

## 4 Materiais e Métodos

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

### 4.1. Amostras Minerais

Neste trabalho usaram-se amostras puras de dois minerais de apatita e quartzo. O quartzo e uma amostra de apatita foram obtidos da Mineração “Zé da Estrada” (Minas Gerais). A outra amostra de apatita foi obtida no centro de tecnologia mineral - CETEM. A maior diferença entre ambas as amostras minerais de apatita foi a sua coloração, sendo que a amostra de Minas Gerais tinha uma cor *azul*, enquanto a amostra cedida pelo CETEM tinha uma cor *verde*. Assim, neste estudo a amostra *azul* foi denominada “*apatita A*” e a amostra *verde* “*apatita B*”.

O grau de pureza dos minerais utilizados no trabalho foi determinado fazendo análises por difração de Raios-X e fluorescência de raios X.

Após etapas de seleção manual, cominuição e peneiramento, diferentes frações granulométricas (Tabela 19) foram selecionadas para a realização das diferentes etapas experimentais, medidas eletroforeticas, ângulo de contato e

flotação. O procedimento completo da obtenção de amostras minerais pode ser observado na Figura 27.

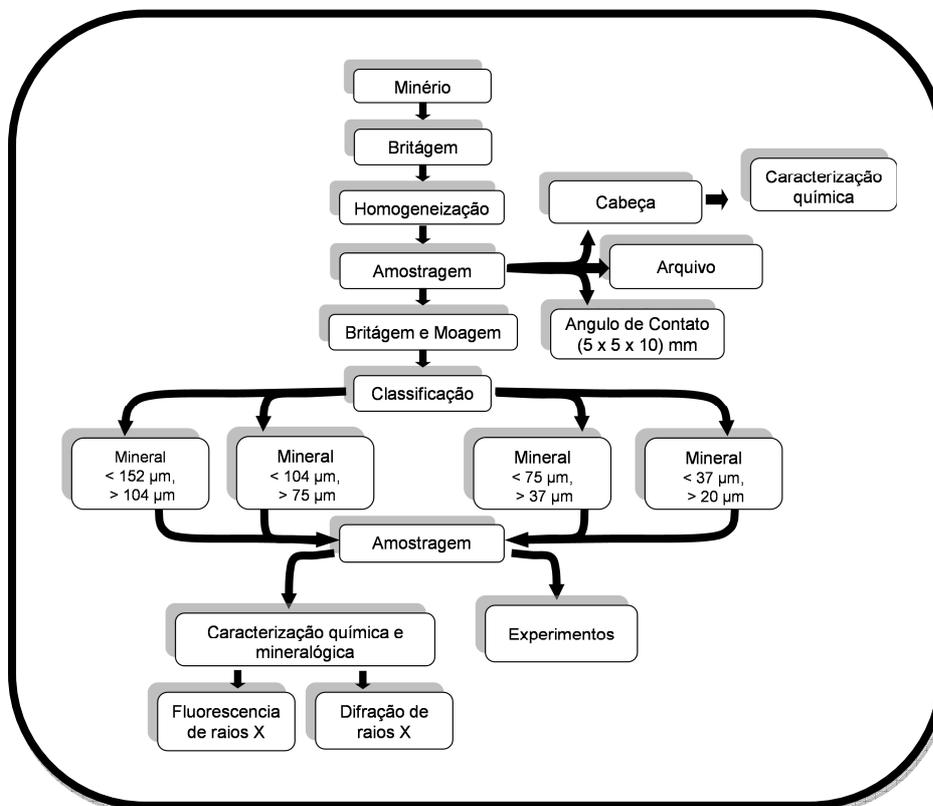


Figura 27- Esquema gráfico da preparação das amostras minerais.

Tabela 19- frações granulométricas dos minerais para cada um dos ensaios realizados

Experimento	Tamanho de Partícula
Testes de potencial Zeta	< 38 µm
Experimentos de microflotação	(150 – 105) µm
	(105 – 75) µm
	(75 – 38) µm
Medidas de ângulo de contato	(0,5 × 0,5 × 1,0) cm

As amostras de apatita foram submetidas a lavagens com HCl 0,01 M, posteriormente lavadas rapidamente com água Milli-Q, varias vezes até que o valor de pH do efluente alcance o valor do inicial de pH da água, para logo serem

secadas e guardadas em dissecador até o momento de serem usados nos ensaios experimentais.

