

DANIELA GOMES HORTA

**Influência da adição da espécie
Acidithiobacillus ferrooxidans e de íons Cl^-
na dissolução da calcopirita (CuFeS_2)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para obter o título de Mestre, no curso de pós-graduação em Química

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior

Araraquara

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

H821i	<p>Horta, Daniela Gomes</p> <p>Influência da adição da espécie <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> e de íons Cl^- na dissolução da calcopirita (CuFeS_2) / Daniela Gomes Horta. – Araraquara : [s.n], 2008 100 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Oswaldo Garcia Junior</p> <p>1. Bioquímica. 2. Biolixiviação. 3. Eletroquímica. 4. Biohidrometalurgia. I. Título.</p>
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FORMAÇÃO ACADÊMICA

I. BACHARELADO EM QUÍMICA

Curso de Bacharelado em Química concluído em 2005 no Instituto de Química de Araraquara – UNESP

I.1. ESTÁGIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Estágio de Iniciação Científica realizado no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, do Instituto de Química, Araraquara – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior, no período de 01/04 a 12/05.

Título: Estudo eletroquímico da interação *Acidithiobacillus ferrooxidans*-calcopirita (CuFeS_2) utilizando eletrodos de pasta de carbono.

II. MESTRADO EM QUÍMICA

Curso de Mestrado em Química no Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior, no período de 01/06 a 06/08.

Título: Influência da adição da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* e de íons Cl^- na dissolução da calcopirita (CuFeS_2)

II.1. ESTÁGIO NO EXTERIOR

Estágio realizado no grupo de Mineralogia Extrativa do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Complutense de Madrid (Espanha) sob a supervisão dos Professores Dr. Antonio Ballester e Dr. Jesus A. Muñoz, no período de 11/07 a 05/08, para desenvolvimento de parte do trabalho experimental da dissertação de mestrado.

III. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

HORTA, D. G.; BEVILÁQUA, D; ACCIARI, H. A.; GARCIA JÚNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Electrochemical noise analysis of chalcopyrite carbon paste electrodes. **Advanced Materials Research**, v. 20-21, p. 83/86-83, 2007.

IV. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILÁQUA, D.; ARENA, F. A. ; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Influence of chalcopyrite (CuFeS_2) concentration in the electrochemical response of carbon paste electrode (CPE). In: IV International Copper Hydrometallurgy Workshop, Hydrocopper, 2007, Viña del Mar. **Proceedings of IV International Copper Hydrometallurgy Workshop**, 2007. p. 101-105.

ARENA, F. A.; HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILÁQUA, D.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Study of the electrochemical behavior of bornite using a carbon paste electrode. In: IV International Copper Hydrometallurgy Workshop, Hydrocopper, 2007, Viña del Mar. **Proceedings of the IV International Hydrometallurgy Workshop**, 2007. p. 09-100.

HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILÁQUA, D.; ARENA, F. A.; FUGIVARA, C. S.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Estudo da concentração de calcopirita (CuFeS_2) em eletrodo de pasta de carbono (CPE). In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, SIBEE, 2007, Águas de Lindóia. CD dos **Anais do XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2007.

ARENA, F. A.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V.; BEVILÁQUA, D.; ACCIARI, H. A.; HORTA, D. G. Estudo do comportamento eletroquímico da bornita (Cu_5FeS_4) utilizando-se eletrodo de pasta de carbono (CPE). In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, SIBEE, 2007, Águas de Lindóia. **Anais do XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2007.

HORTA, D. G.; BEVILÁQUA, D.; CAPELA, M. V.; ACCIARI, H. A.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Cyclic voltammetry of carbon paste electrode. Evaluation (CPE-chalcopyrite): evaluation of repeatability.. In: III Taller Internacional de Hidrometalurgia del Cobre, Hydrocopper, 2005, Santiago. **Proceedings of the III International Copper Hydrometallurgy Workshop**, 2005. p. 373-379.

HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Effect of catalytic ions addition on the biooxidation of chalcopyrite.

In: VII Meeting of the Southern Hemisphere on Mineral Technology/ **XXII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa**, 2007, Ouro Preto. Proceedings, 2007. v. II. p. 59-64.

V. RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

ARENA, F. A.; GARCIA JÚNIOR, O.; BENEDETTI, A. V.; BEVILÁQUA, D.; ACCIARI, H. A.; HORTA, D. G. Estudo do comportamento eletroquímico da bornita (Cu_5FeS_4) utilizando-se eletrodo de pasta de carbono (CPE). In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia. **Anais do XVI Simpósio Eletroquímica e Eletroanalítica**, SIBEE, 2007.

HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILÁQUA, D.; ARENA, F. A. ; FUGIVARA, C. S.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Estudo da concentração de calcopirita (CuFeS_2) em eletrodo de pasta de carbono. In: **XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, SIBEE, 2007, Águas de Lindóia. Anais do XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILÁQUA, D.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analysed by electrochemical noise analysis. In: **6 Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium**, LABS, 2007, Bogota. Memórias de 6 Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium. p. 30.

HORTA, D. G.; ARENA, F. A.; BEVILÁQUA, D.; ACCIARI, H. A.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Estudo comparativo do comportamento voltamétrico dos sulfetos metálicos bornita, calcopirita e covelita. In: **30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, SBQ, 2007, Águas de Lindóia. 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

HORTA, D. G.; GARCIA JUNIOR, O.; BEVILÁQUA, D.; ACCIARI, H. A.; CAPELA, M. V.; BENEDETTI, A. V. Utilização do eletrodo de pasta de carbono (CPE) em estudos

de biolixiviação do minério de calcopirita (CuFeS_2). In: **XVII Congresso de Iniciação Científica**, 2005, Araraquara. XVII Congresso de Iniciação Científica, CIC, 2005.

HORTA, D. G.; BEVILÁQUA, D.; CAPELA, M. V.; ACCIARI, H. A.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Utilização de eletrodos de pasta de carbono (CPE) em estudos de biolixiviação com *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, SBM**, 2005.

HORTA, D. G.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V.; ACCIARI, H. A.; BEVILÁQUA, D. Comportamento eletroquímico dos sulfetos minerais naturais, calcopirita (CuFeS_2) e bornita (CuFeS_3) na presença e ausência da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: **XVI Congresso de Iniciação Científica, CIC**, 2004, Ilha Solteira. XVI Congresso de Iniciação Científica, 2004.

VI. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, SIBEE, 2007

30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, 2007

XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, SBM, 2005

XVII Congresso de Iniciação Científica, CIC, 2005

XVI Congresso de Iniciação Científica, CIC, 2004

Dedico aos meus pais
Otoganizo e Manoela,
pelo exemplo, amor,
confiança e compreensão,
a vocês meu amor e eterna
gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior pela orientação e confiança.

À Dr^a. Denise Bevilaqua e à Dr^a. Heloisa Andréa Acciari pelo apoio imprescindível, minha profunda gratidão, admiração e reconhecimento.

Aos professores Dr. Assis Vicente Benedetti e Dr. Cecílio Sadao Fugivara do departamento de eletroquímica do Instituto de química da UNESP (Araraquara) pela co-orientação e auxílio no laboratório de eletroquímica.

Aos professores Dr. Antonio Ballester e Dr. Jesus Muñoz pela carinhosa recebida e pelo auxílio durante a estância realizada na Universidade Complutense de Madrid.

Aos professores Dr. Luis Gonzaga Santos Sobral e Dr^a. Hideko Yamanaka por comporem a banca examinadora.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e do laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química da UNESP (Araraquara).

Aos amigos e funcionários do Departamento de Metalurgia Extrativa da Universidade Complutense de Madrid (Espanha)

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química que colaboraram direta ou indiretamente com a minha formação e para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Companhia Vale pelo apoio financeiro.

A minha família, meus pais Otoganzo e Manoela, meu irmão César, minha cunhada Paula e minha sobrinha Giovanna, obrigada pela confiança e incentivo.

Ao todos os amigos, velhos ou novos, de perto ou de longe, do passado ou do presente, muito obrigada.

A todos os colegas da Pós-Graduação.

A Deus pela coragem, e esperança.

*"A imaginação é mais
importante que o
conhecimento. Conhecimento
auxilia por fora, mas só o
amor socorre por dentro.
Conhecimento vem, mas a
sabedoria tarda."*

Albert Einstein

RESUMO

Neste trabalho, o efeito dos íons Cl^- e da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, linhagem LR, na dissolução da calcopirita foi investigado por técnicas eletroquímicas e ensaios de biolixiviação em frascos. Os agentes estudados (íons Cl^- e células bacterianas) foram adicionados às células eletroquímicas ou aos frascos de lixiviação no decorrer dos experimentos em duas séries que se distinguem quanto à ordem de adição. Na primeira série de as células bacterianas foram adicionadas anteriormente aos íons Cl^- enquanto na segunda série os íons Cl^- foram adicionados previamente. As técnicas de medidas simultâneas dos ruídos eletroquímicos de potencial e de corrente (ENA – Electrochemical Noise Analysis) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS – Electrochemical Impedance Spectroscopy) aplicadas ao eletrodo de pasta de carbono (CPE – Carbon Paste Electrode) modificado com o mineral de calcopirita foram utilizadas no monitoramento dos ensaios eletroquímicos. Em geral observou-se um comportamento de estado passivo durante os estágios iniciais de imersão e após as adições de bactéria, caracterizado por baixos valores de corrente passiva e pouca dispersão de pontos nos gráficos de admitância. As células bacterianas adicionadas na ausência de íons Cl^- provavelmente aderiram na superfície do CPE-calcopirita. As maiores dispersões nos gráficos de admitância além dos menores valores de resistência do ruído eletroquímico (R_n) e resistência de polarização (R_p) ocorreram após as adições de íons Cl^- provavelmente como consequência do aumento da dissolução da calcopirita presente na pasta de carbono. Entretanto observou-se que o sistema apresenta uma tendência em alcançar um estado estacionário após as adições de íons Cl^- e de células bacterianas. Os ensaios de biolixiviação em frascos foram monitorados por amostragem periódica da fase líquida seguida de medidas de pH, $[\text{Fe}^{2+}]$, além de $[\text{Cu}]$ e $[\text{Fe}]$ totais. Os resíduos sólidos obtidos no final de cada ensaio foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (SEM – Scan Electronic Microscopy) e difração de raios X. Os resultados dos ensaios de biolixiviação em frascos confirmaram que a adição de íons Cl^- e células bacterianas aumentou a taxa de dissolução da calcopirita. A importância da adaptação dos microorganismos às condições do meio de lixiviação foi comprovada pela melhor eficiência em extração de Cu obtida pelas células adaptadas quando comparadas às não adaptadas. A análise dos resíduos sólidos dos ensaios de biolixiviação em frascos revelou a presença de covelita e compostos fosfatados de cálcio como produtos da dissolução da calcopirita.

ABSTRACT

In this work, the effects of Cl^- ions and *Acidithiobacillus ferrooxidans*-LR in the oxidative dissolution of the chalcopyrite were evaluated utilizing electrochemical techniques and shaking flasks bioleaching experiments. These agents (Cl^- ions or bacterial cells) were added to the electrochemical cells or to the leaching flasks in two experiments series changing the addition order. In the first serie, the bacterial cells were added previously to the Cl^- ions while in the second serie the Cl^- ions were added before. Electrochemical noise analysis (ENA) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) applied to the carbon paste electrode modified with chalcopyrite were utilized to monitor the electrochemical experiments. Some parameters were calculated from electrochemical analysis, such as admittance plots, noise resistance data (ENA) and polarization resistance (EIS). In general, it was observed a stable passive behavior, mainly during the initial stages of immersion, characterized by low passive current and low dispersion in the admittance plots, mainly after bacteria addition. This can be explained by the adhesion of bacterial cells on chalcopyrite electrodes, acting as a physical barrier. The higher dispersions in the admittance plots occurred when Cl^- ions additions took place, when the current fluctuations became greater in number and amplitude, characterizing an active state behavior, probably as a consequence of the dissolution of passive layers spontaneously formed on electrode surface. However, there was a tendency of the system to reach the stationary state probably due to repassivation of the electrode some hours after Cl^- addition. This result was also demonstrated by noise and polarization resistances. The shake flasks bioleaching were carried out over with periodic sample of the liquid phase. The supernatant was analyzed for copper, $[\text{Fe}^{2+}]$ $[\text{Fe}]_{\text{total}}$ concentrations, and the solid residues were analyzed by scanning electronic microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). Results of shakeing flasks bioleaching confirmed that the addition of Cl^- ions and bacterial cells increased the dissolution rate of the chalcopyrite. The comparison of the experiments between the adapted and non-adapted bacterial cells revealed higher efficiency in copper extraction for adapted cells in the presence of Cl^- ions. The analysis of the solid residues of the leaching flasks showed the presence of covellite and calcium phosphatised compounds as products of chalcopyrite dissolution.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	22
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
II.1. Biolixiviação	24
II.2. Microorganismos envolvidos – <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	26
II.3. Mecanismos de Interação bactéria - substrato	27
II.4. Calcopirita	31
II.5. Influência dos íons Cl^-	35
II.6. Eletrodo de Pasta de Carbono (CPE)	38
II.7. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	39
II.8. Medidas Simultâneas dos Ruídos Eletroquímicos de Potencial e de Corrente (ENA)	43
III. OBJETIVOS	45
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	46
IV.1. Amostra mineral	46
IV.2. Material biológico	48
IV.2.1. Cultivo Bacteriano	50
IV.2.2. Inoculo	50
IV.2.3. Adaptação das células bacterianas aos íons Cl^-	51
IV.3. Ensaio eletroquímicos	51
IV.3.1. Célula eletroquímica	51
IV.3.2. Eletrodos	52
IV.3.3. Técnicas e equipamentos	53

IV.3.3.a. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	53
IV.3.3.b. Medidas Simultâneas dos Ruídos Eletroquímicos de Potencial e de Corrente (ENA)	54
IV.3.4. Procedimento experimental	54
IV.4. Ensaio de biolixiviação em frasco	56
IV.4.1. Técnicas e equipamentos	56
IV.4.1.a. Espectrofotometria de absorção atômica - Cu e Fe totais	57
IV.4.1.b. Fotocolorimetria - Fe ²⁺	57
IV.4.1.c. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) – resíduos sólidos	57
IV.4.1.d. Difração de Raios X – resíduos sólidos	58
IV.4.2. Procedimento experimental	58
V. RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
V.1. Ensaio eletroquímico	60
V.1.1. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	60
V.1.2. Ruído Eletroquímico (ENA)	67
V.1.3. Análise comparativa: EIS e ENA	78
V.2. Ensaio de biolixiviação em frasco	80
V.2.1. Análise da fase líquida	80
V.2.2. Análise da fase sólida	86
VI. CONCLUSÕES	94

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Mecanismos de interação bactéria/substrato propostos para a ação do *A. ferrooxidans* sobre os sulfetos minerais. (A) mecanismo direto, (B) mecanismo indireto, (C) mecanismo de contato indireto. 28
- Figura 2: Mecanismos de biolixiviação: (A) mecanismo do tiosulfato, pelo qual são dissolvidos minerais insolúveis em ácido; (B) mecanismo do polissulfeto, pelo qual são dissolvidos minerais solúveis em ácido. 30
- Figura 3: Estrutura cristalina da calcopirita (KOCH, 1975). 32
- Figura 4: Circuito elétrico de Randles (A). Espectros de Impedância: Plano Complexo (B) e Formato de Bode (C). 42
- Figura 5: Fluxograma das medidas e análises dos ruídos eletroquímicos (ACCIARI, 2001). 44
- Figura 6: difratograma de raios X do concentrado de calcopirita utilizado. A barra lateral indica a intensidade dos picos e os símbolos indicam c - calcopirita (CuFeS_2), q - quartzo (SiO_2) e fc – compostos fosfatados de cálcio. 47
- Figura 7: Distribuição granulométrica da amostra mineral de calcopirita. 48
- Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura (SEM – *Scanning electron Microscopy*) da amostra mineral de calcopirita. 48
- Figura 9: Imagens microscópicas (SEM) dos cultivos bacterianos utilizados nos ensaios inoculados. 49
- Figura 10: Representação esquemática da célula eletroquímica. 52
- Figura 11: Representação esquemática do eletrodo de pasta de carbono, CPE-calcopirita. 53

Figura 12: Representação esquemática da organização dos eletrodos na célula eletroquímica.

53

Figura 13: Organograma representativo do monitoramento das células eletroquímicas para o estudo da influência da adição de íons Cl^- e de células bacterianas na oxidação do CPE-calcopirita, utilizando-se EIS e ENA realizado em duas séries de medidas.

56

Figura 14: Espectros de EIS, (A) Plano Complexo e (B) Bode, correspondentes à primeira série de experimentos (Cl^-) com 0 (!), 48 (-), 72 (7), 120 (X), 128 (ξ), 272 () e 608 (∇) horas de monitoramento.

61

Figura 15: Modelos de circuitos elétricos equivalentes propostos para os ajustes dos espectros de impedância.

62

Figura 16: Espectros de EIS, (A) Plano Complexo e (B) Bode, correspondentes à segunda série de experimentos (Cl^-) após 0 (!), 48 (-), 96 (7), 192 (X), 288 (ξ), 384 () e 488 (∇) horas de imersão do CPE-calcopirita.

64

Figura 17: Perfis de $\log |Z|_{f=1\text{Hz}}$ com o tempo de monitoramento obtidos para a primeira (A) e segunda séries de medidas (B). As setas indicam o momento das adições de células bacterianas e dos íons Cl^- .

66

Figura 18: Registro simultâneo dos ruídos de potencial e corrente, obtidos no domínio do tempo ($f_a = 10$ Hz), para o CPE-calcopirita.

67

Figura 19: Variação dos valores de E_{coup} e I_{coup} com o tempo de imersão do CPE-calcopirita correspondentes à primeira série de experimentos ($f = 100, 10$ e 2 Hz). As setas representam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

68

Figura 20: Variação dos valores de E_{coup} e I_{coup} com o tempo de imersão do CPE-calcopirita correspondentes à segunda série de experimentos ($f = 100, 10$ e 2 Hz). As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

70

Figura 21: Perfil de R_n (obtido com $f = 2$ Hz) com o tempo de monitoramento da célula contendo íons Cl^- , correspondente à primeira (A) e segunda (B) séries de experimentos. As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- . 71

Figura 22: Perfil de R_n (obtidos com $f = 10$ e 100 Hz) com o tempo de monitoramento da célula contendo íons Cl^- , correspondente à primeira série de experimentos. As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- . 73

Figura 23: Perfil de R_n (obtidos com $f = 10$ e 100 Hz) com o tempo de monitoramento da célula contendo íons Cl^- , correspondente à segunda série de experimentos. As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- . 74

Figura 24: Espectro de A_c correspondentes à primeira série de medidas depois de 0, 72, 272 e 512 horas de imersão dos eletrodos de trabalho na célula eletroquímica. 76

Figura 25: Espectro de A_c correspondentes à segunda série de medidas depois de 0, 96, 288 e 480 horas de imersão dos eletrodos de trabalho na célula eletroquímica. 77

Figura 26: Comparação entre os perfis obtidos para R_n (ENA, $f = 2$ Hz) e R_p (EIS) com o tempo de monitoramento do experimento contendo íons Cl^- , em que o íon foi adicionado antes (A) e depois (B) da adição de células bacterianas. 79

Figura 27: Variação de pH nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (;) 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- . As setas indicam o momento das adições. 81

Figura 28: Variação da concentração de Fe^{2+} nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (;) 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- . As setas indicam o momento das adições. 83

Figura 29: Variação da concentração de Fe^{3+} nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (;) 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- . As setas indicam o momento das adições.

84

Figura 30: Variação da concentração de Cu nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (;) 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- . As setas indicam o momento das adições.

85

Figura 31: Microscopias SEM dos resíduos sólidos dos ensaios de biolixiviação em frasco. A (inóculo não adaptado) e B (inóculo adaptado) correspondem aos ensaios em que as células bacterianas foram adicionadas primeiro. C (inóculo não adaptado) e D (inóculo adaptado) correspondem aos ensaios em que o íon Cl^- foi adicionado primeiro

87

Figura 32: Análise linear SEM-EDS para os elementos fósforo e oxigênio nos resíduos sólidos dos ensaios em que células bacterianas adaptadas foram adicionadas na ausência de íons Cl^- (primeira série). A linha sobre a qual foi realizada a análise EDS está ilustrada na imagem.

88

Figura 33: Análise microscópica elementar pontual SEM-EDS do resíduo sólido da segunda série de ensaios realizada com células bacterianas não adaptadas. O ponto em que foi realizada a análise está marcado (x) na imagem.

89

Figura 34: Análise microscópica elementar pontual SEM-EDS do resíduo sólido da primeira série de ensaios realizada com células bacterianas adaptadas. O ponto em que foi realizada a análise está marcado (x) na imagem.

90

Figura 35: Difractogramas de raios X dos resíduos sólidos de biolixiviação dos experimentos em que as células bacterianas não adaptadas (A) e adaptadas (B) foram adicionadas

anteriormente aos íons Cl^- . Símbolos: C – calcopirita; cv – covelita; fc – compostos fosfatados de cálcio. 91

Figura 36: Difractogramas de raios X dos resíduos sólidos de biolixiviação dos experimentos em que os íons Cl^- foram adicionados anteriormente às células bacterianas não adaptadas (C) e adaptadas (D). Símbolos: C – calcopirita; cv – covelita; fc – compostos fosfatados de cálcio; of – óxido de ferro, Fe_3O_4 . 92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabla 1: Composição química da calcopirita utilizada nos ensaios.	46
Tabela 2: Nomenclatura dos ensaios de biolixiviação em frascos	59

INTRODUÇÃO

A biolixiviação de sulfetos minerais é reconhecida hoje como uma metodologia interessante, sob os pontos de vista econômico e ambiental. A principal bactéria envolvida neste processo é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Essa espécie obtém energia pela oxidação do íon Fe^{2+} e espécies reduzidas de enxofre (incluindo os sulfetos metálicos). Como resultado do seu metabolismo oxidativo ocorre a dissolução dos respectivos metais.

A calcopirita é o sulfeto de cobre mais abundante e ao mesmo tempo é o mais refratário ao ataque químico e bacteriano. A refratariedade da calcopirita é frequentemente relacionada à formação de uma camada de precipitado que passiva a superfície do minério. Essa camada é atribuída geralmente, à formação de jarositas, enxofre elementar ou compostos reduzidos de enxofre. A refratariedade da calcopirita pode também estar relacionada à alta energia de rede cristalina que é da ordem de $17\,000\text{ KJ mol}^{-1}$ (BEVILAQUA, 2003).

O processo de biolixiviação da calcopirita pode ser investigado em escala laboratorial, por experimentos de lixiviação em frascos, colunas ou em biorreatores, no entanto, essas análises fornecem apenas informações quantitativas, ao passo que não inferem nada em relação ao processo que ocorre durante a reação de oxidação. Por outro lado, métodos eletroquímicos apresentam-se como alternativa adequada para o estudo da cinética de biolixiviação (LÁZARO *et al.*, 1995).

Muitos estudos eletroquímicos utilizam sulfetos maciços como eletrodo de trabalho, no entanto, tais eletrodos apresentam problemas com a falta de repetibilidade e fraturas. Uma alternativa adequada é a utilização de eletrodos de pasta de carbono (CPE) (LÁZARO *et al.*, 1995; HORTA *et al.*, 2005). Os CPEs são eletrodos compostos por uma pasta confeccionada com grafite em pó, material aglutinante e agente modificador. O CPE utilizado em estudos de biolixiviação é modificado com o sulfeto mineral pulverizado.

Métodos eletroquímicos são usados de maneira satisfatória nos estudos de mecanismo e cinética de lixiviação dos sulfetos minerais (BEVILAQUA *et al.*, 2004; VELÁSQUEZ *et al.*, 1998). Neste contexto, as técnicas eletroquímicas de impedância eletroquímica (EIS) e ruído eletroquímico (ENA) são adequadas para os estudos da dissolução dos sulfetos minerais

porque não são destrutivas e podem ser utilizadas durante longos períodos de monitoramento das células eletroquímicas (BEVILAQUA *et al.*, 2007).

A dissolução de sulfetos metálicos a partir de amostras minerais pode ser acelerada pela adição de íons Cl^- , que modificam o comportamento eletroquímico do sólido. No entanto, o mecanismo através do qual os íons Cl^- influenciam a dissolução dos sulfetos minerais ainda é controverso na literatura.

Segundo Lu, Jeffrey e Lawson (2000a) os íons Cl^- alteram a morfologia da camada de enxofre depositada sobre a superfície do sulfeto, que se torna mais cristalina e porosa (LU *et al.*, 2000a). A ação dos íons Cl^- também é atribuída à estabilização de íons Cu^+ e Cu^{2+} em solução pela formação de complexos solúveis de cloro e cobre (LUNDSTROM *et al.*, 2005; MAURICE; HAWK, 1999; WINAND, 1991).

Nos estudos que envolvem íons Cl^- com células bacterianas deve-se considerar também a influência destes íons na atividade bacteriana, bem como a possibilidade de adaptação da bactéria ao meio lixiviante utilizado. Ribeiro Neto (2007) observou que a atividade oxidativa de Fe^{2+} da espécie *A. ferroxidans*-LR não foi alterada significativamente em concentrações de até 200 mmol L^{-1} de NaCl.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão foram enfatizados alguns conceitos que estão diretamente relacionados à lixiviação química e bacteriana da calcopirita, sob o ponto de vista bioquímico e eletroquímico, tais como: conceitos de biolixiviação; características da espécie *A. ferrooxidans* e aspectos gerais do mecanismo de interação bactéria-substrato, bem como princípios e fundamentos das técnicas eletroquímicas utilizadas.

II.1. Biolixiviação

Os sulfetos minerais constituem a principal fonte, na natureza, de metais de importância industrial como cobre, chumbo, zinco e níquel. Tais minerais apresentam características adequadas para a extração de metais através de processos pirometalúrgicos, já que são facilmente concentráveis, por técnicas de processamento mineral (flotação), e o enxofre subministra parte da energia necessária para a obtenção do metal. Cerca de 80 a 85% da recuperação de metais a partir de sulfetos minerais é realizada por processos pirometalúrgicos convencionais (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

No entanto, esses processos apresentam sérios problemas tais como elevado custo para a extração dos metais e a crescente preocupação com a poluição provocada pela emissão de SO₂, responsável pelas chuvas ácidas. Essa situação é agravada pelo progressivo esgotamento das reservas minerais com altos teores. Dessa forma, a indústria tem concentrado esforços no sentido de reduzir custos e adequar-se às leis governamentais quanto à emissão de gases poluentes. Uma alternativa adequada é a utilização de processos hidrometalúrgicos.

Nos processos hidrometalúrgicos, a recuperação dos metais de interesse consiste na dissolução seletiva dos mesmos em solução ácida (frequentemente o ácido sulfúrico), básica (como hidróxidos de amônio e sódio) ou pela ação de agentes complexantes (como o cianeto de sódio e o hidróxido de amônio), em condições variadas de pressão e de temperatura (usualmente de 25 a 250°C). (CIMINELLI, 2007). Os processos hidrometalúrgicos são realizados em leito estático que inclui lixiviação *in situ*, em pilhas ou em tanques estáticos. A lixiviação hidrometalúrgica também pode ser realizada em tanques agitados, abertos ou sob pressão.

Dentre as desvantagens dos processos hidrometalúrgicos destacam-se o elevado consumo de reagentes lixiviantes, e as altas pressões e temperaturas que frequentemente são

requeridas. Também é importante ressaltar a geração de resíduos sólidos e efluentes aquosos que, em função de sua natureza, composição e disposição também podem causar impactos ambientais, devido à contaminação dos recursos hídricos.

Nas últimas décadas surgiu a Biohidrometalurgia, e dentro dela a Biolixiviação como uma alternativa adequada e promissora para a recuperação de metais de sulfetos minerais. A biolixiviação consiste na utilização de microorganismos capazes de promover a solubilização de determinados componentes presentes na amostra mineral.

A potencialidade da lixiviação bacteriana decorre de uma série de fatores como:

- Economia de insumos utilizados nos processos hidrometalúrgicos convencionais (ácidos e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos a partir de substratos presentes no referido minério;

- Baixo requerimento de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico, e mesmo a um processo hidrometalúrgico em que se utilizam agitadores;

- Baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional, devido à simplicidade das instalações requeridas;

- Reduzida necessidade de mão de obra especializada na operação e ausência de problemas relacionados à emissão de SO₂ como no processo pirometalúrgico.

