



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS ARARAQUARA

MARCELO SOUSA SANTOS

Avaliação da atividade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre uma mistura composta de diferentes proporções dos sulfetos minerais pirita e calcopirita.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ARARAQUARA

2011

MARCELO SOUSA SANTOS

Avaliação da atividade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre uma mistura composta de diferentes proporções dos sulfetos minerais pirita e calcopirita

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Bevilaqua

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

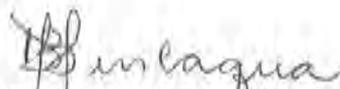
S237a	<p>Santos, Marcelo Sousa</p> <p>Avaliação da atividade oxidativa do <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> sobre uma mistura composta de diferentes proporções dos sulfetos minerais pirita e calcopirita / Marcelo Sousa Santos. – Araraquara : [s.n], 2011</p> <p>66 f. : il.</p>
	<p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Denise Bevilaqua</p>
	<p>1. Biolixiviação. 2. Calcopirita. 3. Interação galvânica.</p> <p>I. Título.</p>

MARCELO SOUSA SANTOS

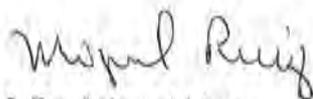
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 24 de agosto de 2011.

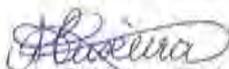
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Denise Bevilaqua (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Miguel Ruiz
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Monica Cristina Teixeira
Escola de Farmácia – UFOP, Ouro Preto

FORMAÇÃO ACADÊMICA

I. BACHARELADO EM QUÍMICA

Bacharel em Química: Graduação em Bacharelado em Química concluído em 2008 no Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

I.1 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Monografia obrigatória para conclusão de curso, apresentada no Instituto de Química em 12/2008, sob Orientação do Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior e Co-Orientação da Dra. Denise Bevilaqua.

Título: Efeito da cisteína na oxidação da pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

II TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SANTOS, M. S.; GARCIA JUNIOR, O.; BEVILAQUA, D.; NOVELLO, A. P. F. Oxidação da Pirita (FeS_2) por *Acidithiobacillus ferrooxidans* crescidas em Fe^{2+} e S^0 na presença de cisteína. In XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008. São José dos Campos (SP).

Dedicatória

Dedico este trabalho a DEUS, pela luz sempre me norteando a seguir os caminhos corretos.

Dedico este trabalho a minha FAMÍLIA, pela educação, apoio, incentivo e força em todos os momentos da minha vida.

Dedico este trabalho a CAMILA SIRACHI RUBINO e toda a sua família, por me acolherem e tornar cada dia vivido em momentos especiais e inesquecíveis.

Dedico este trabalho de forma especial ao eterno amigo OSWALDO GARCIA Jr.(in memoriam), que sempre permanecerá vivo e presente em nossos corações, fruto de sua extrema humanidade e dignidade para com todos.

Dedico este trabalho a minha amiga DENISE BEVILAQUA, por manter-se firme nos momentos difíceis, sempre me apoiando e me guiando em toda a minha vida acadêmica.

Dedico este trabalho a todos os membros e amigos que estiveram comigo durante os anos no GRUPO DE BIOHIDROMETALURGIA da Unesp.

Dedico este trabalho aos meus AMIGOS e COLEGAS, que dividiram alegrias e tristezas, fizemos piadas e discutimos resultados durante anos.

Dedico este trabalho a TODOS que contribuíram para a execução deste trabalho.

Agradecimentos

Agradço a Deus pela Vida.

Agradço ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr. (*in memoriam*) pelas palavras amigas, pelos conselhos e pelos ensinamentos, científicos e pessoais, que jamais serão esquecidos.

Agradço a Profa. Dra. Denise Bevilaqua pela orientação e dedicação para comigo nos mais diversos momentos da minha vida.

Agradço a minha Família e a Família Rubino que me acolheu como filho e sempre me mostrou os caminhos corretos a percorrer.

Agradço a todos que contribuíram e tornaram a realização deste trabalho possível.

Agradço ao Instituto de Química da Unesp – Campus Araraquara, pela estrutura fornecida e pela possibilidade de realizar grandes amigos.

Agradço as pessoas que me apoiaram nos momentos difíceis, e aos que se mostraram contra em alguns momentos e dessa forma me fortalecendo ainda mais.

Agradço as pessoas que me apoiaram nos momentos felizes, por viverem comigo de forma intensa os momentos bons da vida.

RESUMO

A diminuição gradativa, porém constante das reservas mundiais de metais no mundo, tem forçado o desenvolvimento de novas tecnologias para extração e aproveitamento destes bens minerais. A redução de custos e as novas diretrizes ambientais são o maior impulso para a busca destas novas tecnologias. A biohidrometalurgia, mais especificamente, a biolixiviação dentro deste contexto assume uma importância significativa. Os custos de operação deste processo são muito inferiores aos processos convencionais, além de ser ambientalmente mais aceito, uma vez que não gera gases tóxicos. As próprias bactérias, presentes nestas ocorrências minerais, produzem os insumos necessários para a lixiviação, ácido e íons férricos. A principal bactéria envolvida neste processo e também a mais estudada é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta é a única bactéria descrita capaz de utilizar íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre como fonte energética. A calcopirita, mineral de cobre mais abundante na face da Terra, apresenta grande refratariedade ao ataque químico e bacteriano, e ainda não há nenhum processo industrial operando em escala comercial. Neste trabalho foram investigados o efeito da adição de diferentes quantidades de pirita, sulfeto de ferro (FeS_2) no aumento da solubilização de cobre deste sulfeto. A metodologia foi estabelecida baseando-se no mecanismo galvânico de dissolução dos minerais. Os estudos foram realizados através de ensaios respirométricos e de lixiviação em frascos agitados. A presença de bactéria e a adição de íons cloretos também foram avaliadas. Os ensaios respirométricos apresentaram curvas iniciais de consumo de oxigênio sem diferenças significativas para todas as condições analisadas. Os valores finais de consumo de oxigênio variaram. As condições que continham calcopirita/pirita nas proporções 1:3 e 1:1 apresentaram valores superiores a 400 μL de O_2 consumido, enquanto para as outras condições inoculadas estes valores se mantiveram ao redor de 250 μL de O_2 consumido. Os frascos não inoculados não apresentaram consumo significativo de oxigênio, em nenhuma das condições. A adição de íons cloretos provocou uma grande diminuição nos consumos de oxigênio, tanto para 100 quanto para 200 mmol L^{-1} . Os ensaios em frascos agitados foram realizados por 5 (cinco) semanas e foram monitorados os valores de pH, Eh, Fe^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} . A condição 1Cp:3Py apresentou os menores valores de pH, os maiores valores de Eh e também as maiores extrações de cobre. Este último alcançou valores muito maiores aos já obtidos em trabalhos anteriores. A diferença entre os frascos controles e inoculados não foram significativas, demonstrando que a lixiviação química (galvânica) da calcopirita tem grande relevância. Em relação ao ensaio com células adaptadas, as principais diferenças foram observadas nas curvas de pH, Eh e Fe^{3+} . As inclinações destas curvas foram muito maiores que as anteriores, revelando uma cinética diferente na presença de células adaptadas. As solubilizações de cobre não apresentaram diferenças significativas. Através das análises de difração de raios X não podemos afirmar que houve a formação de enxofre. A análise termogravimétrica revelou a presença de enxofre como nova fase formada. Este resultado demonstrou claramente que os resultados obtidos com a termogravimetria são mais sensíveis, revelando com boa margem de segurança a presença de enxofre.

Palavras-chave: Interação Galvânica. Calcopirita. Pirita. *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

ABSTRACT

The gradual depletion of world reserves, however, constant has forced the development of new technologies for extraction and exploitation of these minerals. Cost reduction and new environmental guidelines are the biggest impulse to the search for these new technologies. The biohydrometallurgy, specifically, the bioleaching in this context is of significant importance. The operating cost of this process is much lower than conventional process, in addition to being more environmentally friendly, since it does not generate toxic gases. The bacteria themselves, present in these mineral occurrences produce the inputs needed for leaching acid and ferric ions. The main bacterium involved on this process and also the most studied is the *Acidithiobacillus ferrooxidans*. This is the only bacterium described able to use ferrous ions and reduced sulfur compounds as an energy source. The chalcopyrite, the most abundant copper mineral in the earth, is refractory to the chemical and bacterial attack, and there is no industrial process operating on a commercial scale yet. In this work were investigated the effect of adding different amounts of pyrite, iron sulfide (FeS_2) to increase the solubility of copper sulfide. The methodology was established based on galvanic mechanism of dissolution of minerals. The studies were conducted through respirometric tests and bioleaching experiments in shake flasks. The presence of bacteria and the addition of chloride ions were also evaluated. The respirometric tests showed initial curves of oxygen consumption with no significant differences for all conditions examined. The final values of oxygen consumption diverse. The conditions contained chalcopyrite/pyrite in ratios 1:3 and 1:1 had values greater than 400 μL of O_2 consumed, while other conditions inoculated, these values remained around 250 μL of O_2 consumed. The non-inoculated flasks showed no significant consumption of oxygen, under any conditions; The addition of chloride caused a large decrease in oxygen consumption, both for 100 and 200 mmol. The tests were performed in shaken flasks for five (5) weeks and were monitored the pH, Fe^{2+} , Fe^{3+} and Cu^{2+} . The condition 1Cp:3Py presented the lowest pH, the highest values of Eh and also the greatest extraction of copper. The latter reached much higher values to those already obtained in previous work. The difference between the inoculated and the non-inoculated flasks were not significant, showing that the chemical leaching (galvanic) of chalcopyrite has great relevance. For adapted cells, the main difference were observed in the curves of pH, Eh and Fe^{3+} . The slopes of these curves were much higher than the previous one, revealing a different kinetic in the presence of adapted cells. The solubilization of copper showed no significant differences. The XRD analysis did not reveal the presence of sulfur. The thermogravimetric analysis revealed the presence of sulfur as a new phase formed. This results clearly demonstrated that the results obtained by thermogravimetry are more sensitive, revealing with a good margin of safety the presence of sulfur.

Keywords: Galvanic Interactions. Chalcopyrite. Pyrite. *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Sulfetos Metálicos	10
2.1.1 Calcopirita – CuFeS ₂	11
2.1.2 Pirita – FeS ₂	11
2.2 Acidithiobacillus ferrooxidans	12
2.3 Biolixiviação	15
2.4 Mecanismos do processo de biolixiviação	18
2.4.1 Mecanismo Direto	19
2.4.2 Mecanismo Indireto	19
2.5 Interação galvânica na biolixiviação	20
2.6 Efeito de íons cloreto na biolixiviação	24
3 Objetivos	25
3.1 Objetivo geral:	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Linhagem bacteriana	26
4.2 Meio de cultivo celular	26
4.3 Adaptação do <i>A. ferrooxidans</i> à calcopirita	27
4.4 Sulfetos metálicos: Pirita e Calcopirita	28
4.4.1 Preparação das misturas para utilização em todos os experimentos e nomenclaturas utilizadas:	28
4.5 Estudos de respirometria celular	29
4.5.1 Reagentes utilizados na respirometria	30
4.6 Adição de íons Cloreto ao ensaio respirométrico	31
4.7 Preparo da suspensão celular para ensaios respirométricos	31
4.8 Dosagem de proteínas totais	32
4.8.1 Reagentes de Hartree	32
4.8.2 Procedimento de Hartree	33
4.9 Ensaio de biolixiviação em frascos agitados	34
4.9.1 Métodos de análise e acompanhamento dos sistemas – Fase Líquida	35
4.9.1.1 Determinação do Fe ³⁺	35
4.9.2 Métodos de análise e acompanhamento dos sistemas – Fase sólida	35
4.9.2.1 Difractometria de Raios-X (DRX)	36
4.9.2.2 Análise térmica (DTA/DTG)	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Ensaio utilizando <i>A. ferrooxidans</i> -LR não adaptadas à calcopirita	38
5.1.2 Respirometria celular	38
5.1.2.1 Adição de íons cloreto	40
5.1.3 Ensaio de biolixiviação em frascos agitados	42
5.1.3.1 Resultados das análises da fase líquida	42
5.1.3.1.1 Análise do pH	42
5.1.3.1.2 Análise do Eh	43
5.1.3.1.3 Determinação de íons Fe ³⁺	45
5.1.3.1.5 Concentração de Cu	46
5.1.3.2 Resultados das análises da fase sólida	47
5.1.3.2.1 Análise Térmica	47
5.1.3.2.2 Análise por Difractometria de Raios-X	49
5.2 Ensaio utilizando <i>A. ferrooxidans</i> -LR adaptadas à calcopirita	53
5.2.2 Ensaio de biolixiviação em frascos agitados	53

5.2.2.1 Análise do pH.....	53
5.1.3.2 Análise do Eh	55
5.2.2.3 Determinação de íons Fe ³⁺	56
5.6.2.4 Concentração de Cu	57
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas industriais e econômicos observados no mundo é a diminuição significativa das reservas naturais que possuem recursos necessários ao crescimento e desenvolvimento tecnológico como os metais e o petróleo. A crescente demanda por essas matérias-primas (metais e minerais), faz com que sejam despendidos grandes esforços no sentido de otimizar os processos existentes e na busca por novas rotas de exploração e processamento desses recursos não renováveis, visando redução de custos e tentando se alinhar com as novas diretrizes ambientais.