Já as amostras de quartzo foram lavadas com KOH 0,01M. Logo após, foi realizado o mesmo procedimento feito com as amostras de apatita.

#### 4.2. Preparação do concentrado bacteriano e condições de cultivo

As espécies microbianas empregadas neste estudo foram obtidas da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI - UNICAMP. Trata-se da espécie bacteriana denominada *Rhodococcus Opacus*. O uso da Bactéria *R. Opacus* no processo de bioflotação deve-se as características hidrofóbicas que apresenta a sua superfície, além da sua facilidade em produzir espuma quando em suspensão aquosa, fatos comprovados em trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Primeiramente todo material de vidro utilizado, assim como os diferentes meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm. de pressão e 121°C durante 20 minutos. A cepa bacteriana foi cultivada nomeio sólido – composição vista na Tabela 20 – em placas de Petri e levada a incubação até as colônias da bactéria forem identificadas.

Tabela 20- Meio de cultivo utilizado na cultura bacteriana.

Componente	Sólido (g/L)	Líquido (g/L)
Glicose	4	10
Peptona	5	5
Extrato de malte	10	3
Extrato de levedura	4	3
CaCO <sub>3</sub>	2	-
Agar	12	-
pH	7,2	7,2

Posteriormente, a bactéria foi sub-cultivada no meio de cultura líquido – composição vista na Tabela 20 – em balões de Erlenmeyer de 250 mL e levado a

incubação num shaker rotatório (CIENTEC CT-712) a uma temperatura de 28°C durante 24 horas.



Figura 28- Colônias da bactéria *R. Opacus* em placa petri.

Após o tempo de crescimento foram tomadas alíquotas de 20 ml da suspensão bacteriana para fazer mais um sub-cultivo em meio líquido com concentração inicial de 10% (v/v), incubado no shaker durante 48 horas, o ultimo foi feito para garantir um crescimento bacteriano constante em cada Erlenmeyer utilizado.



Figura 29- Crescimento bacteriano em incubadora Shaker (Cientec-CT712T)

Após o último crescimento, a suspensão celular foi centrifugada com 3300x g durante 8 minutos, o concentrado da centrifugação constituído pelas células da bactéria, foi lavado três vezes com água deionizada, e re-suspenso numa solução de 1mM de NaCl, finalmente a suspensão concentrada obtida foi esterilizada na autoclave para inativar as bactérias presentes. Esse concentrado final é a biomassa utilizada como biorreagente no desenvolvimento do trabalho.



Figura 30- Espectrofotômetro UV/Vis-1800 e Centrifuga digital.