Além do aproveitamento de rejeitos minerais (minérios de baixo teor), a biohidrometalurgia pode ser, ainda, uma alternativa para o aproveitamento de jazidas de pequeno porte, ou de localização adversa, ou seja, longe de centros com infra-estrutura adequada. Atualmente, a lixiviação bacteriana é aplicada, em escala industrial, na recuperação de cobre, urânio e, mais recentemente, de ouro, em vários países, destacando-se os EUA, Canadá, África do Sul, Rússia, Espanha, Chile, México, Bulgária e Austrália, entre outros. (GARCIA JUNIOR, 1997)

Atualmente de 10 a 15% da produção mundial de cobre é obtida por biolixiviação de minerais marginais e de baixos teores. Grande parte das plantas biohidrometalúrgicas de recuperação de cobre estão no Hemisfério Sul, principalmente no Chile, que processa através da biolixiviação 80.800 t/dia de concentrado desde 1980 (BRIERLEY; BRIERLEY, 2001).

No Brasil as perspectivas de ampliação das aplicações da hidrometalurgia são bastante promissoras, diante dos grandes investimentos previstos para o país, em especial para o cobre e níquel. Os projetos da Companhia Vale para o cobre, utilizando rotas bio e hidrometalúrgicas, pretendem transformar o Brasil em um dos grandes produtores mundiais do metal (CIMINELLI, 2007).

II.2. Microorganismos envolvidos – *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Como toda tecnologia que conta com a participação de microorganismos, o conhecimento dos mesmos passa a ser de importância fundamental para o êxito do processo. Os microorganismos envolvidos nos processos de biolixiviação se caracterizam por sua capacidade de evoluir em condições agressivas como baixos valores de pH, altas temperaturas e concentrações de elementos metálicos, em que a fonte energética constitui da oxidação de Fe^{2+} e compostos reduzidos de enxofre.

As bactérias capazes de atacar os sulfetos minerais são, portanto, acidófilas e são classificadas de acordo com a temperatura em que crescem e se desenvolvem, distinguindo-se principalmente em: termófilas moderadas (~40 - ~55 °C), termófilas extremas (~55 - ~80 °C) e mesófilas (até ~ 40 °C) (SHIPPERS, 2007).

Dentre as bactérias termófilas extremas destacam-se as do gênero *Sulfolobus* que podem produzir altas velocidades de biolixiviação dos sulfetos minerais. No entanto, esse grupo de microorganismos apresenta como principal problema a grande sensibilidade de sua membrana frente aos processos que envolvem atrito. Dessa forma, necessitam ser utilizadas em processos de lixiviação dinâmica com baixas densidades de polpa (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Uma alternativa é a utilização de bactérias termófilas moderadas como *Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ou *Sulfobacillus acidophilus* que são mais resistentes, além de suportarem altas concentrações de Fe^{2+} .

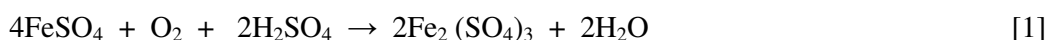
Dentre as bactérias mesófilas, as autótrofas são as principais promotoras da lixiviação de metais enquanto as heterotótrofas exercem a função de eliminar compostos orgânicos que poderiam inibir a ação das autótrofas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). As bactérias mesófilas autótrofas mais frequentemente isoladas em ambientes mineiros são a *A. ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*. Devido às similaridades fisiológicas e ambientais, essas bactérias são encontradas nos ambientes naturais de biolixiviação, coexistindo simultaneamente e cooperando no ataque aos sulfetos minerais.

Apesar da participação de outros microorganismos na dissolução de sulfetos minerais, a espécie *A. ferrooxidans* é considerada a mais importante e por tanto é a mais utilizada nesses estudos.

O *A. ferrooxidans* é uma espécie não patogênica que se apresenta como bastonetes gram-negativos, não esporulantes, com dimensões médias de 0,5 a 0,6 μm de diâmetro por 1,0 a 2,0 μm de comprimento, ocorrendo sozinho ou em pares, raramente em cadeias pequenas. Os bastonetes são móveis, apresentam flagelo polar, e sua reprodução dá-se por

divisão binária simples. A temperatura ótima para seu crescimento é de 30°C (entretanto, foram isoladas linhagens com crescimento entre 2 e 37°C). É um acidófilo estrito e o pH ótimo de crescimento situa-se em torno de 2,0 (ocorrendo, porém, numa faixa entre 1,5 e 4,5) (BEVILAQUA, 2003).

O *A. ferrooxidans* é um organismo obrigatoriamente quimiolitotrófico, pois utiliza como fonte de energia para seu crescimento substratos estritamente inorgânicos, como íons Fe^{2+} e formas reduzidas de compostos de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos. Existe uma unanimidade com relação à estequiometria da reação de oxidação do íon Fe^{2+} na presença da bactéria, que está descrita na equação 1 (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008)



O *A. ferrooxidans* obtém todo seu carbono celular pela fixação de CO_2 atmosférico. É uma típica bactéria aeróbica, no entanto, é capaz de crescer anaerobicamente em substrato de enxofre sob certas condições (LEDUC; FERRONI, 1994).

II.3. Mecanismos de interação bactéria-substrato

As opiniões sobre a interação bacteriana com a interface dos sulfetos se dividem em pesquisadores que defendem uma interação direta e outros uma interação indireta. Entretanto, em todos esses estudos, o mecanismo interfacial bactéria-sulfeto permanece ainda controverso, uma vez que espécies vivas e os muitos compostos que elas secretam interagem com a interface sólida.

Os principais mecanismos propostos atualmente são: o mecanismo de contato direto, mecanismo indireto e mecanismo de contato indireto.

O mecanismo de interação direta (Figura 1A) implica no ataque enzimático da bactéria sobre o mineral, sendo, portanto, necessária sua adesão à superfície do mesmo. Nesse mecanismo, a bactéria extrai elétrons diretamente do mineral e esses elétrons são transferidos ao oxigênio, acceptor final (BEVILAQUA *et al.*, 2003; ROHWERDER; GEHRKE; SAND, 2003). O mecanismo direto pode ser descrito pela equação 2, a seguir:



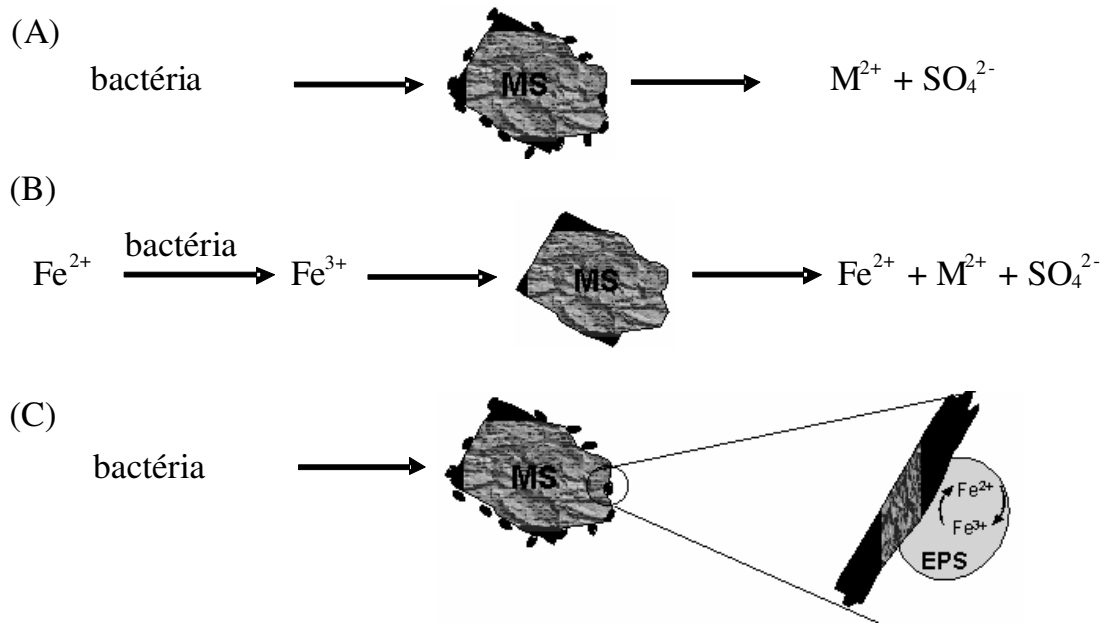
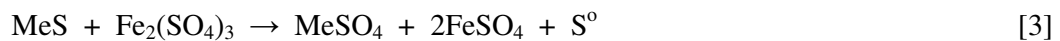


Figura 1: Mecanismos de interação bactéria/substrato propostos para a ação do *A. ferrooxidans* sobre os sulfetos minerais. (A) mecanismo direto, (B) mecanismo indireto, (C) mecanismo de contato indireto.

No mecanismo indireto (Figura 1B) a bactéria não necessita estar em contato com a superfície do mineral. Segundo esse mecanismo a bactéria oxida apenas íons Fe²⁺ a Fe³⁺, esses podem então atacar os sulfetos minerais reduzindo-se a íons Fe²⁺ (ROHWENDER; GEHRKE; SAND, 2003). Neste caso, a bactéria tem somente uma função catalítica, pois gera um lixiviante que oxida quimicamente o sulfeto mineral. Segundo esse mecanismo, a solubilização do metal pode ser descrita pela equação 3 a seguir:



A descoberta de uma substância polimérica extracelular (EPS), que é excretada pela bactéria e adere à superfície do mineral, contribuiu para melhorar o conhecimento dos mecanismos da ação microbiana. Alguns estudos mostram que a formação do material exopolimérico é um requerimento importante para o ataque bacteriano e subsequente solubilização do mineral. O ferro contido no EPS confere carga positiva à célula, estabelecendo atração eletrostática entre a célula bacteriana e a superfície negativamente

carregada de alguns minerais (SAND, *et al.*, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2003). O mecanismo envolvendo o EPS é chamado mecanismo de contato indireto (Figura 1C).

Muitos sulfetos são semicondutores ou semi-metais, e a reatividade interfacial desses sulfetos com espécies eletrolíticas pode ser descrita de diferentes maneiras, sejam elas: em termos de potencial eletroquímico, de estados eletrônicos, de posições energéticas, de bandas de energia e de propriedades de trocas de elétrons. Dependendo dos fatores limitantes envolvidos, o comportamento eletroquímico e a natureza dos produtos de oxidação podem ser muito diferentes (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008).

Sulfetos como ZnS (esfalerita) e CuS (covelita), por exemplo, produzem enxofre elementar como um produto de oxidação, e outros como FeS₂ (pirita), MoS₂ (molibdenita), WS₂ (tungstenita), produzem sulfatos. O fator crítico é a natureza eletrônica da banda de valência (a mais alta banda energética ocupada por elétrons) com a qual o eletrólito pode trocar elétrons durante a reação de dissolução.

No caso da pirita, molibdenita e tungstenita as bandas de valência são derivadas somente dos orbitais dos átomos de metais, enquanto que, para todos os demais sulfetos minerais, as bandas de valência são derivadas de ambos orbitais, do metal e do enxofre. Conseqüentemente, as bandas de valência da pirita, molibdenita e tungstenita não contribuem para a quebra da ligação entre o metal e o enxofre. Esta ligação somente pode ser quebrada por várias etapas de oxidação com o agente oxidante Fe³⁺ e este mecanismo é conhecido como mecanismo do tiosulfato (Figura 2A). O tiosulfato (S₂O₃²⁻) é supostamente formado do dissulfeto da rede cristalina do mineral.

No caso dos outros sulfetos minerais, além dos íons Fe³⁺, prótons H⁺ podem remover elétrons da banda de valência, provocando a quebra da ligação entre o metal e o enxofre. Esses sulfetos são ditos solúveis em ácido e oxidados pelo mecanismo do polisulfeto (Figura 2B). Os principais intermediários envolvidos nesse mecanismo são polisulfetos e enxofre elementar.

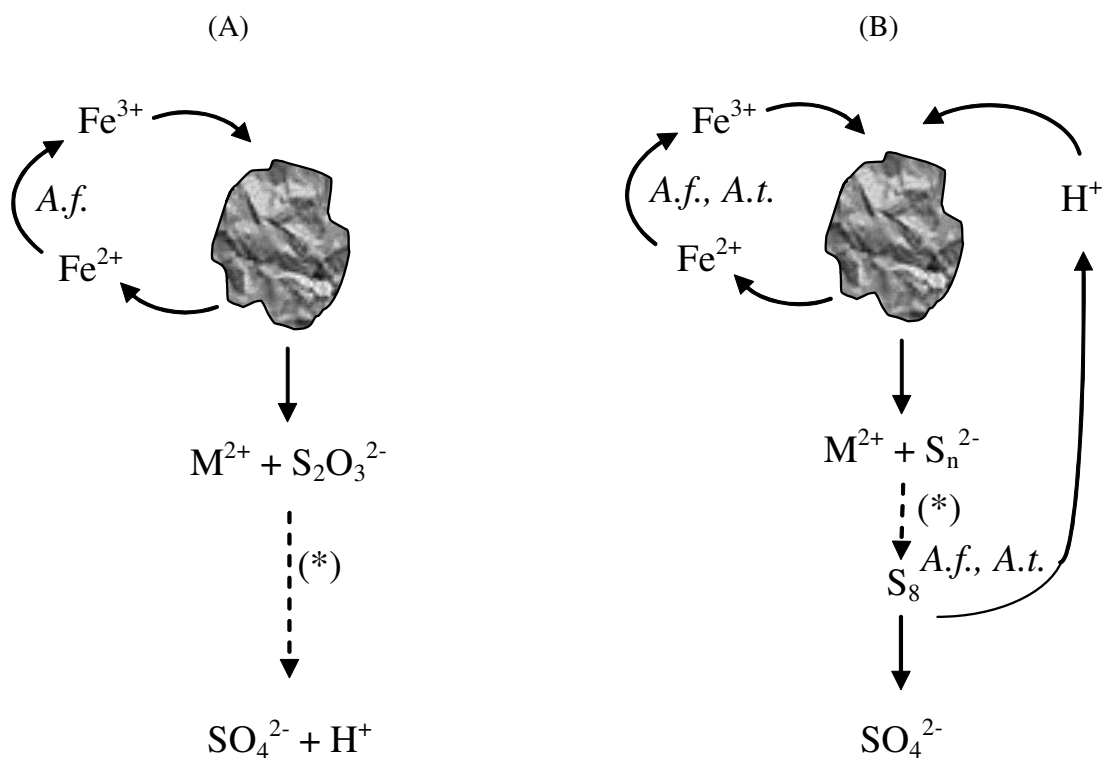


Figura 2: Mecanismos de biolixiviação: (A) mecanismo do tiosulfato, pelo qual são dissolvidos minerais insolúveis em ácido; (B) mecanismo do polissulfeto, pelo qual são dissolvidos minerais solúveis em ácido.

Independentemente de qual mecanismo esteja correto, a adesão da bactéria na superfície dos sulfetos minerais foi detectada e analisada por diversas técnicas (BENGRINE; BLAKE II, 2001; SAMPSON; PHILLIPS; BLAKE II, 2000).

Embora a adesão do *A. ferrooxidans* sobre as superfícies minerais seja tenaz e frequentemente irreversível (KARAN; NATARAJAN; MODAK, 1996), não há muito conhecimento sobre como e quais as forças que dirigem esta interação bactéria-superfície. Essa interação depende das características físico-químicas da superfície e do invólucro celular, bem como da força iônica do meio. Como a bactéria se move em direção a uma superfície sólida, vários fatores afetam as forças que determinam se a adesão irá ou não ocorrer. Entretanto, essas forças diferem na intensidade e na distância na qual elas influenciam a interação entre a bactéria e a superfície a ser aderida. Muito frequentemente as cargas da bactéria e da superfície são negativas e, portanto, ocorrerá uma repulsão eletrostática que pode evitar que a bactéria se aproxime o suficiente para que ocorra a adesão.

Entretanto, as forças de repulsão diminuem com o aumento da força iônica do meio (FLETCHER, 1996).

Outra barreira potencial à adesão de bactéria é a água adsorvida sobre superfícies. Para que a adesão ocorra tem de haver o deslocamento dessa água adsorvida, o que é energeticamente desfavorável. Porém, se as superfícies possuem grupos não polares, esses podem auxiliar na exclusão dessa água por interações hidrofóbicas. Devasia *et al.* (1993) mostraram que para a adesão de *A. ferrooxidans* à calcopirita (CuFeS_2) e à pirita (FeS_2) foi dirigida por interações hidrofóbicas e hidrofílicas.

O processo de adesão bacteriana é, provavelmente, o resultado de uma série de interações que ocorrem simultaneamente (iônicas, hidrofóbicas, de van der Waals, mediadas por proteínas específicas, mediadas por exopolímeros etc.). A contribuição relativa de cada interação depende de alguns fatores tais como composição da amostra, influências ambientais, disponibilidade de substrato etc.

Em sistemas de lixiviação que contenham mais de um mineral, necessariamente estarão envolvidas interações galvânicas entre eles. Quando dois sulfetos minerais estabelecem contato no meio de lixiviação, uma célula galvânica é formada, conseqüentemente o mineral mais ativo do par sofrerá corrosão, enquanto o mais nobre (menor atividade) estará catodicamente protegido. Baseando-se no potencial redox é possível prever o comportamento da dissolução seletiva de um sulfeto mineral em uma combinação de sulfetos (BEVILAQUA, 2003).

O entendimento, em um nível fundamental, desses mecanismos e, conseqüentemente, da adesão dessas bactérias sobre os substratos minerais é de fundamental importância para a manipulação dos processos aplicados em biolixiviação.

II.4. Calcopirita

A calcopirita é um sulfeto de cobre importante e sua fórmula empírica mais adequada seria $\text{Cu}_2\text{S.Fe}_2\text{S}_3$, de modo a destacar que o cobre nesse mineral se encontra, principalmente, no estado cuproso, enquanto o ferro está predominantemente no estado férrico (KOCH, 1975). A estrutura cristalina da calcopirita é tetragonal, em cada metade da célula unitária da calcopirita um átomo de enxofre é rodeado por dois átomos de cobre e dois átomos de ferro, de forma que os íons cobre e ferro ocupam posições alternadas ao longo do eixo z, como ilustrado na Figura 3. Cada átomo metálico está coordenado por um tetraedro de átomos de enxofre e compostos reduzidos de enxofre.

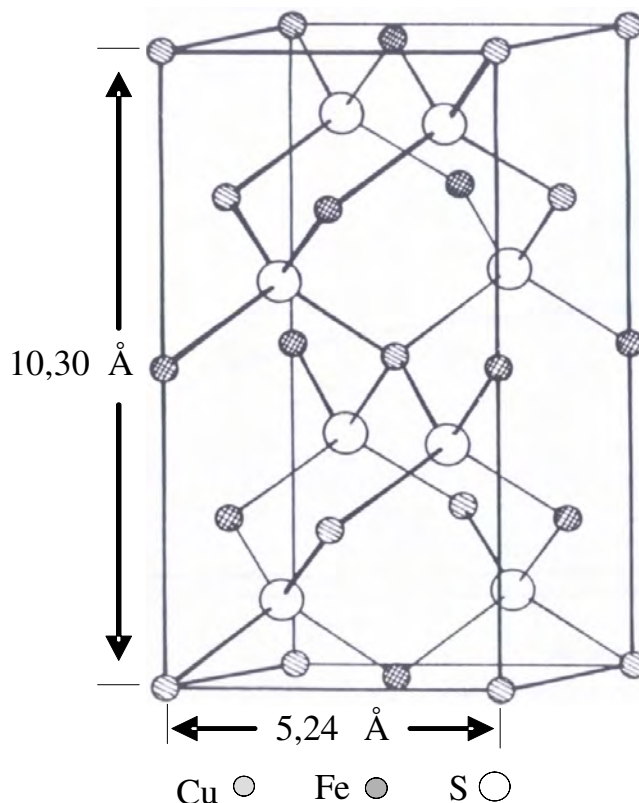


Figura 3: Estrutura cristalina da calcopirita (KOCH, 1975).

A calcopirita é o sulfeto de cobre mais abundante na natureza e pertence ao grupo mais explorado de minerais de cobre. Embora esteja classificada como um mineral solúvel em meio ácido, é o mais refratário tanto ao ataque químico como bacteriano. Neste sentido, o tipo de orbital (de origem somente do metal ou metal-enxofre) envolvido na formação da ligação, que define esse tipo de classificação, parece não ser o fator dominante no mecanismo de dissolução da calcopirita.

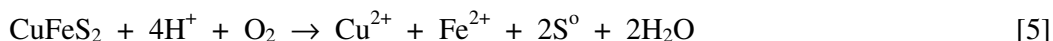
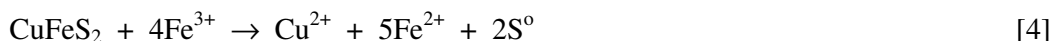
O processo de oxidação da calcopirita é lento e tem sido aferido por métodos químicos analíticos como absorção atômica e espectroscopia. Essas análises são demoradas e fornecem apenas informações quantitativas, pois não inferem nada em relação ao processo que ocorre durante a reação de oxidação. Por outro lado, métodos eletroquímicos apresentam-se como alternativas adequadas para o estudo da cinética de biolixiviação (LÁZARO *et al.*, 1995).

O principal interesse nos estudos eletroquímicos do mineral calcopirita reside no mecanismo e cinética de dissolução em meio ácido oxidante. O processo de dissolução ou lixiviação é uma reação de corrosão metálica, com reações anódica e catódica (TEIXEIRA *et*

al., 2002). No entanto, os sulfetos minerais ocorrem na natureza, mais comumente, como semicondutores e não como condutores. Assim, a melhor aproximação da descrição da cinética de dissolução desses sulfetos pode ser conseguida pelo uso de modelos baseados nas propriedades de minerais semicondutores no estado sólido (CHOI *et al.*, 1993).

A reatividade da calcopirita é dependente de: tamanho do grão, estrutura cristalina, porosidade e origem de uma amostra específica (WARREN; WADSWORTH; EL-RAGHY, 1982). Reações significativamente mais rápidas podem ser conseguidas com melhorias operacionais como agitação vigorosa, aumento da concentração de íons Fe^{3+} e diminuição da concentração de íons Fe^{2+} (PARKER; PAUL; POWER, 1981).

A calcopirita é oxidada pelos íons Fe^{3+} ou pelo oxigênio dissolvido em soluções de ácido sulfúrico com a liberação de íons Fe^{2+} e Cu^{2+} , de acordo com as reações 4 e 5.



Do ponto de vista eletroquímico, essas reações são expressas como uma combinação de reações anódica (equação 6) e catódica (equações 7 ou 8).

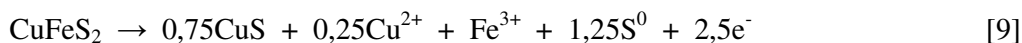


Segundo Hyroyoshi e colaboradores (2002) a taxa de lixiviação da calcopirita depende do potencial de oxi-redução determinado pela razão entre as concentrações dos íons Fe^{3+} (oxidantes) e Fe^{2+} (redutores), em solução. A refratariedade da calcopirita é geralmente atribuída à formação de um filme passivante que recobre a superfície desse mineral limitando sua dissolução. O enxofre elementar, assim como os polissulfetos e os hidróxidos ou óxidos hidratados de ferro são mencionados como possíveis produtos sólidos de lixiviação que poderiam constituir a camada passivante formada sobre a calcopirita (BEVILAQUA *et al.*, 2007; GÓMEZ *et al.*, 1996; HOLLIDAY; RICHMOND, 1990; YIN *et al.*, 2000). Como este

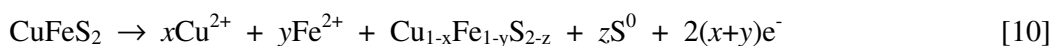
é um tema que tem gerado muitas controvérsias, é importante compreender o mecanismo de lixiviação a partir do conhecimento da natureza e composição dessa camada.

Outro aspecto importante que pode ser responsável pela maior ou menor facilidade de ataque ao mineral é a energia de formação de sua rede cristalina. No caso da calcopirita a energia da rede cristalina é da ordem de $17\ 000\ \text{kJ mol}^{-1}$ (BEVILAQUA, 2003), um dos valores mais altos entre os sulfetos minerais. Isso poderia justificar o fato da calcopirita ser tão refratária aos ataques ácido e bacteriano.

Alguns autores sugerem que a oxidação da calcopirita ocorra com a formação preferencial de calcocita de acordo com a seguinte reação (BIEGLER; HORNE, 1985; HOLLIDAY; RICHMOND, 1990; PARKER; PAUL; POWER, 1981):



Experimentos de voltametria cíclica (CV), com variações no limite catódico de inversão de potencial, sugeriram que a dissolução anódica da calcopirita ocorre com a formação de uma camada de polissulfeto rica em cobre e deficiente em ferro (ELSHERIEF, 2002). A formação de um sulfeto não estequiométrico do tipo $\text{Cu}_{1-x}\text{Fe}_{1-y}\text{S}_{2-x-y}$ (Eq. 10) foi sugerida por Nava e González (2006) que empregaram técnicas eletroquímicas convencionais, incluindo CV.



Com o objetivo de elucidar as fases de sulfetos não estequiométricos e os responsáveis pela passivação dos sulfetos minerais, Miklin e colaboradores (2004) examinaram a superfície da calcopirita em solução ácida utilizando espectroscopia e caracterização eletroquímica. Num estudo comparativo com diferentes minerais como calcopirita (CuFeS_2), bornita (Cu_5FeS_4) e calcocita (Cu_2S) os autores observaram que a oxidação da calcopirita não produziu covelita. A formação de sulfetos não estequiométricos também foi sugerida.

II.5. Influência dos íons Cl^-

Em geral, os estudos da lixiviação da calcopirita em meio ácido, são realizados em meio de SO_4^{2-} , ou de Cl^- . Não obstante, a utilização de meio contendo íons Cl^- tem recebido,

recentemente, destaque devido a vantagens relacionadas ao efeito acelerador desse íon no processo de dissolução de sulfetos minerais.

O aumento da dissolução da calcopirita na presença de íons Cl^- tem sido observado por uma série de trabalhos e se deve, provavelmente, a considerações cinéticas, uma vez que as taxas de transferência de elétrons em soluções de Cl^- são maiores que em soluções de SO_4^{2-} (LIDDICOAT; DREISINGER, 2007; MAURICE; HAWK, 1999; LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a e b; PUVVADA; MURPHY, 2000;).

Há controvérsia na literatura a respeito da ação dos íons Cl^- no mecanismo de lixiviação da calcopirita. Muitos autores acreditam que os íons Cl^- modificam a morfologia da camada de enxofre depositada sobre as partículas de calcopirita. Essa camada formada na presença de íons Cl^- seria mais porosa e menos tenaz, atenuando o efeito de passivação da superfície do mineral (LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a).

Outra vertente de pesquisadores, no entanto, relaciona o efeito acelerador dos íons Cl^- à formação de complexos de Cl^- e Cu (CARNEIRO; LEÃO, 2007; SKROBIAN, HAVILK; UKASIKOS, 2005; WINAND, 1991).

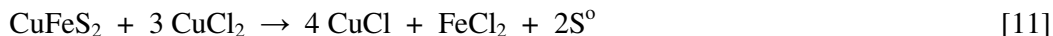
Lu, Jeffrey e Lawson (2000a), utilizando microscopia eletrônica de varredura (SEM), observaram que as imagens das partículas de calcopirita lixiviada na ausência de íons Cl^- foram completamente cobertas por um filme de enxofre amorfo, enquanto que, para aquelas lixiviadas no meio de Cl^- , esse filme foi mais poroso e cristalino.

Os mesmos autores verificaram, num estudo posterior, que o papel dos íons Cl^- parece diferente quando observaram que a camada passivadora da superfície da calcopirita não seria composta predominantemente por enxofre. Numa análise voltamétrica utilizando-se CPE-calcopirita em soluções contendo íons Cl^- , Lu, Jeffrey e Lawson (2000a) observaram que os íons Cl^- afetam a formação da espécie $\text{Cu}_{1-x}\text{Fe}_{1-y}\text{S}_{2-x-y}$, (Eq. 10) durante a varredura anódica.

Segundo Ludstrom e colaboradores (2005) a utilização de soluções de Cl^- na lixiviação da calcopirita é vantajosa devido à natureza agressiva da lixiviação e à estabilidade dos íons Cu^+ e Cu^{2+} pela formação de complexos. Em soluções de elevada concentração de íons Cl^- , o cobre rapidamente forma complexos cuprosos, tais como $[\text{CuCl}_3]^{2-}$, $[\text{Cu}_2\text{Cl}_4]^{2-}$, $[\text{Cu}_3\text{Cl}_6]^{3-}$ e cúpricos, como $[\text{CuCl}]^+$, $[\text{CuCl}_2]^0$, $[\text{CuCl}_3]^-$ e $[\text{CuCl}_4]^{2-}$. Diferentemente do que ocorre com a formação dos complexos de cloro, a formação de íons Cu^+ e Cu^{2+} solvatados não é termodinamicamente favorável nas condições padrão ($\Delta G_{\text{Cu}^+} = 50,20 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G_{\text{Cu}^{2+}} = 64,96 \text{ kJ mol}^{-1}$ (LUNDSTROM *et al.*, 2005).