O setor de mineração tem se deparado com grandes problemas de cunho ambiental, tecnológico e financeiro em seu processo convencional de extração (pirometalurgia), consequência do aumento no rigor do controle ambiental devido à emissão de SO_2 que é um dos responsáveis pela chuva ácida, aliado à elevação dos custos para a extração e processamento dos minérios. Em paralelo a esses dois fatores mencionados, temos uma outra situação agravante, não menos importante, que é o esgotamento das reservas minerais com altos teores metálicos que é condição necessária para o processamento através da pirometalurgia. A pirometalurgia é um dos processos mais utilizados na extração de metais, e se caracteriza por ser um processo extrativo com altos gastos energéticos pois se baseia no uso de altas temperaturas, promovendo diferentes etapas

Em meio aos processos convencionais temos a hidrometalurgia, que caracteriza-se como processos de extração de metais em meio aquoso, necessitando de condições mais brandas de operação além de ser possível também o processamento de minerais com baixos teores metálicos.

Esse processo biotecnológico pode ser aplicado industrialmente para recuperação de vários metais de interesse comercial, dentre eles destacamos o cobre, urânio, ouro e níquel. Esses metais se encontram geralmente na forma de sulfetos metálicos, e na maioria das vezes associados entre si. A biolixiviação se baseia na capacidade de certas bactérias em oxidar sulfetos metálicos como forma de obter energia para seu crescimento, transformando um sulfeto insolúvel no sulfato solúvel correspondente, com a posterior recuperação do metal antes associado.

Várias alternativas tem sido investigadas no sentido de se superar esta alta refratariedade deste mineral utilizando-se as condições brandas da biolixiviação (temperatura e pressão ambientes). Apesar dos diversos estudos publicados até a presente data terem demonstrado que a lixiviação bacteriana é um processo economicamente viável, para a calcopirita no entanto, nenhum deles até o momento teve o êxito necessário para que fosse aplicada comercialmente.

A interação galvânica vem sendo amplamente discutida em termos da eficiência dessas reações no meio oxidativo envolvendo sulfetos metálicos. Tais estudos deram origem a um processo patenteado denominado GALVANOX (Dixon, 2008). Galvanox é a descrição de um processo eletroquímico utilizando-se do par galvânico gerado com o contato em solução dos sulfetos pirita e calcopirita, obteve um recuperação de mais de 90 % de cobre, para minérios concentrados de cobre.

Como objeto deste trabalho, foram utilizados os sulfetos calcopirita e pirita, de forma combinada nos ensaios em diferentes proporções, buscando a melhor relação entre as massas visando uma maior taxa de recuperação do metal de interesse, o cobre. Devido à grande quantidade de minerais escassos em metais, os chamados rejeitos minerais ou minerais de baixos teores metálicos, associamos esse processo galvânico com os processos biotecnológicos em desenvolvimento, como a biolixiviação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sulfetos Metálicos

Os sulfetos são a combinação do enxofre (S) com um elemento metálico (Me) ou um radical. A grande maioria dos sulfetos encontrados são metálicos, do tipo (MeS), sendo comum encontrá-lo combinado com outros elementos como o ferro, carbono e oxigênio, além de associados entre si. Dentre os sulfetos existentes, alguns se destacam pelo interesse comercial e industrial como a calcopirita (CuFeS_2) e a esfalerita (ZnS).

No quadro 1, temos exemplos de fontes minerais de alguns metais de interesse mundial nos mais diversos setores:

Quadro 1: Principais fontes minerais de alguns metais comuns.

Metal	Mineral	Composição
Alumínio	Bauxita	Al_2O_3
Cromo	Cromita	FeCr_2O_4
Cobre	Calcocita	Cu_2S
	Calcopirita	CuFeS_2
	Malaquita	$\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$
Ferro	Pirita	FeS_2
	Hematita	Fe_2O_3
	Magnetita	Fe_3O_4
Chumbo	Galena	PbS
Manganês	Pirolusita	MnO_2
Mercúrio	Cinábrio	HgS
Molibdênio	Molibdenita	MoS_2
Estanho	Cassiterita	SnO_2
Titânio	Ilmenita	FeTiO_3
	Rutilo	TiO_2
Zinco	Esfalerita	ZnS

Fonte: Adaptado de White, P. David; 2005.

2.1.1 Calcopirita - CuFeS_2

O empenho dedicado a este composto se dá por alguns fatores: por ser o sulfeto mineral de cobre mais abundante, assim se tornando o mais utilizado mundialmente na recuperação de cobre, e por outro lado, por ser um dos minérios sulfetados de cobre mais refratários ao ataque químico ou bacteriano, apesar de ser classificado como um mineral solúvel em meio ácido. Essas características desse sulfeto o torna como referência nos estudos no sentido de viabilizar um processo de recuperação do metal de interesse através da biolixiviação.

Quanto ao processo de oxidação da calcopirita, existem algumas divergências no meio científico quanto à origem da sua refratariedade quanto ao ataque químico. É aceito de forma unânime que o meio em que a lixiviação ocorre deva conter características oxidantes, como a presença de íons férricos (Fe^{3+}) e oxigenação; entretanto quanto à presença de íons férricos (Fe^{3+}) surge uma questão que gera discussões sobre o processo que ocorre no meio reacional, onde pequenas concentrações de íons Fe^{3+} auxiliam na lixiviação do mineral, e em contrapartida, o excesso de íons Fe^{3+} em solução inibem o processo oxidativo devido a um processo de passivação que ocorre na superfície do mineral, através da formação de compostos intermediários conhecidos como jarositas. (BALLESTER; CÓRDOBA, 2005).

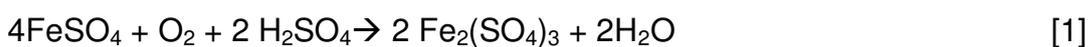
2.1.2 Pirita - FeS_2

A pirita surge com um sulfeto comum em praticamente todas as ocorrências geológicas de metais, estando associada e incrustada na estrutura das rochas, como em locais de extração de calcopirita. A pirita é considerado o sulfeto metálico mais abundante, sendo encontrado associado a praticamente todas as outras formações naturais de sulfetos minerais.

2.2 Acidithiobacillusferrooxidans

Grande parte dos avanços da biotecnologia moderna é derivada das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de micro-organismos. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para: novos antibióticos e agentes terapêuticos; produtos químicos; enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; e dentre várias outras aplicações, temos a biolixiviação e recuperação de minérios.

Na biolixiviação de metais de seus minerais correspondentes, diversas espécies bacterianas podem estar presentes entre elas tais como, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, e *Acidithiobacillus thiooxidans* (Kelly; Wood, 2001), além de outras menos expressivas. Das espécies cultiváveis em laboratório, a que mais tem sido utilizada nos processos de biolixiviação, é o *A. ferrooxidans*, um micro-organismo que obtém a energia para o seu crescimento pela oxidação do íon ferroso e compostos reduzidos de enxofre e seu carbono celular por fixação do CO₂ atmosférico (Leduc & Ferroni, 1994). As equações [1], [2] e [3] apresentam as reações necessárias para o crescimento bacteriano.



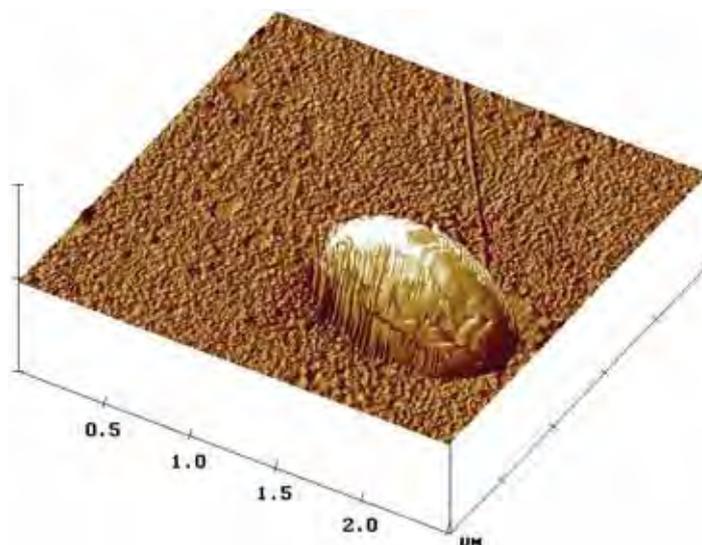
Essa capacidade de oxidar diferentes tipos de compostos inorgânicos reduzidos, produzindo eficientes agentes da lixiviação ácida de metais (íons férrico e ácido sulfúrico), torna o *A. ferrooxidans* o principal micro-organismo envolvido na lixiviação bacteriana. Este micro-organismo é capaz de oxidar diversos sulfetos minerais de importância industrial, como os citados anteriormente.

Segundo Bevilaqua, 2003, essa espécie é capaz de crescer em condições extremas, sobretudo elevada acidez e altas concentrações de metais potencialmente tóxicos como se segue (mmol L⁻¹): 370 Al, 150 Zn, 170 Co, 180 Mn, 160 Cu, 100 Cr, 1,5 As, 10 Cd, 0,1 Hg, 170 Ni e 8U. Essas características têm atraído uma considerável atenção nos últimos anos, não somente pelo desafio que essas descobertas têm causado nos conhecimentos dos limites da vida microbiana, mas principalmente pelo seu potencial biotecnológico (Pronk & Johnson, 1992; Das & Mishra, 1996).

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 isolado ou em pares, raramente em cadeias pequenas; são móveis e apresentam flagelo e sua reprodução é por divisão binária simples (Holt, 1994). DiSpirito et al. (1982), demonstraram a presença de “pilli”, que são estruturas semelhantes a pêlos. É considerado um micro-organismo mesófilo, sendo 30°C a temperatura ótima de crescimento, entretanto, isolaram-se linhagens psicrófilas 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, crescimento numa faixa 1,5 a 4,5; acima de pH 6,5 ou abaixo de pH 1,0, não é capaz de sobreviver. O micro-organismo *A. ferrooxidans* é capaz de reduzir o íon férrico anaerobicamente durante a oxidação do enxofre para a produção de energia utilizada no crescimento bacteriano (Bevilaqua, 2003).

A Figura 1 mostra uma imagem do *A. ferrooxidans*:

Figura 1: Imagem do *A. ferrooxidans* aderido sobre grafite, obtida por microscopia de forças atômicas.



Fonte: Bevilaqua, 2003.

A espécie utiliza-se de substratos inorgânicos para seu crescimento, necessitando basicamente, além da fonte energética (Fe^{2+} ou formas reduzidas de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos), suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (Tuovinen *et al.*, 1979; Rawlings, 1981). Kai *et al.* (1996), isolaram uma linhagem de *A. ferrooxidans* capaz de utilizar não somente ferro, mas também glicose para crescer. Entretanto, a transição de autotrófico para heterotrófico é questionável, uma vez que é freqüente que culturas de *A. ferrooxidans* estejam contaminadas com outros acidófilos heterotróficos facultativos ou obrigatórios (Bhattacharyya *et al.*, 1991), sendo muitos destes recalcitrantes às técnicas comuns de purificação (Johnson & Kelso, 1983).

2.3 Biolixiviação

Como anteriormente salientado, um dos grandes problemas industriais e econômicos observados no mundo, é a diminuição significativa das reservas naturais que possuem recursos minerais com aplicações industriais necessários ao crescimento tecnológico, como os metais e o petróleo. A crescente demanda por essas matérias-primas (metais e minerais), faz com que sejam despendidos grandes esforços no sentido de otimizar os processos existentes e na busca por novas rotas de exploração e processamento desses recursos não renováveis.

Dentre os metais utilizados industrialmente, destacamos o cobre por possuir uma gama de aplicações nos mais diversos setores econômicos mundiais, principalmente em países com crescimento acelerado como a China.

Os processos clássicos para obtenção de metais envolvem basicamente a pirometalurgia, sendo um processo caro devido a altos gastos de energia e de insumos, e necessitando de altas concentrações metálicas nos respectivos minérios ou concentrados minerais, além de ser altamente poluente devido às emissões de SO_2 na atmosfera.

Uma inovação tecnológica que vem ganhando destaque no meio científico pelo alto potencial industrial, é o processo hidrometalúrgico mediado por micro-organismos específicos, capazes de auxiliar na oxidação dos sulfetos metálicos, denominado biohidrometalurgia ou biolixiviação (Zamani *et al.*, 2006).

A biohidrometalurgia é um processo extrativo catalisado por bactérias mesófilas, termófilas ou ainda um consórcio de ambas, ocorrendo em condições de operação mais brandas, envolvendo reações de oxi-redução em meio aquoso, para a dissolução do mineral e a posterior recuperação do metal de interesse.