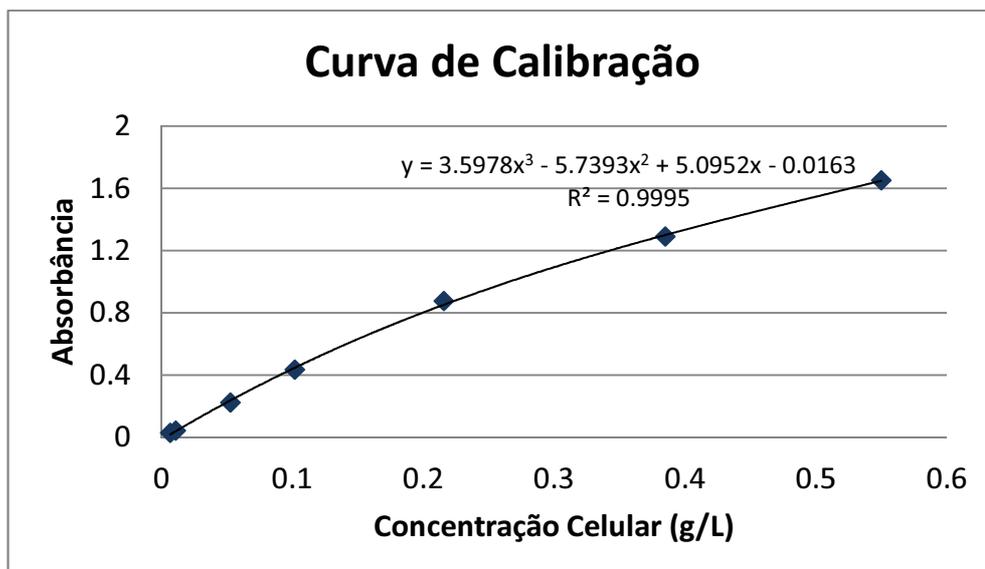


Figura 31- Curva de calibração da bactéria *R. opacus*, relação entre concentração celular e absorbância de uma suspensão celular.

A concentração celular da suspensão bacteriana foi determinada por meio da densidade ótica num espectrofotômetro UV/Vis (UV-Spectrophotometer, UV-1800, Shimadzu) (Figura 30) a comprimentos de onda específica para a bactéria ( $\lambda=620\text{nm}$ ). Para tal, foi necessária a construção de uma curva de calibração concentração celular-absorbância (Figura 31). O peso seco da biomassa foi determinado após filtração em sistema Millipore a vácuo utilizando-se membrana de celulosa de  $0,45\ \mu\text{m}$  (Millipore, EUA) e finalmente seco na estufa a  $160^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.1.

#### **Adaptação da bactéria a substrato mineral**

Com o intuito de confirmar o comportamento seletivo apresentado por uma cepa bacteriana após adaptação a um substrato mineral a cepa *R. opacus* sofreu adaptação a presença de amostras minerais como quartzo e apatita “A”. A adaptação da bactéria foi realizada durante o desenvolvimento das células bacterianas sob as mesmas condições de cultivo e usando o meio de cultura líquido padrão em presença do mineral com uma concentração de 5% (p/v) em 3 sub-culturas consecutivas.

#### 4.3.

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

As medidas de potencial zeta para as bactérias assim como para os amostras minerais foram determinadas num equipamento de micro eletroforese do tipo Zeta meter system +4.0 (Figura 32). O equipamento permite determinar o valor de potencial zeta baseado na velocidade da partícula em suspensão (aquosa ou orgânica) submetida a uma diferença de voltagem entre dois eletrodos.

As medidas de potencial zeta da suspensão mineral e bacteriana foram realizadas empregando-se como eletrólito indiferente NaCl (1 mM). Preparou-se suspensões com concentração de  $0,1\ \text{g.L}^{-1}$ . o valor de pH foi ajustado com alíquotas de HCl e NaOH.

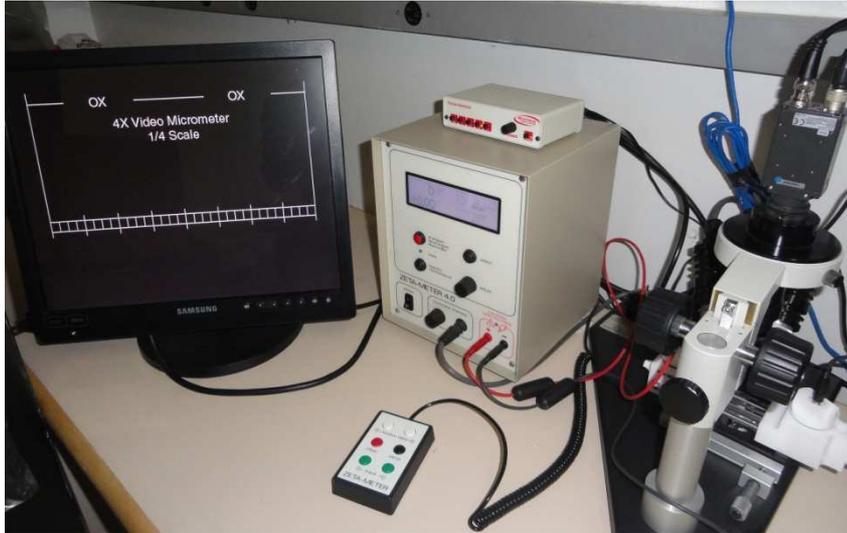


Figura 32- Zeta-Meter +4.0.