Skrobian, Havlik e Ukasik (2005) observaram que a adição de NaCl em soluções ácidas de CuCl_2 ocasiona um aumento na recuperação de cobre metálico da calcopirita nos estágios

iniciais. No entanto, nos estágios finais (após 150 horas) a velocidade de lixiviação diminui. As reações químicas que descrevem a lixiviação da calcopirita em solução de CuCl_2 podem ser representadas como:



Os autores concluíram que a adição de NaCl ao meio de CuCl_2 acentua a taxa de lixiviação da calcopirita, pela formação de complexos em solução. Além disso, não foi observada a formação de uma camada compacta na superfície das partículas do sulfeto mineral, o que poderia diminuir a taxa de lixiviação.

Para Carneiro e Leão (2007), o aumento na velocidade de dissolução da calcopirita na presença de íons Cl^- está relacionado à formação do complexo solúvel, CuCl_2^{1-} , que pode ser representado esquematicamente pela seguinte equação:



Além disso, como os íons cuprosos são estáveis em sistemas de Cl^- , o par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, ao invés de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, torna-se o principal oxidante da calcopirita.

Segundo Winand (1991) a formação preferencial de um complexo ou outro é dependente da concentração de íons Cl^- em solução. Com os íons Cu^{2+} , em altas concentrações de íons Cl^- são formados predominantemente CuCl_3^{1-} e CuCl_4^{2-} , enquanto que em baixas concentrações forma-se CuCl^{1+} além de CuCl_2 . No caso dos íons Cu^+ em altas concentração de íons Cl^- são formados CuCl_4^{3-} ou $\text{Cu}_2\text{Cl}_4^{2-}$, e em baixas concentrações, CuCl^{2-} e CuCl_4^{3-} .

Os mesmos autores sugeriram ainda que na presença de íons Cl^- , tendo como principal par oxidante $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, as reações catódicas correspondentes à reação anódica descrita na equação 6 poderiam ser:





A influência da concentração de íons Cl^- na porcentagem de extração de cobre e na velocidade de lixiviação da calcopirita permanece ainda controversa na literatura. Lu, Jeffrey e Lawson (2000a) observaram que acima de 500 mmol L^{-1} de NaCl a cinética de lixiviação não muda. Por outro lado, Skrobian, Havlik e Ukasik (2005) observaram que o aumento da concentração de NaCl é acompanhado pelo aumento na recuperação de cobre em soluções de CuCl_2 .

Carneiro e Leão (2007) também demonstraram que a adição de NaCl favorece a extração de cobre da calcopirita em soluções de FeCl_3 . Esses autores observaram que a recuperação de cobre aumentou de 45 para 55% com a adição de 500 mmol L^{-1} de NaCl e para 90 % com concentrações $\geq 1 \text{ mol L}^{-1}$. No entanto, não houve modificações ao ser adicionado concentrações maiores, como 1,0; 1,5 e $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Winand (1991) já havia proposto que a velocidade de dissolução dos sulfetos minerais é dependente da concentração de íons Cl^- somente para concentrações menores que $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Nos processos de biolixiviação considera-se também a possibilidade da utilização de íons Cl^- e células bacterianas simultaneamente, com o objetivo de otimizar o processo de dissolução dos sulfetos minerais. Para tanto é importante estudar a influência dos íons Cl^- na atividade bacteriana, bem como avaliar a possibilidade de adaptar as células bacterianas aos meios contendo íons Cl^- .

Shiers, Blight e Ralph (2005) observaram em um estudo com cultura mista de bactérias ferro oxidantes que a partir de concentrações iguais a 7 g L^{-1} (197 mmol L^{-1}) há um efeito inibitório que reduz a taxa de replicação em mais de 50%. Segundo os autores, a exposição prolongada da cultura a essas concentrações não demonstrou sinais de adaptação.

De, Oliver e Pecic (1997) estudaram o efeito de vários íons na atividade oxidativa da espécie *A. ferrooxidans* utilizando medidas de potencial redox, espectrometria de absorção atômica e microscopia eletrônica. Os autores observaram que concentrações de até 10 mg L^{-1} (282 mmol L^{-1}) de íons Cl^- não afetaram a atividade bacteriana.

Em estudos previos (RIBEIRO NETO, 2007) a atividade de oxidação do Fe^{2+} da espécie *A. ferrooxidans*-LR, na presença de várias concentrações de íon Cl^- , 100, 200, 400 e 500 mmol L^{-1} , foi investigada. A atividade bacteriana não foi alterada significativamente em concentrações de até 200 mmol L^{-1} . Entretanto, nas concentrações de 400 e 500 mmol L^{-1} , pode ser observada alguma inibição na taxa de oxidação do Fe^{2+} pela bactéria.

II.6. Eletrodo de Pasta de Carbono (CPE)

Eletrodos modificados de pasta de carbono incluem na mistura da pasta um agente modificador em quantidade variável entre 10 e 30 %, dependendo de suas propriedades (SVANCARA *et al.*, 2001).

O CPE utilizado em estudos de biolixiviação é modificado com o sulfeto mineral pulverizado (espécie eletroativa). É recomendável que a granulação da grafita e do pó do mineral seja a mesma para evitar problemas físicos e de heterogeneidade. Para homogeneização, usa-se, geralmente, uma substância líquida volátil que não altere as propriedades químicas e físicas da pasta.

Quando se utiliza como material aglutinante uma substância condutora, ela pode provocar reações iniciais ou mascarar a espécie eletroativa. No entanto, com a utilização de um material não condutor, a pasta é eletroativa apenas na interface eletrodo/solução, e o eletrodo que a contém pode ser usado várias vezes, apenas renovando-se a superfície (LÁZARO *et al.*, 1995).

Uma série de pesquisadores sugere o uso do CPE por apresentar excelente repetibilidade nos ensaios eletroquímicos devido à ausência de problemas associados com polimento, fratura e falta de homogeneidade, apresentados pelos eletrodos de sulfetos minerais maciços. (CABRAL; IGNATIADIS, 2001; CRUZ *et al.*, 1997; HORTA *et al.*, 2005; LÁZARO *et al.*, 1995; LU; JEFFREY; LAWSON, 2000b; RODUÍGUEZ *et al.*, 2003; TONIAZZO *et al.*, 1999).

Segundo Lázaro e colaboradores (1995), eletrodos de calcopirita suportados em resina epóxi apresentam baixa reprodutibilidade, baixa resolução e tendência à fratura. Além disso, as propriedades físicas desses eletrodos são muito diferentes das propriedades do minério no qual o processo de lixiviação é executado. Por essa razão não é possível conduzir estudos eletroquímicos sistemáticos com esse tipo de eletrodo.

II.7. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica bastante utilizada para investigar os processos de eletrodo por ser essencialmente uma técnica de estado estacionário.

A impedância é definida como um número complexo e geralmente é escrita na forma:

$$Z_{(\omega)} = Z' + jZ'' \quad [17]$$

Em que $j = \sqrt{-1}$ e Z' e Z'' são as partes real e imaginária da impedância, respectivamente. Nas medidas de impedância a.c. (corrente alternada), uma perturbação no potencial, de pequena amplitude senoidal (δE) é superimposta entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Da corrente resultante a essa perturbação (δI), o valor da impedância complexa (Z) pode ser calculado:

$$Z = \frac{\Delta E}{\Delta I} = |Z|e^{i\phi} \quad [18]$$

$$|Z| = \frac{\Delta E}{\Delta I} \quad [19]$$

Em que ϕ é a mudança de fase entre δE e δI . Desde que Z dependa da frequência (f) do sinal senoidal, as variações de $Z = f(f)$ podem ser representadas no plano complexo.

A teoria da impedância eletroquímica é um ramo da teoria a.c., que descreve a resposta de um circuito a uma corrente alternada como função da frequência.

Na teoria d.c. (corrente contínua) ($f = 0$ Hz) a resistência é definida pela lei de Ohm e os resistores (R/Ω) são os únicos elementos de circuito que impedem o fluxo de elétrons:

$$E = i.R \quad [20]$$

Na teoria a.c. ($f \neq 0$) a equação análoga é:

$$E = I.Z \quad [21]$$

Dessa forma a impedância (Z/Ω) é o equivalente a.c. da resistência.

Nos circuitos a.c., além dos resistores, os capacitores e os indutores também impedem o fluxo de elétrons. A impedância pode ser expressa como um número complexo, onde a resistência é a componente real e a capacitância e indutância combinadas são a componente imaginária.

A impedância de um resistor não apresenta componente imaginária. O ângulo de fase ajusta-se a 0° , ou seja, a corrente está em fase com o potencial, e ambas, corrente e impedância, são independentes da frequência (ZOLTOWSKI, 1997).

Já a impedância de um capacitor não tem componente real; sua componente imaginária é uma função da capacitância e da frequência. Devido à impedância de um capacitor variar inversamente com a frequência, em altas frequências um capacitor age como um curto-circuito, sua impedância tende a zero. Em baixas frequências (aproximando-se de um sistema d.c.) um capacitor age como um circuito aberto, e a impedância tende em direção ao infinito. O terceiro componente elétrico é o indutor. A corrente que passa pelo capacitor e pelo indutor está 90° fora de fase com o potencial (ZOLTOWSKI, 1997).

Em uma célula eletroquímica, o fenômeno da difusão pode impedir o fluxo de elétrons sendo considerado análogo aos resistores, capacitores e indutores, que impedem o fluxo de elétrons num circuito a.c..

A célula de Randles (Figura 4A) é definida como uma combinação em paralelo de uma capacitância e uma resistência e modela a impedância eletroquímica de uma interface ajustando-se a muitos sistemas químicos. Sendo assim, é possível relacionar os componentes do circuito na célula de Randles com fenômenos físicos comuns em sistemas eletroquímicos.

No esquema da Figura 4A: R_Ω é a resistência ôhmica ou resistência não compensável da solução entre os eletrodos de trabalho e de referência; R_p é a resistência de polarização ou resistência de transferência de carga na interface eletrodo/solução; C_{DL} é a capacitância da dupla-camada elétrica nesta interface.

Em ambos os limites de baixas e altas frequências, o circuito de Randles comporta-se primariamente como um resistor. A componente imaginária é muito pequena, o ângulo de fase encontra-se próximo de 0° e a impedância não varia com a frequência. Em frequências intermediárias, a impedância do capacitor começa a apresentar outro efeito e a célula torna-se, então, mais capacitiva. A componente imaginária, neste caso, começa a apresentar valores mais significativos e o ângulo de fase pode iniciar uma aproximação de 90° (EG&G PRINCEPTON, 1985).

Os dados de impedância podem ser representados graficamente pelo diagrama do plano complexo em que Z'' é plotado em função de Z' (Figura 4B), ou pelos diagramas de Bode em que $\log |Z|$ é plotado em função do $\log f$ (Figura 4C).

A análise do diagrama do plano complexo revela que a impedância da célula de Randles é quase inteiramente criada pela resistência ôhmica. A frequência alcança seu limite elevado mais à esquerda no final do semicírculo, em que intercepta o eixo real. No limite, em

baixas frequências, a célula de Randles também se aproxima de uma resistência pura com valor igual a $R_{\Omega} + R_p$. A frequência alcança seu limite mais baixo, mais à direita, no final do semicírculo (ACCIARI, 2001).

O gráfico do plano complexo permite analisar os efeitos da resistência ôhmica. Em altas frequências, torna-se fácil extrapolar o semicírculo originado, em direção à esquerda, interceptando o eixo real para ler a resistência ôhmica (Figura 4C). A forma da curva, frequentemente um semicírculo, não varia quando a resistência ôhmica varia. Conseqüentemente, torna-se possível comparar os resultados de dois experimentos que diferem somente na posição do eletrodo de referência. Outra vantagem deste tipo de gráfico é que ele enfatiza os componentes do circuito que estão em série, tal como a resistência ôhmica (ACCIARI, 2001).

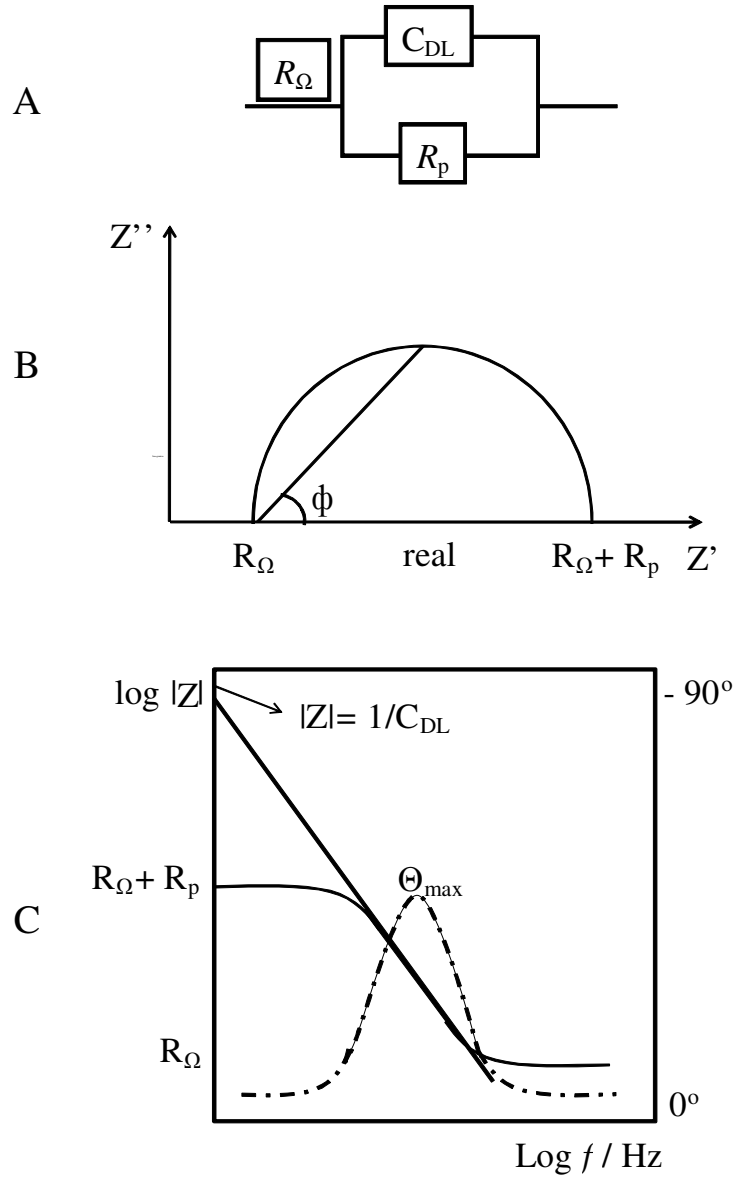


Figura 4: Circuito elétrico de Randles (A). Espectros de Impedância: Plano Complexo (B) e Formato de Bode (C).

O gráfico do Plano Complexo também possui algumas desvantagens. Primeira, a frequência não aparece explícita. Segunda, embora a resistência ôhmica e a resistência de polarização possam ser lidas diretamente no gráfico, a capacitância do eletrodo pode ser calculada somente após a frequência ser conhecida.

No gráfico de Bode, $|Z|$ e a e f estão em escala logarítmica para permitir que uma ampla faixa de dados seja organizada. Isto pode ser uma vantagem quando a impedância é amplamente dependente da frequência como no caso de um capacitor.

No gráfico de Bode o $|Z|$ também pode ser plotado em função do ângulo de fase Φ , ambos como ordenadas em função da frequência Figura 4C.

A principal vantagem da técnica de EIS é que se pode associar um circuito elétrico à interface eletrodo/solução, permitindo obter os parâmetros de circuito por ajustes aos resultados experimentais e relacioná-los às características físico-químicas dessa interface. Na prática, pode-se correlacionar uma curva de impedância, obtida para um dado sistema eletroquímico, com um ou mais circuitos equivalentes, porém será a interpretação física da interface que decidirá por um dos circuitos (BONORA, 1995).

Para a escolha do circuito elétrico alguns critérios têm que ser obedecidos como: uso de circuitos com o menor número de elementos ou componentes; bom ajuste, isto é, baixo valor da somatória dos desvios quadráticos médios (χ^2) e pequeno valor do desvio entre o valor ajustado e o experimental para cada elemento do circuito e ter, principalmente, significado físico (BONORA, 1995)

II.8. Medidas Simultâneas dos Ruídos Eletroquímicos de Potencial e de Corrente (ENA)

As análises dos ruídos eletroquímicos são realizadas em ambos os domínios, do tempo e da frequência, seguindo-se as etapas descritas no fluxograma representado pela Figura 5.

As medidas e análises de ruídos eletroquímicos (ENA) compõem uma técnica relativamente nova, que encontra crescente aplicação no monitoramento da corrosão geral e localizada, na corrosão induzida por microorganismos e na avaliação da resistência de filmes sobre metais. É apropriada para monitorar fenômenos associados ao estudo de corrosão, por não necessitar de nenhum sinal externo a ser aplicado na aquisição de dados experimentais, por ser menos dispendiosa, devido ao baixo custo do equipamento utilizado e por ser experimentalmente mais simples (MANSFELD *et al.*, 1997).

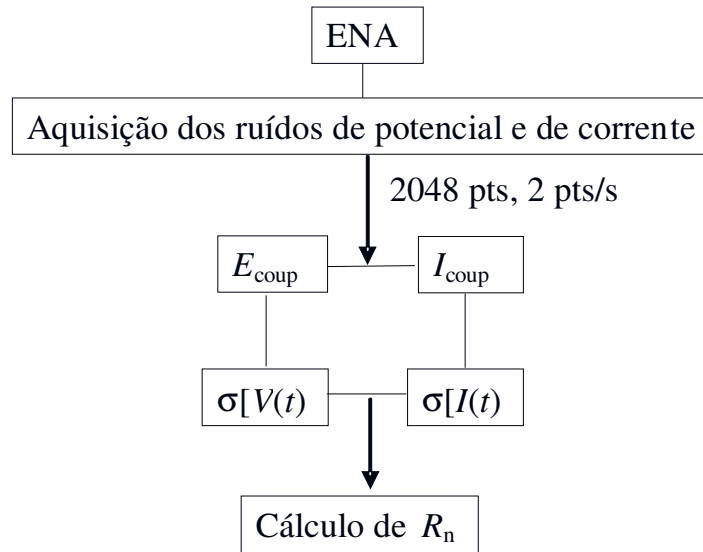


Figura 5: Fluxograma das medidas e análises dos ruídos eletroquímicos (ACCIARI, 2001).

Por meio dessa técnica mede-se o potencial e a corrente simultaneamente, a uma determinada razão de aquisição de pontos, para um número de pontos previamente fixado. Frequentemente, os ruídos são medidos por longos períodos de imersão, como dias, semanas, meses, ou até anos, na tentativa de identificar uma alteração nos ruídos que corresponda a uma variação nos eletrodos, tal como no início de um processo de corrosão acelerada.

O potencial de corrosão corresponde ao potencial médio, E_{coup} , medido entre dois eletrodos de trabalho acoplados, *versus* um eletrodo de referência estável. A corrente média, I_{coup} , é a que flui entre os eletrodos eletricamente acoplados por um ZRA (LEE; MANSFELD, 1998; MANSFELD *et al.*, 1997).

Os termos $\sigma[V(t)]$ e $\sigma[I(t)]$ correspondem aos desvios-padrão (média quadrática) dos ruídos de potencial e de corrente, respectivamente. Ambos os valores podem ser monitorados em função do tempo com o objetivo de avaliar o início da corrosão. Em geral, tem sido observado que $\sigma[V(t)]$ diminui e $\sigma[I(t)]$ aumenta com a degradação de um material. Esses parâmetros também são utilizados para o cálculo de R_n , a resistência do ruído eletroquímico, obtida de análises estatísticas dos ruídos, para avaliar o desempenho de diferentes sistemas em corrosão, matematicamente definida como (MANSFELD *et al.*, 1997):

$$R_n = \frac{\sigma E_t}{\sigma I_t} \quad [22]$$

III. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi estudar a influência da adição de íons Cl^- , e da espécie *A. ferrooxidans*-LR na oxidação da calcopirita utilizando-se ensaios eletroquímicos e de biolixiviação em frascos. Medidas de impedância eletroquímica (EIS) e de ruído eletroquímico (ENA) aplicadas ao CPE-calcopirita foram utilizadas para investigar o efeito da adição dos agentes estudados no decorrer do experimento. Ensaio de biolixiviação em frascos, bem como a análise dos resíduos sólidos foram realizados para complementar os estudos eletroquímicos.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho abordou o estudo do efeito do íon Cl^- e da espécie bacteriana *A. ferrooxidans*, linhagem LR, no processo de oxidação da calcopirita. O efeito de cada um desses fatores individualmente e conjuntamente foram avaliados. Para tanto, foram realizados dois tipos de ensaios: eletroquímicos e de biolixiviação em frascos.

Os ensaios eletroquímicos, que constituíram a primeira etapa do trabalho, foram realizados no Grupo de Eletroquímica e Materiais do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara.

A segunda etapa do trabalho, que envolveu estudos de biolixiviação em frascos, foi realizada no grupo de investigação em metalurgia extrativa e biohidrometalurgia situado no Departamento de Ciências de Materiais e Engenharia Metalúrgica da Universidade Complutense de Madrid, Madrid, Espanha.

A seguir, está descrita a metodologia da experimentação de todos os trabalhos realizados.

IV.1 Amostra mineral

A amostra mineral de calcopirita (CuFeS_2) é proveniente da mina de Sossego-PA, fornecida pela Companhia Vale. Para a execução dos ensaios a amostra foi moída para uma granulometria $100\% < 0,2 \text{ mm}$.

Na tabela 1 está descrita a composição química da amostra, (análise realizada no CNEN-COLAB, Poços de Caldas-MG) a qual apresentou como impurezas principais Ca e Si.

Tabla 1: Composição química da calcopirita utilizada nos ensaios.

Elemento	% em massa	Desvio
Fe	27,3	0,1
Cu	23,0	0,2
S(pirítico)	22,5	0,1
S(sulfático)	0,390	0,03
S(total)	22,9	0,1
Si	3,20	0,2
Ca	7,00	0,1

O difratograma correspondente à amostra mineral utilizada (Figura 6) indica que esta apresenta alto conteúdo de calcopirita e, como impurezas mais importantes, quartzo (SiO_2) e compostos fosfatados de cálcio do tipo $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{S}$, $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ou $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.

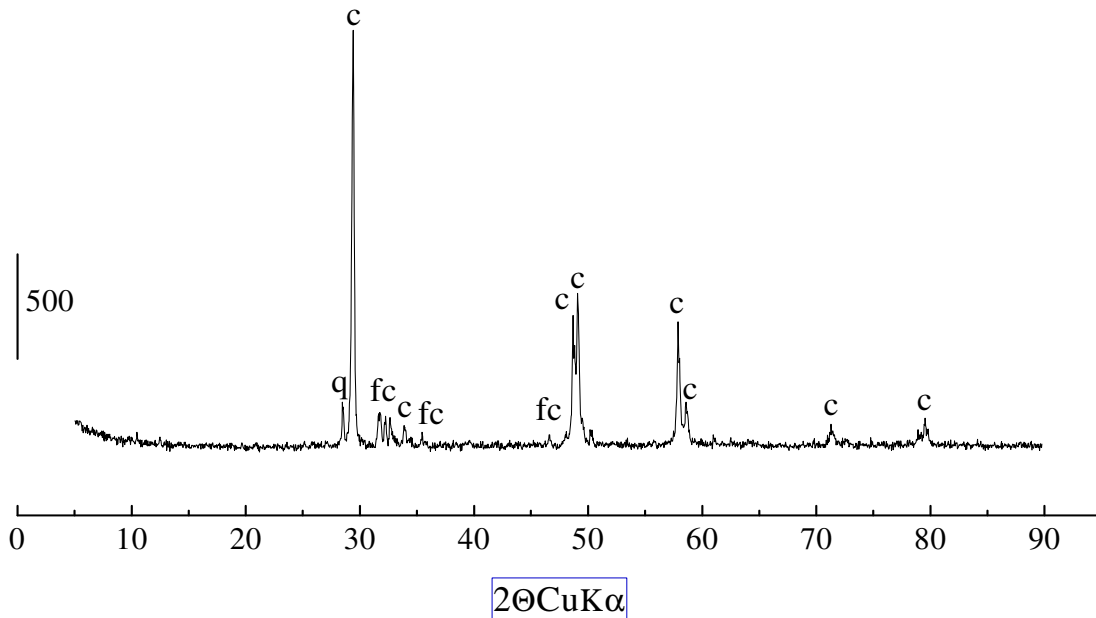


Figura 6: difratograma de raios X do concentrado de calcopirita utilizado. A barra lateral indica a intensidade dos picos e os símbolos indicam c - calcopirita (CuFeS_2), q - quartzo (SiO_2) e fc – compostos fosfatados de cálcio.

Uma análise da distribuição granulométrica do mineral foi realizada no Instituto de Cerâmica e Vidro da Universidade Complutense de Madrid (CSIC-UCM), por análise de pulso laser. Observou-se que a amostra apresenta uma grande distribuição de tamanhos de partícula que variou desde aproximadamente $0,1 \mu\text{m}$ até mais de $100 \mu\text{m}$, ou seja, as diferenças de tamanhos entre partículas são de até três ordens de magnitude (Figura 7). Essas diferenças granulométricas também foram observadas na Figura 8.

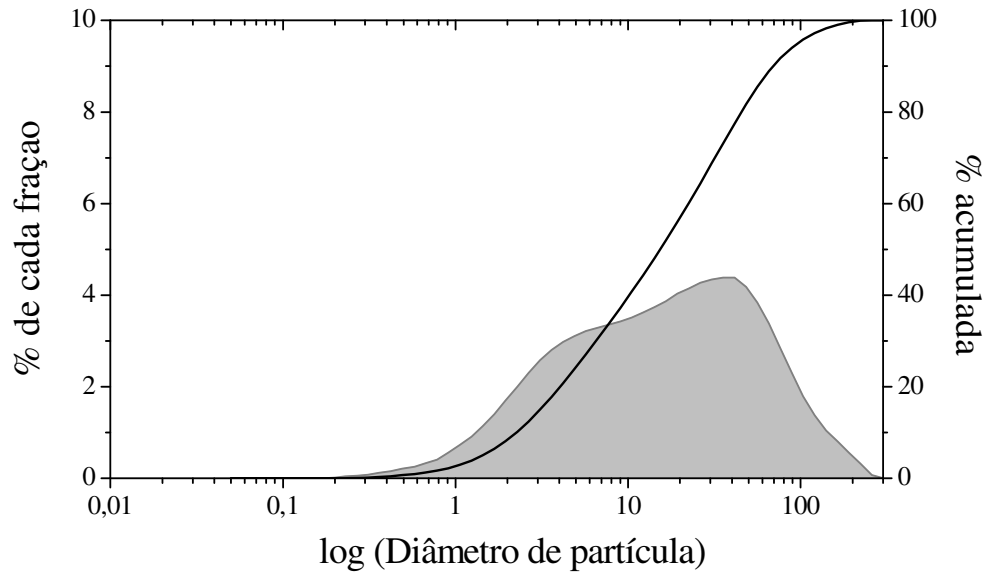


Figura 7: Distribuição granulométrica da amostra mineral de calcopirita.

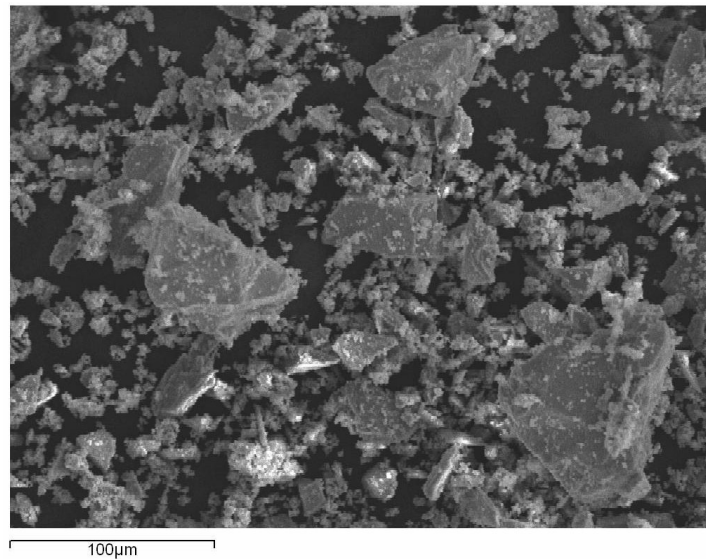


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura (SEM – *Scanning electron Microscopy*) da amostra mineral de calcopirita.

