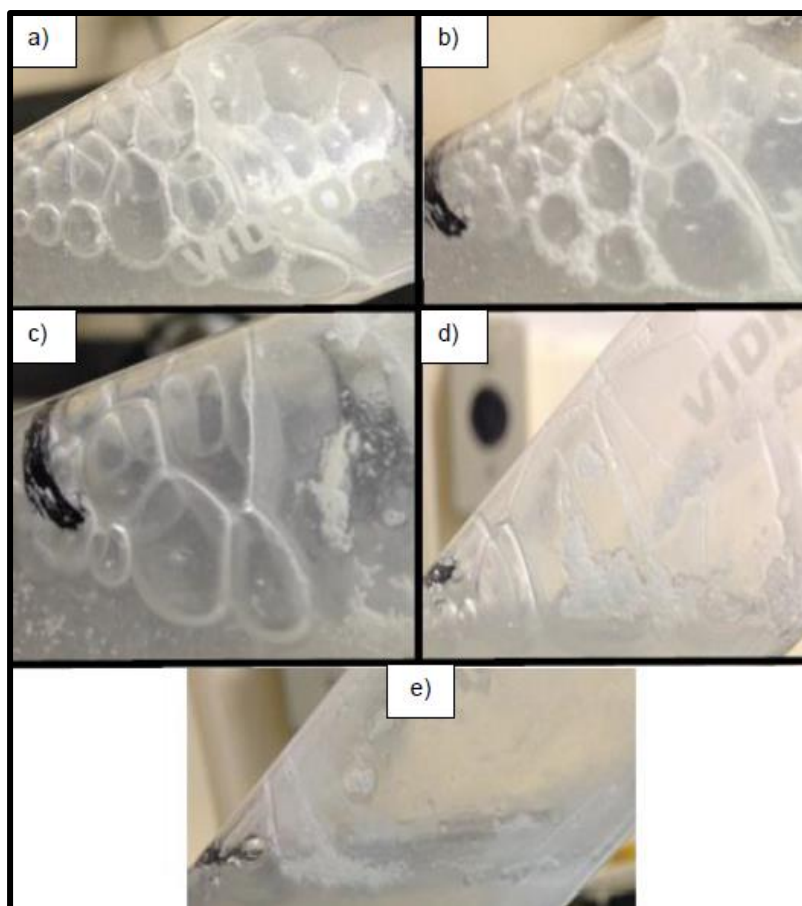


Figura 21 - Espuma gerada pela bactéria *Rhodococcus erythropolis* em diferentes valores de pH. a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7, d) pH 9, e) pH 11; Concentração bacteriana: 125 mg/L.

5.7.

Microflotação da apatita usando a bactéria e o biossurfactante como biorreagente

Foram realizados ensaios de flotabilidade da apatita, utilizando tubo de *Hallimond*, na faixa de pH entre 3 e 11, com tamanho de partículas minerais entre 75 e 106 μm , tamanho comum no processo de flotação mineral, numa solução de NaCl com concentração de 10^{-3} mol/L, usando diferentes concentrações de biomassa e de biossurfactante (0; 25; 50; 75; 100; 125 e 150 mg/L) e tempo de condicionamento e de flotação de 2 minutos.

Em todos os ensaios, o biossurfactante apresentou melhor desempenho, alcançando melhores resultados de flotabilidade quando comparado com o uso do concentrado bacteriano, o qual formou mais

espuma, indicando possível aplicação como bioespumante e, no caso do biossurfactante como biocoletor de apatita. Em todos os casos, tanto para a bactéria quanto para o biossurfactante, observou-se um incremento da flotabilidade em valores de pH ácido, na faixa entre 3 e 5, a mesma faixa de pH na qual a bactéria consegue formar espuma, no entanto, a maior flotabilidade (aproximadamente, 80 %) apresentou-se em pH igual a 5 com a utilização do biossurfactante numa concentração de 125 mg/L. Percebe-se que quando há formação de espuma há também aumento na capacidade coletora dos biorreagentes, ou seja, na faixa de pH em que há formação de espuma (pH menor do que 7) os biorreagentes conseguem capturar e transpostar partículas minerais com mais eficiência, devido, provavelmente, à menor resistência oferecida pelo meio graças à menor tensão superficial, como discutindo no tópico anterior, enquanto que em faixas de pH alcalino a flotabilidade decresce e em pH neutro a flotabilidade da apatita não foi relevante.

Este mesmo decaimento na flotabilidade em valores de pH alcalino foi observado por Yang *et al.* (2007) na flotação de hematita usando a bactéria *M. plhei*, por Merma (2012) na flotação de apatita com a bactéria *Rhodococcus opacus*, por Oliveira (2015; 2017), na flotação de hematita também com a *Rhodococcus erythropolis* e por Merma *et al.* (2017), na flotação de quartzo e de apatita com a *Rhodococcus opacus*. Os autores afirmaram que, na faixa ácida de pH, a bactéria tem uma carga superficial nula e dessa forma incrementa a sua hidrofobicidade, o que favorece a coagulação entre o mineral e as células da bactéria, melhorando assim a flotação. Entretanto, na faixa alcalina de pH as superfícies do mineral e da bactéria são negativas, causando assim uma repulsão eletrostática entre elas durante a flotação.

Os resultados da bioflotação de apatita em função das concentrações da bactéria *Rhodococcus erythropolis* e do biossurfactante em diferentes valores de pH podem ser vistos na Figura 22 e na Figura 23. Estes resultados de recuperação mineral com o biossurfactante foram, relativamente, próximos aos valores de flotabilidade atingidos em outros estudos de bioflotação (MESQUITA, 2000; MESQUITA, LINS & TOREM,

2003; MERMA, 2012; OLIVERA, 2015; DIDYK-MUCHA *et al.*, 2015; PUELLES, 2016; MERMA, HACHA & TOREM, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Estes resultados também se assemelham ou são, inclusive, superiores aos valores de recuperação de apatita utilizando surfactantes vegetais e/ou sintéticos na indústria mineral, que tem como especificação a obtenção de um concentrado apatítico com teor entre 30 e 40% (PAIVA, MONTE & GASPAR, 2011; ROSÁRIO, 2015).

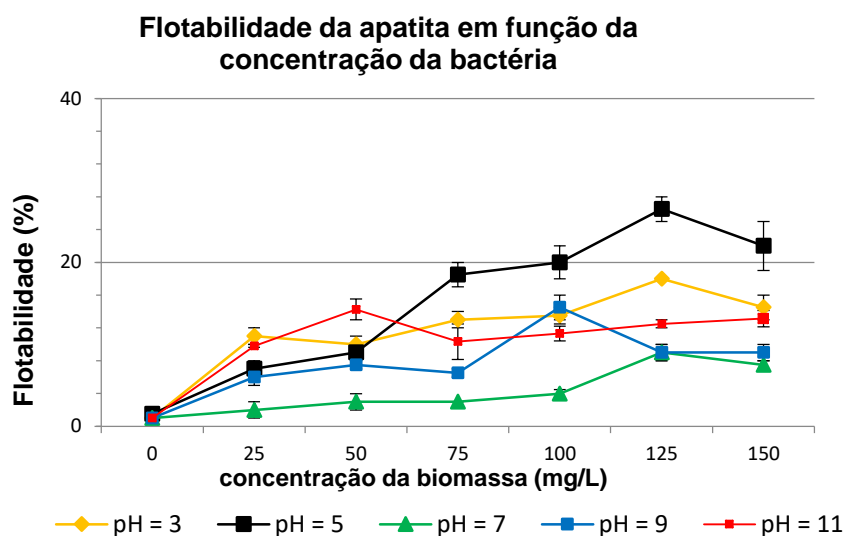


Figura 22. Flotabilidade da apatita em função da concentração da biomassa

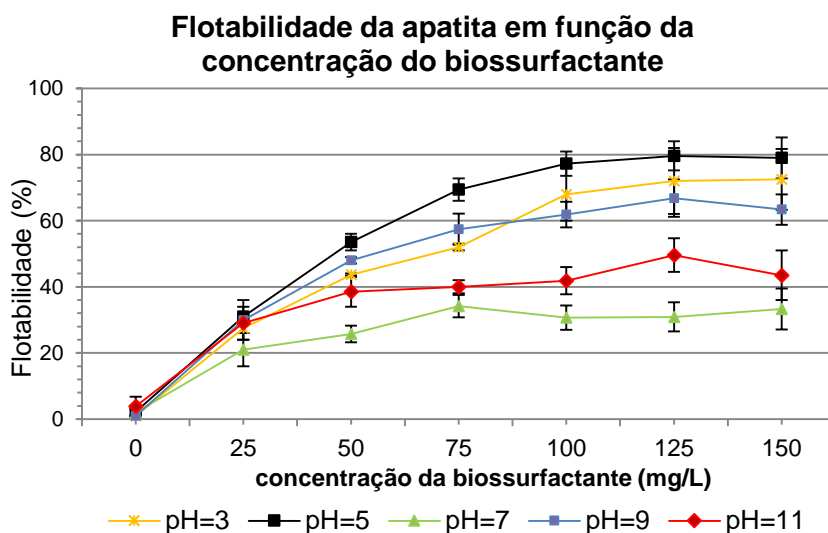


Figura 23 - Flotabilidade da apatita em função da concentração do biossurfactante.

Na Figura 23 é possível observar que com o incremento da concentração do biossurfactante há também um incremento na flotabilidade. A percentagem de recuperação mineral aumenta, em sua maioria, até atingir flotabilidade máxima, aproximadamente 80%, em concentração igual a 125 mg/L. A bactéria se comportou de maneira semelhante, atingindo flotabilidade máxima, 26,5%, também em concentração igual a 125 mg/L, porém nota-se que o perfil de flotabilidade da bactéria tem maior destaque quando apresentado em função do pH (o valor da recuperação mineral cresce em pH menor que 7, diminui em pH igual a 7 e tem um incremento adicional em pH maior que 7) do que em função da concentração, em que se torna mais difícil identificar um comportamento uniforme, pois, de maneira geral, a percentagem de flotabilidade permanece, praticamente, constante, com exceção do pH igual a 5 e 7. Enquanto que para o perfil de flotabilidade do biossurfactante o comportamento é mais uniforme e fácil de identificar, tanto em função do pH (cresce em pH menor que 7, diminui em pH igual a 7 e tem um incremento adicional em pH maior que 7) quanto em função da concentração, em que, de maneira geral, o valor da flotabilidade aumenta com o incremento da concentração.