A seguir, é apresentado o procedimento que foi seguido para a realização dos testes de determinação de potencial zeta da suspensão celular e/ou mineral:

- 1) Preparar suspensão com a concentração desejada;
- 2) Ajustar pH da suspensão;
- 3) Repouso de 5 minutos;
- 4) Preencher a célula do zeta meter com a suspensão;
- 5) Conectar os terminais da célula a fonte de tensão;
- 6) Realizar a medida de 20 partículas.

Assim, foram realizados ensaios de potencial zeta visando avaliar a influência da interação das células bacterianas na superfície das espécies minerais. Nesse caso, foi efetuado um pré-condicionamento das soluções minerais com uma suspensão celular de concentração conhecida, durante 10 minutos. Após este período, o sobrenadante foi utilizado nas medidas. Foram avaliados diferentes valores de pH no pré-condicionamento, sendo empregado como eletrólito uma solução de NaCl 1mM. Para garantir a exatidão da medição, tomaram-se a média de 20 valores e o valor de desvio padrão.



Figura 33- Célula de acrílico do zeta-meter +4.0.

#### 4.4. Ensaio de medida de ângulo de contato

Com o objetivo de avaliar a possível alteração na hidrofobicidade da superfície dos minerais após da adesão do biorreagente serão medidos os valores de ângulo de contato das amostras minerais antes e após da interação com a bactéria. Será empregado um goniômetro Ramé Hart-inc modelo 100-00-115 (Figura 34). Para medir os valores de ângulo de contato das amostras minerais, seções polidas dos minerais, medindo  $0,5 \times 0,5 \times 1,0$  cm (Figura 35) foram moldadas com resina epoxíca. A superfície de cada amostra foi, então, cuidadosamente polida até chegar a suspensão de diamante ( $1\mu\text{m}$ ). As superfícies das seções de cada mineral foram levadas a banho ultrassom durante 2 minutos e logo lavadas com jatos de água deionizada para remover pequenas partículas aderidas. Para ter certeza que todas as imperfeições superficiais foram atenuadas no polimento foi empregada uma lupa com um aumento de 10 vezes.

O acondicionamento da superfície mineral foi realizado com suspensão celular da bactéria a uma concentração conhecida ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ), NaCl  $0,001\text{M}$  e com diferentes valores de pH, valores ajustados com alíquotas de HCl e NaOH. Gotas da suspensão celular foram depositadas sobre a superfície dos minerais e deixadas em repouso por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram lavadas com solução NaCl  $0,001 \text{ M}$  para remover as células não aderidas. Depois submersas na mesma solução com o mesmo valor de pH do condicionamento. Finalmente foram liberadas bolhas de ar com tamanho de  $5\mu\text{m}$  de diâmetro sobre a superfície, sendo

realizadas as medidas de ângulo de contato no goniômetro, utilizando o método de bolha cativa. As medidas foram realizadas em triplicata.

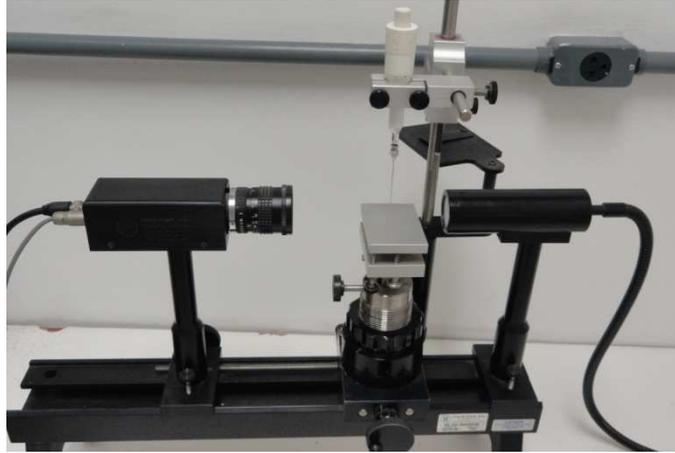


Figura 34- Goniômetro Ramé Hart-inc.