IV.2. Material biológico

Nos ensaios inoculados foi utilizado um cultivo puro de *A. ferrooxidans*-LR, isolada de lixívia ácida de minério de urânio proveniente da Lagoa Real - Bahia (GARCIA JUNIOR, 1991). Essa linhagem apresentou, nos trabalhos realizados em nosso laboratório, maior atividade oxidante na dissolução dos sulfetos de cobre, embora tenha sido extraída de uma

mina de urânio. *A. ferrooxidans*-LR também foi escolhida por apresentar maior resistência a metais pesados. Na Figura 9 estão ilustradas imagens de SEM das células bacterianas de *A. ferrooxidans*-LR.

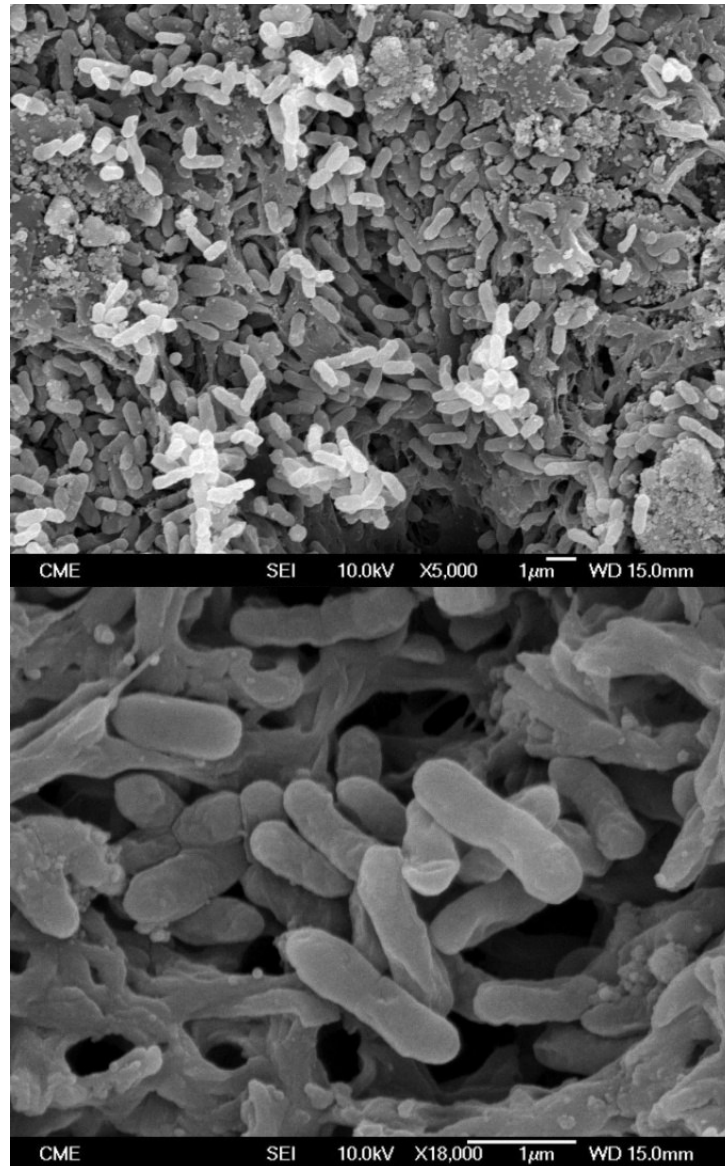


Figura 9: Imagens microscópicas (SEM) dos cultivos bacterianos utilizados nos ensaios inoculados.

IV.2.1. Cultivo bacteriano

Para a manutenção periódica da linhagem bacteriana foi utilizado o meio de cultura T&K, desenvolvido por Tuovinen e Kelly (1973), com pequenas modificações. A composição e o modo de preparo do referido meio estão descritos a seguir:

Solução A:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
pH (H ₂ SO ₄ concentrado).....	1,8
água destilada	q.s.p. 800 mL

Solução B:

FeSO ₄ .7H ₂ O	33,3 g
pH (H ₂ SO ₄ concentrado).....	1,8
água destilada	q.s.p. 200 mL

A solução A foi esterilizada em autoclave (120 °C, 20 min, 1 atm), e a solução B por filtração em membrana de éster de celulose (0,45 µm de diâmetro de poro – Millipore – HAWP 04700). No momento do uso as soluções A e B foram misturadas na proporção de 4:1.

O *A. ferrooxidans*-LR foi crescido em 1,0 L de meio T&K, à temperatura de 30 °C em mesa agitadora com rotação de 150 rpm. O crescimento da bactéria (aproximadamente 48 horas) foi indicado pela oxidação total de Fe²⁺ observada pela mudança de coloração do meio (verde para vermelha).

VI.2.2. Inóculo

Foram utilizados dois tipos de inóculo: O primeiro, utilizado nos ensaios eletroquímicos foi constituído por células bacterianas limpas resuspensas em 10,0 mL da solução A do meio T&K (pellet); O segundo, utilizado nos ensaios de biolixiviação em frascos foi constituído da solução oxidada de cultivo.

Para a obtenção do pellet 1,00 L do meio de cultura oxidado foi centrifugado a 4.000 rpm por 60 min (rotor JA-10, centrífuga Beckman Avanti J-25). As células assim coletadas foram lavadas três vezes com água esterilizada acidificada pH 1,8 com H₂SO₄ concentrado, centrifugando-se a suspensão a 4.000 rpm por 15 minutos sob refrigeração (rotor RTH-750, centrífuga Sorvall - RT7 - Du Pont). O sobrenadante foi, então, desprezado e as células foram resuspensas em um volume de 10,0 mL da solução A do meio T&K. Quando não utilizada imediatamente, a suspensão celular foi estocada em refrigerador a 4 °C por 5 dias, no máximo, sem perda significativa de sua atividade.

VI.2.3. Adaptação das células bacterianas ao íon Cl⁻

Alguns experimentos foram realizados com células bacterianas adaptadas ao íon Cl⁻. O processo de adaptação foi realizado com o aumento gradual da concentração do íon Cl⁻ (mmol L⁻¹) no meio de cultura bacteriana: 50, 100, 150, 180, 200. Foram realizados dois repiques de cultura para cada concentração, e a concentração máxima de íons Cl⁻ em que houve crescimento bacteriano foi de 200 mmol L⁻¹. O crescimento bacteriano foi avaliado pela oxidação do Fe²⁺ presente no meio (mudança de coloração de verde para vermelho).

VI.3. Ensaio eletroquímicos

VI.3.1. Célula eletroquímica

A célula eletroquímica consistiu de um copo de vidro Pirex de 5 cm de diâmetro, acoplada a uma tampa de teflon com entrada para os eletrodos, de forma que os mesmos ficassem verticalmente posicionados como ilustrado na Figura 10 Na execução dos ensaios eletroquímicos foram utilizados, aproximadamente, 40,0 mL de solução eletrolítica.

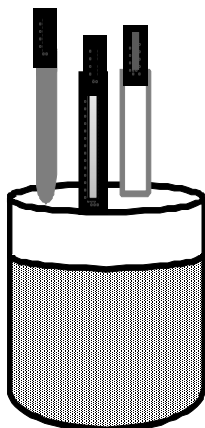


Figura 10: Representação esquemática da célula eletroquímica.

VI.3.2. Eletrodos

Utilizou-se como referência um eletrodo de ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$) e como eletrodo auxiliar uma rede de platina. O eletrodo de trabalho consistiu de um eletrodo de pasta de carbono (CPE) modificado com calcopirita cuja confecção está descrita a seguir.

Para a confecção da pasta, 0,4 g de grafita (Aldrich), 0,10 g de calcopirita (granulometria < 400 mesh) e 0,15 g de nujol foram misturados com clorofórmio (CHCl_3). O nujol é o agente aglutinante não condutor responsável pela adesão da pasta no eletrodo. O clorofórmio é responsável pela homogeneização da pasta uma vez que não interfere nas propriedades do material eletroativo e é rapidamente evaporado. A pasta confeccionada foi mantida sob atmosfera de argônio até sua utilização durante o registro dos ensaios eletroquímicos, a fim de evitar a oxidação espontânea da espécie eletroativa (calcopirita) (HORTA *et al.*, 2005).

Para o preparo do CPE-calcopirita, a pasta foi empacotada na cavidade do corpo de um eletrodo, similar àquele utilizado por Toniazzo e colaboradores (1999), em contacto com um disco de platina, de área geométrica de $7,54 \text{ mm}^2$, como ilustrado na Figura 11.

Em todos os ensaios utilizou-se CPE modificado com 20% de calcopirita.

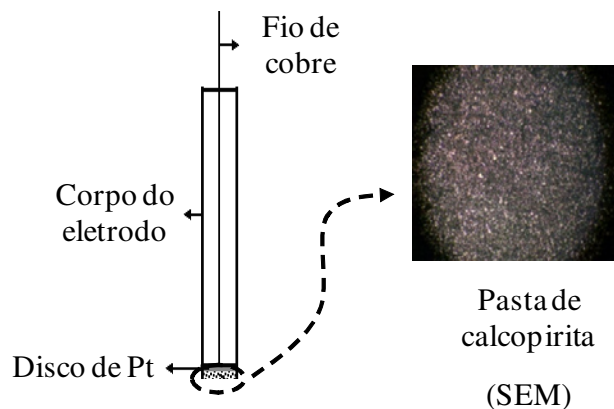


Figura 11: Representação esquemática do eletrodo de pasta de carbono, CPE-calcopirita.

VI.3.3. Técnicas e equipamentos

VI.3.3.a. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

As medidas de EIS foram realizadas com dois eletrodos de trabalho CPE-calcopirita em curto-circuito e utilizando um eletrodo de referência ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat.}}$) para medir o potencial entre os dois eletrodos. A fim de eliminar ruídos espúrios, utilizou-se um capacitor de $0,1 \mu\text{F}$ conectado ao eletrodo de referência e a um fio de Pt (Figura 12).

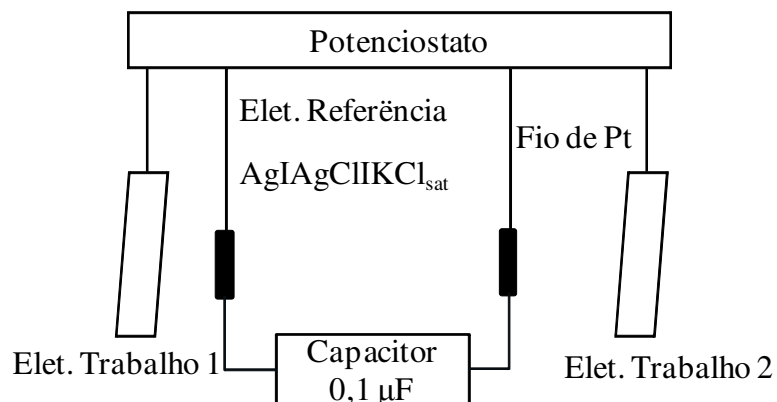


Figura 12: Representação esquemática da organização dos eletrodos na célula eletroquímica.

Nas medidas de EIS foi aplicado o potencial de circuito aberto, medido após estabilização do potencial do eletrodo em solução. O intervalo máximo de frequências foi de

20 kHz a 10 mHz, com amplitude de 10 mV rms de perturbação no potencial e 10 pontos por década de frequência. As medidas foram realizadas para um dos dois eletrodos, num arranjo de célula convencional.

As medidas de impedância foram realizadas num potenciostato marca EG&G PAR 273A acoplado a um analisador de resposta de frequência (FRA - Frequency Response Analyser) modelo 1250. Os espectros de impedância eletroquímica foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados não lineares utilizando-se o programa ZVIEW.

VI.3.3.b. Medidas Simultâneas dos Ruídos Eletroquímicos de Potencial e de Corrente

No arranjo experimental para a coleta dos dados de ENA utilizou-se um eletrodo $\text{Ag|AgCl|KCl}_{\text{sat}}$ como referência e dois eletrodos de trabalho idênticos, correspondentes ao CPE-calcopirita, conectados por meio de um amperímetro de resistência nula (ZRA) (MANSFELD *et al.*, 1997).

Utilizou-se um potenciostato marca GAMRY para o registro dos ruídos de potencial e de corrente coletados simultaneamente a três diferentes frequências de aquisição: $f_s = 2$ Hz por 1024 segundos, $f_s = 10$ Hz por 204,8 s e $f_s = 100$ Hz por 20,5 s; todos os registros com um total de 2048 pontos. A aquisição de pontos para a coleta e análise dos ruídos de potencial e de corrente foi realizada utilizando-se o programa ESA400.

VI.3.4. Procedimento experimental

A influência da adição de íons Cl^- e da espécie *A. ferrooxidans*, linhagem LR, no processo oxidativo da calcopirita do sistema CPE-calcopirita foi monitorada por vários dias, em meio ácido e inoculado, utilizando-se as técnicas eletroquímicas de ENA e EIS. Os ensaios foram realizados em duas etapas que diferem no que diz respeito à ordem de adição da bactéria e dos íons Cl^- .

Na primeira etapa, a célula eletroquímica foi mantida durante três dias com solução A do meio T&K. No quarto dia de experimento (72 h) adicionou-se a espécie *A. ferrooxidans*, linhagem LR. No sexto (128 h), décimo segundo (272 h) e no vigésimo terceiro (512 h) dias foram realizadas adições sucessivas dos íons Cl^- . Dessa forma, os íons Cl^- foram adicionados na célula eletroquímica na presença da bactéria *A. ferrooxidans*-LR. Todos os ensaios eletroquímicos foram inoculados com pellet (descrito na secção IV.2.2).

O efeito da adição de íons Cl^- foi investigado por meio de adições sucessivas de solução de NaCl , de modo que, após a primeira adição, a concentração de íons Cl^- na célula correspondeu a $9,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; após a segunda adição, a concentração de íons Cl^- na célula correspondeu a $0,19 \text{ mol L}^{-1}$; após a terceira adição, a concentração de íons Cl^- na célula correspondeu a $0,26 \text{ mol L}^{-1}$.

Na segunda etapa houve a inversão da ordem de adição de forma que os íons Cl^- foram adicionados anteriormente, ou seja, na ausência de células bacterianas. Inicialmente, a célula eletroquímica foi mantida com solução A do meio T&K durante quatro dias. No quinto dia (96 h) adicionou-se Cl^- . Foi adicionado a solução de NaCl , de modo que a concentração de íons Cl^- não correspondeu a $9,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. No décimo terceiro dia (288 h) adicionou-se a espécie *A. ferrooxidans* (linhagem LR).

No decorrer do experimento foram realizadas medidas de ENA nas frequências de 2, 10 e 100 Hz, consecutivamente. Paralelamente aos ensaios de ENA foram realizadas medidas de EIS. Tanto as medidas de ENA como de EIS foram realizadas em diferentes períodos de imersão. O organograma da Figura 13 ilustra a execução das duas etapas do experimento.

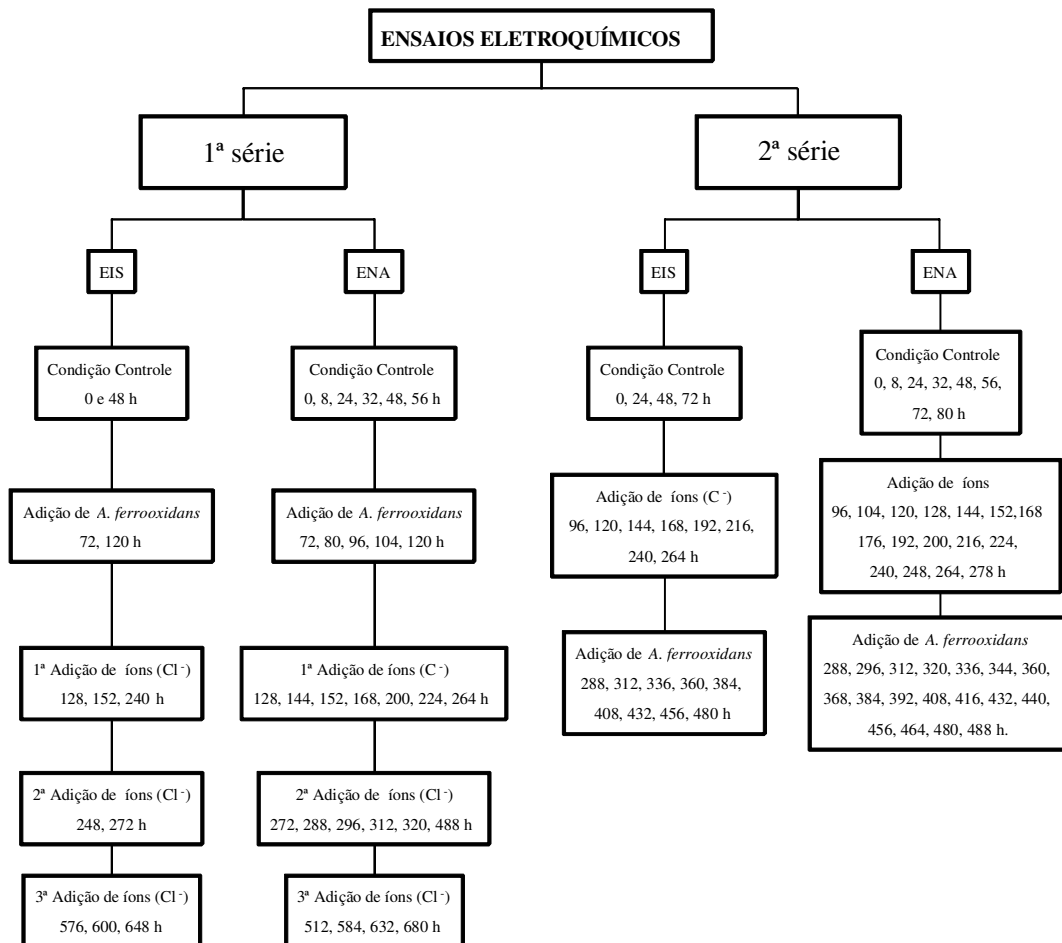


Figura 13: Organograma representativo do monitoramento das células eletroquímicas para o estudo da pirita, Figura 13: Organograma representativo do monitoramento das células eletroquímicas para o estudo da influência da adição de íons Cl^- e de células bacterianas na oxidação do CPE-calcopirita, utilizando-se EIS e ENA realizado em duas séries de medidas.

VI.4. Ensaios de biolixiviação em frascos

VI.4.1. Técnicas e equipamentos

Os ensaios de biolixiviação em frascos foram monitorados por amostragem periódica seguida da análise da fase líquida, além da análise dos resíduos sólidos finais. A seguir estão descritas as metodologias de análise das duas fases mencionadas.

IV.4.1.a. Espectrometria de absorção atômica - Cu e Fe totais

As concentrações de Cu e Fe totais nas amostras líquidas foram analisadas por espectrometria de absorção atômica, utilizando um espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1100B. O comprimento de onda para os elementos estudados foi de: 248,3 nm para o Fe e 324,8 nm para o Cu.

IV.4.1.b. Fotocolorimetria - Fe²⁺

O Fe²⁺ foi determinado pelo método descrito por Lovley e Phillips (1986). Para tanto uma alíquota de 500 µL da amostra foi acidificada com HCl 0,5 M (4,5 mL). Em seguida, 100 µL da amostra acidificada reagiu por 15 minutos com 3,0 mL de solução de ferrozina (1g de 3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenilsulfônico)-1,2,4-triazina por litro em tampão HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinil etanosulfônico), pH 6,5; 50mmol L⁻¹). A absorbância do complexo ferrozina-Fe²⁺ foi medida ($\lambda = 562$ nm). A concentração do íon ferroso foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida com sulfato de etilendiamônio ferroso.

A concentração de Fe³⁺ foi determinada pela diferença entre as concentrações de Fe total e Fe²⁺.

IV.4.1.c. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) – resíduos sólidos

Para a obtenção das imagens de SEM todas as amostras foram recobertas com grafita utilizando-se o equipamento MED 010 Balzers Union, com o objetivo de aumentar a condutividade elétrica da superfície.

Os resíduos sólidos provenientes dos ensaios que continham células bacterianas foram submetidos ao tratamento do ponto crítico. Esse tratamento teve o objetivo de desidratar as células bacterianas.

Anteriormente ao tratamento do ponto crítico, as amostras foram preparadas através de um tratamento com acetona. As amostras sólidas foram colocadas em um conjunto de filtração de membrana Millipore (0,2 µm) de 1,4 cm de diâmetro. Através desse sistema foram injetadas soluções de acetona de 30, 50, 70 e 90%, nessa ordem. As amostras foram mantidas em contato com cada solução durante 15 minutos, exceto com a solução de 90% de

acetona, cujo contato com a amostra durou 12 horas. Após este período foi injetada acetona concentrada através do filtro e a amostra foi submetida ao tratamento do ponto crítico.

O tratamento do ponto crítico foi realizado em um equipamento Balzers CPD030. Para tanto, a acetona líquida foi retirada da amostra com uma corrente de CO₂ por condições de pressão e temperatura do sistema.

Além das análises microscópicas de SEM, foram realizadas análises pontuais e lineares de composição química elementar (SEM-EDS).

Utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura marca JEOL, modelo JSM-6400, com potencial de 20 kV composto de um dispositivo de microanálise EDS, para a detecção de elementos químicos, e o software INCA para processar os dados enviados pelo microscópio.

IV.4.1.d. Difração de Raios X – resíduos sólidos

Para as análises de raios X foi utilizado um difratômetro PHILLIPS X'PERT-MPD com comprimento de onda de Cu-K $\alpha = 1,5406$; voltagem de 45 kV, corrente de 40 mA, passo 0,04° (2 Θ), tempo de contagem 1s, ângulos de varredura de 5° a 90° (2 Θ). A identificação de fases presentes foi feita por comparação com fichas padrão do “International Centre for Diffraction Data” (ICDD).

IV.4.2. Procedimento experimental

Os ensaios de biolixiviação em frascos foram realizados em mesas agitadoras a 180 rpm e temperatura de 30 °C. Como reatores foram utilizados erlenmeyers de 250 mL tampados com algodão hidrófobo. Foram utilizados 100 mL de solução lixiviante e 2,5 g de amostra mineral o que conferiu aos ensaios uma densidade de polpa de 2,5 %. Utilizou-se como solução lixiviante inicial a solução A do meio T&K.

Para o inóculo dos ensaios foram utilizadas células adaptadas a Cl⁻ e células não adaptadas a 5% (v/v) do sobrenadante das respectivas culturas.

A água de evaporação foi repostada anteriormente a cada amostragem com água destilada estéril. Depois de 29 dias o pH do meio foi ajustado durante os ensaios pela adição de 1,0 mL de solução de H₂SO₄ 50%.

Os ensaios foram acompanhados por amostragem periódica da fração líquida seguida de análises das concentrações de Cu e Fe totais, Fe²⁺ e medidas de pH. Foram realizadas

medidas de Eh, mas devido a problemas com o equipamento, refletidos nos valores dos potenciais medidos, esses dados não foram apresentados no trabalho.

No final da experimentação os resíduos sólidos foram analisados por SEM e Difração de raios X.

De maneira similar ao ensaio eletroquímico, íons Cl^- e células bacterianas adaptadas e não adaptadas foram adicionados aos frascos de lixiviação no decorrer do experimento em diferentes ordens de adição. Foram realizadas duas adições, que ocorreram depois de 12 e 48 dias de ensaio. As adições de íons Cl^- foram realizadas através da adição de 5,0 mL de solução concentrada ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$) de NaCl de modo que a concentração do íon estudado no frasco reator fosse de 200 mmol L^{-1} . Na Tabela 2 está descrita a maneira como foram denominados os experimentos.

Tabela 2: Nomenclatura dos ensaios de biolixiviação em frascos

1ª adição	2ª adição	Símbolo
Cl^-	Bactéria	A
Cl^-	Bactéria adaptada	B
Bactéria	Cl^-	C
Bactéria adaptada	Cl^-	D

Também foram realizados dois tipos de ensaios controles que foram constituídos de:

1. Solução A do meio T&K (branco)
2. Solução A do meio T&K + 200 mmol L^{-1} de íons Cl^-

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência da adição de íons Cl^- e de células bacterianas da espécie *A. ferrooxidans*, linhagem LR, no processo oxidativo da calcopirita foi investigada por experimentos eletroquímicos e de lixiviação em frascos. Em ambos os casos, os dois agentes estudados foram adicionados aos ensaios durante o transcurso do experimento em duas séries que se diferenciam quanto à ordem de adição. Nas duas séries de medidas, os experimentos foram iniciados numa condição controle, ou seja, com solução A do meio T&K. Na primeira série de medidas as células bacterianas foram adicionadas previamente à adição de íons Cl^- , enquanto que, na segunda série, os íons Cl^- foram adicionados previamente à adição de células bacterianas.

A discussão dos resultados foi segmentada em duas partes: primeiramente serão apresentados os resultados eletroquímicos e, em seguida, os resultados de biolixiviação em frascos.

V.1. Ensaios eletroquímicos

Na primeira série de ensaios eletroquímicos uma adição de células bacterianas (72 h) à célula eletroquímica foi seguida de três adições sucessivas de íons Cl^- (128, 272 e 536 h). Na segunda série de medidas uma adição de íons Cl^- (96 h) foi seguida de uma adição de células bacterianas (288 h). A célula eletroquímica foi monitorada diariamente realizando-se medidas de EIS e ENA.

V.1.1. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Na Figura 14 estão ilustrados alguns dos espectros de EIS obtidos durante a primeira série de medidas. Analisando-se os espectros obtidos, imediatamente após a imersão dos eletrodos no meio ácido ou controle (0 h), observou-se o aparecimento de dois semicírculos no gráfico do plano complexo (Figura 14A). Essas duas componentes também aparecem bem definidas na forma de dois máximos na variação do ângulo de fase com a frequência (Figura 14B). Como observado em estudo prévio, a primeira constante de tempo em altas frequências pode estar relacionada à contribuição dada pela pasta de carbono na resposta eletroquímica. Logo, a segunda constante que aparece em baixas frequências pode corresponder à oxidação da calcopirita (HORTA *et al.*, 2007)

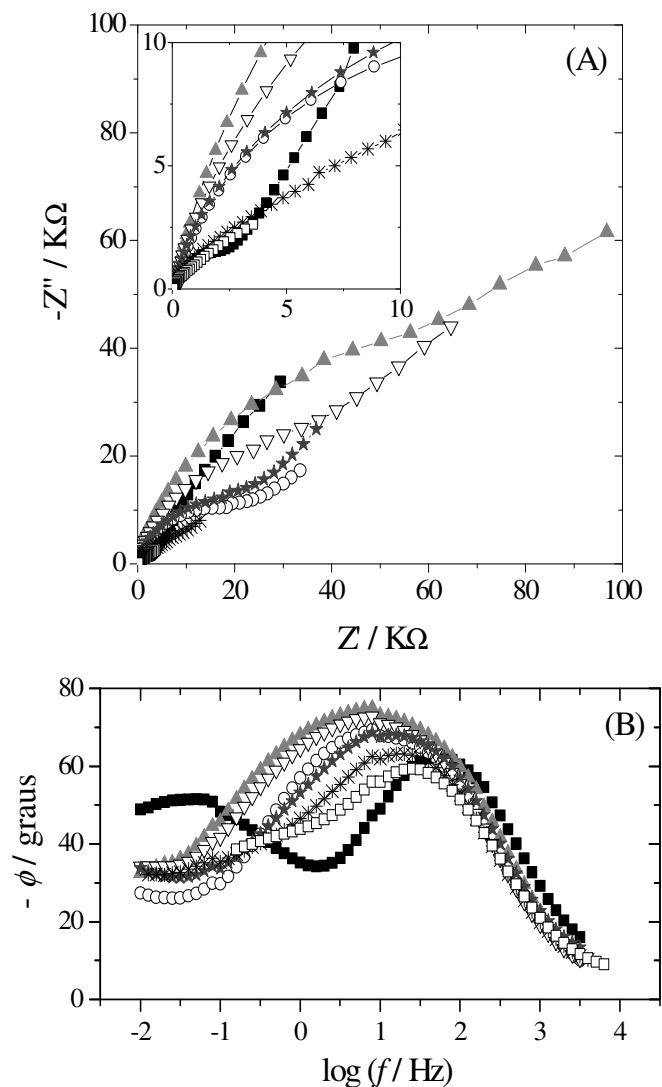


Figura 14: Espectros de EIS, (A) Plano Complexo e (B) Bode, correspondentes à primeira série de experimentos (Cl⁻) com 0 (!), 48 (-), 72 (7), 120 (X), 128 (ξ), 272 () e 608 (∇) horas de monitoramento.