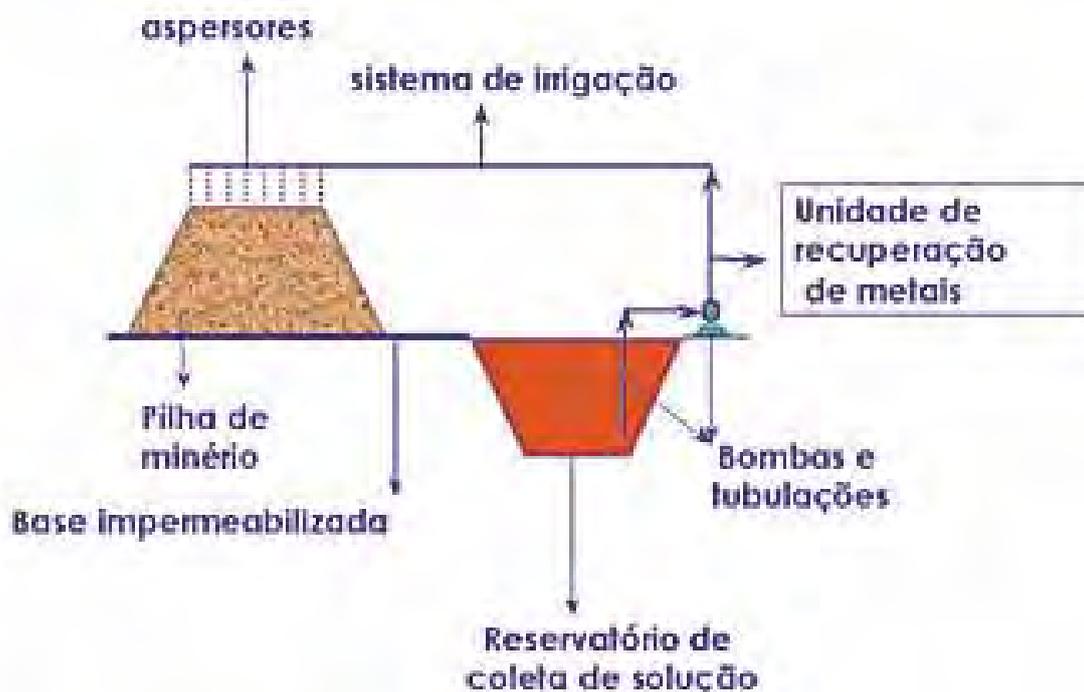
O processo biotecnológico apresenta algumas vantagens que cabe salientar em relação a processos convencionais, dentre elas temos:

- o baixo custo de insumos (ácidos e agentes oxidantes), pois grande parte dos mesmos são produzidos pela própria bactéria
- reduzidos gastos energéticos (pressão e temperatura ambiente)
- baixo investimento de capital (equipamentos simples e/ou ausentes)
- baixo custo operacional.

Aliado às vantagens anteriormente citadas, enfatizamos a possibilidade de utilização de minérios com baixos teores (concentração de cobre < 0,3% sem concentração por flotação) que faz com que o processo seja promissor, assim observa-se essa busca acelerada em todas as partes do mundo para que se possam otimizar os processos já existentes, e a descoberta de novas metodologias e protocolos para a extração de forma mais viável, econômica e ambientalmente, atendendo à demanda por este e outro metais.

Em escala industrial, a biolixiviação é conduzida em pilhas sobre uma área impermeabilizada, com uma leve inclinação do terreno, redirecionando o líquido lixiviante para um tanque, a partir deste, essa solução é bombeada novamente para as pilhas (FIGURA 2). Podem ser recuperados metais a partir de minerais sulfetados de baixa concentração como: níquel, urânio, cobre e ouro. Podemos destacar alguns países que utilizam esse processo em escala industrial como: EUA, Canadá, África do Sul, Rússia, México, Bulgária, Espanha, Chile, Austrália e dentre outros (GARCIA; URENHA, 2001).

Figura 2:Esquema geral de uma pilha de minério sendo biolixiviada.



Fonte: Garcia; Urenha, 2001.

Para exemplificar a importância do processo, países como Chile, Peru, Austrália, EUA, China, dentre outros, aplicam a biolixiviação para a extração principalmente de cobre, ouro e urânio. A mina de Cerro Verde no Peru consegue processar por via biotecnológica cerca de 32.000 t de minério de cobre por dia (Olson *et al.*, 2003).

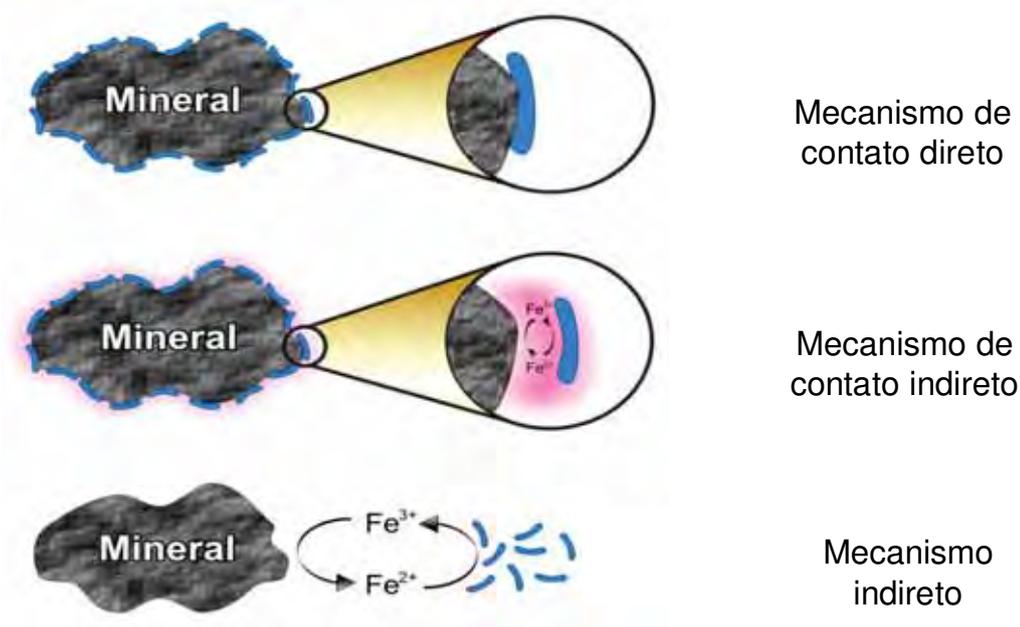
O desenvolvimento tecnológico e sua consequente aplicação no Brasil, gera expectativas em algumas empresas nacionais como a Vale, que pretende alcançar uma capacidade de produção de um milhão de toneladas métricas de cobre por ano em 2016 (Vale, 2011). Assim, o Brasil se destacará como um grande exportador do produto, transformando-se em um dos grandes produtores mundiais do metal (Ciminelli, 2007).

2.4 Mecanismos do processo de biolixiviação

Os mecanismos envolvidos na biolixiviação de sulfetos minerais são complexos. As interações entre substratos minerais e organismos vivos em meio ácido, geram uma infinidade de processos que convergem e divergem entre si, fazendo com que os estudos desses mecanismos sejam efetuados considerando fatores químicos, bioquímicos e eletroquímicos. Estudos demonstram que a interação bacteriana com a superfície dos sulfetos minerais resulta no aumento da atividade de corrosão (Watling, 2006), entretanto existe uma discussão a cerca de duas principais vertentes a respeito desses mecanismos de interação bactéria-substrato que direcionam os estudos: mecanismo direto e mecanismo indireto.

Conforme a FIGURA 3, temos algumas propostas do modelo de oxidação que ocorre na superfície do mineral.

Figura 3: Mecanismos propostos de interação entre o micro-organismo e o mineral.



Fonte: Adaptado de Crundwell, 2003.

2.4.1 Mecanismo Direto

O mecanismo direto implica no ataque enzimático da bactéria ao mineral sendo, portanto, necessária a sua adesão à superfície do mineral. O íon ferroso é um substrato solúvel utilizado pela *A. ferrooxidans* em seu crescimento, no entanto, o enxofre elementar e sulfetos minerais tais como pirita, calcopirita entre outros, são substratos insolúveis e refratários, porém podem também ser usados como fonte de energia pela bactéria.

De uma forma generalizada o mecanismo direto é representado pela seguinte reação:



Alguns fatores como as interfaces existentes no sistema de biolixivação e as propriedades bioquímicas do organismo são responsáveis pela forma com que ocorrerá a adesão bacteriana à superfície do sulfeto (Devasia *et al.*, 1993).

O *A. ferrooxidans* é capaz de reconhecer sítios ativos na superfície do sulfeto mineral onde provavelmente processos controlados eletroquimicamente causam a dissolução e liberam íons ferrosos e tiosulfato (Sand *et al.*, 1995).

2.4.2 Mecanismo Indireto

No processo descrito como mecanismo indireto, a bactéria gera um agente lixiviante (íon férrico em meio ácido) ocasionando a oxidação química do sulfeto mineral. O mecanismo indireto pode ser representado da seguinte forma:



Assim, o Fe^{2+} e o S^0 , gerados nessa reação, são reutilizados pela bactéria como fonte energética, produzindo o íon Fe^{3+} (oxidante) e ácido sulfúrico. Alguns estudos demonstram que este enxofre elementar, que é formado durante o processo oxidativo do sulfeto metálico, acumula-se na

superfície do mesmo, ocasionando uma passivação na superfície e a consequente redução na cinética do processo.

A presença da bactéria, em solução ou aderida ao mineral, catalisa a dissolução dos sulfetos minerais pela modificação dos mecanismos eletroquímicos de corrosão. O entendimento destes mecanismos é de fundamental importância para orientar os estudos de otimização do processo bacteriano de recuperação de metais em escala industrial.

2.5 Interação galvânica na biolixiviação

Muitos minerais são condutores ou semicondutores. Esses minerais imersos em solução atuam como eletrodos devido à diferença de potencial existente entre eles, ocorrendo dissolução através de processos corrosivos envolvendo reações de oxi-redução, devido à ocorrência de interações galvânicas.

Em sistemas de lixiviação que contenham mais de um mineral, necessariamente estarão envolvidas interações galvânicas entre eles. Diversos sulfetos minerais podem ser organizados em uma série eletroquímica baseada nos seus potenciais de repouso. Dependendo da natureza, tipo e quantidade de impurezas presentes nos sulfetos minerais, a medida do potencial de repouso pode variar de amostra para amostra, e dessa maneira pode-se prever uma mudança na posição de um determinado sulfeto mineral numa série galvânica.

Quadro 2. Série eletroquímica de alguns sulfetos metálicos em um meio de biolixiviação.

Mineral	E_e vs SHE (V)	
Pirita (FeS_2)	0,63	<p style="text-align: center;">Nobreza</p>  <p style="text-align: center;">Atividade (reatividade)</p>
Calcopirita (CuFeS_2)	0,52	
Calcocita (Cu_2S)	0,44	
Covelita (CuS)	0,42	
Galena (PbS)	0,28	
Esfarelita (ZnS)	-0,24	

Fonte: Adaptado de Holmes; Crundwell, 1995; Natarajan, 1990.

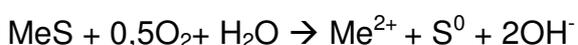
Conforme pode ser visto pelo QUADRO 2, a pirita e a calcopirita, sendo sulfetos mais nobres, são difíceis de serem oxidadas em meio ácido.

Em sistemas aquosos, os efeitos galvânicos são de suma importância nas reações de transformação dos minérios e minerais, tais como a flotação e a lixiviação. Essas interações galvânicas foram estudadas em vários sistemas de lixiviação e biolixiviação (Metha; Murr, 1983; Paramguru; Nayak, 1996; Madhuchhanda *et al.*, 2000). Nestes sistemas, a interação galvânica pode aumentar substancialmente a lixiviação de um ou de ambos os minerais que formam a célula galvânica, dependendo da eletroquímica característica dos minerais (Nowak *et al.*, 1984; Paramguru; Nayak, 1996; Abraitis *et al.*, 2003).

As interações que podem ocorrer entre os minerais envolvem o fluxo de elétrons em solução. Uma célula galvânica formada por diferentes sulfetos é modelada de acordo com as seguintes reações (Albuquerque *et al.*, 2006):



E assim a equação global do processo galvânico:



A oxidação da calcopirita por íons férricos pode ser representada estequiometricamente pela reação global (Gupta; Mukherjee, 1990):



Através da reação acima podemos observar a formação de enxofre elementar no processo de oxidação da calcopirita. Essa formação vem sendo amplamente discutida visto que com a sua formação, observa-se uma passivação sobre a superfície do mineral, e desta forma uma diminuição ou até mesmo uma inibição na oxidação da calcopirita, ocasionando uma menor taxa de recuperação de cobre.

A contribuição do mecanismo galvânico nos processos de lixiviação pode variar significativamente, dependendo de muitos fatores. Entre os mais importantes estão: presença ou não de micro-organismos; o grau de diferença entre os potenciais de repouso; a área superficial relativa entre o cátodo e o ânodo, a natureza e a duração do contato; a condutividade do mineral e algumas características do eletrólito em questão (Bevilaqua, 1999).