Após atingir a concentração em que há máxima recuperação da apatita, os resultados de flotabilidade tendem a diminuir com o incremento da concentração. Este comportamento está de acordo com os estudos de YANG, ZHANG & JIANG (2007), BOTERO, TOREM & MESQUITA (2007) e BOTERO, TOREM & MESQUITA (2008) que afirmam que a flotabilidade sofre uma queda acima do valor limite de concentração, devido ao tamanho dos flocos formados entre o mineral e as células da bactéria, já que com maiores concentrações de bactéria os flocos formados podem ficar muito grandes, e dessa forma não conseguem ser carregados até a superfície.

Com relação a Figura 24 e Figura 25, observa-se que para todos os casos o máximo de flotabilidade é obtido em concentração igual a 125 mg/L. Na curva fica evidente a abrupta queda na percentagem de recuperação mineral em pH igual 7, devido a baixa concentração de contra-íons na solução, dificultando as interações químicas entre os minerais e

reagentes no meio. Posteriormente, em pH maior que 7, a percentagem de recuperação mineral sofre um incremento que, porém, não supera os resultados obtidos em pH menor que 7.

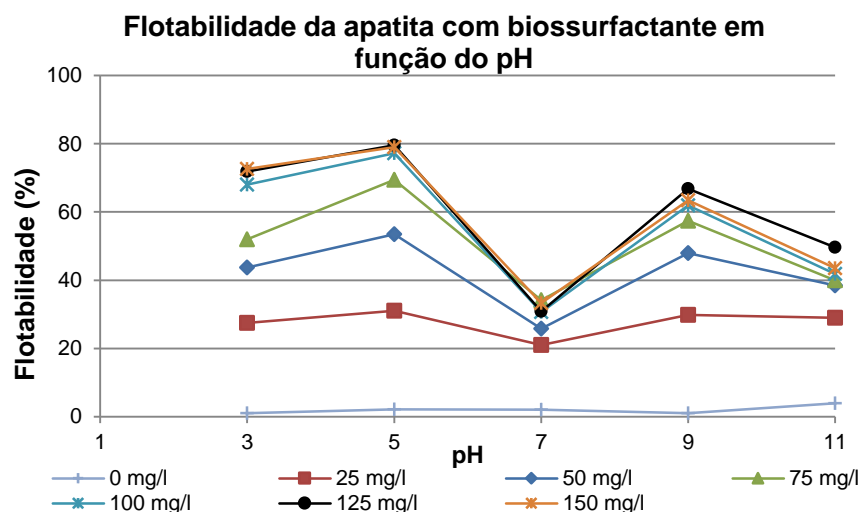


Figura 24 - Flotabilidade da apatita com biossurfactante em função do pH

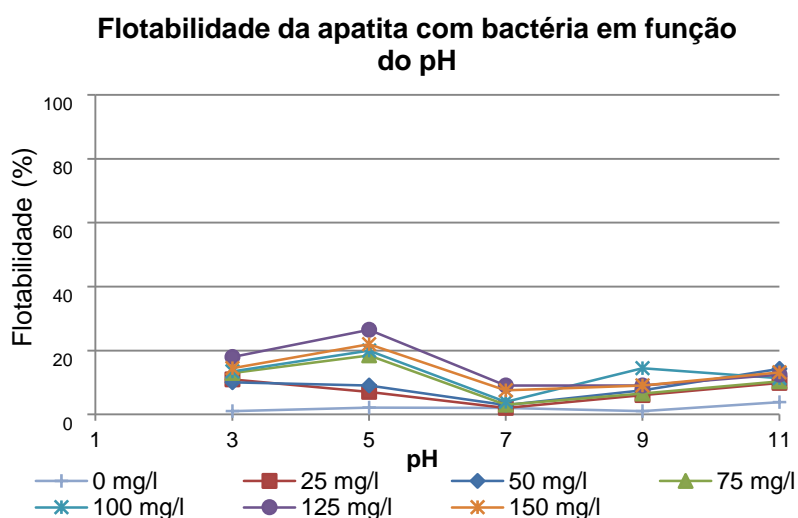


Figura 25 - Flotabilidade da apatita com bactéria em função do pH

Sabe-se que a variável mais importante no processo de flotação é o pH da suspensão, pois dependendo do pH a superfície do mineral e da bactéria são ativadas, através de diversas reações de dissolução, hidrólise entre outras (MERMA, 2012; OLIVEIRA, 2015).

Na Figura 24 e Figura 25 é possível observar os resultados da flotabilidade da apatita em função do pH, usando diferentes concentrações do biossurfactante e da bactéria, respectivamente. Primeiramente, nota-se que a recuperação da apatita usando o biossurfactante como coletor foi muito maior do que com a bactéria, em todos os valores de pH, devido ao tipo de contato do biossurfactante com o mineral em que este recobre toda a superfície da apatita e não só faz contato “ponto a ponto” como a bactéria, dessa forma os resultados de recuperação com o biossurfactante atinge resultados até três vezes superiores do que os da flotação com a bactéria. Resultado semelhante à pesquisa desenvolvida por Puelles (2016) que ao estudar a bioflotação do mineral hematita com a bactéria *R. opacus* obteve maior recuperação mineral com o biossurfactante do que com a bactéria.

Outra observação importante é que os dois biorreagentes têm um comportamento semelhante, em que, independente do valor da concentração, há um incremento na flotabilidade até pH igual a 5, ponto em que atinge flotabilidade máxima, e com o aumento do pH a recuperação de apatita diminui consideravelmente até pH igual a 7, ponto de mínima flotabilidade, para depois tornar a aumentar em meio alcalino (pH igual a 9 e pH igual a 11), porém sem superar, em sua maioria, os resultados de flotabilidade alcançados em pH igual a 5.

O valor de pH em que houve máxima flotabilidade, neste estudo, se assemelha aos resultados obtidos por YANG *et al.* (2007), em que na flotação de hematita usando a bactéria *Mycobacterium plhei*, encontraram como faixa ideal de pH para flotação do mineral valores de pH entre 5 e 7; por MERMA (2012), MERMA *et al.* (2013) e MERMA, HACHA & TOREM (2017), que estudaram o sistema apatita-quartzo utilizando a bactéria *R. opacus*, e por LOPEZ *et al.* (2015), ao estudar o mineral apatita com a bactéria *Rhodococcus ruber*, estes autores também encontraram valor máximo de flotabilidade da apatita em pH igual a 5.

O fato de a bactéria ter carga superficial nula na faixa de pH menor que 7, incrementando a sua hidrofobicidade, favorece a coagulação entre o mineral e as células da bactéria, melhorando assim a recuperação

mineral na flotação. Entretanto, na faixa alcalina de pH as superfícies do mineral e da bactéria são negativas, causando assim uma repulsão eletrostática entre elas durante a flotação (OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013).

A superfície de resposta do processo de bioflotação de apatita com a bactéria e o gráfico de contornos do processo, com as diferentes zonas da flotação são apresentados na Figura 26. Estes gráficos foram gerados no MATLAB R2012b no programa criado por Puelles (2016) membro do grupo de tecnologia mineral-PUC-Rio.

O efeito da concentração do biorreagente e do pH foram analisados com base nos critérios de p-valor. O p-valor pode ser interpretado como a probabilidade de que a variabilidade da resposta resulte da aleatoriedade inerente ao processo (WALPOLE *et al.*, 2012). Portanto, trabalhando com uma confiança de 95%, se o p-valor for superior a 0,05, a variável independente não afetará significativamente a resposta. Seguindo este critério, é possível avaliar, não apenas qualitativamente, mas quantitativamente o efeito das variáveis independentes sobre a resposta.

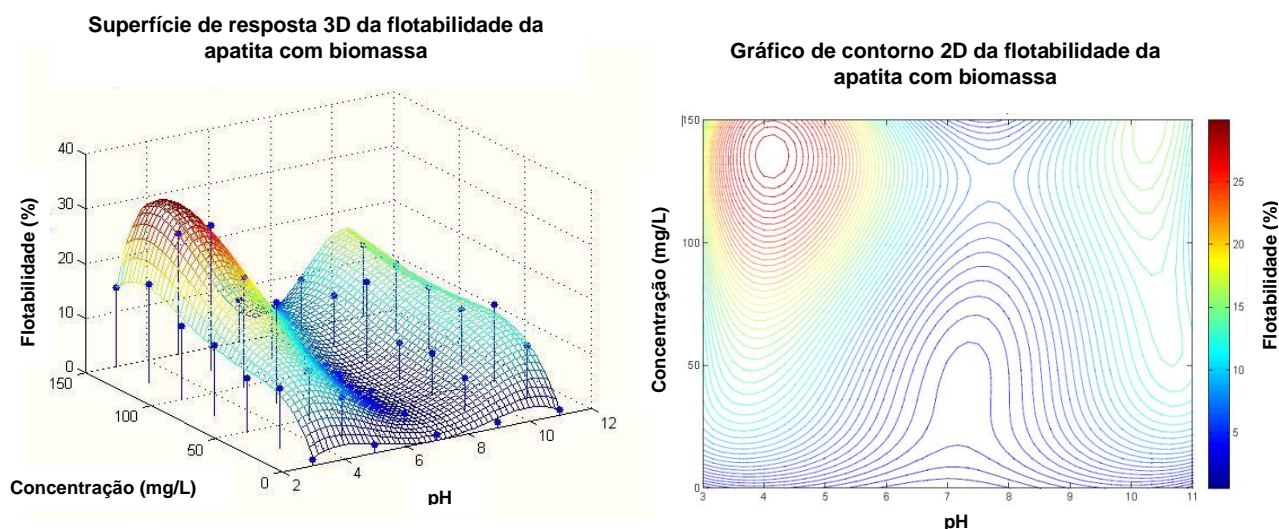


Figura 26 - a) Superfície de resposta 3D da flotabilidade de apatita em função do pH e concentração da bactéria. b) Gráfico de contorno 3D da flotabilidade da apatita

A Tabela 5-2 mostra os coeficientes estimados do modelo estatístico, onde x_1 é o pH e x_2 é a concentração bacteriana, com seu

respectivo valor de p. A matriz com os dados experimentais necessários para gerar este modelo encontra-se no apêndice B – Dados experimentais de flotação. Apenas os coeficientes com valores de p menores do que 0,05 foram considerados para composição do modelo. Valores de p maiores do que 0,05 não afetam significativamente a recuperação de apatita e foram descartados do modelo. O modelo ajustado foi uma função polinomial de 4ª e 3ª ordem para o pH e concentração da biomassa, respectivamente; com coeficiente de correlação (R^2) de 86,74%. A Equação 1 mostra o modelo empírico:

$$R = p_{11}x_1 \cdot x_2 + p_{21}x_1^2 \cdot x_2 + p_{31}x_1^3 \cdot x_2 + p_{41}x_1^4 \cdot x_2 + p_{23}x_1^2 \cdot x_2^3 \quad (1)$$

Sendo:

$$R^2 = \frac{\sum_i (\hat{Y}_{iz} - \bar{Y})^2}{\sum_i (\hat{Y}_{ij} - \bar{Y})^2} \quad (2)$$

Tabela 5-2 - *Coeficientes da regressão polinomial da flotação da apatita com a bactéria*

Coeficientes	Estimação	valor-p
$x_1 \cdot x_2$	1.1582	0.046309
$x_1^2 \cdot x_2$	-0.31854	0.014565
$x_1^3 \cdot x_2$	0.032313	0.010012
$x_1^4 \cdot x_2$	-0.0010793	0.01327
$x_1^2 \cdot x_2^3$	1.4527e-06	0.049314

A superfície de resposta do processo de bioflotação de apatita com o biossurfactante e o gráfico de contornos do processo, com as diferentes zonas da flotação são apresentados na Figura 27.