Os espectros de EIS podem ser ajustados a modelos de circuitos elétricos equivalentes que são fisicamente associados à interface eletrodo-solução. Dessa maneira, a escolha do circuito elétrico considera a interpretação física dos possíveis fenômenos superficiais que ocorrem na região de eletrodo.

Os espectros de impedância, correspondentes às duas séries de medidas, foram ajustados utilizando-se diferentes modelos de circuitos elétricos equivalentes. Para os casos em que mais de um modelo foi apropriado para representar as diferentes interfaces

eletroquímicas sob investigação, optou-se pela representação mais simples e também por aqueles que apresentaram menor valor de χ^2 e de erro percentual de cada elemento elétrico, parâmetros estes indicativos da qualidade dos ajustes efetuados.

Na Figura 15 estão ilustrados os modelos de circuitos elétricos utilizados para os ajustes dos espectros obtidos. Para todos os modelos avaliados (Figura 15), R_Ω é a resistência ôhmica da célula. CPE é uma abreviação comum para o elemento de fase constante; o qual pode ser expresso como $Z_{CPE} = Q^{-1}(j\omega)^{-\alpha}$, onde Q é o coeficiente, α é o expoente do CPE, j é a unidade imaginária e ω é a frequência angular. O expoente α do CPE é uma medida da dispersão da capacitância tendo valores entre 1 (capacitância ideal) e 0,5 (dispersão na capacitância, como, por exemplo, eletrodos porosos).

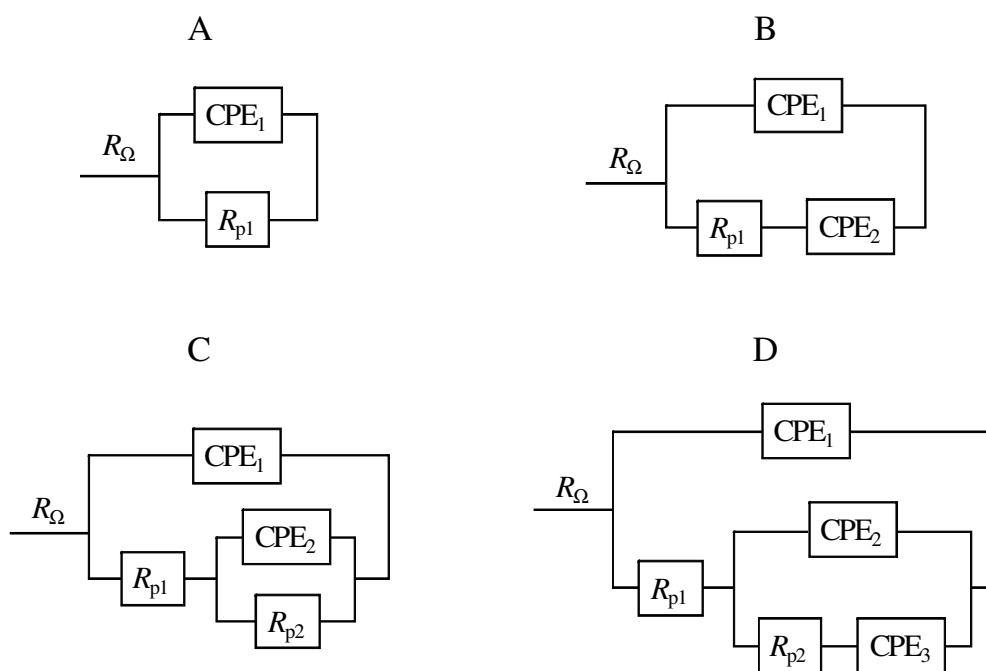


Figura 15: Modelos de circuitos elétricos equivalentes propostos para os ajustes dos espectros de impedância.

Os espectros obtidos imediatamente após a imersão dos eletrodos no meio controle (0 h, Figura 14) na primeira série de medidas foram ajustados ao circuito elétrico da Figura 15C. Duas associações R_p -CPE em paralelo foram utilizadas para ajustar os espectros obtidos nestas condições. Sugere-se que $R_{p1}CPE_1$ pode estar relacionado à contribuição dada pela pasta de carbono na resposta eletroquímica e, $R_{p2}CPE_2$, que aparece em baixas frequências, pode corresponder à oxidação da calcopirita, a espécie eletroativa da pasta.

Após 48 h de imersão, a natureza do espectro de EIS mudou, conforme ilustrado pela Figura 14. A origem da segunda componente capacitiva, com características de difusão ao invés de um segundo semicírculo, foi demonstrada pelo comportamento retilíneo da segunda constante de tempo no plano complexo, o que denota um processo de transferência de massa. Conseqüentemente, o modelo de circuito elétrico equivalente ilustrado na Figura 15B foi ajustado para os espectros obtidos depois de 48 h.

Este comportamento permaneceu invariável mesmo após 576 horas de imersão, indicando que o processo de dissolução do CPE-calcopirita em meio ácido, a partir de 48 horas de imersão, pode ser representado pelo mesmo modelo de circuito elétrico equivalente (Figura 15B). Isso significa que a adição de íons Cl^- ou de bactéria não influenciou a natureza do mecanismo e do espectro.

Espécies eletroquimicamente ativas podem migrar do seio da solução para a região de eletrodo formando produtos de oxidação insolúveis no meio e que constituirão a composição química e a morfologia de uma nova camada sobre a superfície do CPE-calcopirita. Essas mudanças podem ser responsáveis pelas modificações nos espectros de EIS e nos modelos de circuito elétrico ajustado.

Na Figura 16 estão ilustrados alguns dos espectros de EIS obtidos para a segunda série de medidas, em que os íons Cl^- foram adicionados após 96 h de monitoramento, e as células bacterianas após 288 h. De maneira análoga à situação controle, correspondente à primeira série de medidas, observa-se o aparecimento de dois máximos no gráfico do ângulo de fase com a frequência. Os máximos oscilam em torno de 50° , valor que está muito próximo daquele encontrado para a livre difusão das espécies em solução (45°) (GABRIELLI, 1992; TAITTY, 1994).

Esses espectros foram ajustados ao circuito elétrico da Figura 15D. Algumas dissimilaridades na região de baixas frequências, sobretudo no formato do plano complexo, podem ser observadas entre as duas medidas realizadas na condição controle (0 h) para as duas séries de medidas. Como conseqüência, alterações foram observadas no modelo de circuito elétrico equivalente. De um lado, Figura 15C, foi necessária a inserção de CPE_2 em paralelo com R_{P2} para ajustar o segundo arco capacitivo. De outro foi necessária a inserção dos termos R_{P2} e CPE_3 em série (Figura 15D) para o ajuste da componente de difusão na região de baixas frequências.

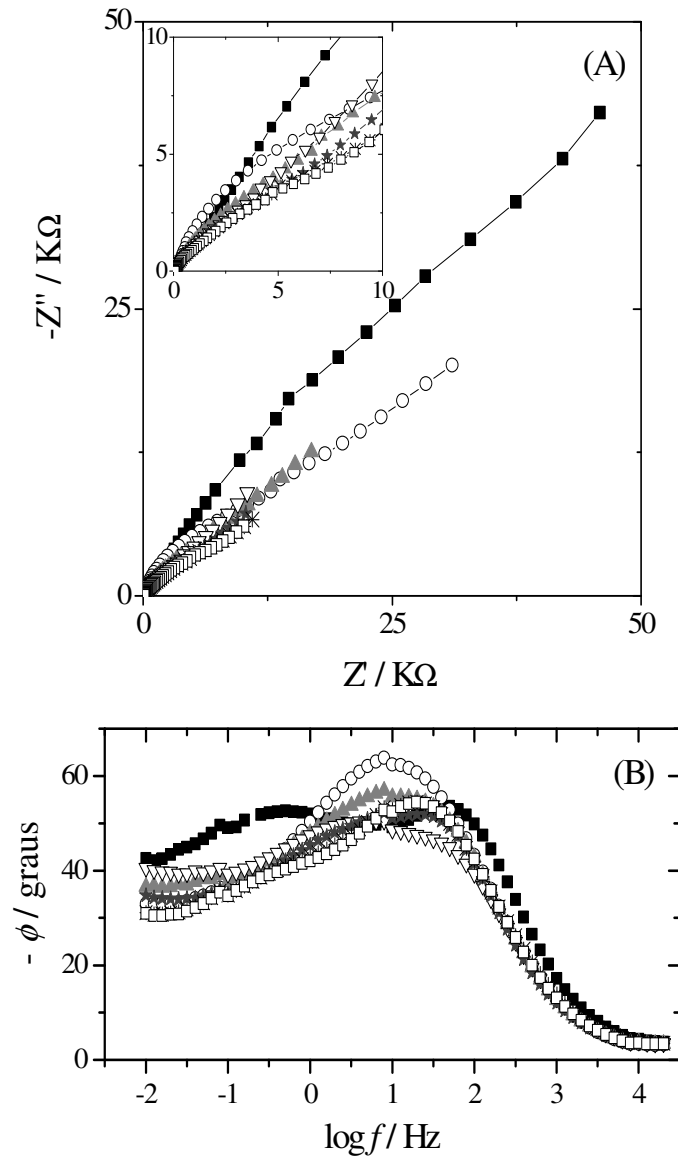


Figura 16: Espectros de EIS, (A) Plano Complexo e (B) Bode, correspondentes à segunda série de experimentos (CI) após 0 (!), 48 (-), 96 (7), 192 (X), 288 (ξ), 384 () e 488 (∇) horas de imersão do CPE-calcopirita.

Essas diferenças entre medidas realizadas sob as mesmas condições experimentais são observadas, sobretudo a baixas frequências, em que a aquisição de um novo ponto durante a medida torna-se cada vez mais lenta, o que pode ocorrer devido à própria instabilidade do sistema eletroquímico. Além disso, o processo de dissolução da calcopirita é complexo e envolve a formação de uma série de compostos intermediários incluindo sulfetos não estequiométricos.

Após 24 horas de imersão, Figura 16, observou-se o desaparecimento da segunda constante de tempo, enquanto a segunda componente capacitiva assume características difusionais. Tais mudanças nos espectros de EIS ocorreram anteriormente à adição dos agentes modificadores da solução eletrolítica (Cl^- ou bactéria), e o circuito elétrico que melhor ajustou-se aos espectros está ilustrado na Figura 15B. Isto indica uma modificação na morfologia e na composição química da superfície do CPE-calcopirita, que ocorreu naturalmente.

Após 480 horas (172 horas após a adição de bactéria e 384 após a adição de Cl^-), Figura 16, a separação de dois máximos no gráfico do ângulo de fase com a frequência torna-se evidente embora o máximo em baixas frequências seja pouco expressivo. Como consequência o circuito elétrico ajustado mudou para o correspondente da Figura 15C.

As características dos espectros de EIS permaneceram constantes até 488 horas de imersão, que corresponde ao final da segunda série de medidas. Igualmente, o circuito elétrico equivalente da Figura 15C ajustou bem os espectros de impedância até a última medida.

Nota-se que as modificações nos circuitos elétricos equivalentes com o decorrer do tempo de imersão dos CPEs-calcopirita não acontecem concomitantemente à adição dos agentes estudados, Cl^- e bactéria. Observa-se também que somente a análise dos dados de EIS não permite distinguir entre a primeira e a segunda série de medidas, ou seja, entre a adição de íons Cl^- antes ou depois das células bacterianas.

Muito embora a proposição de modelos de circuitos elétricos equivalentes, para representar diferentes interfaces eletroquímicas, seja amplamente utilizada no cálculo de R_p , a analogia entre esses dois sistemas deve ser empregada com cuidado. O problema consiste em que circuitos elétricos com três ou mais elementos combinados de formas diferentes podem produzir exatamente a mesma resposta de impedância, ou seja, não existe uma correspondência biunívoca entre o espectro de impedância eletroquímica e os circuitos elétricos equivalentes. Isso dificulta a escolha do modelo adequado às propriedades físicas e químicas do sistema (ZOLTOWSKI, 1997).

Um método alternativo para a determinação de um parâmetro com informação quantitativa, a partir dos dados de EIS, consiste na obtenção do módulo de impedância a 1 Hz, $|Z|_{f=1\text{Hz}}$, no formato de Bode. Esta nova proposição foi elucidada por De Rosa, Earl e Biewagen (2002) na avaliação estatística de dados de EIS e ENA para monitorar sistemas em corrosão. Segundo os autores, o valor de $f = 1$ Hz foi escolhido justamente por refletir as

variações que podem ser observadas em um dado sistema eletroquímico durante o período de monitoramento investigado. Nas frequências menores, um erro pode ser introduzido devido às possíveis mudanças na amostra durante o próprio tempo de medida, caracterizando um período não-estacionário, enquanto que, nas frequências maiores, os sistemas são predominantemente capacitivos e mostram pouca variação.

A variação de $|Z|_{f=1\text{Hz}}$ com o tempo de monitoramento correspondente ao estudo da influência dos íons Cl^- e da espécie *A. ferrooxidans* foi investigado e está ilustrado na Figura 17.

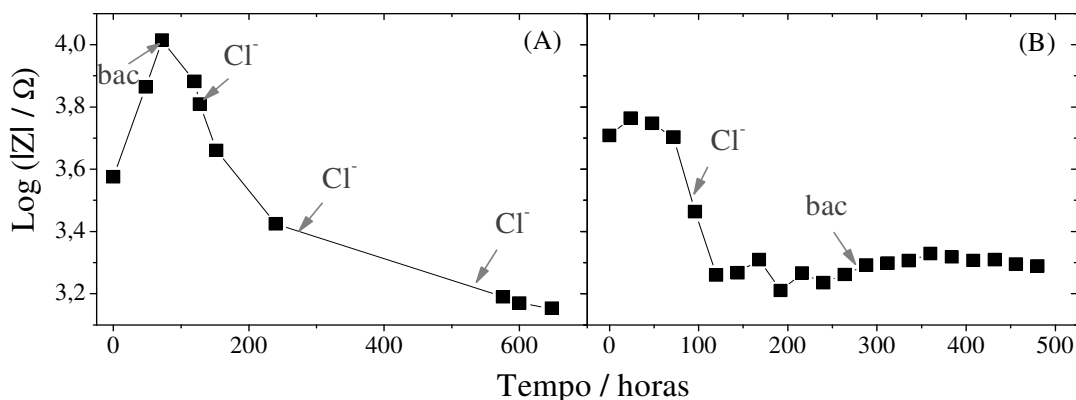


Figura 17: Perfis de $\log |Z|_{f=1\text{Hz}}$ com o tempo de monitoramento obtidos para a primeira (A) e segunda séries de medidas (B). As setas indicam o momento das adições de células bacterianas e dos íons Cl^- .

Observa-se na Figura 17 uma diminuição dos valores de $|Z|_{f=1\text{Hz}}$ com aumento do período de imersão que pode ser entendida como um aumento da taxa de dissolução da calcopirita. Considerando a primeira série de medidas, Figura 17A, observa-se que esse aumento na taxa de dissolução da calcopirita tende a ser progressivo na medida em que foram adicionados novos agentes químicos e biológicos (íons Cl^- e bactérias).

Já na segunda série de medidas, após a primeira adição de íons Cl^- , Figura 17B, os valores de $\log |Z|_{f=1\text{Hz}}$ diminuíram consideravelmente até a estabilização em torno de 3,3 kΩ. A posterior adição de células bacterianas não ocasionou modificações significativas neste perfil.

V.1.2. Ruído Eletroquímico (ENA)

Paralelamente às medidas de EIS foram realizados ensaios de ENA para as duas séries de experimentos. Na Figura 15 está ilustrado um registro típico de ruídos de potencial e de corrente, coletados simultaneamente no domínio do tempo.

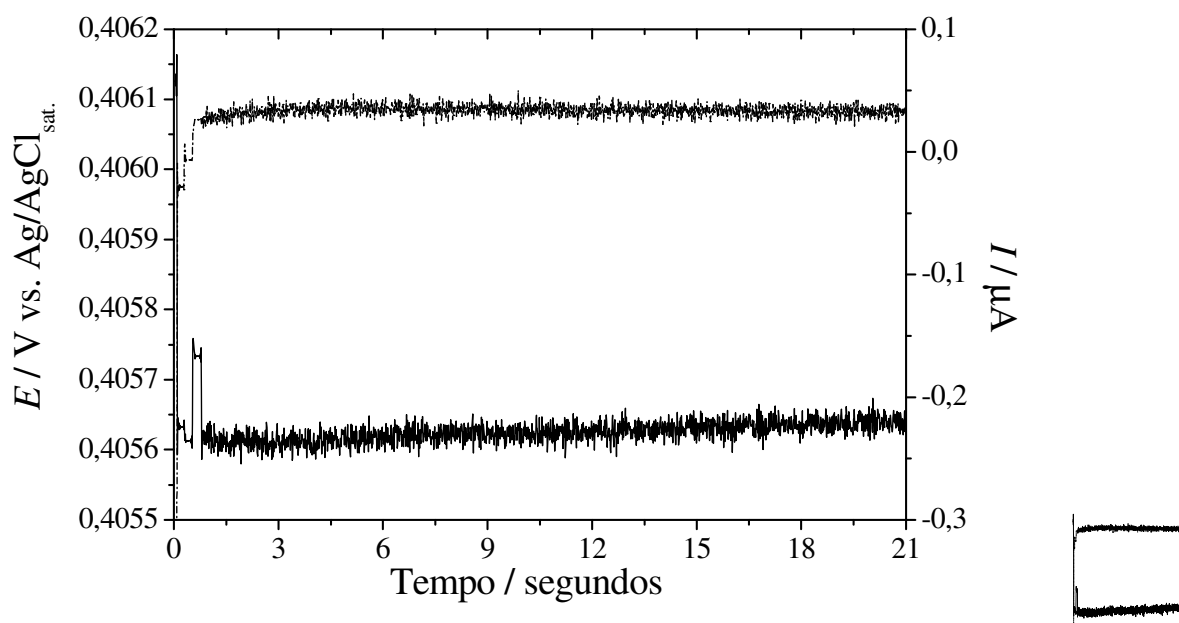


Figura 18: Registro simultâneo dos ruídos de potencial e corrente, obtidos no domínio do tempo ($f_a = 10$ Hz), para o CPE-calcopirita.

A partir de um registro típico de ENA, como o representado na Figura 15, foram calculados os parâmetros estatísticos comuns nesse tipo de análise, tais como: valor médio do potencial medido entre os dois eletrodos de trabalho, E_{coup} ; valor médio da corrente que flui entre os dois eletrodos, I_{coup} ; desvios-padrão dos ruídos de potencial e de corrente, $\sigma[V(t)]$ e $\sigma[I(t)]$, respectivamente; e a resistência do ruído, R_n , calculada a partir da razão entre os desvios-padrão dos ruídos de potencial e de corrente.

Os dados de ruído eletroquímico foram registrados a frequências de aquisição de 2, 10 e 100 Hz. A necessidade de se medir ruídos de potencial e de corrente a diferentes valores de frequência (no caso, $f = 2, 10$ e 100 Hz) reside na importância de se verificar que quanto maior for a frequência de aquisição desses dados, maior a possibilidade de se registrar um evento correspondente aos fenômenos de superfície em tempo real. Um evento registrado a $f = 2$ Hz significa que um ponto é registrado a cada 0,5 s, enquanto que a $f = 10$ Hz, um ponto

é registrado a cada 0,1 s e ainda, a $f = 100$ Hz, um ponto é registrado a cada 0,01 s. Isto significa que quanto maior o valor de f , mais “contínuo” torna-se o registro obtido.

A variação dos valores de E_{coup} e I_{coup} com o tempo de imersão dos CPEs-calcopirita, correspondentes à primeira série de medidas está ilustrada na Figura 19.

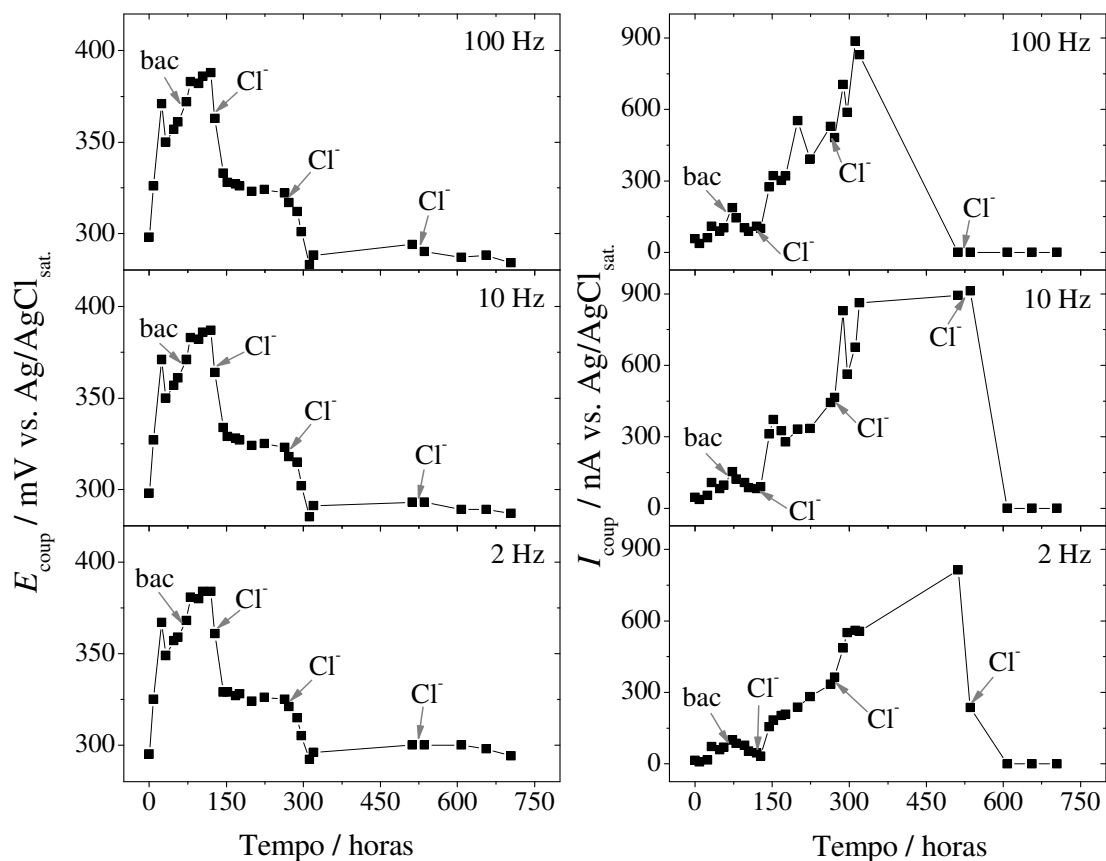


Figura 19: Variação dos valores de E_{coup} e I_{coup} com o tempo de imersão do CPE-calcopirita correspondentes à primeira série de experimentos ($f = 100, 10$ e 2 Hz). As setas representam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

Leituras anteriores de potencial vs. tempo revelaram que o CPE modificado com 20 % de calcopirita apresenta potencial de circuito aberto em aproximadamente 275 mV (HORTA *et al.*, 2007). Pode-se observar na Figura 19 que E_{coup} partiu de 300 mV e aumentou espontaneamente durante a condição controle. Após a adição das células bacterianas, E_{coup} continuou aumentando e se tornou estável em aproximadamente 380 mV. Após as duas primeiras adições de íons Cl^- observou-se uma queda acentuada nos valores de E_{coup} . A terceira adição de íons Cl^- não ocasionou mudanças significativas nos valores de potencial.

Observa-se ainda na Figura 19 que no início do experimento os valores de I_{coup} aproximaram-se de zero. A adição de células bacterianas ocasionou, num primeiro momento, um ligeiro aumento seguido da queda gradual dos valores de I_{coup} . Essa queda foi interrompida pela primeira e segunda adições de íons Cl^- que fizeram com que I_{coup} aumentasse significativamente. Somente após aproximadamente 600 horas de monitoramento, I_{coup} atingiu valores próximos de zero, assim como na condição inicial.

Esse retorno ao estado inicial, observado tanto para I_{coup} como para E_{coup} , pode estar associado à exaustão da espécie eletroativa na superfície do eletrodo após um extensivo processo de corrosão. Nava e colaboradores (2008) afirmaram que a presença de um óleo mineral, utilizado como agente aglutinante na confecção da pasta de carbono confere à superfície do eletrodo propriedades hidrofóbicas. Isso previne a penetração do eletrólito no eletrodo, limitando as reações eletroquímicas na superfície da pasta.

Além disso, outro fator que pode contribuir para limitar a taxa de oxidação da calcopirita é a formação de espécies insolúveis que podem aderir na superfície do mineral. A identificação desses produtos e de seus reais efeitos é de suma importância na otimização dos processos de dissolução de sulfetos minerais, no sentido de prevenir sua adesão ou até mesmo sua formação.

A variação dos valores de E_{coup} e I_{coup} com o tempo de imersão dos CPEs-calcopirita, correspondente à segunda série de medidas, está ilustrada na Figura 20. Observa-se nessa figura que após a adição de Cl^- , E_{coup} diminuiu e ficou constante ao redor de 315 mV, ao passo que a adição de bactéria fez com que esse valor aumentasse e se estabilizasse em torno de 355 mV. Já os valores de I_{coup} não apresentaram variação bem definida após a adição de íons Cl^- anteriormente às células bacterianas.

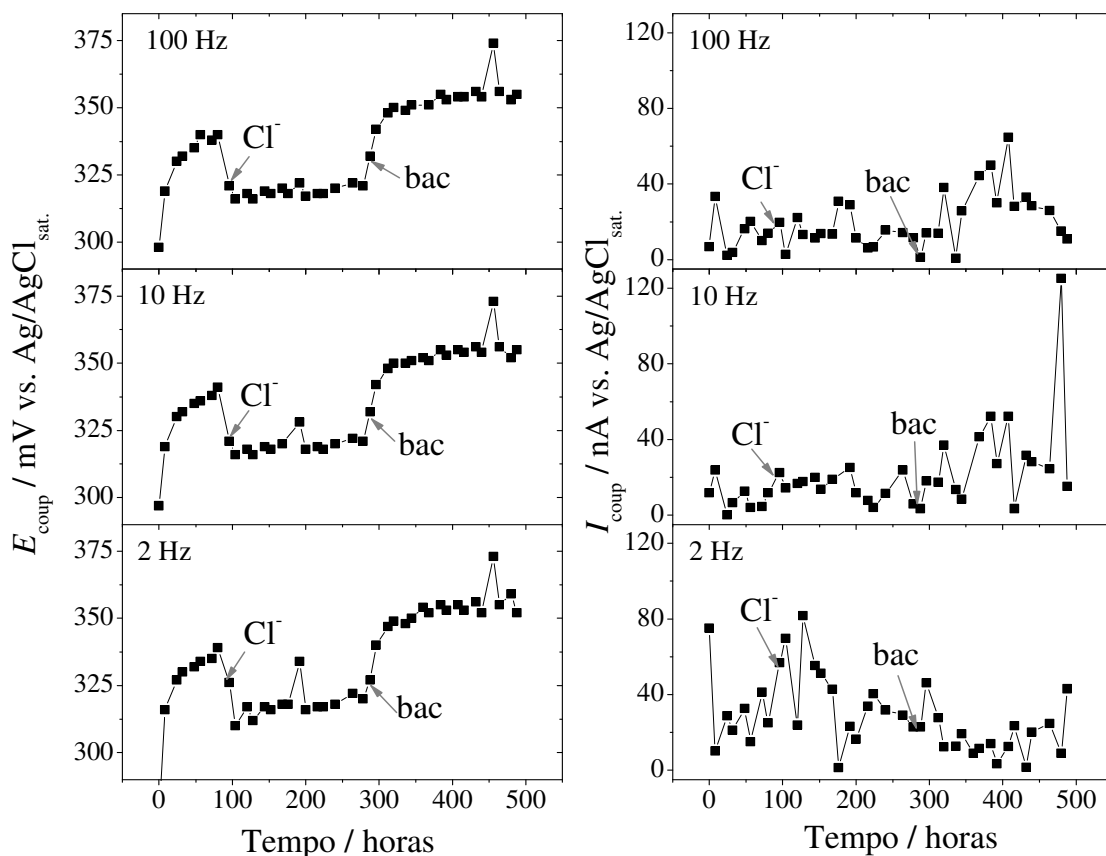


Figura 20: Variação dos valores de E_{coup} e I_{coup} com o tempo de imersão do CPE-calcopirita correspondentes à segunda série de experimentos ($f = 100, 10$ e 2 Hz). As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

Comparando-se os perfis de E_{coup} e I_{coup} das duas séries de medidas (Figuras 16 e 17) observa-se que a adição da bactéria ocasionou um aumento no potencial enquanto a adição de íons Cl^- provocou sua diminuição. Tanto na primeira (Figura 19) quanto na segunda série (Figura 20) os valores de E_{coup} foram similares para todas as frequências de aquisição. Por outro lado, I_{coup} comportou-se de maneira diferente dependendo da frequência de aquisição dos dados de ENA.