Diferentes sulfetos metálicos variam nas suas susceptibilidades à dissolução bacteriana oxidante, dependendo de suas propriedades eletroquímicas e estrutura cristalina (Tributsch & Bennett, 1981a,b). Ahonen & Tuovinen (1993), através da análise química das lixívia de diferentes sulfetos metálicos, estabeleceram uma ordem nas taxas de oxidação apresentadas pela bactéria: $\text{Zn} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Cu}$.

Ainda quanto ao mecanismo galvânico, foi requerida uma patente internacional denominada GALVANOX (DIXON, 2008, a qual descreve a recuperação de mais de 99% de cobre, quando se dá a formação do par galvânico pirita-calcopirita, sendo este par objeto de estudo no presente trabalho. Galvanox (Dixon, 2008) é um processo estritamente eletroquímico, diferentemente do estudo efetuado que envolve micro-organismos, diferenciando também pelo fato do processo Galvanox utilizar minérios com altos teores metálicos.

2.6 Efeito de íons cloreto na biolixiviação

Estudos recentes vem demonstrando que a utilização de íons cloreto (Cl^-) no meio reacional acelera o processo oxidativo de dissolução dos sulfetos minerais através do aumento na taxa de transferência de elétrons em relação a soluções contendo somente sulfato (Liddicoat; Dreisinger, 2007; Maurice; Hawk, 1999;).

A literatura tem reportado duas vertentes em relação ao mecanismos de biolixiviação com adição de íons cloreto. Lu; Jeffrey; Lawson, 2000 através de experimentos de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e outros estudos, demonstraram que o filme que se forma na superfície da calcopirita após a biolixiviação com adição de cloreto é mais poroso e cristalino, enquanto aquele obtido no processo conduzido na ausência de íons Cl^- , é amorfo.

Com isso, alguns autores acreditam que a influência dos íons Cl^- se dá por mudanças nas características morfológicas da camada de enxofre depositada sobre a superfície da calcopirita.

Estudos feitos por Skroibian, Havilk; Ukasikos, 2005; Carneiro e Leao; 2007, com a presença de íons cloreto através da adição de NaCl ao meio contendo CuCl_2 , concluíram que a adição de íons Cl^- leva à aceleração no processo de formação de complexos cuprosos e cúpricos, que são estáveis em sistemas contendo Cl^- . Assim o par $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ se torna o principal oxidante da calcopirita, em detrimento ao par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ acentua a taxa de lixiviação da calcopirita.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral:

Avaliação da atividade oxidativa do *Acidithiobacillusferrooxidans* em um sistema de biolixiviação, considerando as interações galvânicas entre pirita e calcopirita.

3.2 Objetivos específicos

→ Estudar a cinética de oxidação do *A. ferrooxidans* por respirometria celular nas seguintes proporções dos minerais:

Pirita : Calcopirita (m/m) : 1:1; 1:3; 3:1

→ Analisar a influência dessas razões na **solubilização do cobre**, através de ensaios de biolixiviação em frascos agitados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem bacteriana

Foi utilizada a linhagem *A. ferrooxidans*-LR isolada de lixívia ácida de minério de urânio, proveniente da mina de Lagoa Real-Bahia (Garcia Junior, 1991). Esse micro-organismo foi utilizado devido à sua resistência a metais pesados e demonstrar uma maior atividade oxidativa para os sulfetos de cobre.

4.2 Meio de cultivo celular

Para a manutenção periódica da linhagem bacteriana, assim como para a obtenção de células para a realização dos estudos de oxidação dos sulfetos, e adaptação à calcopirita, utilizou-se o meio de cultura conhecido como “T&K” descrito por Tuovinen e Kelly, 1973. Esse meio de cultura é formado pela mistura de diferentes sais inorgânicos, para a formação de duas soluções (A e B), como apresentado no QUADRO 3:

Quadro 3: Descrição dos reagentes e quantidades necessárias para a composição das soluções A e B para o preparo do meio T&K.

Solução A		Solução B	
Reagentes	Massa (g)	Reagentes	Massa (g)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	FeSO ₄ .7H ₂ O	33,3
KH ₂ PO ₄	0,5	H ₂ O destilada	q.s.p 200 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5		
H ₂ O destilada	q.s.p. 800 mL		

Fonte: O autor.

Ambas as soluções são acidificadas com ácido sulfúrico concentrado até pH=1,8. Este processo é realizado através da medição simultânea por equipamento eletrônico até atingir o valor desejado.

O preparo da solução A envolve esterilização dos sais em autoclave (120 °C) por 20 minutos. A solução B é esterilizada por filtração em membrana em ambiente estéril (0,45 µm de diâmetro de poro). No momento do uso, as soluções A e B são misturadas na proporção de 4:1, respectivamente.

4.3 Adaptação do *A. ferrooxidans* à calcopirita

Essa linhagem foi também adaptada ao sulfeto mineral calcopirita para verificarmos possíveis diferenças no comportamento do sistema em relação à linhagem não adaptada.

A adaptação foi efetuada substituindo-se progressivamente a fonte de energia (Fe^{2+}) do meio T&K (Tuovinen; Kelly, 1973), sendo um total de 5 etapas de substituição da fonte convencional de energia pelo mineral calcopirita, de acordo com o QUADRO 4:

Quadro 4: Etapas de adaptação de *A. ferrooxidans* LR ao sulfeto mineral calcopirita em meio T&K.

Fase	Solução A (mL)	Solução B (mL)	[Fe^{+2}] (mmol.L ⁻¹)	H ₂ O ácida (mL)	Calcopirita (g)
1	80	10	60	10	0,2
2	80	5	30	15	0,4
3	80	2,5	15	17,5	0,8
4	80	1,25	7,5	18,75	2,0
5	80	----	---	20	2,5

Fonte: O autor.

Algumas considerações a respeito da adaptação devem ser pontuadas:

- As soluções A e B são as mesmas descritas no item anterior (3.2).
- O pH da água deve ser igual ao do meio de cultivo (1,8), utilizando H₂SO₄ concentrado para atingir esse valor de pH.

→ Cada fase durou cerca de duas semanas; ao término desse período foram feitos testes de viabilidade antes de prosseguirmos para a próxima fase. O teste foi realizado inoculando-se uma alíquota da suspensão em meio T&K completo.

→ Cada fase foi feita em triplicata.

→ Ao longo da adaptação os valores de Eh e pH foram monitorados, efetuando-se correções para pH=1,8 quando necessário, utilizando-se H₂SO₄.

4.4 Sulfetos metálicos: Pirita e Calcopirita

Em todos os ensaios foram utilizados dois sulfetos metálicos: pirita (FeS₂) comercial e calcopirita (CuFeS₂) fornecida pela Companhia VALE, proveniente da jazida de Salobo, PA. A granulometria das amostras foi de 100% < 0,2 mm. Os sulfetos foram moídos utilizando moinho de bola e posteriormente foi efetuado o peneiramento para separação das partículas no tamanho desejado, as que não se apresentaram em conformidade à granulação pretendida retornavam ao moinho para posterior peneiramento. Após esses procedimentos ambos os minerais foram acondicionados em frascos plásticos contendo o gás argônio para deixar o meio inerte, evitando possíveis reações de oxidação indesejadas.

4.4.1 Preparação das misturas para utilização em todos os experimentos e nomenclaturas utilizadas:

Após os sulfetos minerais estarem na granulometria desejada, conseguido através de sucessivas moagem e peneiramento, as amostras foram preparadas de acordo com o estabelecido abaixo:

As proporções dos sulfetos calcopirita (Cp) e pirita (Py) utilizados nos ensaios foram as seguintes (m/m):

1:1 – designado no texto como 1Cp:1Py

1:3 – designado no texto como 1Cp:3Py

3:1 – designado no texto como 3Cp:1Py

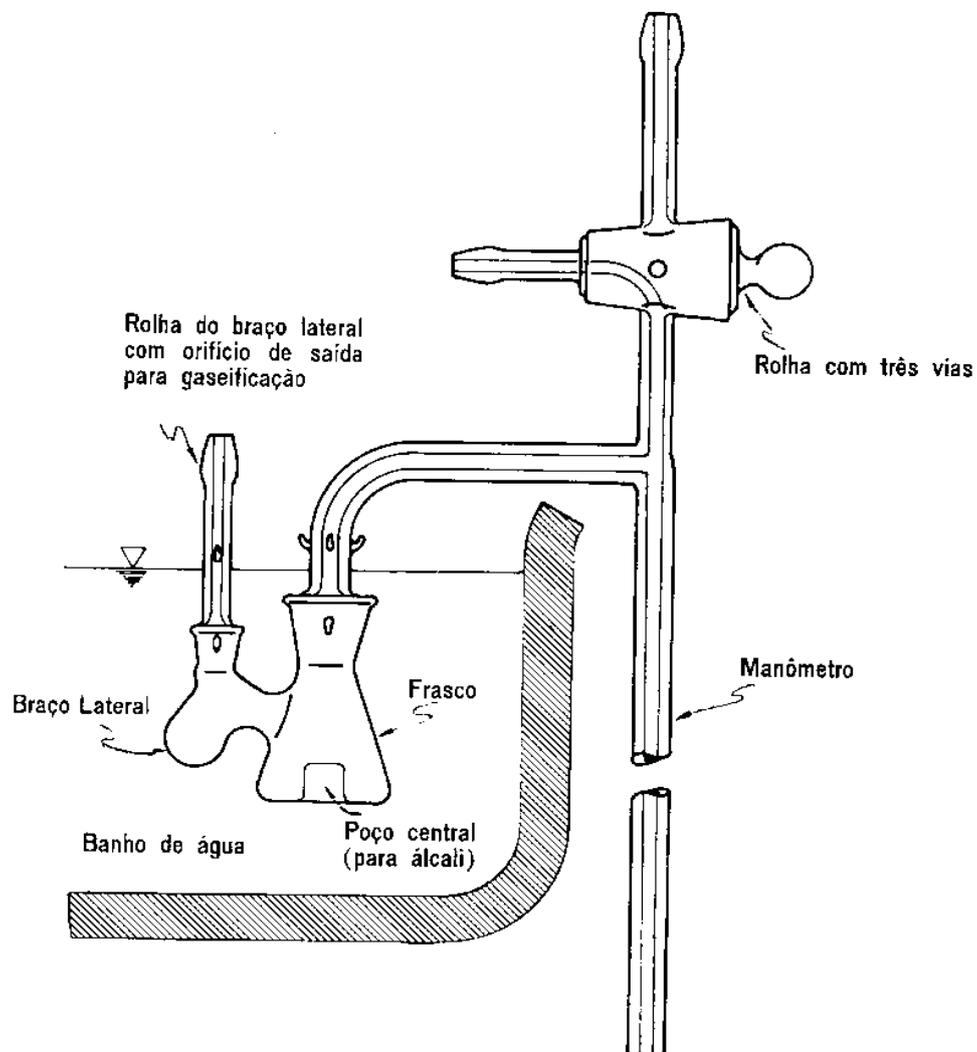
4.5 Estudos de respirometria celular

A técnica de respirometria celular permite uma avaliação rápida e bastante sensível (ordem de μmol de oxigênio consumido) da oxidação de um substrato por uma suspensão celular desacoplada de crescimento, isto é, células em repouso ou sem divisão celular.

O respirômetro de Warburg (Umbreit; Burris; Stauffer, 1972) utilizado nesse estudo, consiste basicamente de manômetros graduados, os quais contêm um líquido de densidade conhecida (solução de Brodie), um frasco de reação, onde é colocado um determinado substrato oxidável, um reservatório lateral para adição de células e um poço central para adição de KOH para remoção de CO_2 , o qual poderia ser fixado pela suspensão celular e promover crescimento. Um esquema deste sistema é mostrado na FIGURA 5. Em cada um dos frascos de reação foram colocados 2,0 mL de água acidificada (pH 1,8), 0,5 mL de suspensão celular ($300 \mu\text{L mL}^{-1}$) e 100 mg de sulfeto (mistura de pirita e calcopirita na proporções previamente definidas conforme item 3.4.1). Em paralelo aos ensaios inoculados foram realizados controles químicos, nos quais não houve adição da suspensão celular. Todos os ensaios respirométricos foram realizados em triplicatas.

No poço central do frasco de reação foi colocada uma tira de papel de filtro pregueada, embebida com 0,1 mL de KOH 20% com o intuito da absorção do CO_2 . Todo o conjunto frasco-manômetro ficou mantido em um banho de água com temperatura controlada (30°C) e sob agitação constante. Logo, qualquer modificação na pressão foi decorrente do consumo de oxigênio durante a oxidação do substrato.

Figura 5: Esquema básico do aparelho de Warburg.



Fonte: Umbreit; Burris; Stauffer, 1972.

4.5.1 Reagentes utilizados na respirometria

- Água acidificada com H_2SO_4 até pH 1,8
- KOH 20%
- Solução de Brodie
- Suspensão celular
- Minerais

4.6 Adição de íons Cloreto ao ensaio respirométrico

Ensaio com diferentes concentrações de cloreto (100 e 200 mmol) também foram efetuados, com o intuito de detectar alterações durante a oxidação dos sulfetos em estudo, visto que íons Cl^- são capazes de modificar a cinética (V_0) dessas reações, através de mudanças morfológicas na estrutura superficial dos minerais, bem como na alteração das formas de complexos de cobre e cloro que são formados.