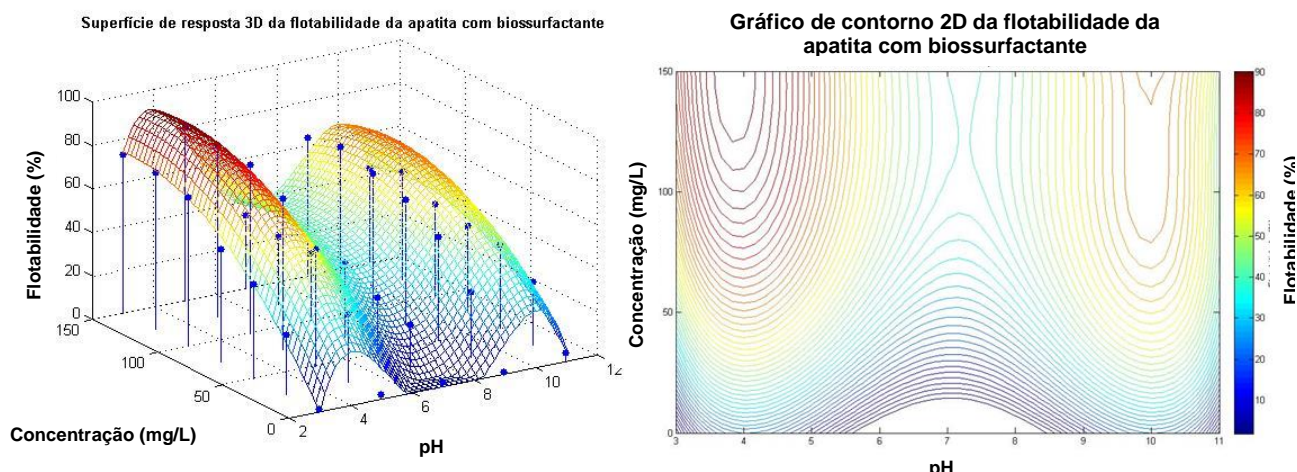


Figura 27 - a) Superfície de resposta 3D da flotabilidade de apatita em função do pH e concentração do biossurfactante. b) Gráfico de contorno 3D da flotabilidade da apatita

O modelo ajustado foi uma função polinomial de 4ª ordem para o pH e ordem 0 para a concentração do biossurfactante; ou seja apenas o valor do pH afeta significativamente este modelo. O coeficiente de correlação (R^2) é 90,41% e a Equação 3 mostra o modelo empírico:

$$R = p_{10}x_1 + p_{20}x_1^2 + p_{30}x_1^3 + p_{40}x_1^4 \quad (3)$$

Tabela 5-3 Coeficientes da regressão polinomial da flotação da apatita com biossurfactante

Coeficientes	Estimação	valor-p
x_1	523.02	1.9769e-07
x_1^2	-127.85	1.2779e-07
x_1^3	12.891	1.0556e-07
x_1^4	-0.45801	1.0637e-07

Dos modelos estatísticos elaborados foi encontrado como ponto ótimo de flotação o valor de pH de, aproximadamente, 4 e concentração de, aproximadamente, 140 mg/L de biorreagente. Sendo assim, com o novo lote de biorreagentes, foram realizados novos testes de flotação para validação do modelo, já que experimentalmente foi encontrado como ponto

de maior recuperação mineral o valor de pH igual a 5 e concentração de 125 mg/L de biorreagente, valores próximos aos encontrados no modelo.

A Figura 28 e Figura 29 permitem observar que, tanto para o concentrado bacteriano quanto para o biossurfactante, a curva de flotabilidade em pH igual a 4 apresenta valores superiores aos da curva de pH igual a 5. O mesmo acontece ao comparar as concentrações dos biorreagentes, a concentração encontrada como valor ótimo pelo modelo, 140 mg/L apresentou resultados de flotabilidade superiores aos de concentração de 125 mg/L. Estas análises serviram para validar o modelo empírico criado, comprovando que os resultados de flotabilidade foram superiores no ponto ótimo de pH e concentração encontrados.

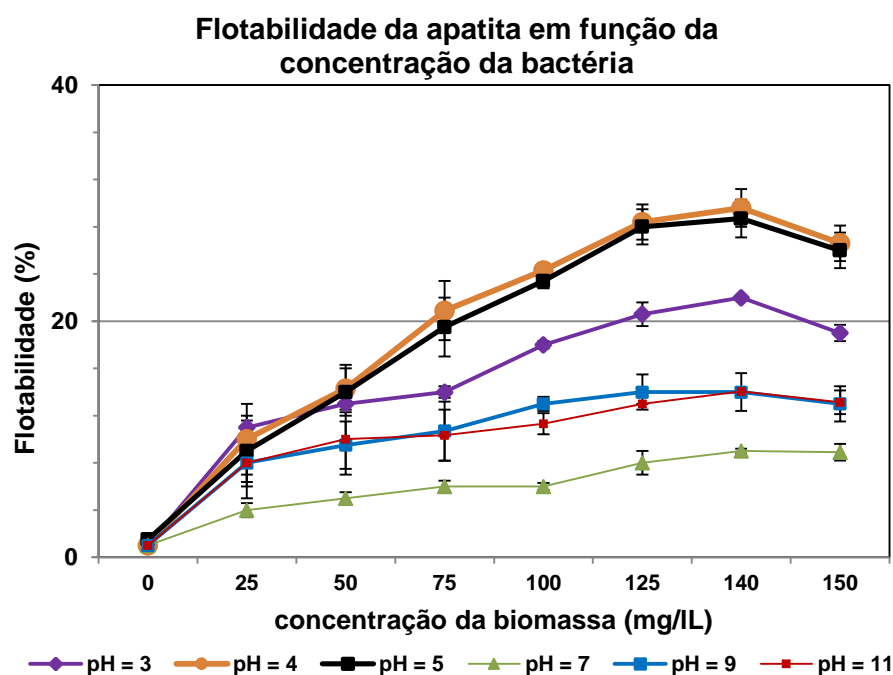


Figura 28 - Flotabilidade da apatita em função da concentração da bactéria

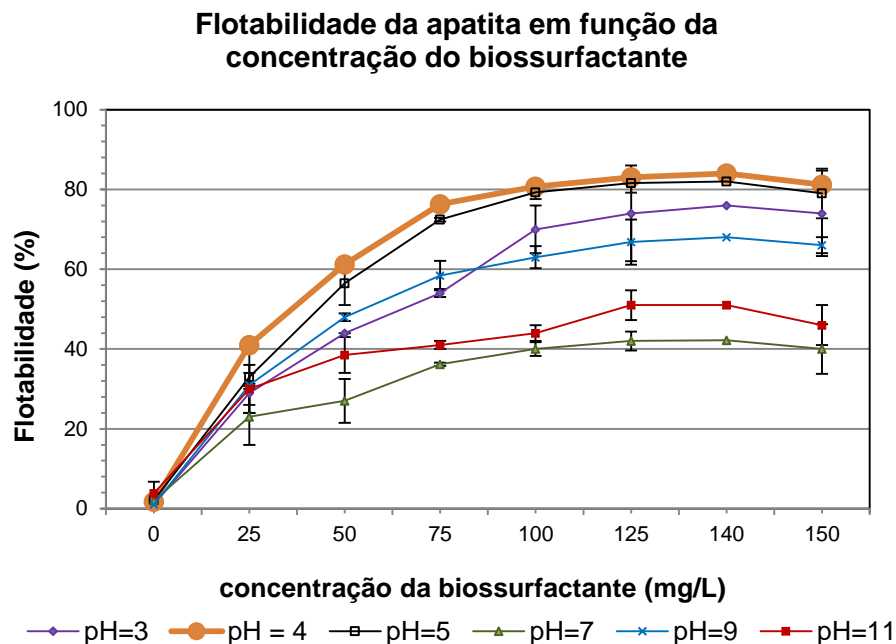


Figura 29 - Flotabilidade da apatita em função da concentração do biossurfactante

5.8. Ensaio de bioadesão da bactéria

Os experimentos de adesão bacteriana foram realizados com intuito de observar a afinidade que o microrganismo estabelece com as superfícies minerais. De acordo com Sharma & Rao (2002), a afinidade pode ser apresentada pela interação entre os grupos funcionais da parede celular da bactéria e a superfície mineral. Para realização destes ensaios foram levadas em consideração as condições ótimas de concentração da bactéria em que foi possível obter, neste estudo, a maior flotabilidade da apatita. Portanto os valores de concentração analisados são valores próximos a 125 mg/L.

Como já afirmado anteriormente, sabe-se que na faixa ácida de pH, a bactéria tem uma carga superficial nula, o que incrementa a sua hidrofobicidade, favorecendo a coagulação entre o mineral e as células da bactéria, melhorando assim a flotação e que na faixa alcalina de pH as superfícies do mineral e da bactéria são negativas, causando assim uma repulsão eletrostática entre elas durante a flotação (YANG *et al.*, 2007;

MERMA, 2012; OLIVEIRA, 2015 e MERMA *et al.*, 2017). Logo, espera-se que haverá maior adesão da bactéria ao mineral em $\text{pH} < 7$.