A técnica de ENA mostrou-se bastante adequada para registrar as variações nos dados decorrentes das alterações no sistema durante o monitoramento. Pelos perfis de E_{coup} observou-se que existe uma tendência natural ao retorno do estado estacionário, após a perturbação causada pelas adições de Cl^- ou bactéria.

As variações de E_{coup} e I_{coup} foram úteis para descrever as mudanças ocorridas no meio oxidante. No entanto, somente esses parâmetros não são suficientes para dar informações a respeito da taxa de oxidação da calcopirita.

Dentre as variáveis estatísticas que podem ser calculadas a partir de um dado registro dos ruídos de potencial e de corrente, R_n constitui um parâmetro significativo, com informação quantitativa para se avaliar a taxa de dissolução da calcopirita. Neste caso, não faz sentido a comparação com os valores absolutos de $|Z|_{f=1\text{Hz}}$, extraídos das medidas de EIS, pelos mesmos terem sido obtidos a diferentes frequências de amostragem (R_n a 2, 10 e 100 e $|Z|$ a 1 Hz).

Na Figura 21 está ilustrado o comportamento de R_n com o tempo de imersão do CPE-calcopirita, para os registros de ruídos eletroquímicos coletados no domínio do tempo com frequência de aquisição de 2 Hz, correspondentes às duas séries de medidas.

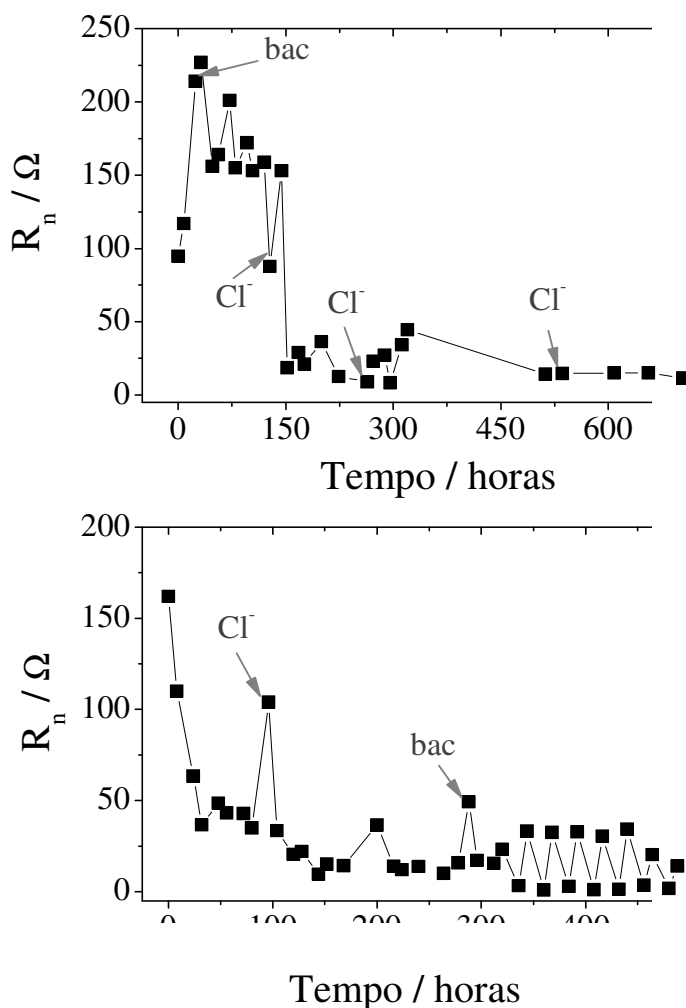


Figura 21: Perfil de R_n (obtido com $f = 2$ Hz) com o tempo de monitoramento da célula contendo íons Cl^- , correspondente à primeira (A) e segunda (B) séries de experimentos. As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

A análise conjunta das duas séries de medidas, com respeito à variação de R_n com o tempo, mostra um comportamento descendente comum para as duas curvas.

Além disso, também se pode observar que a adição de bactéria, anterior à adição de íons Cl^- , proporcionou os maiores valores de resistência, devido, provavelmente, à adesão bacteriana à superfície do CPE-calcopirita. Nenhum estudo verificou a adesão da espécie *A. ferrooxidans* na superfície de eletrodos de pasta de carbono modificados com calcopirita; no entanto, Bevilaqua (2003) observou, por microscopia de força atômica, sua adesão na superfície da calcopirita maciça e de HOPGrafite logo nos primeiros minutos de imersão.

A adesão pode ocorrer porque as moléculas de água não se adsorvem fortemente à superfície da calcopirita e da grafita, devido ao caráter hidrofóbico desses materiais, permitindo a fácil aproximação e adesão das células bacterianas. Segundo Fletcher (1996) a interação hidrofóbica pode atuar como um mecanismo primário da adesão, que pode ser explicada pelas interações de van Der Waals existentes entre a superfície do material e a parte externa da célula. Neste contexto, os elevados valores de R_n observados após a adição de células bacterianas (Figura 8A) provavelmente não estão relacionados à passivação da superfície do CPE-calcopirita, pois o processo de biolixiviação pode estar ocorrendo na interface eletrodo-bactéria ao invés de na interface eletrodo-solução.

Após a primeira adição de íons Cl^- os valores de R_n apresentaram uma queda expressiva, o que pode estar relacionado com o aumento da taxa de dissolução da calcopirita, verificado por uma série de autores (LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a e b; PUVVADA; MURTHY, 2000).

Lu, Jeffrey e Lawson (2000a) verificaram que a variação da concentração de íons Cl^- na solução lixiviante não muda a porcentagem de recuperação de cobre. Isto poderia explicar o fato de não se observar variações significativas nos valores de R_n após a segunda adição de íons Cl^- , como ilustrado na Figura 8A. Dessa forma, pequenas quantidades de íons Cl^- em solução podem ser suficientes para manter um ambiente agressivo que acelera a dissolução do mineral calcopirita. Após a terceira adição de íons Cl^- os valores de R_n também não sofreram modificações consideráveis.

Observa-se na Figura 21B que a adição dos íons Cl^- antes das células bacterianas provocou uma diminuição nos valores de R_n , menos proeminente quando comparada à primeira série. Entretanto, a adição de bactéria após 288 h no meio contendo íons Cl^- parece não ter influenciado significativamente nos valores de resistência, que permaneceram

aproximadamente constantes desde a centésima hora de imersão. Este resultado indica que os íons Cl^- podem ter impedido a adesão ou alterado o mecanismo de atividade bacteriana.

Os valores obtidos de R_n , com as aquisições dos dados de ENA realizadas à $f = 10$ e à $f = 100$ Hz também foram calculados e estão ilustrados nas Figuras 22 (primeira série de medidas) e Figura 23 (segunda série).

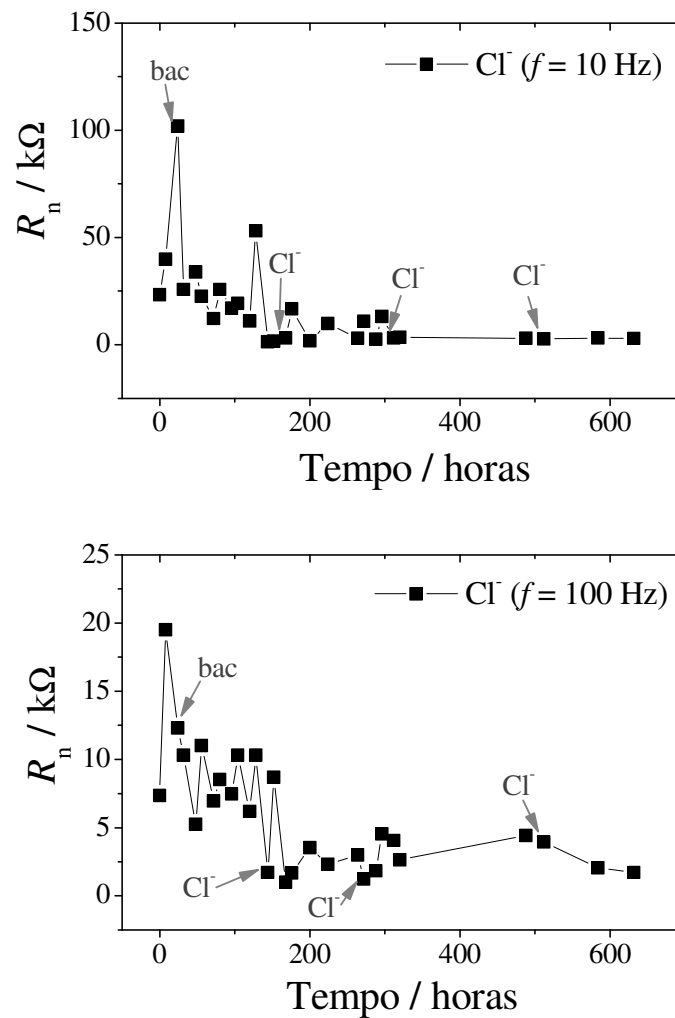


Figura 22: Perfil de R_n (obtidos com $f = 10$ e 100 Hz) com o tempo de monitoramento da célula contendo íons Cl^- , correspondente à primeira série de experimentos. As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

Pode ser observado (Figuras 22 e 23) que a magnitude dos valores de R_n altera-se significativamente conforme a frequência de aquisição dos ruídos varia. Os valores de R_n obtidos com frequência de aquisição de 100 Hz são, em geral, menores do que aqueles

obtidos a 10 Hz. Esta diferença pode estar relacionada com o registro de fenômenos específicos mais (100 Hz) ou menos (10 Hz) localizados.

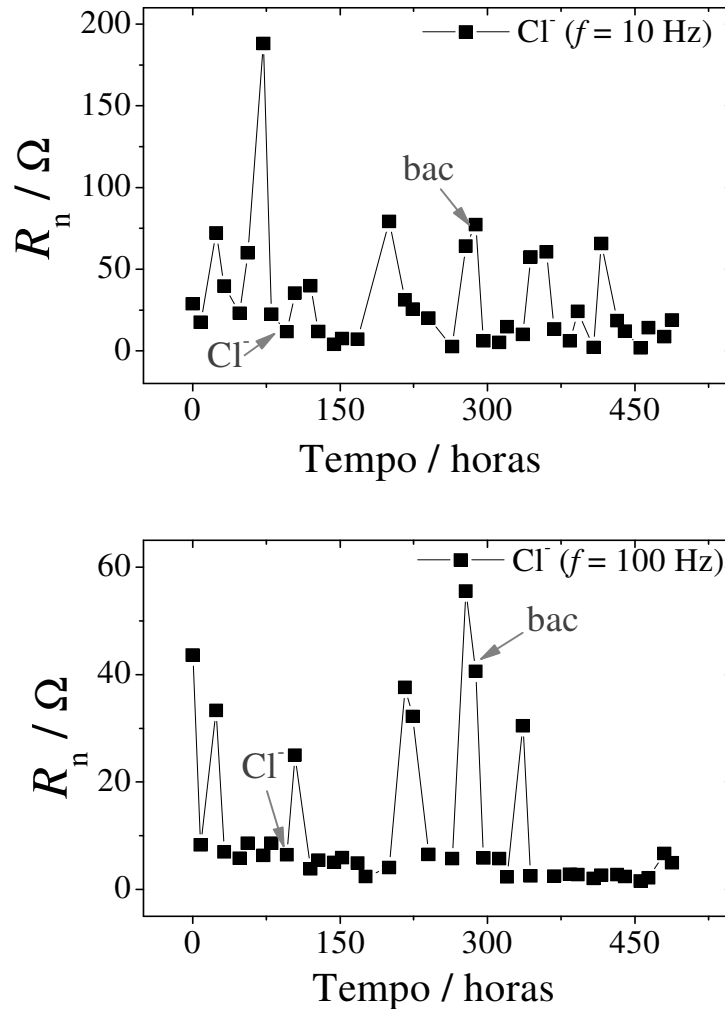


Figura 23: Perfil de R_n (obtidos com $f = 10$ e 100 Hz) com o tempo de monitoramento da célula contendo íons Cl^- , correspondente à segunda série de experimentos. As setas indicam o momento da adição da suspensão bacteriana e dos íons Cl^- .

Com relação à influência dos agentes adicionados durante os ensaios (Cl^- e bactéria), observou-se na primeira série de medidas uma diminuição de R_n no decorrer do experimento e da adição de bactéria e íons Cl^- . Já na segunda série de medidas os valores de R_n obtidos a 10 e 100 Hz parecem oscilar aleatoriamente (Figura 23).

Uma proposta alternativa para investigação do tipo de processo corrosivo, empregando-se ENA, foi utilizada por Park e Kwon (2005) e consiste na análise de gráficos

de admitância. Este método foi aplicado ao estudo do sistema CPE-calcopirita em meio ácido com o propósito de investigar a influência de adições sucessivas de íons Cl^- e células de *A. ferrooxidans*-LR na dissolução oxidativa da calcopirita.

A admitância, A_c , é definida pela seguinte equação (PARK e KWON, 2005):

$$A_c = \frac{\sigma I}{\sigma E} \quad [23]$$

A extração do ruído real a partir dos dados experimentais constituiu o primeiro passo dessa análise. Quando a informação estatística é extraída dos registros das flutuações no domínio do tempo em quantidades elétricas (corrente ou potencial), confronta-se, freqüentemente, com o problema de que o sinal amostrado às vezes não aparece como sendo estacionário, ao menos dentro do intervalo de tempo de medidas. Geralmente, a este tipo de sinal diz-se “tendencioso” (*drifting*).

A remoção da tendência dos dados foi realizada utilizando-se o método de ajuste polinomial antes de calcular os valores de A_c . A variação da admitância está ilustrada nas Figuras 24 e 25 para a primeira e segunda série de medidas, respectivamente.

A análise dos dados de admitância, obtidos a partir dos dados de ruídos eletroquímicos, pode simplesmente ser realizada no domínio do tempo, pela investigação do tamanho, da forma e da distribuição dos transientes observados durante o processo estudado.

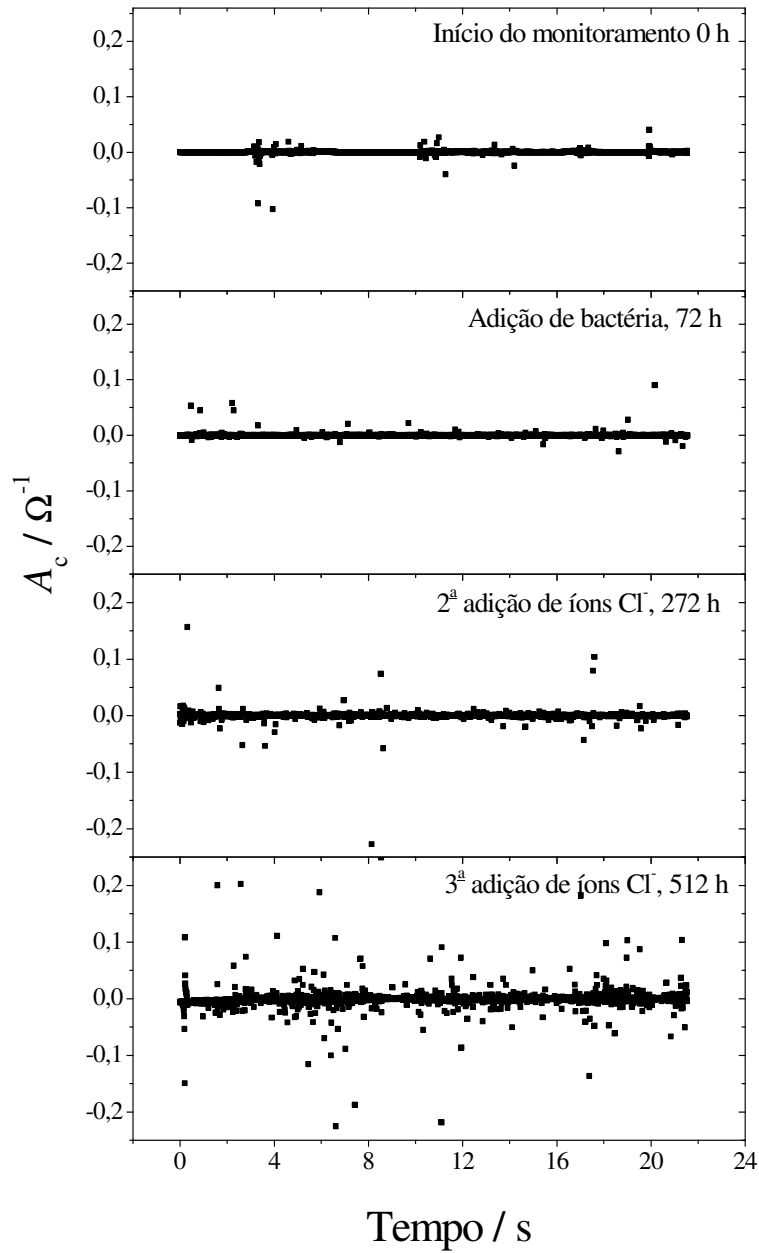


Figura 24: Espectro de A_c correspondentes à primeira série de medidas depois de 0, 72, 272 e 512 horas de imersão dos eletrodos de trabalho na célula eletroquímica.

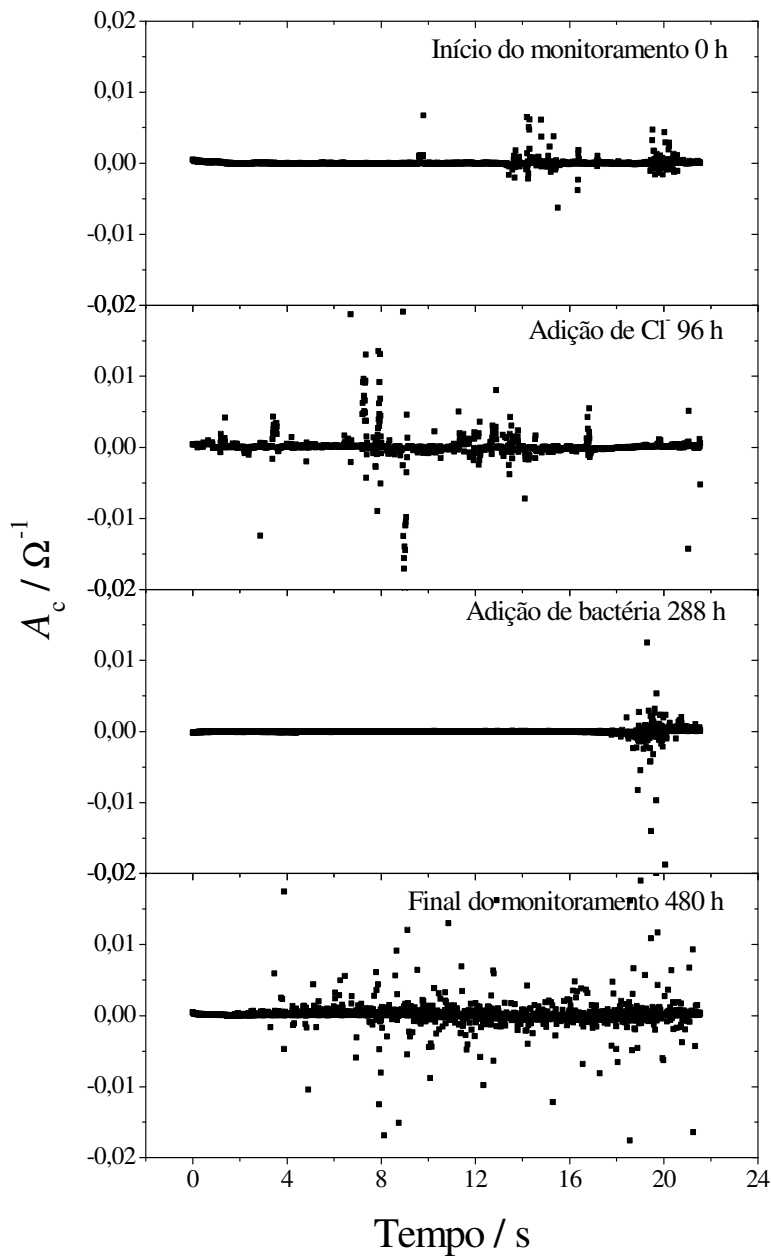


Figura 25: Espectro de A_c correspondentes à segunda série de medidas depois de 0, 96, 288 e 480 horas de imersão dos eletrodos de trabalho na célula eletroquímica.

Na análise dos gráficos da Figura 24, que ilustra os registros efetuados durante 512 horas de monitoramento (primeira série de ensaios), observou-se:

- Comportamento de estado passivo estável caracterizado por um gráfico de A_c com valores que oscilam em torno do zero e com pequena dispersão de pontos. Este comportamento mostra que mesmo após a adição de bactéria, o sistema não sofre

rapidamente uma transição entre os limites passivo e ativo. Ao contrário, a adesão de células bacterianas na superfície dos grãos de calcopirita que compõem a pasta no CPE contribui na manutenção do comportamento passivo do eletrodo, por atuar como uma barreira física, limitando a taxa de dissolução do sulfeto no meio eletrolítico.

- Um comportamento de estado passivo com pequenas flutuações: este comportamento foi observado após a segunda adição de íons Cl^- , a 272 h de imersão, quando o número de dispersões nos gráficos de admitância aumentou significativamente.

- Um comportamento de estado ativo: com dispersões maiores em número e amplitude, este comportamento foi observado a 512 h, quando foi realizada a 3ª adição de íons Cl^- ao sistema.

Com respeito aos gráficos de admitância correspondentes à segunda série de medidas (Figura 25) observou-se um aumento do grau de dispersão de pontos ao longo do período de monitoramento, como na primeira série, indicando que a ordem de adição de Cl^- ou de bactéria, parece não afetar esta transição, sofrida pelo sistema, de um limite passivo-ativo. Entretanto, as maiores dispersões só são observadas nos estágios finais do período de monitoramento. O gráfico correspondente a 288 h de imersão, correspondente à adição de células bacterianas, apresentou o menor grau de dispersões, confirmando que nos estágios iniciais da interação com a calcopirita são observadas, novamente, características de barreira física limitando a taxa de oxidação desde sulfeto mineral.

V.1.3. Análise comparativa: EIS e ENA

A partir dos valores calculados com base nos ajustes dos espectros de EIS, por meio da proposição de modelos de circuitos elétricos equivalentes, foi traçado um perfil da resistência de polarização, R_p , com o tempo de monitoramento do sistema investigado. No gráfico da Figura 26 este perfil também é comparado com aqueles apresentados pelos valores de R_n , correspondentes a frequência de aquisição de dados de 2 Hz, uma vez que ambos os parâmetros denotam uma estimativa da taxa de dissolução da calcopirita nos meios empregados.

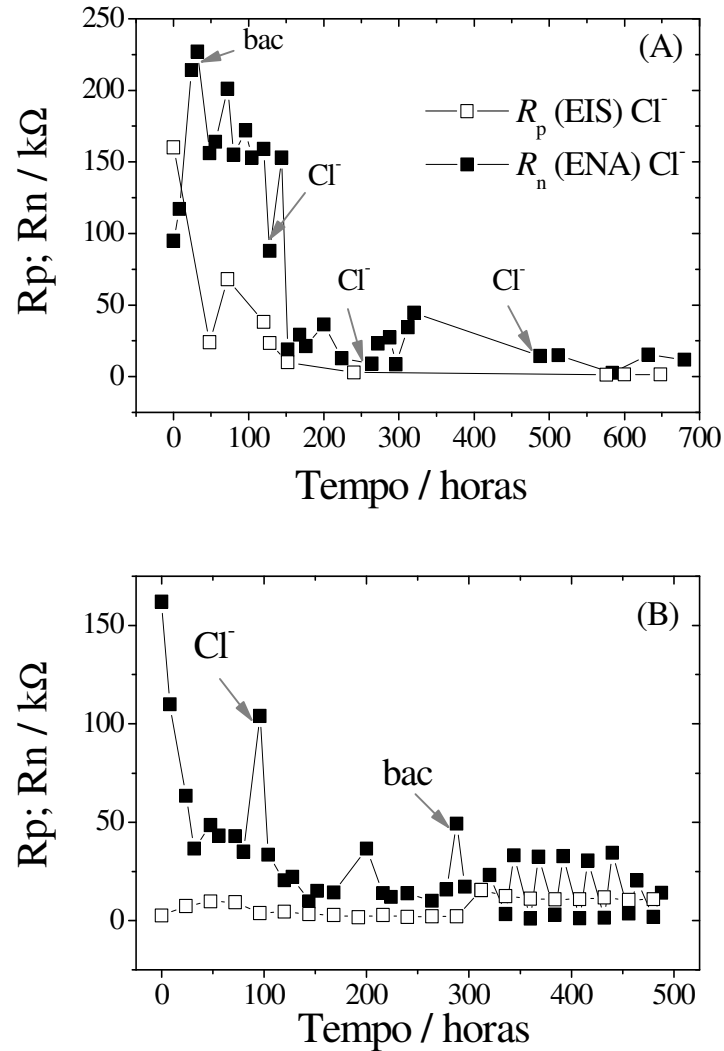


Figura 26: Comparação entre os perfis obtidos para R_n (ENA, $f = 2$ Hz) e R_p (EIS) com o tempo de monitoramento do experimento contendo íons Cl^- , em que o íon foi adicionado antes (A) e depois (B) da adição de células bacterianas.

Segundo Mansfeld e colaboradores (2001) boa concordância entre os valores de R_n e R_p pode ser obtida para dados coletados durante longos períodos para sistemas com elevadas taxas de corrosão, em casos onde o módulo de impedância está dentro do limite de corrente dc. Boa concordância entre os valores de R_n e R_p foi observada, como ilustrado na Figura 26, principalmente na primeira série de medidas e após 150 horas de monitoramento para ambas as células.

V.2. Ensaio de Biolixiviação em frasco

Na segunda etapa do trabalho foi realizado o estudo da influência da adição de íons Cl^- e da espécie *A. ferrooxidans*, linhagem LR, no processo de dissolução da calcopirita através de ensaios de lixiviação em frascos. O objetivo dessa etapa foi complementar o estudo eletroquímico realizado sob o ponto de vista da dissolução da calcopirita e a análise dos resíduos sólidos.

Os ensaios foram monitorados por amostragem periódica da fração líquida seguida de medidas de pH e concentrações de Cu e Fe totais, além de Fe^{2+} e indiretamente Fe^{3+} . No final dos experimentos, os resíduos sólidos obtidos foram analisados por SEM, EDS e difração de Raios X.

V.2.1. Análise da fase líquida

Da mesma forma como nos ensaios eletroquímicos, os íons Cl^- e a espécie *A. ferrooxidans* foram adicionados aos frascos de lixiviação no decorrer do experimento em duas diferentes ordens de adição que designaram duas séries de ensaios. Na primeira as células bacterianas foram adicionadas após 12 dias de ensaio e após 48 dias adicionou-se Cl^- . Na segunda série inverteu-se a ordem de adição; íons Cl^- foram adicionados aos 12 dias de ensaio e bactéria após 48 dias. Os íons Cl^- foram adicionados de maneira que sua concentração final no frasco fosse de 200 mmol L^{-1} . Antes da primeira adição os frascos continham solução A do meio T&K além de calcopirita (densidade de polpa = 2,5%).

Um dos principais aspectos a serem considerados nos estudos que envolvem a utilização de agentes aceleradores dos processos de biolixiviação dos sulfetos minerais é o possível efeito inibitório desta adição na atividade bacteriana. Uma medida adequada a ser tomada nesse tipo de ensaio é a adaptação das células bacterianas à condição escolhida. Para tanto foi realizada a adaptação da espécie *A. ferrooxidans*, linhagem LR, a 200 mmol L^{-1} .

Nas Figuras 27, 28, 29 e 30 estão ilustradas as variações de pH, $[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{3+}]$ e $[\text{Cu}_{\text{total}}]$, respectivamente, com o tempo de ensaio das duas séries de medidas. As condições controle também estão representadas.