Nos ensaios com adição de cloreto, foram mantidas as mesmas proporções dos sulfetos minerais, da densidade de polpa e todos os parâmetros dos ensaios sem adição de Cl^- , excetuando-se a preparação uma solução concentrada de íons cloreto e fazendo-se as devidas diluições para que fossem obtidos 100 e 200 mmol de Cl^- em solução.

4.7 Preparo da suspensão celular para ensaios respirométricos

Para a realização dos ensaios respirométricos foram utilizadas suspensões celulares do *A. ferrooxidans* LR. As suspensões do *A. ferrooxidans* LR foram obtidas de culturas crescidas em um volume de 1,0 L do meio de cultura "T&K" por cerca 48 horas. Este crescimento foi acompanhado pela oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}), através de titulação redox com dicromato de potássio (Vogel, 1981). Após a completa oxidação do meio de cultura, a solução foi filtrada em papel de filtro Watman nº 1 para a retirada de precipitados do meio. A seguir a cultura foi centrifugada à temperatura de 4 °C e 4000 rpm durante 60 minutos para separação da massa celular (rotor JA-10, centrífuga BeckmanAvanti J-25). O precipitado contendo a suspensão celular foi então lavado em água acidificada com H_2SO_4 (pH=1,8) até a retirada completa de precipitados (jarositas). Após uma nova centrifugação a suspensão de células foi ressuspendida em um volume de 5mL de água acidificada a pH 1,8. Essa suspensão celular foi estocada em geladeira para posterior utilização.

4.8 Dosagem de proteínas totais

Como parâmetro indicativo da quantidade de células utilizou-se o teor de proteína total da biomassa celular. Uma fração (1 mL) da suspensão das células obtidas foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos e após o descarte do sobrenadante, as células são ressuspensas em NaOH 1 mol L⁻¹ e mantidas em ebulição por 30 minutos para sua completa hidrólise. Para a dosagem de proteína total alíquotas são retiradas dessa solução e a quantificação é realizada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972), como descrito a seguir:

4.8.1 Reagentes de Hartree

Solução A de Hartree:

KNaC₄H₄O₆.4H₂O ----- 0,5g
 Na₂CO₃ ----- 25g
 NaOH 1 mol L⁻¹ -----125 mL
 H₂O destilada----- q.s.p. 250 mL

Solução B de Hartree:

KNaC₄H₄O₆.4H₂O ----- 0,2 g
 CuSO₄.5H₂O----- 0,1 g
 NaOH 1 mol L⁻¹----- 1,0 mL
 H₂O destilada ----- 9,0 mL

Solução C de Hartree:

Reagente de Folin-Ciocalteu ----- 15,0 mL
 H₂O destilada ----- 45,0 mL

Padrão de soro-albumina bovina:

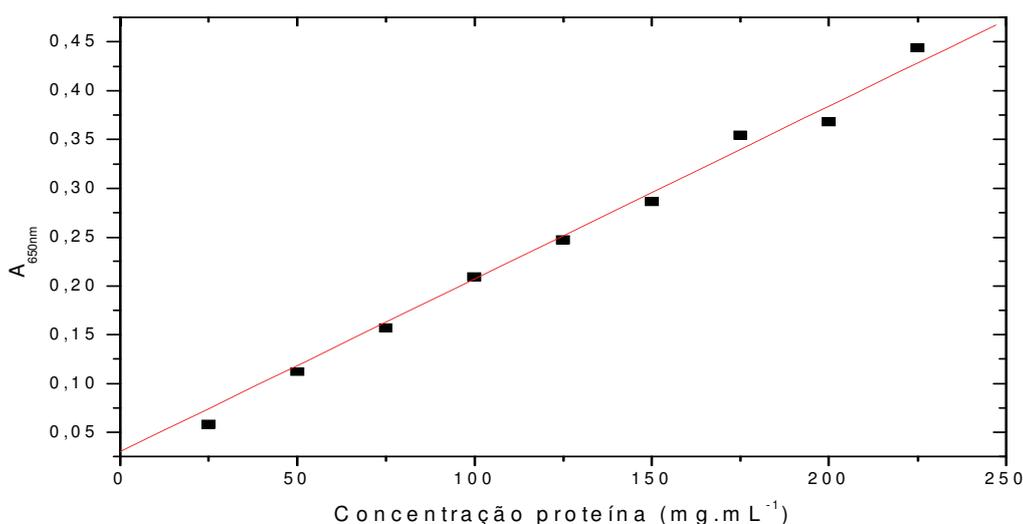
Soro-albumina ----- 0,025 g
 H₂O destilada ----- q.s.p. 50 mL
 Concentração final: 0,5 mg mL⁻¹

4.8.2 Procedimento de Hartree

A suspensão de células hidrolisadas foi diluída apropriadamente e colocada em tubos de ensaio (1mL de cada diluição), aos quais foram adicionados 0,9 mL da solução A de Hartree incubando-se em banho-maria por 10 minutos a uma temperatura de 50 °C, e resfriando em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 0,1 mL da solução B de Hartree a cada tubo, agitou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Por último adicionou-se 3mL da solução C de Hartree incubando-se os tubos por 30 minutos a 50 °C e resfriando a temperatura ambiente. Para a quantificação da proteína total, medidas da absorbância das soluções foram feitas em espectrofotômetro Femto 600S, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando-se a soroalbumina bovina para a obtenção da curva padrão.

As “proteínas totais” foram escolhidas como unidade biológica de rotina para expressar os resultados dos estudos de respirometria, pois o método utilizado é simples de ser realizado, preciso e muito sensível (15 -110 µg). Além disso, a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. ferrooxidans* como método de rotina é demorado (10 dias) e de difícil execução. A FIGURA 6 apresenta uma curva obtida seguindo o descrito anteriormente.

Figura 6:Exemplo de curva obtida acordo com o Método de Hartree.



Fonte: O autor.

Através dos dados da curva obtém-se uma equação que representa a função base para calcular a concentração de proteínas totais existente na suspensão celular.

4.9 Ensaios de biolixiviação em frascos agitados

Foram utilizados frascos erlenmeyers (250 mL) como reatores, mantidos em uma mesa agitadora com temperatura e rotação controlada (200 rpm, 30^oC), de forma a estabelecer o contato e a interação efetiva entre os minerais e o meio reacional. As condições utilizadas para esse estudo foram as seguintes:

Calcopirita/Pirita (m/m): 1Cp:1Py; 1Cp:3Py; 3Cp:1Py; 0Cp:1Py; 1Cp:0Py

Densidade de polpa: 2,5% (m/v)

Volume total: 150 mL

Inóculo: 5% (7,5 mL)

Para todas as condições mencionadas, foram realizados em paralelo os respectivos controles abióticos.

Os ensaios foram executados durante 32 dias, utilizando a linhagem *A. ferrooxidans* LR não adaptada e adaptada ao sulfeto mineral calcopirita. Após os frascos estarem prontos para se iniciar o experimento, os mesmos foram pesados a fim de se controlar a massa de água evaporada durante os experimentos, sendo esta, repostada semanalmente.

Foram retiradas alíquotas semanais (cerca de 10 mL) após a reposição da água de evaporação de acordo com a diferença verificada durante as pesagem efetuadas, e estas alíquotas eram centrifugadas, afim de se obter um sobrenadante que era destinado às análises da fase líquida e a retirada do precipitado para efetuar as análises dos sólidos.

4.9.1 Métodos de análise e acompanhamento dos sistemas – Fase Líquida

A técnica de titulação colorimétrica descrita por Karamanev (2006) foi utilizada para o acompanhamento das concentrações de íons férricos durante o ensaio. Houve o monitoramento na variação dos valores de pH/Eh, utilizando-se eletrodo combinado de vidro e eletrodo de platina (vsAg|AgCl|KCl_{sat}), visto que em uma solução, o potencial (Eh) da solução é alterado em função do par de íons Fe²⁺/Fe³⁺. A quantificação do cobre em solução foi feita pela técnica de espectroscopia de absorção atômica.

4.9.1.1 Determinação do Fe³⁺

O acompanhamento da concentração de Fe³⁺ em experimentos de biolixiviação é de grande importância, pois esse é um parâmetro central na indicação da atividade oxidativa da espécie *A. ferrooxidans*. O método foi descrito por Karamanev *et al.*, 2002.

Reagentes

Ácido sulfosalicílico (SSA) ----- 10%

Procedimento: uma alíquota de 100 µL de amostra foi adicionada em balão volumétrico de 100 mL, posteriormente foram adicionados 3mL de SSA e completou-se com H₂O destilada para volume final de 100 mL. Após agitação até completa homogeneização foi efetuada a leitura de absorbância do complexo formado (sulfosalicilato de Fe³⁺) utilizando λ=500 nm. O resultado foi analisado através da curva de calibração previamente obtida.

4.9.2 Métodos de análise e acompanhamento dos sistemas – Fase sólida

Os resíduos sólidos dos ensaios foram analisados pelas técnicas de difratometria de raios-X (DRX) e análises térmica (diferencial e termogravimétrica).

4.9.2.1 Difractometria de Raios-X (DRX)

Foram analisados os resíduos finais provenientes do ensaio de biolixiviação após 32 dias. Estas amostras foram secas em estufa a 60 °C por 1 dia e mantidas em tubos ependorf vedados e em atmosfera de argônio para manter inerte o ambiente antes do envio para posterior análise.

Para a obtenção dos difratogramas foi utilizado difratômetro de raios-X D5000 – Siemens, acoplado com um monocromador no feixe difratado. Os parâmetros nas medidas utilizados foram variação do ângulo 2θ , abertura das fendas, e voltagem das linhas de base, estabelecendo corrente de 30 mA e contagem de 40 KV, com linha de base inferior 0,520V e linha de base superior 1,620V, com tempo de contagem 2s, passo $0,05^\circ (2\theta)$, fendas 2/2/0,6 e ângulo de varredura de 10° a $70^\circ (2\theta)$. Foi utilizado porta amostra de teflon 47mm de diâmetro por 3 mm de espessura, com cavidade no centro de 15 ou 20 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade.

4.9.2.2 Análise térmica (DTA/DTG)

O enxofre é descrito na literatura como um agente passivador do processo oxidativo da calcopirita, assim utilizamos uma técnica termoanalítica para tentarmos caracterizar a presença do mesmo.

Análise térmica foi utilizada devido à sensibilidade da técnica na identificação e caracterização do enxofre formado durante o processo oxidativo. O intuito de utilizar essa técnica é detectar a formação do enxofre, pois através das análises de DRX, não é conclusivo quanto à formação do enxofre, sobretudo se a concentração deste for inferior a 1%.

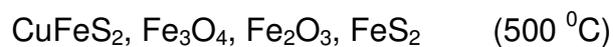
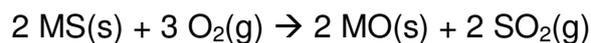
As condições utilizadas para estas análises foram:

- Razão de aquecimento: $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$
- Cadinho: alumina
- Massa da amostra: Aproximadamente 0,1 g
- Vazão: $100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ar sintético (60% N_2 :40% O_2)

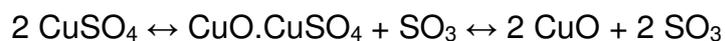
→ CuFeS₂: decompõe a 800 °C, liberando S.