A realização deste ensaio teve como objetivo comprovar esta teoria. Foi feita a investigação da capacidade de bioadesão da *Rhodococcus erythropolis* em função do pH sobre a superfície do mineral apatita, além de descobrir o comportamento da bactéria nas condições ótimas de flotação encontradas neste estudo (meio ácido e concentração de biorreagente no entorno de 125 mg/L). As variáveis como o tempo de condicionamento ($t = 2$ min), velocidade de agitação e temperatura (28°C) foram as mesmas utilizadas na flotação. Os testes foram expressos em mg de bactéria.g⁻¹ de apatita, como no trabalho de Mesquita (2000).

Na Figura 30, podemos ver os resultados da adsorção da bactéria sobre a superfície da apatita em função do pH. Como já mencionado, foi utilizado o tempo de condicionamento de 2 min. Para todos os casos, a maior adesão foi ao redor do pH igual a 2, muito próximo ao ponto isoelétrico da bactéria (2,2). A quantidade máxima de bactéria aderida na superfície da apatita foi de, aproximadamente, 8.1 mg.g⁻¹ para uma solução de 150 mg/L. Este valor é equivalente ao valor encontrado no trabalho feito por Oliveira (2015) onde para o sistema hematita-*R. erythropolis* na concentração de 200 mg/L, a quantidade máxima de biomassa aderida na amostra mineral de hematita foi de 8.7 mg.g⁻¹. A curva de calibração deste ensaio encontra-se no apêndice A. Este resultado está em concordância com as literaturas citadas (MESQUITA, 2000; SHARMA & RAO, 2002; YANG, ZHANG & JIANG, 2007; OLIVEIRA, 2015; MERMA, 2012; MERMA, HACHA & TOREM, 2017), já que, de fato, houve maior bioadesão em valor de pH menor que 7 e que com o aumento do valor do pH a quantidade de bactéria aderida a superfície mineral decai.

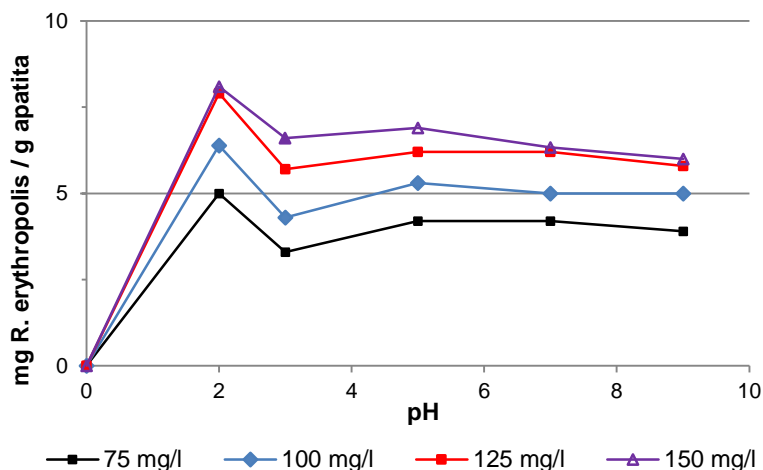


Figura 30 - Influência do pH na adsorção da bactéria *Rhodococcus erythropolis* sobre a superfície da apatita

No valor de pH 2, em que houve maior bioadesão das células bacterianas às partículas minerais, foram realizados novos testes de flotação. Porém os resultados encontrados não foram superiores aos resultados de flotabilidade em pH 4 e pH 5 (Figura 31), provavelmente, devido a característica semi-solúvel da apatita, ou seja, quanto menor o pH mais solúvel se torna a apatita, a ponto de se dissolver em meio muito ácido ($\text{pH} \leq 2$) de modo que os íons PO_4^{3-} da apatita reagem com íons H^+ da água acidificando ainda mais o meio, além do fato de que ao se dissolver a apatita torna-se mais hidrofílica, tendo ainda mais preferência pelo meio aquoso do que pelas bolhas de ar formadas. Dessa forma, apesar do concentrado bacteriano apresentar maior bioadesão em pH 2, para melhor resultado de flotabilidade as características minerais também devem ser levadas em consideração (FERNANDES, LUZ & CASTILHOS, 2010; WANG, SOTILLO & LILLEY, 2008; PAIVA *et al.*, 2011).

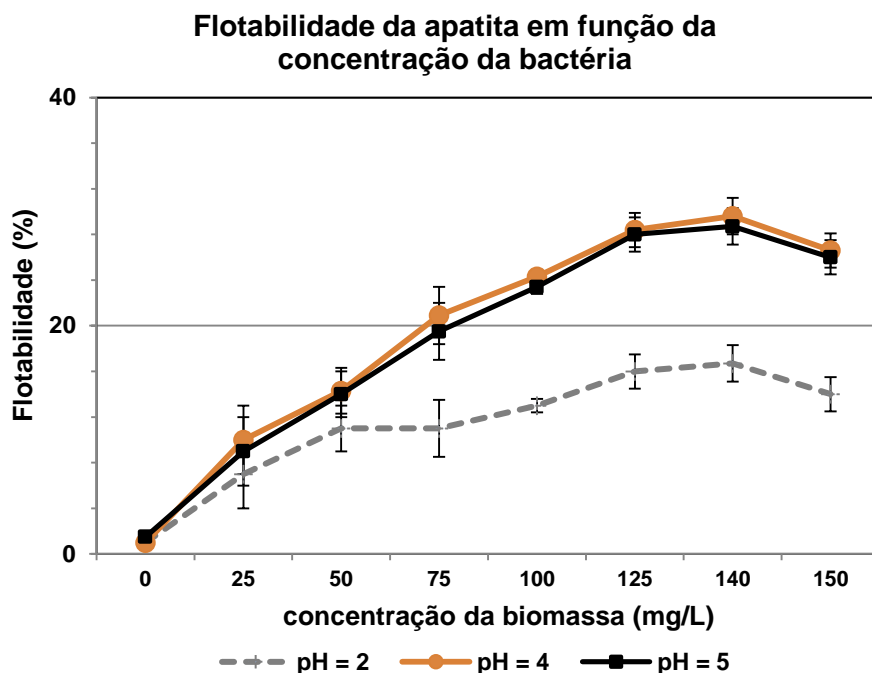


Figura 31 - Flotabilidade da apatita em função da concentração da bactéria (teste de flotação em pH igual a 2)

5.9. Influência do tempo na flotação

Estudos destacaram um incremento na flotabilidade ao aumentar o tempo de flotação e/ou condicionamento (MERMA, 2012; OLIVERA, 2015; YANG *et al.*, 2013). Surgiram novas indagações quanto à possibilidade de obter maiores valores de recuperação mineral ao aumentar o tempo de condicionamento e de flotação. Sendo assim foram feitos novos ensaios de microflotação nas mesmas condições dos ensaios anteriores variando apenas o tempo de condicionamento e de flotação, sendo o tempo de condicionamento igual a 5 minutos e o tempo de flotação “infinito” até a recuperação de apatita atingisse um valor máximo, se tornasse constante ou começasse a declinar.

Em todos os casos o biossurfactante apresentou, novamente, desempenho melhor quando comparado à bactéria. Com relação às condições ótimas para bioflotação da apatita, nestes novos testes os valores de pH e concentração para obtenção do máximo de flotação

permaneceram os mesmo, pH 4 e concentração de 140 mg/L, porém tanto o biossurfactante quanto a bactéria apresentaram melhores resultados de recuperação. A diferença no tempo de flotação apresentou ganhos nos resultados de flotabilidade. Ao aumentar o tempo para 5 minutos houve um incremento na recuperação da apatita em todas os valores de pH e concentração, chegando a atingir incrementos de mais de 140% na flotabilidade. Nas condições ótimas de pH e concentração o incremento foi de 16% de recuperação da apatita, atingindo um valor de 97% de concentração.

A Figura 32 e a Figura 33 apresentam os resultados de flotabilidade, em função da concentração, obtidos nestes novos ensaios com 5 minutos de flotação, para a bactéria e para o biossurfactante, respectivamente. O máximo de recuperação mineral alcançado foi de 97,22% de apatita com o tempo de 7 minutos de flotação, contra 97,10% de recuperação com 5 minutos de flotação, ambos em pH 4 e concentração de biossurfactante de 140 mg/L. Em tempos maiores de flotação não houveram ganhos de flotabilidade, de forma que a recuperação de apatita permaneceu constante, não ultrapassando os 97,22% atingidos. Para a biomassa o mesmo comportamento se repetiu, o valor máximo de recuperação foi de 70% de apatita com 7 minutos de flotação contra 69% de flotabilidade com 5 minutos de flotação, sendo que ao aumentar o tempo de flotação não foi possível atingir maiores resultados de recuperação mineral (Figura 34).

Flotabilidade com bactéria em função do pH TESTE (5 min)

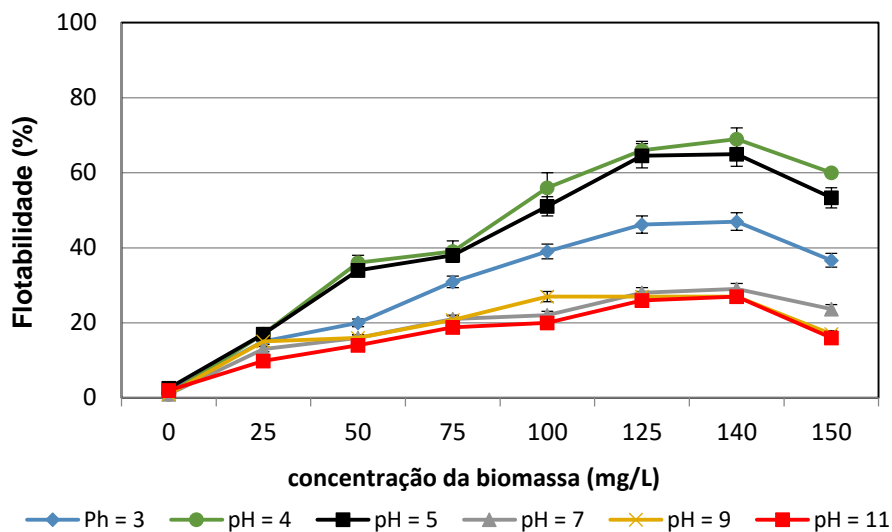


Figura 32 - Flotabilidade da apatita com bactéria em função da concentração

Flotabilidade com BS em função do pH TESTE (5 min)