Antes de cada medida de ângulo de contato nas seções polidas, realizou-se um polimento com suspensão de diamante e banho ultrassom. Após isso as seções foram lavadas repetidas vezes, e mantidas mergulhadas em água Milli-Q, por curtos períodos de tempo, antes de se proceder a um novo ensaio. A limpeza das superfícies foi verificada medindo-se previamente o ângulo de contato em água Milli-Q, apresentando valor igual ou próximo de zero, para as superfícies dos minerais.



Figura 35- Seções polidas de amostras minerais, Quartzo e apatita.

#### 4.5. Ensaio de Microflotação

Os ensaios de microflotação foram conduzidos em tubo de Hallimond modificado. Para tal precisou-se de um rotâmetro para medir a vazão de ar, um bolhometro para calibrar o rotâmetro, um agitador magnético para manter as partículas minerais em suspensão, uma bomba de vácuo-compressor para fornecer o ar necessário e o tubo de Hallimond. A Figura 36 mostra o sistema usado neste processo.

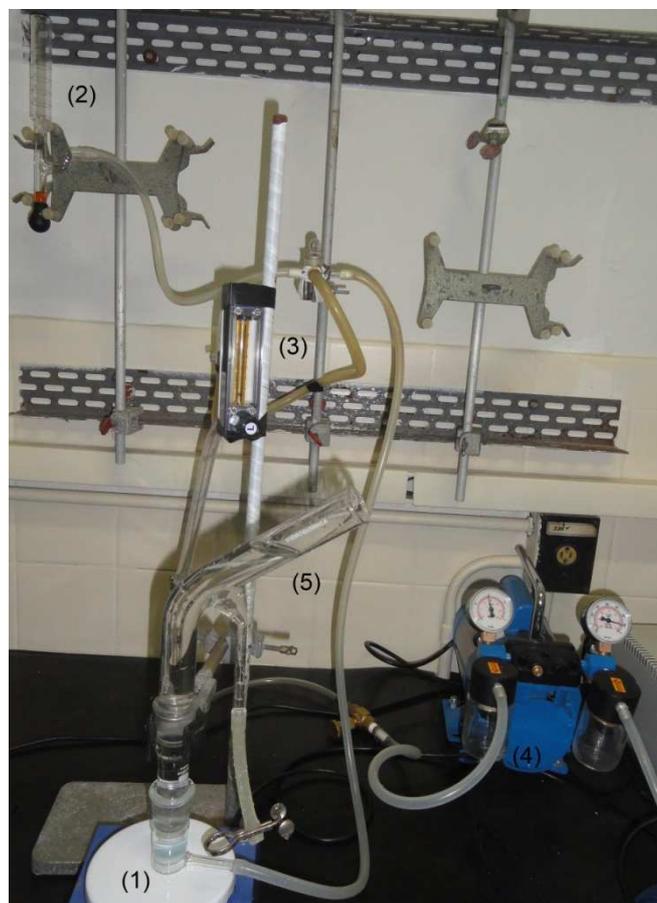


Figura 36- Sistema de microflotação em tubo de Hallimond, (1) Agitador magnético, (2) Bolhometro, (3) Rotâmetro, (4) Bomba de vácuo-compressora, (5) Tubo de Hallimond.

Antes de realizar os ensaios o rotâmetro foi calibrado para garantir uma vazão de ar de  $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Todos os experimentos de microflotação foram realizados em duplicata.

Inicialmente foi estudada a facultade espumante apresentada pela bactéria *Rhodococcus opacus*, posteriormente, foi estudada a flotabilidade dos minerais puros em função do pH, usando um tubo de Hallimond modificado com diferentes alturas a fim de minimizar o arraste de partículas. Em seguida, foram realizados ensaios para determinar o comportamento da bactéria na flotabilidade de cada mineral, primeiro foi determinado o efeito do pH, e logo a influência da concentração da suspensão celular.