Para razões de aquecimento entre 10 e 20 °C.min⁻¹ temos as seguintes etapas observadas em diferentes temperaturas:

→ Formação de óxidos :



→ Decomposição de CuFeS₂ em SO₄²⁻:



- Entre 350 °C e 440 °C, a superfície se oxida formando FeSO₄, CuSO₄ e Fe₂O₃.
- Na faixa de temperatura entre 440 °C e 500 °C, ocorre a oxidação (formação de sulfatos).
- Com o aumento da temperatura, o CuSO₄ se decompõe inicialmente em CuO.CuSO₄, em seguida se decompõe em CuO.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

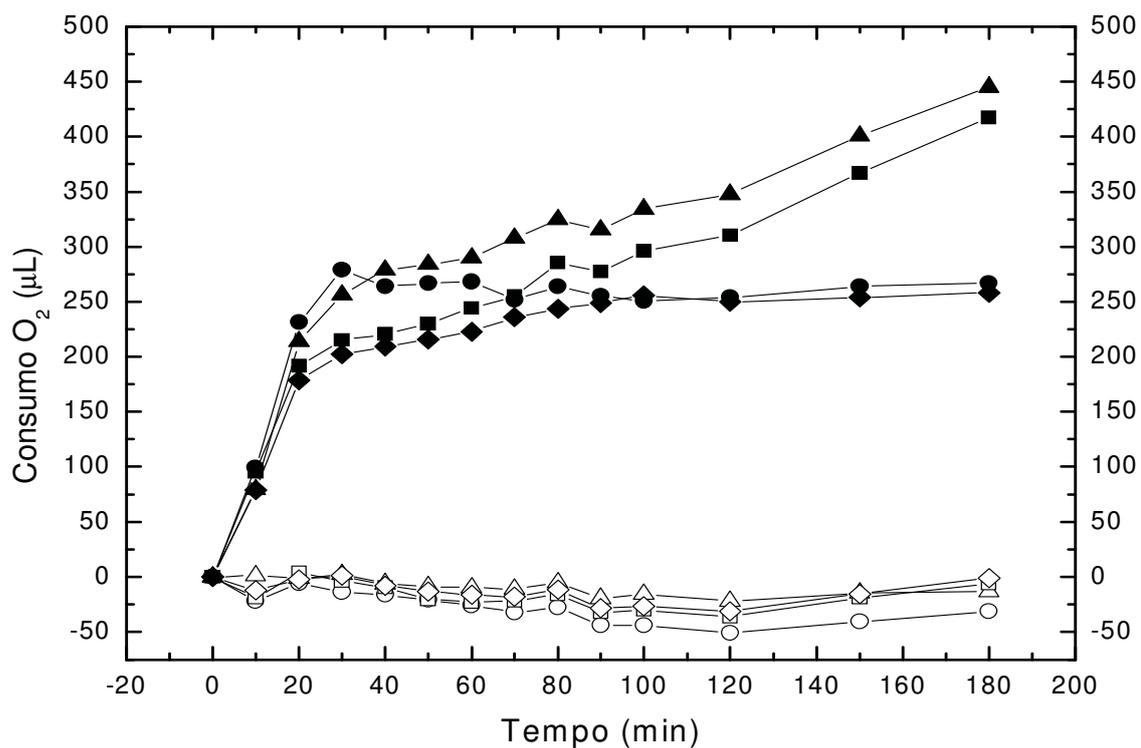
5.1 Ensaio utilizando *A. ferrooxidans*-LR não adaptadas à calcopirita

Nestes experimentos, foram utilizadas bactérias crescidas em meio contendo apenas sulfato ferroso como fonte energética para seu crescimento, de acordo com o descrito no item 3.2.

5.1.2 Respirometria celular

Todas as relações de massa entre os minérios testados (massa final: 100 mg) apresentaram uma cinética inicial de oxidação bastante semelhante, conforme pode ser visto na FIGURA 7. Com o tempo, as curvas se afastaram e observou-se uma pequena alteração no consumo de oxigênio entre elas, conseqüentemente uma diferença velocidade de oxidação de cada ensaio. Entretanto o tipo de curva semelhante entre os ensaios 1Cp:3Py e 1Cp:1Py, sugere o mesmo mecanismo, obtendo-se valores próximos do consumo de oxigênio. Para a condição 3Cp:1Py temos o menor consumo de oxigênio dentre os 3 ensaios, este fato pode ser atribuído à calcopirita ser mais refratária do que a pirita; assim, estando em maior proporção diminui a cinética oxidativa da reação. O efeito puramente químico, aliado à curta duração do experimento como na condição dos ensaios abióticos, não apresentaram praticamente nenhum consumo de oxigênio, o que demonstra que a presença de pirita, por si só, não é suficiente para provocar uma dissolução química da calcopirita. Em linhas gerais pode-se afirmar que a presença de pirita promoveu uma taxa mais elevada na oxidação da calcopirita na presença de *A. ferrooxidans* LR. O efeito puramente químico não foi percebido devido ao tempo curto de realização deste experimento, sendo que os controles abióticos foram semelhantes entre todas as condições testadas.

Figura 7: Atividade respiratória do *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3Cp / 1 Py; ▲/△: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp/ 1 Py; ◆/◇: 1Cp/0Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



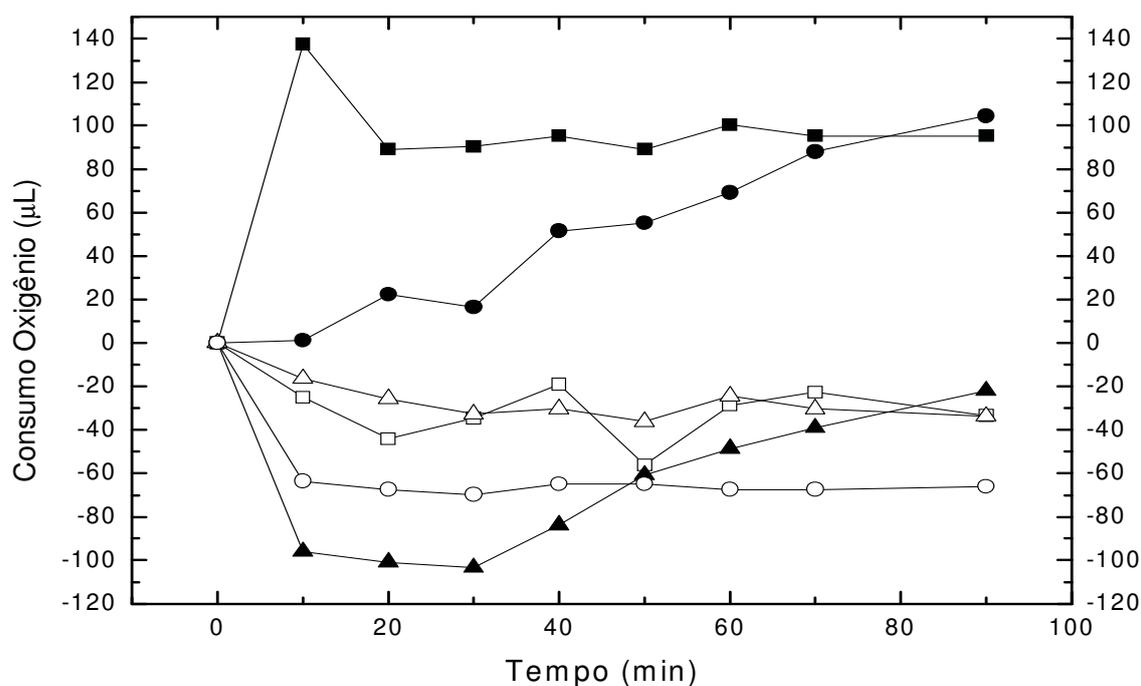
Fonte: O autor.

5.1.2.1 Adição de íons cloreto

Os estudos respirométricos com a adição de Cl^- , mostraram que a cinética da reação é inibida, tanto com 100 mmol (FIGURA 8) e 200 mmol (FIGURA 9) de íons na solução. Em ambos os casos detectamos respiração bacteriana, porém claramente temos uma inibição no consumo de oxigênio. Temos uma particularidade na condição de 100 mmol de Cl^- (1 Cp: 3 Py), na qual observamos produção de gases pelos valores negativos medidos, esse fato ainda não está completamente elucidado, cabendo ainda uma exploração mais profunda à respeito das possíveis reações que ocorrem e os produtos possíveis de serem gerados.

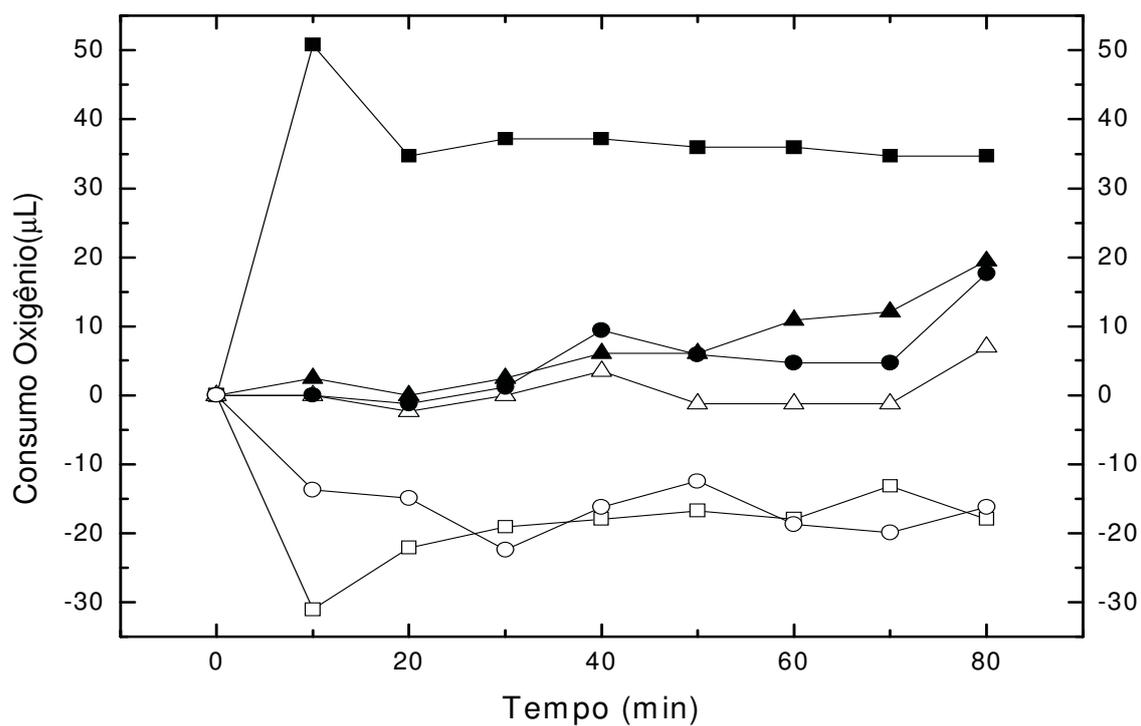
Devido ao fato de não obtermos resultados positivos para a adição de íons cloreto associados ao par galvânico, não foram realizados estudos de biolixiviação em frascos com a adição de tais íons.

Figura 8. Atividade respiratória do *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais com adição de 100 mmol de cloreto: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

Figura 9: Atividade respiratória do *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais com adição de 200 mmol de cloreto: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

5.1.3 Ensaio de biolixiviação em frascos agitados

5.1.3.1 Resultados das análises da fase líquida

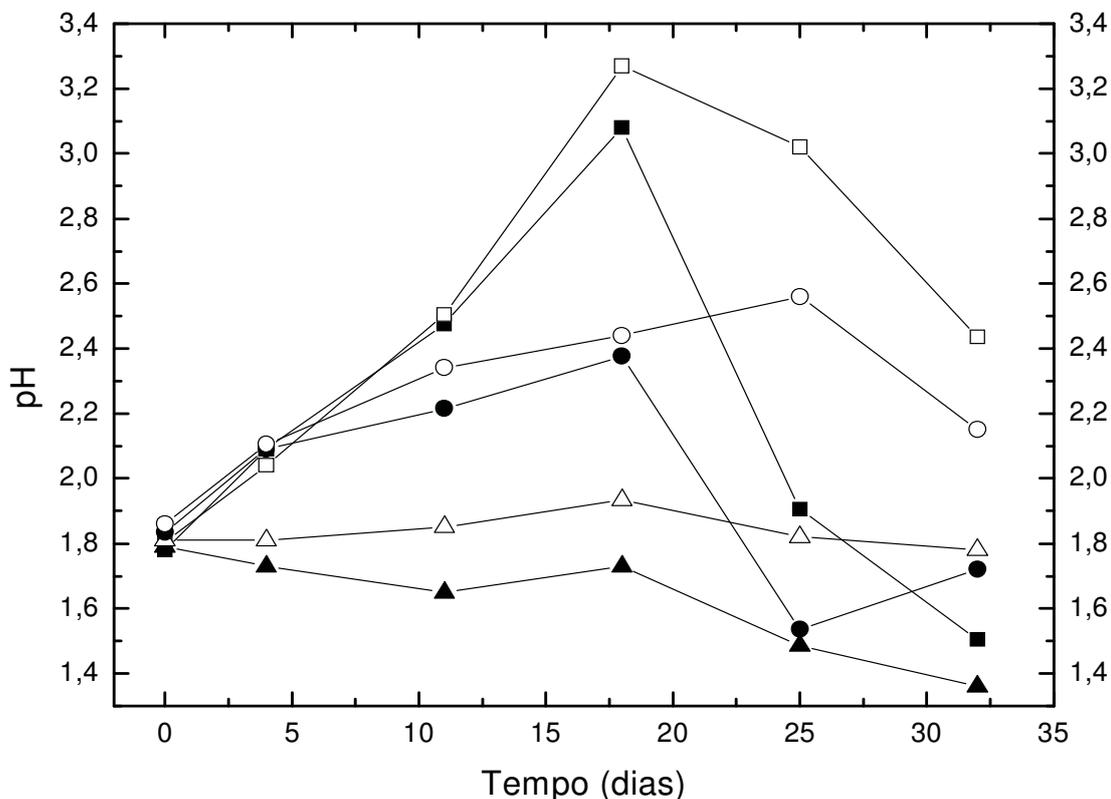
Para efetuar essas análises, a amostragem foi efetuada de acordo com o item 3.9.

5.1.3.1.1 Análise do pH

Na FIGURA 10 estão representados os resultados da variação do pH durante o experimento de biolixiviação em frascos, evidenciando o consumo inicial de ácido pelo sistema e posteriormente, a redução nos valores de pH, justificado pela formação de ácido durante a oxidação bacteriana.