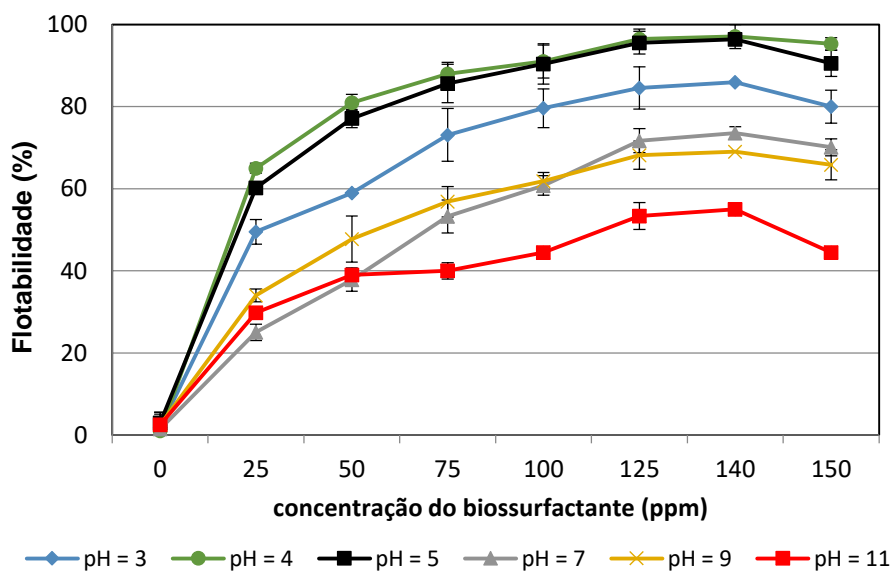


Figura 33 - Flotabilidade da apatita com biossurfactante em função da concentração

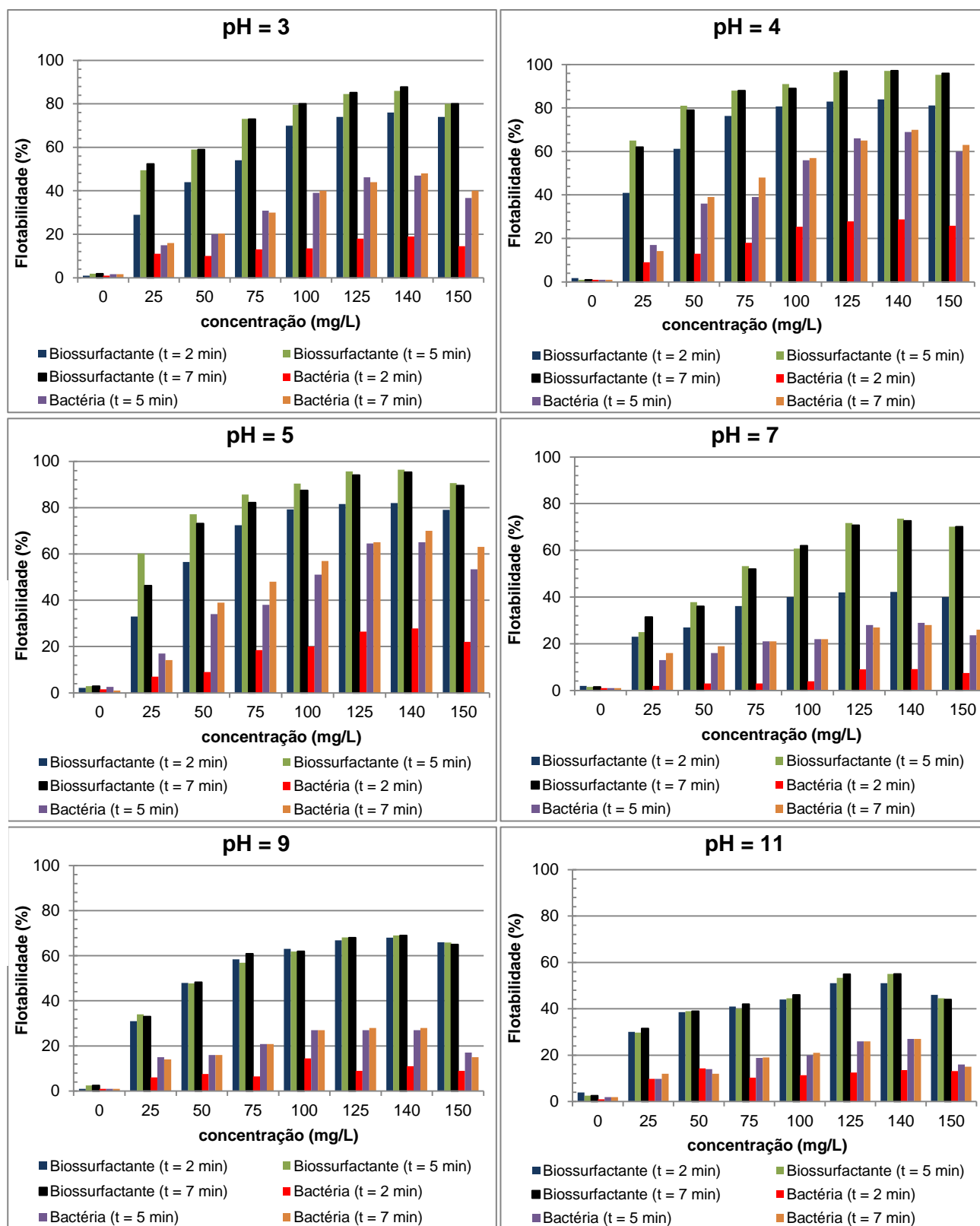


Figura 34 - Comparativo global de flotabilidade

De maneira geral, o comportamento da flotabilidade em função do pH permaneceu semelhante aos ensaios com menor tempo de flotação, ou

seja, em pH menor que 7 há maior recuperação da apatita. Porém, com maior tempo de flotação, em pH menor que 7 os resultados de flotabilidade foram superiores e, de forma semelhante, com o incremento dos valores de pH a recuperação mineral diminuiu (Figura 34).

Ao comparar os testes em função da concentração, torna-se mais evidente o comportamento do perfil de flotabilidade, em que, de maneira geral, a recuperação da apatita aumenta com o incremento da concentração até atingir um valor máximo de recuperação, em 140 mg/L, para depois sofrer uma pequena queda em concentração maior, 150 mg/L, pois, como já discutido, após atingir a concentração em que há máxima recuperação da apatita, a flotabilidade sofre uma queda acima do valor limite de concentração, devido ao tamanho dos flocos formados entre o mineral e as células da bactéria, já que com maiores concentrações de bactéria os flocos formados podem ficar muito grandes, e dessa forma não conseguem ser carregados até a superfície.

Para ambos biorreagentes, nota-se mais facilmente que em valores de pH menor que 7 os resultados de recuperação mineral são muito maiores do que nas outras faixas de pH (o mesmo ocorreu com outros autores: YANG *et al.* (2013), MERMA *et al.* (2013), BOTERO, TOREM & MESQUITA (2007), FARAHAT, HIRAJIMA & SASAKI (2010), OLIVEIRA *et al.* (2017) e em pH 7 os resultados de recuperação com tempo maior de flotação se destacam devido à discrepância entre os resultados dos testes com tempos diferentes, em que nos testes de flotação com maior tempo a recuperação chega a ser quase duas vezes maior do que os resultados obtidos com menor tempo de flotação para o biossurfactante e até sete vezes maior para a bactéria.

Para o biossurfactante, não houveram ganhos significativos com os ensaios com tempo maior do que 5 minutos, pois percebe-se, através do gráfico de barras, que os valores foram muito semelhantes. No entanto, para a bactéria os ganhos na recuperação da apatita foram maiores nos testes com tempos maiores. É importante reforçar que, para a bactéria, em todos os casos de concentração e pH, os resultados de flotabilidade obtidos

nestes últimos testes tiveram mais destaque, principalmente, devido ao fato da recuperação mineral ter sido, praticamente, insignificante nos testes com menor tempo de duração. O que chama atenção para o tempo de adesão bacteriana à superfície da apatita, ou seja, a bactéria precisa de mais tempo de interação para conseguir recobrir a sua superfície mineral, como é demonstrado por outros autores KUMAR, RAMARAO & SHARMA, (2013), FARAHATA *et al.* (2009), FARAHAT, HIRAJIMA & SASAKI (2010), e BOTERO, TOREM & MESQUITA (2007), enquanto que o biossurfactante, por ser solúvel, entra mais facilmente em contato com a superfície mineral.

O fato de ter alcançado maiores resultados de recuperação com maior tempo de flotação está em conformidade com estudos realizados por outros autores SZYMANSKA & SADOWSKI (2010), FAZAEIPOOR, KHOSHDAST & RANJBAR (2010), KUYUMCU *et al.* (2009), MERMA *et al.* (2013), FARAHATA *et al.* (2009) e ABDEL-KHALEK *et al.* (2017) que demonstraram que quanto maior o tempo de flotação maior será a percentagem de recuperação obtida, até que seja atingido um máximo de flotabilidade, a partir do qual, mesmo aumentando o tempo, a recuperação se mantém constante ou reduz.

Neste trabalho, o valor de máxima flotabilidade com a bactéria *R. erythropolis* foi alcançado com sete minutos de flotação, sendo de, aproximadamente, 70% (contra 28,7% e 69% de flotabilidade com tempo de dois e cinco minutos, respectivamente) em pH 4 e concentração de 140 mg/L. Merma (2012), em condições semelhantes de concentração (150 mg/L) e valor de pH 5, obteve, aproximadamente, 65% de recuperação de apatita com dois minutos de flotação e, aproximadamente, 90% de recuperação de apatita com sete minutos de flotação, utilizando uma bactéria do mesmo gênero, a *R. opacus*. Oliveira (2015) obteve 56% de flotabilidade de hematita utilizando uma concentração de 200mg/L da mesma bactéria deste estudo, *R. erythropolis*. Abdel-Khalek *et al.* (2017) obteve, aproximadamente, 72,5% de flotabilidade da hematita com 10 minutos de flotação com a bactéria *PaeniBacillus polymyxa*.