O procedimento utilizado neste trabalho foi o seguinte: uma quantidade conhecida de mineral foi condicionada por 5 minutos em suspensão celular de concentração também conhecida a um valor determinado de pH, valores ajustados com alíquotas de soluções diluídas de NaOH e HCl. A suspensão mineral-bactéria foi transferida ao tubo de Hallimond com um volume de 160mL. Finalmente, ligou-se a bomba de ar e a flotação foi conduzida durante 2 minutos. Após este tempo a massa flotada foi recolhida, seca e pesada. A flotabilidade corresponde à porcentagem de massa flotada. Na Tabela 21 são apresentadas as condições experimentais dos ensaios realizados.

Tabela 21- Condições empregadas na microflotação mineral

PARAMETRO	Apatita "A"	Apatita "B"	Quartzo
Vol. Solução (mL)	160	160	160
Massa Mineral (g)	1	1	1
Conc. Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	0,1; 0,15; 0,2	0,1; 0,15; 0,2	0,1; 0,15; 0,2
Vazão (mL.min <sup>-1</sup> )	15	15	15
Temperatura (°C)	23	23	23
pH	3; 5; 7; 9; 11	3; 5; 7; 9; 11	3; 5; 7; 9; 11
Tempo (min)	2	2	2

Nesta etapa também foram coletadas amostras de material flotado dos minerais para análise em microscópio eletrônico MEV e poder visualizar as bactérias aderidas no processo.

A recuperação do mineral em determinado tempo de flotação foi calculado baseando-se na concentração inicial do mineral, isto é:

$$R(\%) = \left( \frac{m_0 - m_{nf}}{m_0} \right) \times 100 \quad (27)$$

Ou:

$$R(\%) = \left( 1 - \frac{m_{nf}}{m_0} \right) \times 100 \quad (28)$$

Onde:

$m_{nf}$ : Massa não flotada do mineral;

$m_0$ : Massa inicial do mineral;

$R(\%)$ : Recuperação do mineral.

Para determinar a cinética da flotação das amostras minerais usando a bactéria *R. opacus* como biorreagente, foram realizados ensaios em função do tempo. Os parâmetros utilizados nestes ensaios podem ser vistos na Tabela 22

Tabela 22- Parâmetros utilizados na determinação da cinética de microflotação mineral usando a bactéria *R.opacus* como biorreagente.

PARAMETRO	Apatita "A"	Apatita "B"	Quartzo
Vol. Solução (mL)	160	160	160
Massa Mineral (g)	1	1	1
Conc. Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	0,2	0,15	0,15
Vazão (mL.min <sup>-1</sup> )	15	15	15
Temperatura (°C)	23	23	23
Tempo (min)	0,5; 1; 2; 3; 5; 7	0,5; 1; 2; 3; 5; 7	0,5; 1; 2; 3; 5; 7

#### 4.6. Microscopia eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi usada na caracterização, validação da interação e/ou adesão dos microrganismos e/ou produtos metabólicos na superfície mineral durante o processo de bioflotação. Para tal usou-se um MEV modelo FEI Quanta 400.

A preparação de amostras biológicas a serem analisadas no MEV segue um procedimento detalhado, o qual garante a conservação da estrutura da amostra. Neste trabalho foram utilizados dois tipos de amostras, sendo a primeira uma amostra da célula bacteriana, e a segunda, amostras do mineral coletado na etapa de flotação. A amostra mineral deve ter na sua superfície células da bactéria aderidas, motivo pelo qual essas amostras foram preparadas como amostras do tipo biológicas.

Procedimento de preparação de amostras biológicas para análise em MEV:

- a. Fixação química da estrutura da bactéria por um período de 3 horas em glutaraldeído a 5% (v/v), preparando em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M.
- b. Desidratação da amostra mergulhando a amostra em soluções crescentes de acetona ou etanol entre 30% e 100% em água destilada.
- c. Secagem da amostra, realizada no equipamento de ponto crítico de CO<sub>2</sub>.
- d. Metalização da superfície com ouro.
- e. Análise MEV.