A condição de 1Cp : 3Py apresentou os menores valores de pH durante todo o ensaio, devido a produção de ácido pela oxidação química e bacteriana do enxofre presente na pirita, um mineral bem menos refratário que a calcopirita (mais nobre). Apesar da pirita ser mais nobre, podemos considerar que ela se lixívia por estar presente em solução em uma quantidade 3 vezes superior, assim temos uma quantidade significativa de pirita em solução em relação à calcopirita, levando à dissolução deste sulfeto paralelamente, porém não de forma preferencial à oxidação da calcopirita. A condição inversa de 3Cp : 1Py apresentou, por outro lado, os maiores valores de pH, pois mesmo devido à baixa dissolução inicial da calcopirita que é consumidora de ácido aliado à alta refratariedade da calcopirita, temos um problema significativo para a oxidação bacteriana desse sulfeto e conseqüentemente a baixa produção de ácido sulfúrico no meio reacional.

Figura 10: Variação do pH no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.

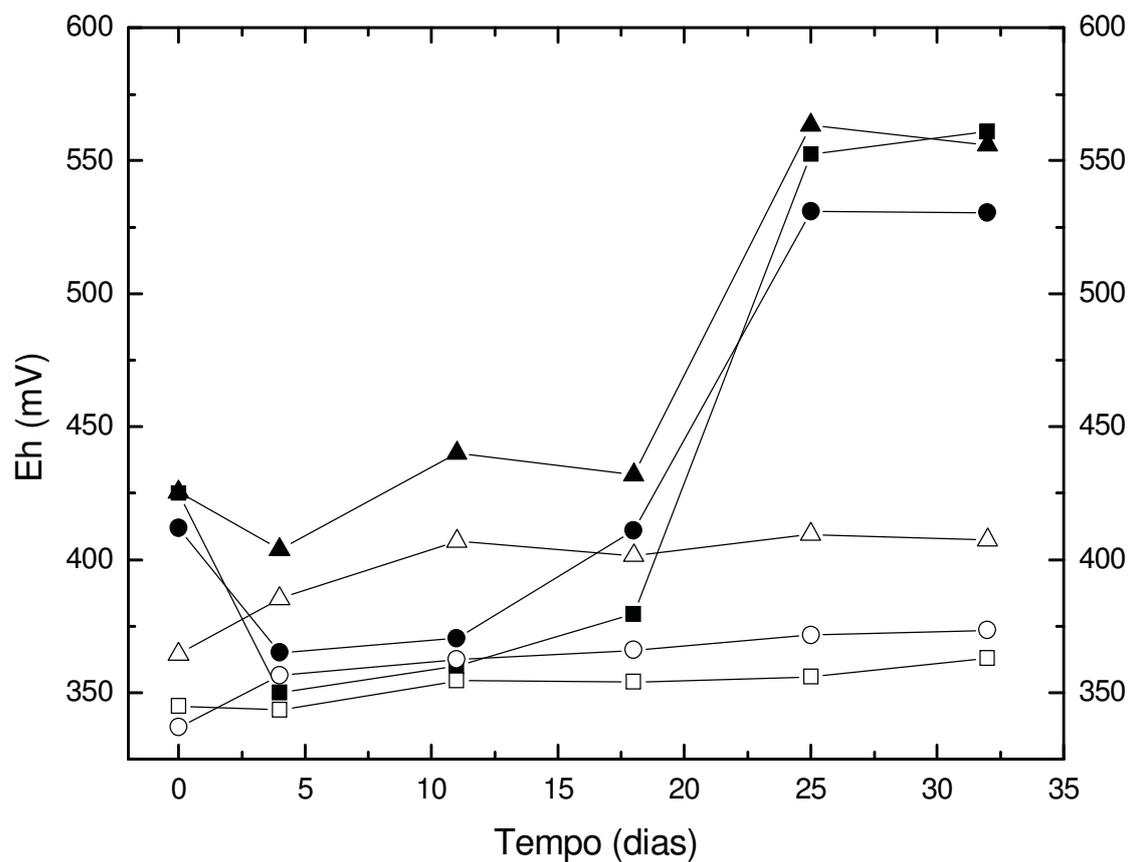


Fonte: O autor.

5.1.3.1.2 Análise do Eh

O valor do potencial de óxido-redução (Eh), FIGURA 11, nos dá um indicativo de como o sistema se comportou em relação à oxidação dos substratos presente no meio reacional (minerais) caracterizando-se pelo aumento e chegando a valores superiores a 500 mV nos frascos inoculados. Ao contrário, os frascos utilizados como controles abióticos não apresentaram um aumento no potencial da solução (< 420mV), evidenciando a eficiência da bactéria como catalisador do processo oxidativo mineral.

Figura 11: Média da variação do potencial de óxi-redução no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos. Estão apresentadas as curvas do valor médio das duas duplicatas de cada tratamento.

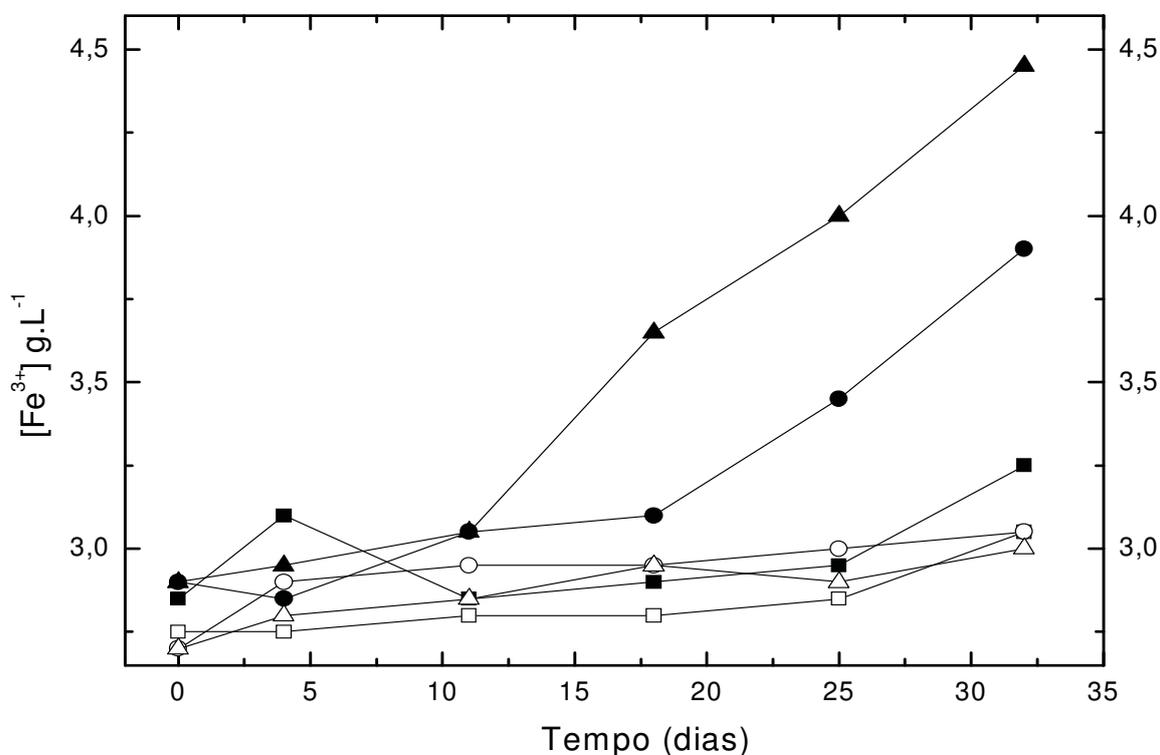


Fonte: O autor.

5.1.3.1.3 Determinação de íons Fe^{3+}

Em relação às análises das concentrações de íons Fe^{3+} em solução, pode-se observar um pequeno aumento na concentração de Fe^{3+} durante o ensaio nos tratamentos inoculados (FIGURA 12). Este comportamento já era esperado uma vez que o potencial de óxido-redução elevou-se durante o experimento nos frascos inoculados. Os valores de Fe^{2+} (não mostrados) foram coerentes com a determinação do íon férrico: não detectados nos frascos inoculados, como consequência da oxidação bacteriana e nos frascos controles uma presença em concentrações próximas aquelas de Fe^{3+} , justificando os valores baixos do potencial de óxido-redução.

Figura 12. Variação na concentração de Fe^{3+} no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



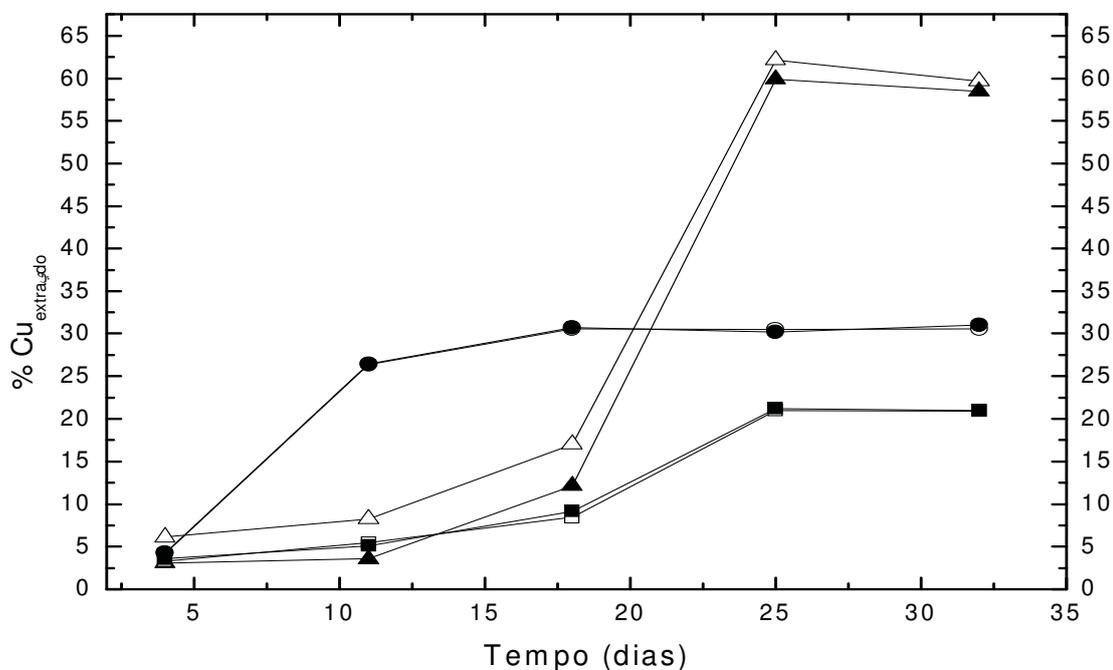
Fonte: O autor.

5.1.3.1.5 Concentração de Cu

Na FIGURA 13 estão apresentadas as porcentagens de recuperação do cobre durante o ensaio, nas várias condições estabelecidas. Pode-se observar que para a condição estudada de 1Cp : 3Py foi obtida a maior recuperação deste metal (~ 60%), seguida da condição de 1Cp:1Py (~ 30%), obtendo como menor valor absoluto de recuperação de cobre para os ensaios realizados utilizando-se a condição de 3Cp:1Py (~ 20%). A presença da pirita parece ter exercido um efeito positivo na dissolução da calcopirita. Podemos associar à maior dissolução da calcopirita pelo efeito galvânico produzido quando em contato com a pirita em solução. A diferença de potencial de repouso entre os sulfetos minerais (calcopirita e pirita), provoca uma indução no fluxo de elétrons, aumentando assim a cinética oxidativa da calcopirita, e conseqüentemente a recuperação de cobre. Diferentemente dos resultados respirométricos, que apresentaram diferenças significativas entre os ensaios inoculados e os ensaios controles, os ensaios de biolixiviação apresentaram resultados muito semelhantes entre eles, evidenciando a lixiviação química da calcopirita na presença de pirita. Apesar dos ensaios inoculados apresentarem potenciais de oxido-redução superiores aos ensaios controles (FIGURA 10), esta atmosfera oxidante não provocou uma maior solubilização da calcopirita.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, com esta mesma amostra mineral (Lahti,H.,2009; Melo, W. C. M. A., 2010), obtiveram uma recuperação média de 30 % de Cu em solução na presença de bactéria após 40 dias de ensaio. Em comparação com esses dados, podemos inferir um efeito positivo significativo utilizando a interação galvânica como descrito anteriormente.

Figura 13. Recuperação de cobre (%) no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

5.1.3.2 Resultados das análises da fase sólida

5.1.3.2.1 Análise Térmica

A análise da decomposição térmica da calcopirita (FIGURA 14), mostrou a formação do enxofre ao final do processo de oxidação.

A análise térmica nos indicou que a decomposição inicial de CuFeS_2 libera SO_2 e é seguida imediatamente por um ganho de massa entre 330°C e 350°C . Acima de 450°C , temos presente o CuSO_4 e Fe_2SO_3 . Acima de 600°C até 850°C , temos a oxidação e formação dos produtos finais, onde ocorre a decomposição de CuSO_4 em CuO , e este último reage com Fe_2SO_3 para formar ferrita.

Através da curva obtida (FIGURA 14), pode-se concluir que a massa de enxofre formada corresponde a 10% da massa inicial.