Os resultados obtidos corroboram a eficiência do biossurfactante como possível biocoletores de apatita e superam a especificidade mínima exigida industrialmente, em torno de 30-40% de recuperação de apatita (BARROS, LEAL FILHO & PERES, 2001; ZAPATA & ROY, 2004; ROSÁRIO, 2015). O resultado máximo de flotabilidade com o uso do biossurfactante foi aproximadamente, 97% de recuperação de apatita tanto com cinco minutos quanto com sete minutos de flotação (contra, aproximadamente, 84% com dois minutos de flotação), também em pH 4 e concentração de 140 mg/L. Em outros estudos de bioflotação com biossurfactante foram observados resultados semelhantes. Fazaelipoor *et al.* (2010) em estudos de bioflotação de carvão utilizando o biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* obteve 80% de flotabilidade com dois minutos de flotação e, aproximadamente, 100% de flotabilidade com três minutos de flotação. Puelles (2016) em pH menor que 7 obteve 43,5% de flotabilidade de hematita com a bactéria *R. opacus* e, aproximadamente, 96% com o biossurfactante com concentrações de 125mg/L e 100mg/L, respectivamente. Szymanska & Sadowski (2010) com cinco minutos de flotação conseguiram atingir, aproximadamente, 100% de recuperação da hematita utilizando como coletor um biossurfactante *do tipo rhamnolipids* produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Este estudo demonstrou o potencial de novos biorreagentes para a flotação de apatita, sendo um biocoletores (biossurfactante extraído da *Rhodococcus erythropolis*) e o outro bioespumante (a própria bactéria), assim projetando-se para uma futura aplicação na indústria da flotação mineral, talvez até, utilizando os dois biorreagentes juntos, cada um exercendo uma função diferente, no processo de flotação.

6 Conclusões

- Os testes para produção de biossurfactante indicaram um tempo de incubação da bactéria entre cinco e seis dias, sendo que com seis dias houve um incremento de 113% na concentração do biossurfactante. Em ambos os casos o desempenho na flotabilidade não foi alterado.
- É necessário entre 3000 a 4500 ml de cultivo bacteriano para obtenção de 100 a 150 ml, em média, de biossurfactante.
- As análises de fluorescência e difração de raios-x comprovaram que a amostra se tratava de apatita pura, provavelmente do tipo cloroapatita, ou, em outra hipótese, houve substituição do flúor (F) por cloro (Cl) no processo de formação deste mineral.
- As medições de potencial zeta indicaram que, para uma força iônica de 10^{-4} M NaCl, o ponto isoelétrico da bactéria *Rhodococcus erythropolis* (inativa) ocorre em pH 2,2; para o sistema apatita – bactéria *Rhodococcus erythropolis* em pH 2,61 e para o sistema apatita – biossurfactante em pH 2,62.
- Nas análises de espectrofotometria de infravermelho do biossurfactante identificaram-se picos característicos de uma vibração de Keynote, que são amidas derivadas de ácidos carboxílicos. Para a bactéria o maior destaque foram os picos característicos das vibrações

do tipo para grupos de estiramento de aminas primárias e, para a apatita, os picos de maior intensidade foram os identificados como cloroalcanos.

- Nas faixas de pH entre 2 e 11 não foi possível encontrar o ponto isoelétrico da apatita. Supõe-se que este esteja entre 1,8 e 2,0.
- A análise das curvas de potencial zeta da bactéria indicou a predominância de grupos aniônicos, sendo obtidos valores negativos com o incremento do pH da solução.
- A maior taxa de bioadesão da bactéria foi de 8,1 mg de *R. erythropolis*/g de apatita, para uma solução de 150 mg /L em pH menor que 7, próximo ao valor do PIE (pH igual a 2,2). Nesta mesma faixa de pH (pH menor que 7) a bactéria forma mais espuma.
- Em todos os casos o biossurfactante apresentou valores de flotabilidade maiores do que a bactéria, indicando seu potencial uso como biocoletores de apatita.
- O tempo de flotação teve influência na recuperação da apatita. O aumento do tempo resultou num incremento de 13% na máxima flotabilidade, atingindo valores próximos a 100% de recuperação mineral.
- Em concentrações menores do que 100 mg/L de bactéria ou biossurfactante, a percentagem de recuperação de apatita alcançada é menor. Em termos gerais quanto maior a concentração do biorreagente maior a recuperação da apatita; até atingir o ponto de concentração máxima, a partir do qual a flotabilidade começa a diminuir.

- Com relação aos valores de pH ocorre o contrário. Os melhores resultados de flotabilidade foram apresentados em pH menor que 7, com incremento do pH os resultados de flotabilidade decrescem.
- As condições ótimas encontradas para bioflotação de apatita neste estudo foi em pH igual a 4, concentração igual a 140 mg/L e tempo de flotação de 7 minutos. Nestas condições foi encontrado o valor máximo de recuperação de apatita de, aproximadamente, 97% com o uso do biossurfactante e de 70% com o uso da bactéria.
- Este estudo demonstrou que a bactéria *R. erythropolis* pode ser utilizada como bioespumante, em meio ácido, na flotação de apatita.
- Os resultados de flotabilidade obtidos com os biorreagente são semelhantes e até superiores aos valores de recuperação alcançados com surfactantes sintéticos e/ou vegetais utilizados na indústria de beneficiamento de fosfato.

7

Recomendações para futuros trabalhos

- Testar a seletividade do biossurfactante em um sistema misto de dois ou mais minerais.
- Sendo o biossurfactante um potencial biocoleto, novas pesquisas devem ser realizadas, com o intuito de obter maior conhecimento a respeito deste. Como, por exemplo, para quais tipos de minérios ele pode ser usado como biorreagente, valores de mercado, etc.
- Estudar a influência de diferentes meios de cultivo na capacidade de adesão da bactéria *R. erythropolis* sobre o mineral de apatita.
- Realizar ensaios de bioadesão para o biossurfactante.
- Estudar formas de reutilizar o etanol usado na extração do biossurfactante.
- Investir na caracterização da bactéria, pesquisando mais a respeito dos elementos e compostos químicos que formam a parede celular.
- Investir na caracterização do biossurfactante com intuito de conhecer os componentes presentes nele para, posteriormente, tentar reproduzi-lo.
- Entender melhor, através de pesquisas, de que forma a bactéria retém o biossurfactante em seu interior.
- Identificar de forma precisa os compostos extracelulares gerados pelo microrganismo.

- Continuar estudando a adesão da bactéria *R. erythropolis* adaptada ao mineral de apatita e a sua influência na captação.
- A partir dos resultados deste trabalho, mais pesquisas são necessárias para complementar o entendimento da bioflotação da apatita, por exemplo, fazer medições do ângulo de contato de mineral, antes e após da interação com a bactéria, já que esse valor vai afirmar se a bactéria é um reagente altamente hidrofóbico.
- Avaliar a tensão superficial da bactéria e do biossurfactante, extraído da *Rhodococcus erythropolis*, em função da sua concentração;
- Estudar a captação (mg de bactéria/g mineral) em diferentes temperaturas, inclusive em condições extremas de temperatura.
- Devem ser feitos ensaios de flotação para diferentes granulometrias de apatita pura.
- Testes industriais da bioflotação de apatita com bactéria e biossurfactante.
- Testar outros microrganismos, como certas leveduras, para selecionar espécies que produzam mais biossurfactante.

8

Referências bibliográficas

ABDEL-KHALEK, N. A., SELIM, K. A., HASSAN, M. M., MOHARRAM, M. R., SALEH, A. M., & RAMADAN, A. M. (2017). **The Role of Interaction between *Paenibacillus polymyxa* Bacteria and Pyrolusite-Hematite System through Bioflotation.** *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 4,. 1121-1129.

ABU-RUWAIDA, A., BANAT, I., HADITIRTO, S., & KHAMIS, A. (1991). **Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus bacterium*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 51 , 53-61.

AHMED, M., IBRAHIM, G., & HASSAN, M. (2007). **Improvement of Egyptian talc quality for industrial uses by flotation process and leaching.** *International Journal Mineral Process*, 83, 132-145.

BACK, N., COHEN, I. R., LAJTHA, A., LAMBRIS, J. D., & PAOLETTI, R. (2010). ***Biosurfactants: ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY.*** (R. SEN, Ed.) New York: LLC.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., & CAMEOTRA, S. S. (2000). **Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants.** In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.

BAPTISTA, S. J. **Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel.** *Tese de doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BARROS, L. A., FERREIRA, E. E., & PERES, A. E. (2008). **Floatability of apatites and gangue minerals of an igneous phosphate ore.** *Minerals Engineering*, 21, 994 - 999.

BARROS, L., LEAL FILHO, L., & PERES, A. (2001). ***Plant Practice innovations in a phosphate concentrator.*** *Minerals Engineering*. 14, 117-121.

BELL, K., PHILP, J., JAW, D., & CHRISTOFI, N. (1998). **The genus *Rhodococcus***. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 195-210.

BORTOLOTTI, C. T., OLIVEIRA, M. C., DOS SANTOS, M., & ATAIDE, C. (2009). **Efeito de íons contaminantes na flotação de apatita em coluna**. *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*.

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

BOTERO, A., TOREM, M. L., & MESQUITA, L. DE (2008). **Surface chemistry fundamentals of biosorption of *Rhodococcus opacus* and its effect in calcite and magnesite flotation**. *Minerals Engineering*, 21, 83 - 92.

BUENO, S. M. (2008). **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 99 p. São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

CARVALHO, C. C. DE (2012). **Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and biorremediation under extreme conditions**. In: *Research in microbiology*, 163, 125-136.

CARVALHO, C. C. DE, & FONSECA, M. R. DA (2005). **The remarkable *Rhodococcus erythropolis***. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 113, 715-726.

CHAVES, A.P. (2009). **Teoria e prática do tratamento de minérios. 2ª ed.** São Paulo: Signus, 1, 166 p.

CHRISTOFI, N., & IVSHINA, I. B. (2002). **Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation**. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 915-929.

CIAPINA, E. M. (2008). **Produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do seu efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo**. *Tese de doutorado*. UFRJ, Rio de Janeiro, 139 p.

CUNICO, M. W., CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G., ZAWADZKI, S. F., PERALTA-ZAMORA, P., & VOLPATO, N. (2008). **Factorial desing: a valuable statistic tool to define experimental parameters applied in scientific research**. *Visão Acadêmica*, 23-32.

DALTIN, D. (2011). **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo - SP: Blucher, 1, 59 p.

DESAI, J., & BANAT, I. (1997). **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.

DIDYK-MUCHA, A., POLOWCZYK, I., SADOWSKI, Z., & KUDELKO, J. (2015). **Electrokinetic and flotation investigations of surface properties modification of magnesite and serpentinite using biosurfactants and surfactants.** *Journal of Physical Science and Application*, 5, 87-95.