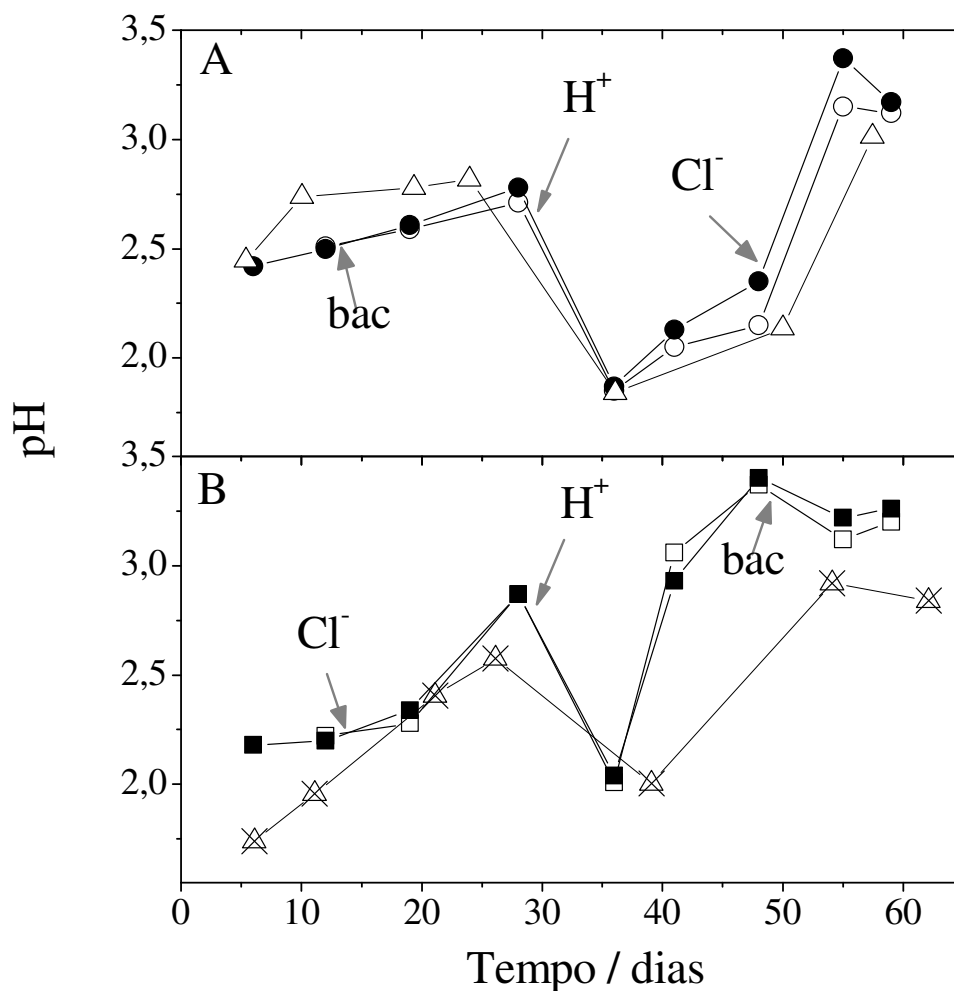


Figura 27: Variação de pH nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (:) 200 mmol L⁻¹ de íons Cl⁻. As setas indicam o momento das adições.

Observa-se que os valores de pH (Figura 27) apresentaram o mesmo comportamento para as células bacterianas adaptadas ou não adaptadas.

O pH dos ensaios tende a aumentar com o tempo como consequência do consumo de H⁺ no processo de lixiviação do mineral. Essa tendência foi observada em todos os ensaios realizados incluindo os controles. Isso indica que as reações que governam a oxidação da calcopirita, de uma maneira geral, envolvem o consumo de ácido. O aumento do pH pode levar à precipitação de produtos sólidos (BEVILAQUA *et al.*, 2002), o que justificou um ajuste depois de 26 dias de ensaio em todos os frascos.

Na primeira série de ensaios, após a adição de células bacterianas (previamente à adição de íon Cl^-) observou-se um aumento de pH pouco significativo (Figura 27A). Após a correção ácida houve um aumento significativo nos valores de pH para todas as condições testadas, inclusive na segunda série de medidas.

A adição de íons Cl^- após 12 dias, na segunda série de medidas, provocou um aumento mais acentuado nos valores de pH (Figura 27B) do que após a adição de bactérias na primeira série. A adição de bactérias após 48 dias não provocou alterações significativas nos valores de pH.

As concentrações de Fe^{2+} , obtidas em todas as condições testadas nas duas séries de medidas, foram pouco significativas. O máximo valor detectado foi de $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 28).

Na primeira série de ensaios, a adição de *A. ferrooxidans*-LR (12 dias) ocasionou um aumento significativo e progressivo nas concentrações de Fe^{3+} (Figura 29) e, como consequência, a extração de Cu_{total} (Figura 30) apresentou o mesmo comportamento. Após adição de íons Cl^- , no entanto, observou-se um pequeno aumento seguido da diminuição da concentração de Fe^{3+} , além de um aumento menos proeminente na concentração de Cu_{total} .

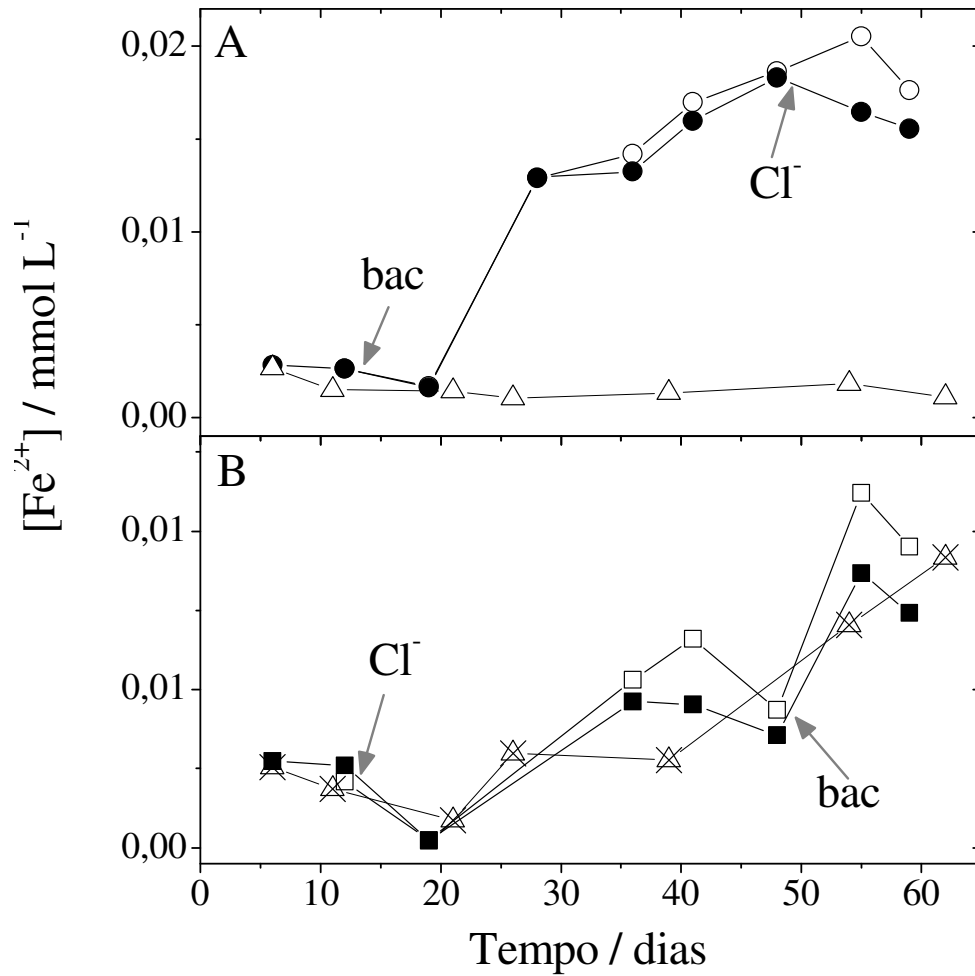


Figura 28: Variação da concentração de Fe^{2+} nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (:) 200 $mmol L^{-1}$ de íons Cl^- . As setas indicam o momento das adições.

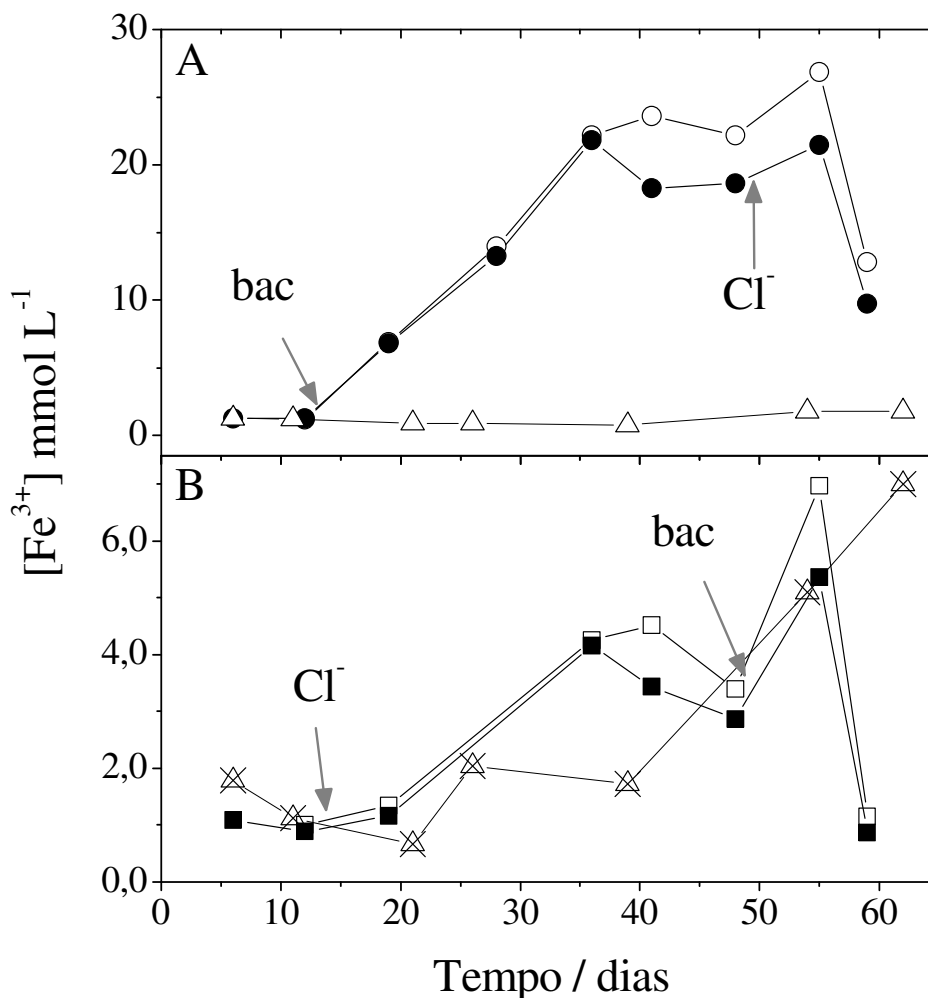


Figura 29: Variação da concentração de Fe^{3+} nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (2) 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- . As setas indicam o momento das adições.

Na segunda série de medidas, após a adição de íons Cl^- (12 dias) foi observado um aumento progressivo até 38 dias de ensaio, seguido da diminuição das concentrações de Fe^{3+} (Figura 29). A adição de bactéria adaptada (48 dias) ocasionou uma nova elevação nesses valores. É importante ressaltar a diferença nos valores de concentração de Fe^{3+} para essas duas séries de ensaio. A atmosfera oxidante, determinada pela presença da bactéria na primeira série de medidas, determinou valores cerca de 4 vezes maior em relação à concentração de Fe^{3+} em solução.

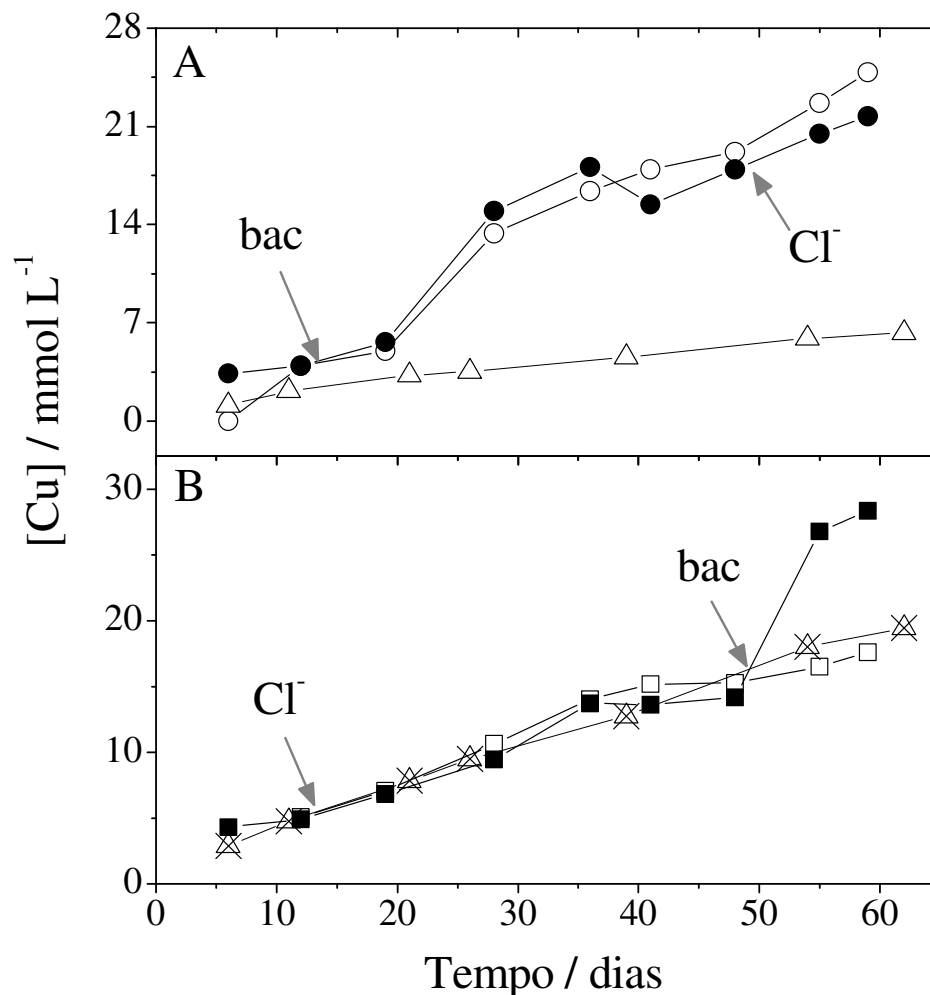


Figura 30: Variação da concentração de Cu nos ensaios de lixiviação da calcopirita da primeira (A) e segunda (B) séries utilizando-se bactéria adaptada (símbolos fechados) e não adaptada (símbolos abertos). Além de ensaios controles que continham solução A do meio T&K sem (8) e com (:) 200 mmol L⁻¹ de íons Cl⁻. As setas indicam o momento das adições.

A extração de Cu_{total}, na segunda série de medidas (Figura 30B), não apresentou diferenças entre nenhuma das condições testadas até a adição de bactérias (após 48 dias de ensaio), quando a extração de cobre no ensaio com células adaptadas se elevou significativamente. Nesse caso, o sistema permaneceu influenciado pela presença dos íons Cl⁻, não respondendo à adição de bactéria não adaptada, o que indicou ausência de atividade oxidativa do *A. ferrooxidans*-LR na presença de íons Cl⁻ sem adaptação prévia. Esse resultado reforça a idéia da necessidade da adaptação dos microorganismos às condições específicas presentes nos meios de biolixiviação como maneira de otimização do processo.

Apesar das diferenças entre as duas séries de medidas, a extração final de cobre alcançou valores comparáveis em ambos os casos.

As diminuições da concentração de Fe^{3+} (Figura 29), observadas no decorrer dos experimentos, foram resultado da concomitante elevação nos valores de pH (Figura 27), que possibilitam e favorecem a formação de precipitados, como as jarositas.

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, as inoculações com *A. ferrooxidans*-LR foram realizadas no início do ensaio e, de modo geral, a extração de Cu alcança valores máximos em aproximadamente duas semanas. Comparando-se os resultados do presente estudo com esses trabalhos anteriores de nosso grupo podemos inferir que a adição de células bacterianas, no decorrer do processo de biolixiviação da calcopirita, pode apresentar melhores resultados na extração de cobre. Isso está relacionado, provavelmente, a uma provável perda de atividade bacteriana no decorrer do ensaio que seria recuperada após reinoculação.

V.2.2. Análise da fase sólida

Nos processos de biolixiviação, a dissolução dos sulfetos minerais pode gerar fases sólidas secundárias como enxofre elementar, jarositas, oxihidróxidos de ferro e outros sulfatos, cujas características dependem de fatores como pH, concentração de Fe ou sulfato, temperatura, cátions presentes no meio, tipos de microorganismos e suas atividades. (AGUIRRE, 2006, BARON; PALMER, 1996). A refratariedade da calcopirita aos processos de lixiviação tanto química como bioquímica é normalmente atribuída à deposição de produtos sólidos sobre o mineral e conseqüente passivação de sua superfície (GÓMEZ *et al.*, 1996; HOLLIDAY; RICHMOND, 1990). Nesse contexto, o estudo de biolixiviação foi complementado com a caracterização dos resíduos sólidos, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (SEM e SEM-EDS) e difração de Raios X.

Na Figura 31 estão ilustradas as análises de microscopia eletrônica de varredura dos resíduos sólidos finais dos ensaios de biolixiviação em frasco.

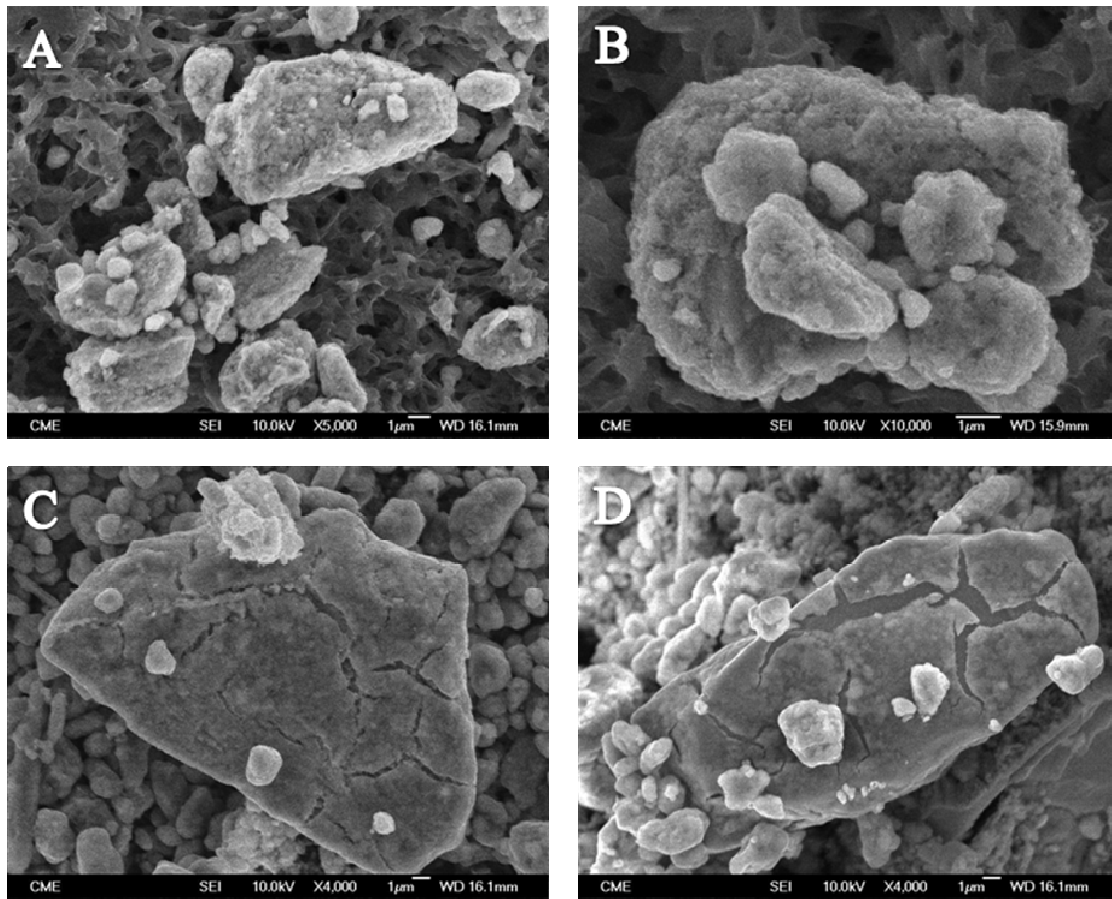


Figura 31: Microscopias SEM dos resíduos sólidos dos ensaios de biolixiviação em frasco. A (inóculo não adaptado) e B (inóculo adaptado) correspondem aos ensaios em que as células bacterianas foram adicionadas primeiro. C (inóculo não adaptado) e D (inóculo adaptado) correspondem aos ensaios em que o íon Cl^- foi adicionado primeiro.

Observa-se em todas as imagens de SEM que uma fase sólida parece envolver as partículas de calcopirita. Isso fica mais evidente nas imagens C e D em que a camada aparece quebrada, provavelmente devido ao tratamento do ponto crítico. Em uma análise linear SEM-EDS (Figura 32) observa-se que essa camada é rica nos elementos fósforo e oxigênio. Isso é confirmado pela ausência de tais elementos na fase inferior à película que corresponde, provavelmente, a uma partícula de calcopirita.

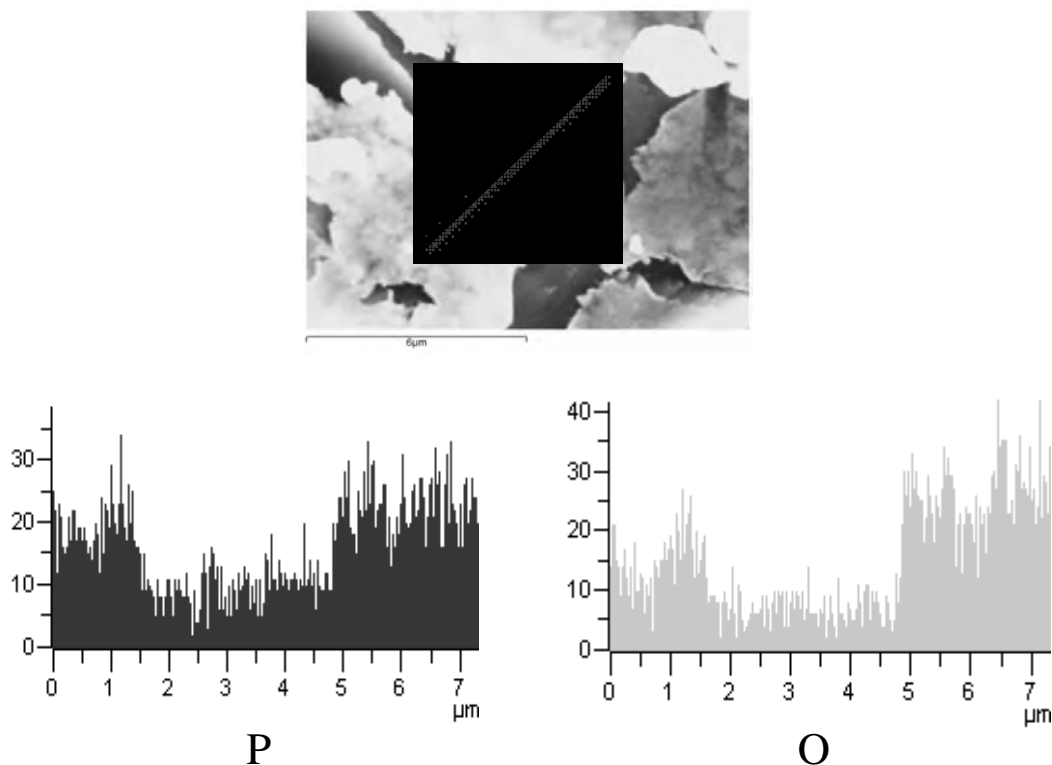


Figura 32: Análise linear SEM-EDS para os elementos fósforo e oxigênio nos resíduos sólidos dos ensaios em que células bacterianas adaptadas foram adicionadas na ausência de íons Cl^- (primeira série). A linha sobre a qual foi realizada a análise EDS está ilustrada na imagem.

As análises microscópicas pontuais SEM-EDS permitiram identificar as porcentagens atômicas dos principais elementos presentes nos resíduos. Foram encontrados, além dos elementos presentes na amostra original (ver item IV.1), Cl e K provenientes do meio de cultura. Essas análises serviram de base para a caracterização dos difratogramas dos resíduos sólidos que serão discutidos a seguir.

A microscopia utilizando-se SEM-EDS permitiu a análise da composição dos resíduos da fase sólida através de análises pontuais e em linha. Grande parte das análises elementares detectaram principalmente Cu, Fe e S nas proporções atômicas de aproximadamente 1:1:2 o que é característico da fase de calcopirita (Figura 33).

Em alguns casos, pode ser estabelecida a associação entre cálcio e fósforo pelo aparecimento de picos intensos desses dois elementos (Figura 34). Na Figura 34 também se observa a presença do elemento cloro.

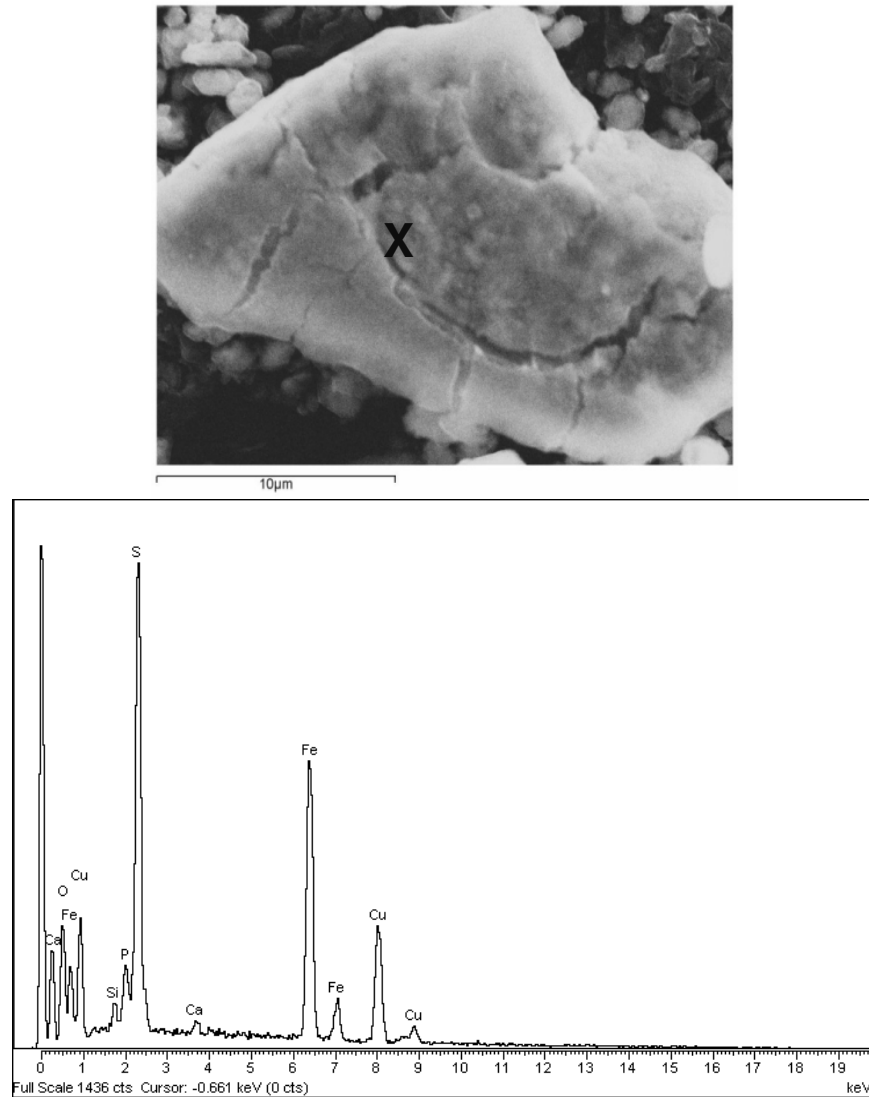


Figura 33: Análise microscópica elemental pontual SEM-EDS do resíduo sólido da segunda série de ensaios realizada com células bacterianas não adaptadas. O ponto em que foi realizada a análise está marcado (x) na imagem.