DIVISÃO DE BIBLIOTECAS E DOCUMENTAÇÃO, D. (s.d.). **Acesso remoto/Área restrita PUC-Rio.** Acesso em 10 de julho de 2017, disponível em DBD PUC-Rio: www.dbd.puc-rio.br/area_restrita.php

DNPM. (2015). **Sumário Mineral - DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL**. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), Brasília, 35, 31 p.

DWYER, R., BRUCKARD, W., REA, S., & HOLMES, R. (2012). **Bioflotation and bioflocculation review: microorganisms relevant for mineral beneficiation.** *Mineral Process Extrative*, 121, 65-71.

FARAHAT, M., HIRAJIMA, T., & SASAKI, K. (2010). **Adhesion of Ferroplasma acidiphilum onto pyrite calculated from the extended DLVO theory using the van Oss–Good–Chaudhury approach.** *Journal of Colloid and Interface Science*, 349, 594-601.

FARAHATA, M., HIRAJIMA, T., SASAKIA, K., & DOI, K. (2009). **Adhesion of Escherichia coli onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74, 140-149.

FAZAELOPOOR, M. H., KHOSHDAST, H., & RANJBAR, M. (2010). **Coal flotation using a biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa as a frother.** *Korean J. Chem. Eng.*, 27, 1527 - 1531.

FERNANDES, F., LUZ, A. B., & CASTILHOS, Z. C. (2010). **Agrominerais para o Brasil (Vol. 1).** Rio de Janeiro: CETEM/MCT.

FINNERTY, W. (1992). **The Biology and Genetics of the Genus Rhodococcus.** *Annual Review of Microbiology*, 46, 193-218.

FINNERTY, W. (1994). **Biosurfactants in environmental biotechnology.** *Current Opinion in Biotechnology*. 5, 291-295.

FORNASIERO, D., & RALSTON, J. (2005). **Cu(II) and Ni(II) Activation in the Flotation of Quartz, Lizardite and Chlorite.** *Int. J. Miner. Process*, 76, 75-81.

FOX, A. (2016). **Bacteriology**. (University of South Carolina School of Medicine) Acesso em 02 de novembro de 2017, disponível em Microbiology and Immunology on-line: <http://www.microbiologybook.org/book/bact-sta.htm>

FRIEDRICH, B., & SCHWARTZ, E. (1993). **Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs**. *Annual Reviews full-text article*, 47, 351-383.

FUERSTENAU, D., & CHANDER, S. (1986). **Thermodynamics of Flotation**. In: *Advances in Mineral Processing*. Colorado: SME, 57, 205-217.

GARIP, S., GOZENB, A. C., & SEVERCAN, F. (2009). **Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates**. In: *Food Chemistry*, 113, 1301–1307.

GUO, X., XIANG, D., DUAN, G., & MOU, P. (2010). **A review of mechanochemistry applications in waste management**. *Waste Manag*, 30, 4-10.

IUPAC. (2017). **IUPAC Gold book**. Acesso em 19 de 07 de 2017, disponível em alkoxyamines: <http://goldbook.iupac.org/html/A/A00226.html>

KELLY, E. G., & SPOTTISWOOD, D. J. (1982). **Introduction to mineral processing**. 1, 516.

KHOSHDAST, H., & SAM, A. (2011). **Flotation Frothers: Review of Their Classifications, Proper ties and preparation**. *The Open Mineral Processing Journal*, 4, 25-44.

KIM, G., PARK, K., CHOI, J., GOMEZ-FLORES, A., & HAN, Y. (2015). **Bioflotation of malachite using different growth phases of Rhodococcus opacus: Effect of bacterial shape on detachment by shear flow**. *International Journal of Mineral Processing*, 193, 98-104.

KOSARIC, N., & VARDAR-SUKAN, F. (Eds.). (2015). **Biosurfactants production and utilization - processes, technologies and economics**. london: Taylor & Francis, 159, 389.

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

KUMAR, A., RAMARAO, V. V., & SHARMA, K. D. (2013). **Microbial Induced Flotation Studies on Sphalerite Ore**. *Journal of Materials Science and Engineering*, 3, 488-493.

KUYUMCU, H. Z., BIELIG, T., VILINSKA, A., & RAO, K. H. (2009). **Biocoagulation and its Application Potentials for Mineral Bioprocessing.** *The Open Mineral Processing Journal*, 2, 1-11.

LANG, S. (2002). Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7, 12-20.

LANG, S., & PHILP, J. C. (1998). **Surface-active lipids in Rhodococci.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 59-70.

LAPIDO-LOUREIRO, F., & NASCIMENTO, M. (2003). **Fertilizantes e Sustentabilidade na Agricultura: Uma Abordagem Mínero-Química-Metalúrgica.** *Publicações/Série Estudos e Documentos nº53*. CETEM, 68 p.

LEAL FILHO, L. S. (1995). **Concentração por flotação.** São Paulo: Convênio CVRD/EPUSP.

LÓPEZ OLIVARES, L. Y.(2014). **Fundamental aspects of hematite flotation using the bacterial strain Rhodococcus ruber.** *Dissertação de mestrado*. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Rio de Janeiro, 107 p.

LOPEZ, L. Y., MERMA, A. G., TOREM, M. L., & PINO, G. H. (2015). **Fundamental aspects of hematite flotation using the bacterial strain Rhodococcus ruber as bioreagent.** *Minerals Engineering*, 75, 63-69.

LUZ, A. B., & ALMEIDA, S. L. (1989). In: **Manual de usinas de beneficiamento.** Rio de Janeiro: CETEM/CNPq.

LUZ, A. B., & LINS, F. F. (2008). **Rochas e minerais industriais: usos e especificações (2ª ed.).** (A. B. Luz, & F. F. Lins, Eds.) Rio de Janeiro: CETEM/MCT.

LUZ, A. B., SAMPAIO, J. A., & FRANÇA, S. C. (2010). **Tratamento de minérios (5ª ed., Vol. único).** (A. B. Luz, J. A. Sampaio, & S. C. França, Eds.) Rio de Janeiro: CETEM/MCT.

MARTÍNKOVÁ, L., UHNÁKOVÁ, B., MIROSLAV, N., & JAN & KŘEN, V. (2009). **Biodegradation potential of the genus Rhodococcus.** *Environment International*, 35, 162-177.

MATIS, K. (Ed.). (1994). **Flotation Science and Engineering.** Taylor & Francis.

MC CLELLAN, G. H., & KAUWENBERG, S. J. (1990). **Mineralogy of sedimentary apatites.** *Phosphorite research and development* 385-413.

MEHRABANI, J., NOAPARAST, M., MOUSAVI, M., DEHGHAN, R., RASOOLi, E., & HAJIZADEH, H. (2010). **Depression of Pyrite in the Flotation of High Pyrite Low-Grade Lead-Zinc Ore Using Acidithiobacillus Ferrooxidans.**

MERMA, A. G. (2012). **Aspectos Fundamentais da Bioflotação do Sistema Apatita Quartzo usando a bactéria Rhodococcus opacus como biorreagente.** Tese de doutorado. Rio de Janeiro: PUC-Rio.

MERMA, A. G., HACHA, R. R., TOREM, M. L. (2017). **Cellular Adaptation: Culture conditions of R. opacus and bioflotation of apatite and quartz.** REM - International Engineering Journal.

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

MESQUITA, L. M. DE (2000) **Bioflotação de Hematita e Quartzo - Um Estudo de Seletividade.** 93 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia na PUC-Rio, Rio de Janeiro - RJ.

MESQUITA, L. M. DE, LINS, F., & TOREM, M. L. (2003). **Interaction of a Hydrophobic Bacterium Strain in a Hematite-Quartz Flotation System.** 71, 33-44.

MESQUITA, A. C. (2004). **Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes.** 158 p. Tese de doutorado. UFRJ, Rio de Janeiro.

MEW, M. C. (setembro de 2015). Phosphate rock costs, prices and resources interaction. *Science of the Total Environment*, 5.

MME. (2009). **Relatório técnico 53: Perfil do fosfato.** MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME) e BANCO MUNDIAL.

MONTE, M., & PERES, A. (2002). **Química de superfície na flotação.** In: A. LUZ, J. SAMPAIO, M. MONTE, & S. ALMEIDA, *Tratamento de Minérios* (3ª ed., p. 849). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: CETEM/MCT.

MOREAU, R., POWELL, M. J., & SINGH, V. (2003). **Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol and ethanol.** *Journal of the American Oil Chemists' Society.*

MULLIGAN, C. N. (2005). **Environmental Applications for Biosurfactants.** In: *Environmental Pollution* (pp. 183-198).

MULLIGAN, C., SHARMA, S. K., & MUDHOO, A. (Eds.). (2014). *Biosurfactants: **Research trends and applications***. LONDON: Taylor & Francis.

NATARAJAN, K. (2006). **Microbially-induced mineral flotation and flocculation: prospects and challenges**. *Proceedings of XXIII International Mineral Processing Congress*, 487-498.

NGUYEN, A., & SCHULZE, H. (2004). **Colloidal Science of Flotation**. In: A. NGUYEN, & H. SCHULZE, *Surfactant Science* (p. 840). New York: Marcel Dekker.

OLIVEIRA, C. A., MERMA, A. G., PUELLES, J. G., & TOREM, M. L. (2017). **On the fundamentals aspects of hematite bioflotation using a Gram positive strain**. *Minerals Engineering*, 55–63.

OLIVEIRA, J. G., & GARCIA-CRUZ, C. H. (2013). **Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using Vinasse and Waste Frying Oil as alternative carbon sources**. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

OLIVEIRA, C. A. (2015). **Biofotação da hematita usando a bactéria: *Rhodococcus Erythropolis***. *Dissertação de mestrado*. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-Rio, Rio de Janeiro.

PAIVA, M. P., POMPEO, A., RODRIGUES, R. T., & RUBIO, J. (2011). **Caracterização e flotação de minérios de fosfato do Chile**. *Holos*, 5, 30-38.

PAIVA, P., MONTE, M. B., & GASPAR, J. C. (2011). **Concentração por flotação da apatita proveniente de rochas de filiação carbonatítica**. *Rem: Revista Escola de Minas*, 111 - 116.

PATRA, P., & NATRAJAN, K. (2008). **Role of Mineral Specific Bacterial Proteins in Selective Flocculation and Flotation**. *Int. J. Miner. Process.*, 53-58.

PEI, X., ZHAN, X., & ZHOU, L. (2009). **Effect of biosurfactant on the sorption of phenanthrene onto original and H₂O₂-treated soils**. *Journal of Environmental Sciences*.

POTAFOS. (2005). **Arquivo do Agrônomo nº 10 – Nutri-fatos**. Publicações POTAFOS.

PUELLES, J. G. (2016). **Hematite flotation using a crude biosurfactant extracted from *Rhodococcus opacus***. *Dissertação de mestrado*. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - Puc-RJ, Rio de Janeiro.

RAO, K. H., VILINSKA, A., & CHERNYSHOVA, I. V. (2010). **Minerals Bioprocessing: R & D Needs in Mineral Biobeneficiation.** *Hydrometallurgy*.

RAO, K., & SUBRAMANIAN, S. (2007). **Bioflotation and bioflocculation of relevance to minerals bioprocessing.** In: E. DONATI, & W. SAND (Eds.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Netherlands: Springer.

RIVERA-MUÑOZ, E. M. (2011). **Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization.** Acesso em 2017 de julho de 16, disponível em INTECH: <https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydroxyapatite-based-materials-synthesis-and-characterization>

RODRIGUEZ, M., CASTILLO, P., DIAZ, V., & ORRANTIA, E. (2009). **Effect of Leptospirillum Ferrooxidans on the Flotation Kinetics of Sulphide Ores.** *Minerals Engineering*.

ROSÁRIO, L. M. DO (2015) **Caracterização tecnológica do minério sílico carbonatado da mina do Barreiro em Araxá.** Trabalho de conclusão de curso. Curso de graduação em engenharia de minas com habilitação em lavras e beneficiamento na Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, Bahia, Brasil, 107 p.

SCHNELRATH, J., CORREIA, J. C., GUIMARÃES, R. C., & TEIXEIRA, S. H. (2001). **Serrana/Mina Araxá.** In: *Usinas de Beneficiamento de Minérios do Brasil*. CETEM.

SHARMA, P. K. (2001) **Surfaces Studies Relevant to Microbial Adhesion and Bioflotation of Sulphide Minerals.** *Tese de doutorado*. Lulea University of Technology, Department of Chemical and Metallurgical Engineering, Division of Mineral Processing. 297 p.

SHARMA, P., & RAO, K. H. (2002). **Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry.** In: *Advances in Colloid and Interface Science* (pp. 341–463).

SHAW, D. J. (1992). **Introdution to Colloid and Surface Chemistry.** Boston: BUTTERWORTH HEINEMANN.

SILVA, L. M. DA (2007). **Remoção de Cu e Co contido em soluções aquosas por biossorção.** *Tese de doutorado*. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-RIO, 77 p.

SILVEIRA, L. H. (2014). **Subcomissão temporária de elaboração do projeto de lei do marco regulatório da mineração e da exploração de terras raras no brasil - CCTSTTR.** Senado Federal.

SIM, R. (Agosto de 2016). **The Essential Element: How Phosphorus Scarcity Endangers the World.** *Harvard International Review (HIR).*

SOUZA, M. DE (2012). **Processos Inorgânicos.** Rio de Janeiro, Ed: Synergia.

SUBRAMANIAN, S., SANTHIYA, D., & NATARAJAN, K. (2003). **Surface modification studies on sulphide minerals using bioreagents.** *International Journal of Mineral Processing*, 175-188.

SZYMANSKA, A., & SADOWSKI, Z. (2010). **Effects of biosurfactants on surface properties of hematite.** *Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, Wroclaw University of Technology.*

USGS. (01 de 2017). **Mineral Commodity Summaries.** Acesso em 18 de 07 de 2017, disponível em U.S. Geological Survey: https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate_rock/mcs-2017-phosp.pdf

VAN DER WAL, A., NORDE, W., ZEHNDER, A. B., & LYKLEMA, J. (1997). **Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria.** *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, 81 - 100.

VILINSKA, A., & HANUMANTHA RAO, K. (2008). **LeptosirillumFerrooxidans – Sulfide Mineral Interaction with Reference to Bioflotation and Bioflocculation.**

WALPOLE, E., RONALD, E., MYERS, R., MYERS, S., & KEYING, Y. (2012). **Probability and statistics for engineers and scientists.** 9. Boston: Pretice Hall.

WANG, G., SOTILLO, F. J., & LILLEY, G. M. (2008). **Patente Nº US 7516849 B2.** United States.

WEBER, K., ACHENBACH, L., & COATES, J. (2006). **Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction.** *Nature Reviews Microbiology*, 752-764.

WHYTE, L. G., SCHULTZ, A., VAN BEILEN, J. B., LUZ, A. P., PELLIZARI, V., LABBÉ, D., *et al.* (2002). **Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils.** *FEMS Microbiology Ecology*, 141-150.

WILLS, B. A., & NAPIER-MUNN, T. (2006). **Mineral Processing Technology: An introduction to the practical aspects of ore treatment and mineral (7ª ed.).** Elsevier Science & Technology Books.

YANG, H., LI, T., TANG, Q., WANG, C., & MA, W. (2013). **Development of a bio-based collector by isolating a bacterial strain using flotation and culturing techniques.** *International Journal of Mineral Processing*, 145-151.

YANG, H., TANG, Q., WANG, C., & ZHANG, J. (2013). **Flocculation and flotation response of *Rhodococcus erythropolis* to pure minerals in hematite ores.** *Minerals Engineering*, 67-72.

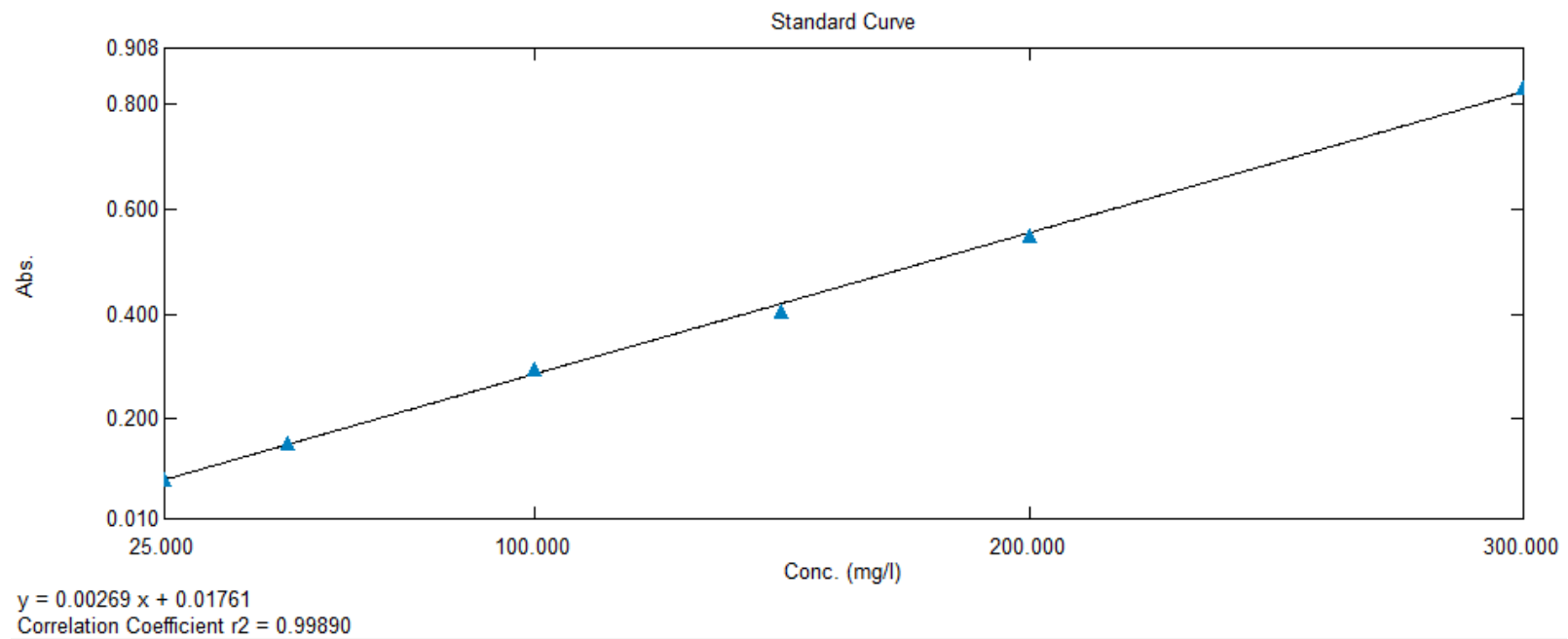
YANG, H., ZHANG, Q., & JIANG, Z. (2007). **Adsorbability of *Mycobacterium phlei* on hematite surface.** *Journal of University of Science and Technology*, 103-106.

ZAPATA, F., & ROY, R. (2004). **Use of phosphate rocks for sustainable agriculture.** *Fertilizer and Plant Nutrition Bull.*

ZHENG, X., ARPS, P. J., & SMITH, R. W. (2001). **Adhesion of Two Bacteria onto Dolomite and Apatite:** Their Effect on dolomite Depression in Anionic.

Apêndices

Apêndice A – Curva de calibração do ensaio de bioadesão



Apêndice B – Dados experimentais de flotação

pH	conc (mg/L)	Flotabilidade (%)	
		BS	Bactéria
3	0	1,00	1,00
3	25	27,50	11,00
3	50	43,67	10,00
3	75	52,00	13,00
3	100	68,00	13,50
3	125	72,00	18,00
3	150	72,51	14,50
5	0	2,17	1,50
5	25	31,00	7,00
5	50	53,50	9,00
5	75	69,41	18,50
5	100	77,25	20,00
5	125	79,60	26,50
5	150	79,00	22,00
7	0	2,00	1,00
7	25	21,00	1,99
7	50	25,76	2,98
7	75	34,15	3,00
7	100	30,67	3,97
7	125	30,90	9,00
7	150	33,32	7,50
9	0	1,00	1,00
9	25	29,86	6,00
9	50	47,97	7,50
9	75	57,42	6,50
9	100	61,89	14,50
9	125	66,80	9,00
9	150	63,38	9,00
11	0	3,88	1,00
11	25	29,00	9,81
11	50	38,50	14,26
11	75	40,00	10,33
11	100	41,85	11,32
11	125	49,60	12,50
11	150	43,50	13,13