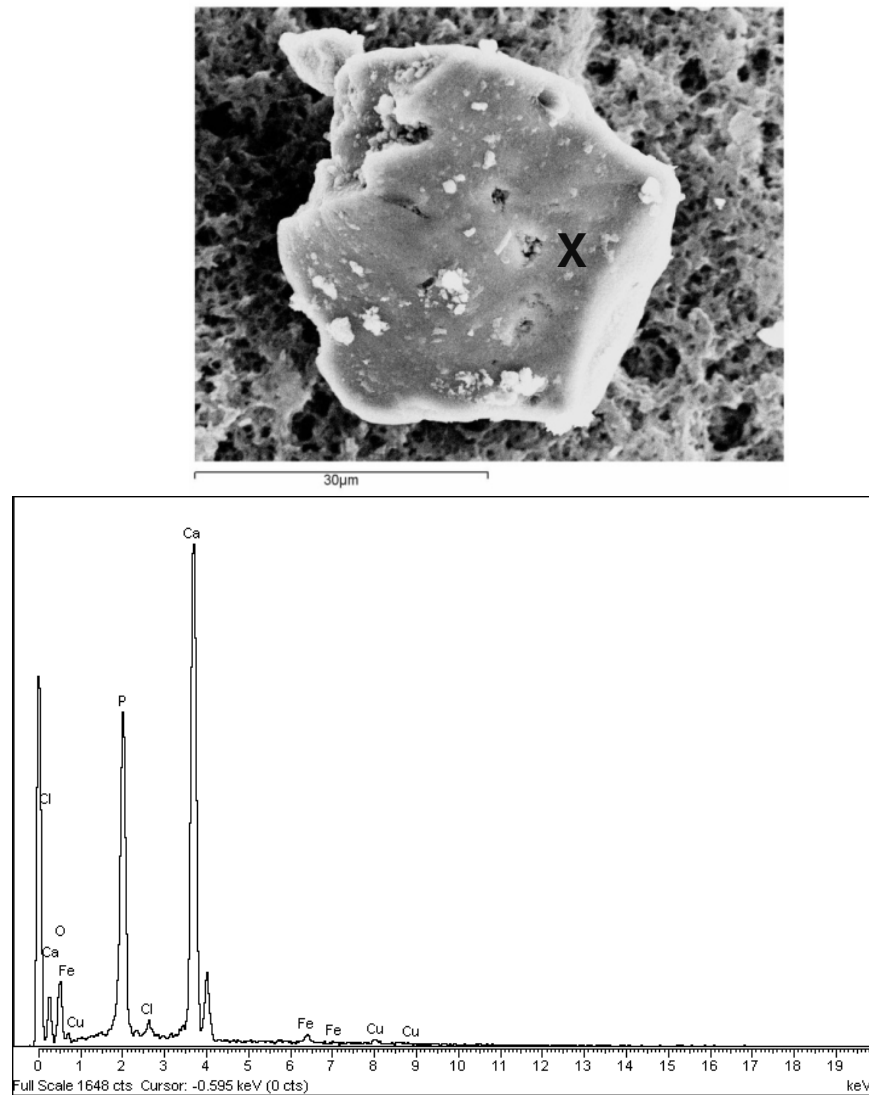


Figura 34: Análise microscópica elemental pontual SEM-EDS do resíduo sólido da primeira série de ensaios realizada com células bacterianas adaptadas. O ponto em que foi realizada a análise está marcado (x) na imagem.

A seguir estão ilustrados os difratogramas de Raios X dos resíduos dos ensaios de biolixiviação em frascos correspondentes à primeira (Figura 35) e segunda (Figura 36) séries de medidas.

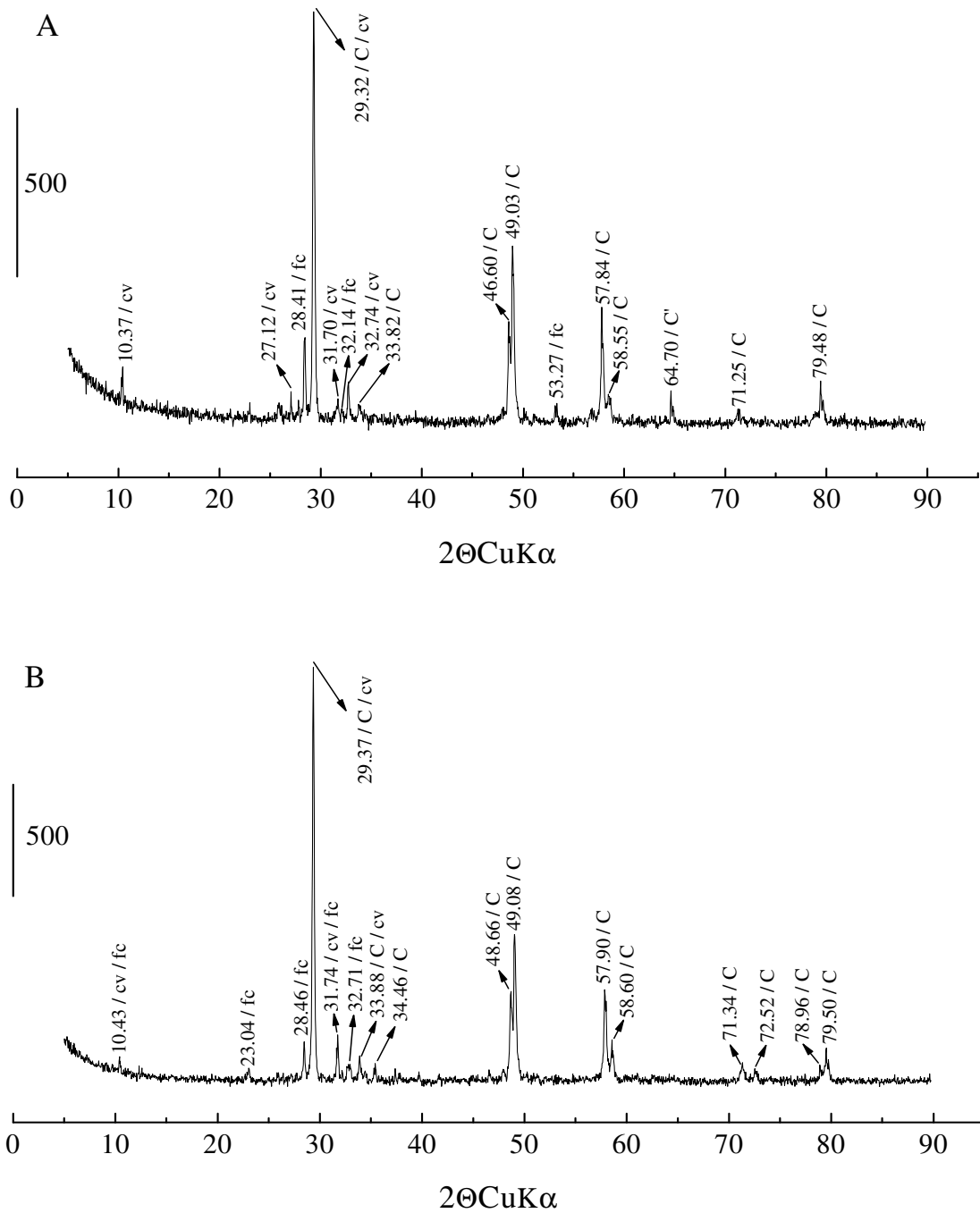


Figura 35: Difratomogramas de Raios X dos resíduos sólidos de biolixiviação dos experimentos em que as células bacterianas não adaptadas (A) e adaptadas (B) foram adicionadas anteriormente aos íons Cl^- . Símbolos: C – calcopirita; cv – covelita; fc – compostos fosfatados de calcio.

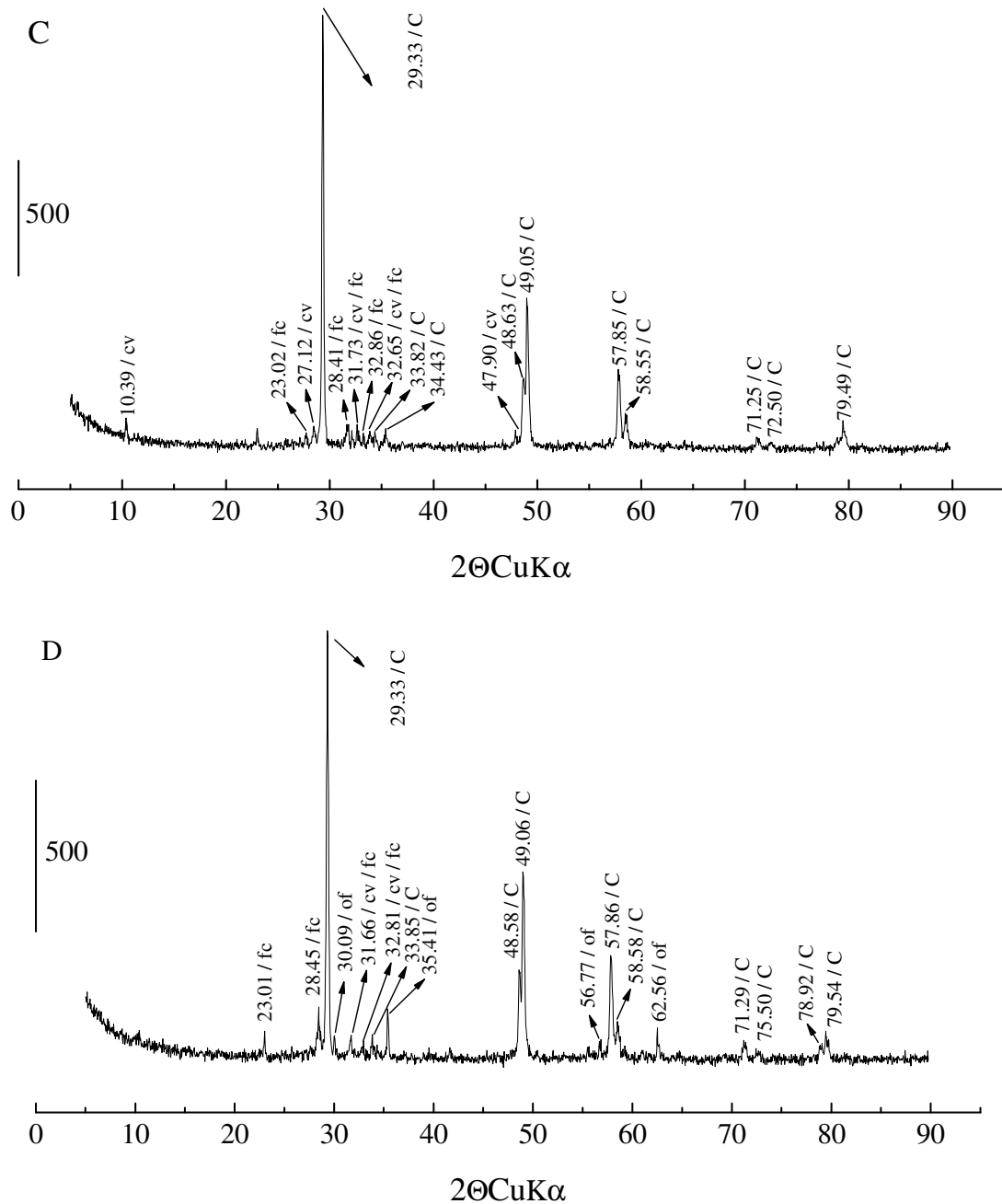


Figura 36: Difratoformas de Raios X dos resíduos sólidos de biolixiviação dos experimentos em que os íons Cl^- foram adicionados anteriormente às células bacterianas não adaptadas (C) e adaptadas (D). Símbolos: C – calcopirita; cv – covelita; fc – compostos fosfatados de cálcio; of – óxido de ferro, Fe_3O_4 .

Nas análises dos difratogramas de Raios X observou-se, de maneira geral, a formação de covelita (CuS) nos tratamentos inoculados, nas duas séries de medidas. Alguns autores, de fato, defendem que a oxidação da calcopirita ocorre via formação de covelita segundo a

reação 9, seção II.4 (BIEGLER; HORNE, 1985; HOLLIDAY; RICHMOND, 1990; PARKER; PAUL; POWER, 1981):

Compostos fosfatados de cálcio do tipo $\text{Ca}_5((\text{PO}_4)_3\text{OH})$, $\text{Ca}_4\text{H}_2(\text{PO}_{10})_2$, ou $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ estão, igualmente, presentes em todos os difractogramas apresentados. Os compostos hidróxifosfatos também foram encontrados na amostra original (Figura 6, seção IV.1). Antonijevic e Bogdanovic (2004), contudo, observaram, por difração de Raios X, a associação do cálcio presente na amostra original com sulfato proveniente da lixiviação da calcopirita por H_2SO_4 . Os autores sugeriram, ainda, que devido ao grande volume de precipitado formado, podem ocorrer pequenas rupturas no grão de calcopirita, o que estabeleceria novas condições de lixiviação pela exposição da superfície do mineral.

Nos resíduos em que o inóculo adaptado foi adicionado posteriormente aos íons Cl^- observou-se a presença de óxido salino de ferro (Fe_3O_4) (Figura 36B). Apesar de não se pretender quantificar as substâncias sólidas formadas ou presentes nas amostras, observou-se que os picos correspondentes à calcopirita são menos intensos nos resíduos que na amostra original.

Uma das principais fases sólidas comumente formadas nos sistemas de biolixiviação são as jarositas, hidróxi-sulfatos de ferro, cuja fórmula geral é $\text{AFe}(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2$, em que A pode ser cátions como K^+ , Na^+ , H_3O^+ e NH_4^+ . O aumento de pH estabelece condições para a formação de jarositas; no entanto, essas fases sólidas não foram identificadas pelas análises de Raios X dos resíduos sólidos dos ensaios de lixiviação em frasco, em nenhuma das amostras. Como já discutido anteriormente, houve uma elevação significativa nos valores de pH ($\cong 3,5$), o que pode ter provocado a formação de “schwermannite”, que por ser relativamente pouco cristalina, não é detectada por análises de Raios X (AHONEN; TUOVINEN, 1994).

Materiais cristalinos podem ser detectados em níveis de 1-2% (m/m) por difração de Raios X. O mesmo poderia ocorrer com os precipitados de Cl^- associados ao cobre que também não foram encontrados nas análises de Raios X, e poderiam estar presentes em quantidades inferiores ao limite de detecção da técnica.

VI. CONCLUSÕES

Pela estimativa de R_p , calculada a partir dos ajustes aos espectros de impedância obtidos, e de R_n , calculada a partir da relação entre os desvios-padrão de ruídos de potencial e de corrente, foi possível acompanhar o aumento ocorrido na taxa de dissolução da calcopirita em meio ácido, em meio às adições de íons Cl^- ou de bactéria.

EIS e ENA foram, portanto, adequadas para este tipo de aplicação, pela sensibilidade oferecida por estes dois métodos para registrar as alterações ocorridas nos eletrodos, quando se aplica uma perturbação a um sistema que encontra uma tendência natural para alcançar um estado estacionário.

As células bacterianas adicionadas aos experimentos antes dos íons Cl^- provavelmente aderiram à superfície do CPE-calcopirita ocasionando aumento nos valores de resistência. Esse comportamento, no entanto, não foi observado quando os íons foram adicionados antes das células bacterianas. Esse resultado é um indicativo de que os íons Cl^- adicionados anteriormente impedem a adesão bacteriana à superfície da calcopirita.

O efeito originado pelas propriedades de barreira oferecidas pela adesão bacteriana também foi evidenciado pelos resultados de admitância.

O efeito da adição dos íons Cl^- e da espécie *A. ferrooxidans*-LR no aumento da extração de Cu da calcopirita foi confirmado pelos experimentos de biolixiviação em frascos.

A importância da adaptação dos microorganismos às condições do meio de lixiviação foi comprovada pela melhor eficiência em extração de Cu obtida pelas células adaptadas quando comparadas às não adaptadas.

A análise dos resíduos sólidos dos experimentos de lixiviação em frascos permitiu detectar a formação de covelita e compostos fosfatados de cálcio durante a dissolução da calcopirita nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS

- ACCIARI, H. A. **Estudo de corrosão das fases componentes de amálgamas dentários**. 2001. 92 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
- AGUIRRE, D. M. Z. **Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de esfalerita, proveniente del distrito minero de Marmato (Caldas)**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual da Colombia, Medellín, 2006.
- AHONEN, L.; TUOVINEN, O. H. Solid-phase alteration and iron transformation in column bioleaching of a complex sulfide ore. **Environmental Geochemistry of Sulfide Oxidation**, v. 550, p. 79-89, 1994.
- ANTONIJEVIC, M. M.; BOGDANOVIC, G. D. Investigation of the leaching of chalcopyrite ore in acidic solutions. **Hydrometallurgy**, v. 73, p. 245-256, 2004.
- BARON, D.; PALMER, C. D. Solubility of jarosite at 4-35 °C. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 60, p. 185-195, 1996.
- BENGRINE, A.; OHMURA, N.; BLAKE II, R. C. *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* adhere to different sites on the surface of pyrite? In: CIMINELLI, V. S. T.; GARCIA JUNIOR, O. (Ed.). **Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development, Part B: biosorption and bioremediation**. Amsterdam: Elsevier, 2001. Cap. 4, p. 573-581.
- BEVILAQUA, D. **Estudo da interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS_2) e Bornita (CuFeS_4)**. 2003. 113f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 587-592, 2002.
- BEVILAQUA, D.; ACCIARI, H. A.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Electrochemical techniques used to study bacterial-metal sulfides interactions in acidic environments. In: DONATI, E. R.; SAND, W. **Microbial processing of metal sulfides**. La Plata: Springer, 2007. Cap. 3, p. 59-76.
- BEVILAQUA, D.; PEREZ, I. D.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 79-84, 2004.
- BEVILAQUA, D.; PEREZ, I. D.; FUGIVARA, C. S.; SANZ, F.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Characterization of Bornite (Cu_5FeS_4) Electrodes in the presence of the bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 637-644, 2003.

- BIEGLER, T.; HORNE, M. D. The electrochemistry of surface oxidation of chalcopyrite. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 132, p. 1363-1369, 1985.
- BONORA, P. L.; DEFLORIAN, F.; FEDRIZZI, L. Electrochemical impedance spectroscopy as a tool for investigating underpaint corrosion. **Electrochimica Acta**, v. 41, p. 1073-1082, 1995.
- BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 233-239, 2001.
- CABRAL, T.; IGNATIADIS, I. Mechanistic study of the pyrite-solution interface during the oxidative bacterial dissolution of pyrite (FeS_2) by using electrochemical techniques. **International Journal of Mineral Processing**, v. 62, p. 41-64, 2001.
- CARNEIRO, M. F. C.; LEÃO, V. A. The role of sodium chloride on surface properties of chalcopyrite leached with ferric sulphate. **Hydrometallurgy**, v. 87, p. 73-82, 2007.
- CHOI, W. K.; TORMA, A. E.; OHLIN, R. W.; GHALI, E. Electrochemical aspects of zinc sulphide leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 33, p. 137-152, 1993.
- CIMINELLI, V. S. T. Hidrometalurgia. In: FERNANDES, R. C.; MATOS, G. M. M.; CASTILHOS, Z. C.; LUIZ, A. B. **Tendências tecnológicas brasil 2015** - geociências e tecnologia mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. Cap. 4, p. 157-174.
- CRUZ, R.; LÁZARO, I.; RODRÍGUEZ, J. M.; MONROY, M.; GONZÁLEZ, I. Surface characterization of arsenopyrite in acidic medium by triangular scan voltammetry on carbon paste electrode. **Hydrometallurgy**, v. 46, p. 303-319, 1997.
- DE, G. C.; OLIVER, D. J.; PESIC, B. M. Effect of heavy metals on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 44, p. 53-63, 1997.
- DE ROSA, R. L.; EARL, D. A.; BIEWAGEN, G. P. Statistical evaluation of EIS and ENM data collected for monitoring corrosion barrier properties of organic coatings on Al-2024-T3. **Corrosion Science**, v. 44, p. 1607-1620, 2002.
- DEVASIA, P.; NATARAJAN, K. A.; SATHYNARAYANA, D. N.; RAO, G. R. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4051-4055, 1993.
- EG&G PRINCEPTON APPLIED RESEARCH. **AC-1**: basics of AC impedance measurements. Manhattan, 1985. 92 p.
- ELSHERIEF, A. E. The influence of cathodic reduction, Fe^{2+} and Cu^{2+} ions on the electrochemical dissolution of chalcopyrite in acidic solution. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 215-223, 2002.
- FLETCHER, M. Bacterial attachment on aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: FLETCHER, M. (Ed.). **Molecular and ecological diversity of bacterial adhesion**. New York: Wiley-Liss, 1996. Cap. 1, p. 1-24.

GABRIELLI, C.; KEDDAM, M. Review of applications of impedance and noise analysis to uniform and localized corrosion. **Corrosion**, v. 48, p. 794-811, 1992.

GARCIA JUNIOR, O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 20, p. 1-6, 1991.

GARCIA JUNIOR, O. Microorganismos e metais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa, 1997. Cap. 1, p. 11-39.

GARCIA JUNIOR, O.; BEVILAQUA, D. Microorganismos, minerais e metais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa, 2008. Cap. 3, p. 50-81.

GÓMEZ, C.; FIQUEROA, M.; MUÑOZ, J.; BLÁZQUEZ, M. L.; BALLESTER, A. Electrochemistry of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 43, p. 331-334, 1996.

HOLLIDAY, R. I.; RICHMOND, W. R. An electrochemical study of the oxidation of chalcopyrite in acidic solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 288, p. 83-98, 1990.

HORTA, D. G.; ACCIARI, H. A.; BEVILAQUA, D.; ARENA, F. A.; FUGIVARA, C. S.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Influence of chalcopyrite (CuFeS_2) concentration in the electrochemical response of carbon paste electrode (CPE). In: HYDROCOPPER, 4 th., 2007, Viña del Mar. **Proceedings...** Viña del Mar: Universidad de Chile, 2007. Cap. 2, p. 101-106.

HORTA, D. G.; BEVILAQUA, D.; CAPELA, M. V.; ACCIARI, H. A.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Cyclic voltametry of carbon paste electrodes (CPE-chalcopyrite): evaluation of the repetitiveness. In: HYDROCOPPER, 3 th., 2005, Santiago. **Proceedings...** Santiago: Universidad de Chile, 2005, p. 373-380.

HIROYOSHI, N.; MIKI, H.; HIRAHIMA, T.; TSUNEDAWA, M. A model for ferrous-promoted chalcopyrite leaching. **Hydrometallurgy**, v. 57, p. 31-38, 2000.

KARAN, G.; NATARAJAN, K. A.; MODAK, J. M. Estimation of mineral-adhered biomass of *Thiobacillus ferrooxidans* by protein assay - some problems and remedies. **Hydrometallurgy**, v. 42, p. 169-175, 1996.

KOCH, D. F. A. Electrochemistry of sulfide minerals. In: BOCKRIS J. O. M. **Modern aspects of electrochemistry**. New York: Plenum Press, 1975. Cap. 4, p. 211-237.

LÁZARO, I.; MEDINA, N. M.; RODRÍGUES, I.; ARCE, E.; GONZÁLES, I. The use of carbon paste electrodes with non-conducting binder for the study of minerals: chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 38, p. 277-287, 1995.

LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, p. 103-120, 1994.

LEE, C. C.; MANSFELD, F. Analysis of electrochemical noise data for a passive system in the frequency domain. **Corrosion Science**, v. 40, p. 959-962, 1998.

LIDDICOAT, J.; DREISINGER, D. Chloride leaching of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 89, p. 323-331, 2007.

LOVELEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron anaerobic sediments. **Application Environmental Microbiology**, v. 51, p. 683-689, 1986.

LUNDSTROM, M.; AROMA, J.; FORSÉN, O.; HYVARINEN, O.; BARKER, M. H. Leaching of chalcopyrite in cupric chloride solution. **Hydrometallurgy**, v. 77, p. 89-95, 2005.

LU, Z. Y.; JEFFREY, M. I.; LAWSON, F. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hydrometallurgy**, v. 56, p. 189-202, 2000a.

LU, Z. Y.; JEFFREY, M. I.; LAWSON, F. An electrochemical study of the effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hydrometallurgy**, v. 56, p. 145-155, 2000b.

MANSFELD, F.; HAN, L. T.; LEE, C. C.; CHEN, C.; ZHANG, G.; XIAO, H. Analysis of electrochemical impedance and noise data for polymer coated metals. **Corrosion Science**, v. 39, p. 255-279, 1997.

MAURICE, D.; HAWK, J. A. Simultaneous autogenous milling and ferric chloride leaching of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 51, p. 371-377, 1999.

MIKHLIN, Y. L.; TOMASHEVICH, Y. V.; ASANOV, I. P.; OKOTRUB, A. V.; VARNEK, V. A.; VYALIKH D. V. Spectroscopic and electrochemical characterization of the surface layers of chalcopyrite (CuFeS_2) reacted in acidic solutions. **Applied Surface Science**, v. 225, p. 395-409, 2004.

NAVA, D.; GONZÁLES, I.; LEINEN, D.; RAMOS-BARRADO, J. R. Surface characterization by X-ray photoelectron spectroscopy and cyclic voltammetry of products formed during the potentiostatic reduction of chalcopyrite. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 4889-4899, 2008.

PARK, C.; KWON, H. Electrochemical noise analysis of localized corrosion of duplex stainless steel aged at 475 °C. **Materials Chemistry and Physics**, v. 91, p. 355-360, 2005.

PARKER, A. J.; PAUL, R. L.; POWER, G. P. Electrochemistry of the oxidative leaching of copper from chalcopyrite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 118, p. 305-316, 1981.

PUVVADA, G. V. K.; MURTHY, D. S. R. Selective precious metals leaching from a chalcopyrite concentrate using chloride/hypochlorite media. **Hydrometallurgy**, v. 58, p. 185-191, 2000.

RODRÍGUEZ, Y.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, F.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, J. A. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 37-46, 2003.

RODRÍGUEZ, Y.; BLÁZQUEZ, M. L.; BALLESTER, F.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, A. J. La biolixiviación al comienzo del siglo XXI. **Revista de Metalurgia**, v. 37, p. 616-627, 2001.

ROHWERDER, T.; GEHRKE, T.; SAND, W. Bioleaching review part A - Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 239-248, 2003.

SAMPSON, M. I.; PHILLIPS, C. V.; BLAKE II, R. C. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. **Minerals Engineering**, v. 13, p. 373-389, 2000.

SAND, W.; GEHRKE, T.; HALLMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry biofilm, and the indirect attack mechanism, a critical evaluation of bacterial leaching. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 961-996, 1995.

SHIERS, D. W.; BLIGHT, K. R.; RALPH, D. E. Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron oxidizing bacteria. **Hydrometallurgy**, v. 80, p. 75-82, 2005.

SCHIPPERS, A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: DONATI, E. R.; SAND, W. **Microbial processing of metal sulfides**. La Plata: Springer, 2007. Cap. 1, p. 3-33.

SKROBIAN, M.; HAVLIK, T.; UKASIK, M. The effect of NaCl concentration and particle size on chalcopyrite leaching in cupric chloride solution. **Hydrometallurgy**, v. 77, p. 109-114, 2005.

SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J. Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 311-345, 2001.

TAIT, W. S. **An introduction to electrochemical corrosion testing for practicing engineers and scientists**. Wisconsin: PairOdocs, 1994. 139p.

TEIXEIRA, C. M.; RAMIRES, I.; GARCIA JUNIOR, O.; GUASTALDI, A. C. Aplicação de técnicas eletroquímicas no estudo da dissolução oxidativa da covelita (CuS) por *Thiobacillus ferrooxidans*. **Química Nova**, v. 25, p. 20-26, 2002.

TONIAZZO, V.; LAZARO, I.; HUMBERT, B.; MUSTIN, C. Bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*: fixed grains electrode to study superficial oxidized compounds. **Surface Geosciences**, v. 328, p. 535-540, 1999.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison CO₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v. 88, p. 285-298, 1973.

VELÁSQUEZ, P.; GÓMEZ, H.; LEINEN, D.; RAMOS-BARRADO, J. R. Electrochemical impedance spectroscopy analysis of chalcopyrite CuFeS_2 electrodes. **Colloids and Surfaces**, v. 140, p. 177-182, 1998.

YIN, Q.; VAUGHAN, D. J.; ENGLAND, K. E. R.; KELSALL, F. H.; PRANDON, N. P. Surface oxidation of chalcopyrite (CuFeS_2) in alkaline solutions. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 147, p. 2945-2951, 2000.

WARREN, G. W.; WADSWORTH, M. E.; EL-RAGHY, S. M. Passive and transpassive anodic behavior of chalcopyrite in acid solutions. **Metallurgical Transactions Bioprocess Metallurgy**, v. 13, p. 571-579, 1982.

WINAND, R. Chloride hydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 27, p. 285-316, 1991.

ZOLTOWSKI, P. The power of reparametrization of measurement models in electrochemical impedance spectroscopy. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 424, p. 173-178, 1997.