Figura 14: Curvas TG (DTA/DTG) para o resíduo final na condição (3Cp:1Py) após o experimento de biolixiviação utilizando de bactérias não adaptadas ao sulfeto mineral.

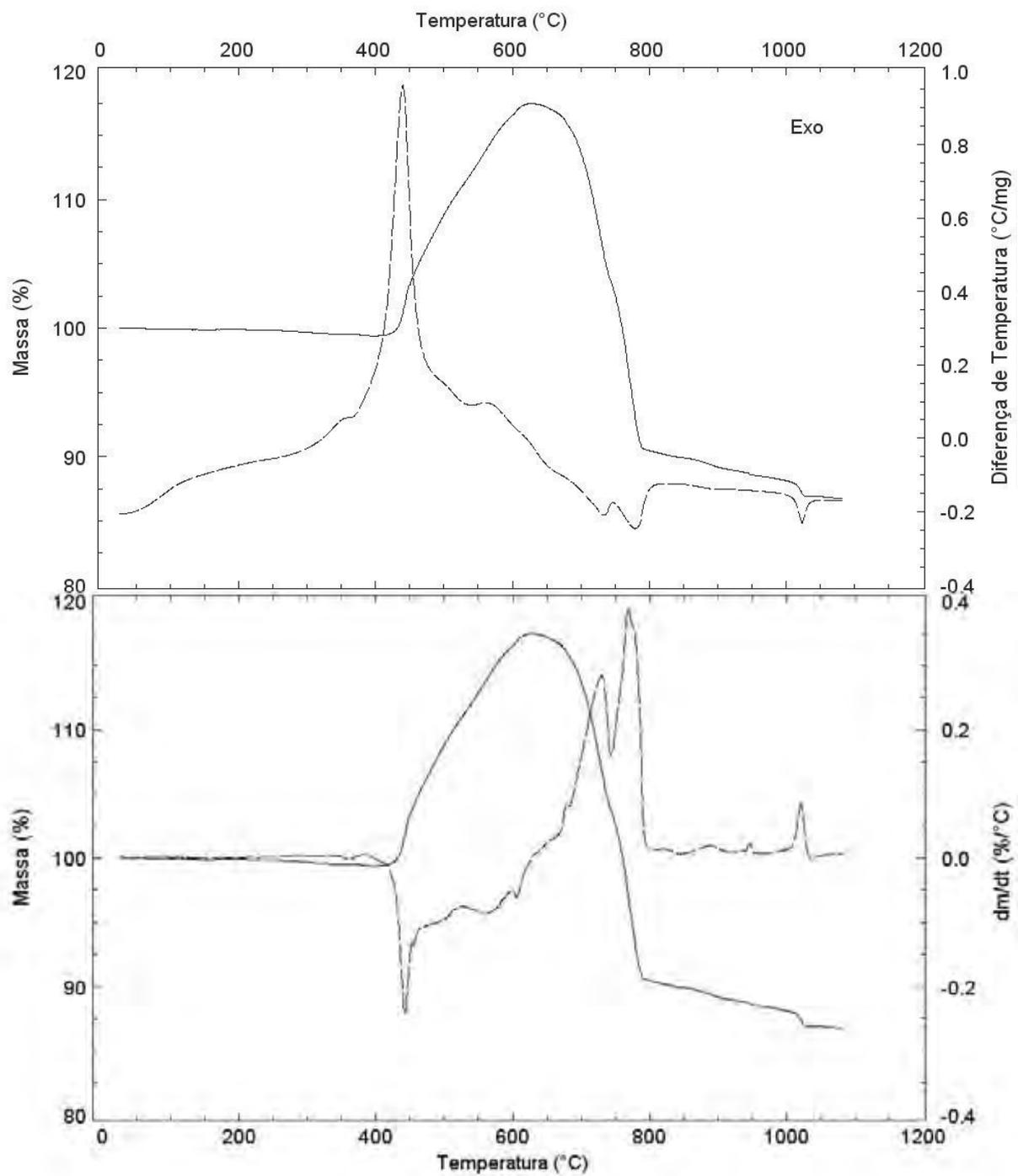


Figura 13: O autor.

5.1.3.2.2 Análise por Difractometria de Raios-X

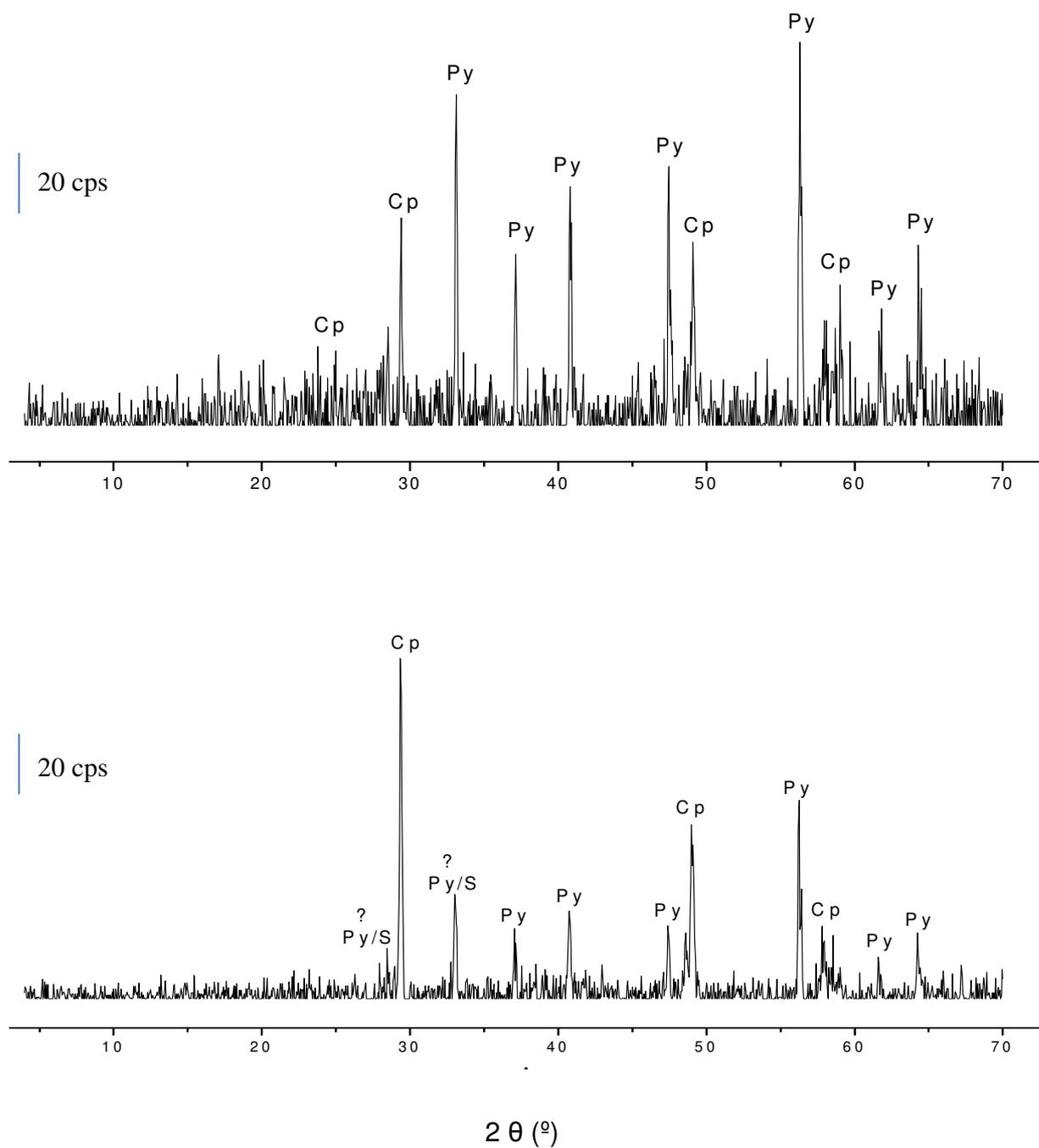
Os dados apresentados nas FIGURAS 15, 16 e 17, representam os dados obtidos com os resíduos finais após os ensaios de biolixiviação.

O intuito destas análises foi o de identificar a possível formação de novas fases cristalinas, incluindo o enxofre, nos sulfetos minerais após o ataque químico e bacteriano realizado através dos experimentos de biolixiviação.

Em todas as condições testadas, não foi possível detectar essas novas fases, pois consideramos que para afirmarmos quanto à presença de uma nova formação, buscamos detectar pelo menos os 3 picos principais, e os mesmos não foram encontrados de forma clara. Como exemplo, podemos citar os 3 principais picos do enxofre, os quais 2 deles se apresentam na mesma posição dos picos de pirita e calcopirita, que é sabido que está presente na amostra.

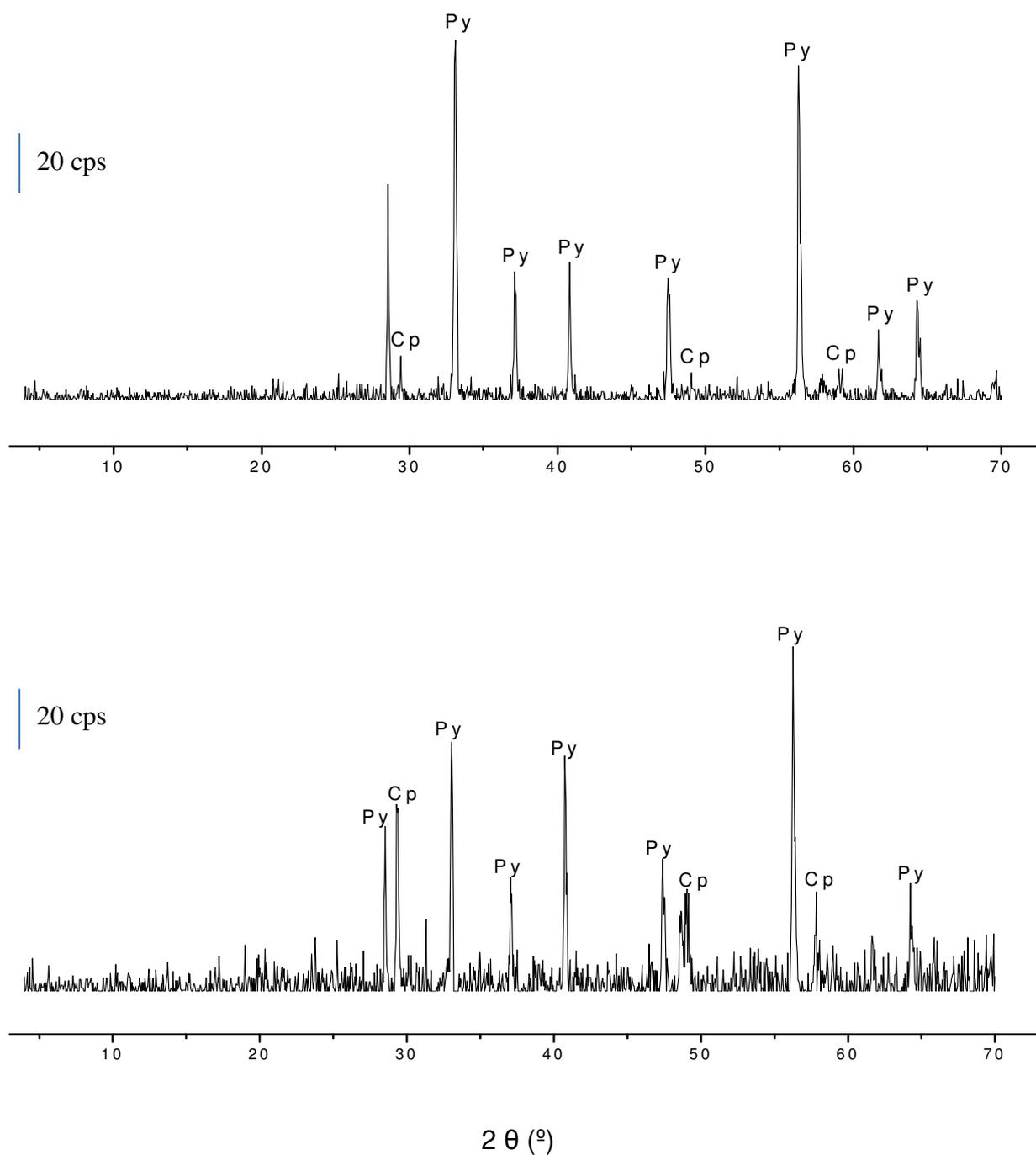
O enxofre foi o foco principal desse ensaio, pois a literatura descreve a formação de uma camada passivadora na superfície dos sulfetos metálicos, compostas por diferentes formas de enxofre, que inibe o processo oxidativo, limitando ou até mesmo inibindo a oxidação da calcopirita e tornando o processo ineficiente.

Figura 15: Difratogramas de raios-x para os resíduos provenientes dos ensaios de biolixiviação referente à condição 1Cp:1Py. O gráfico superior é referente ao ensaio abiótico e o inferior referente ao ensaio inoculado. Legenda: Cp: calcopirita; Py: pirita; S: enxofre. $\lambda_{CuK\alpha}$



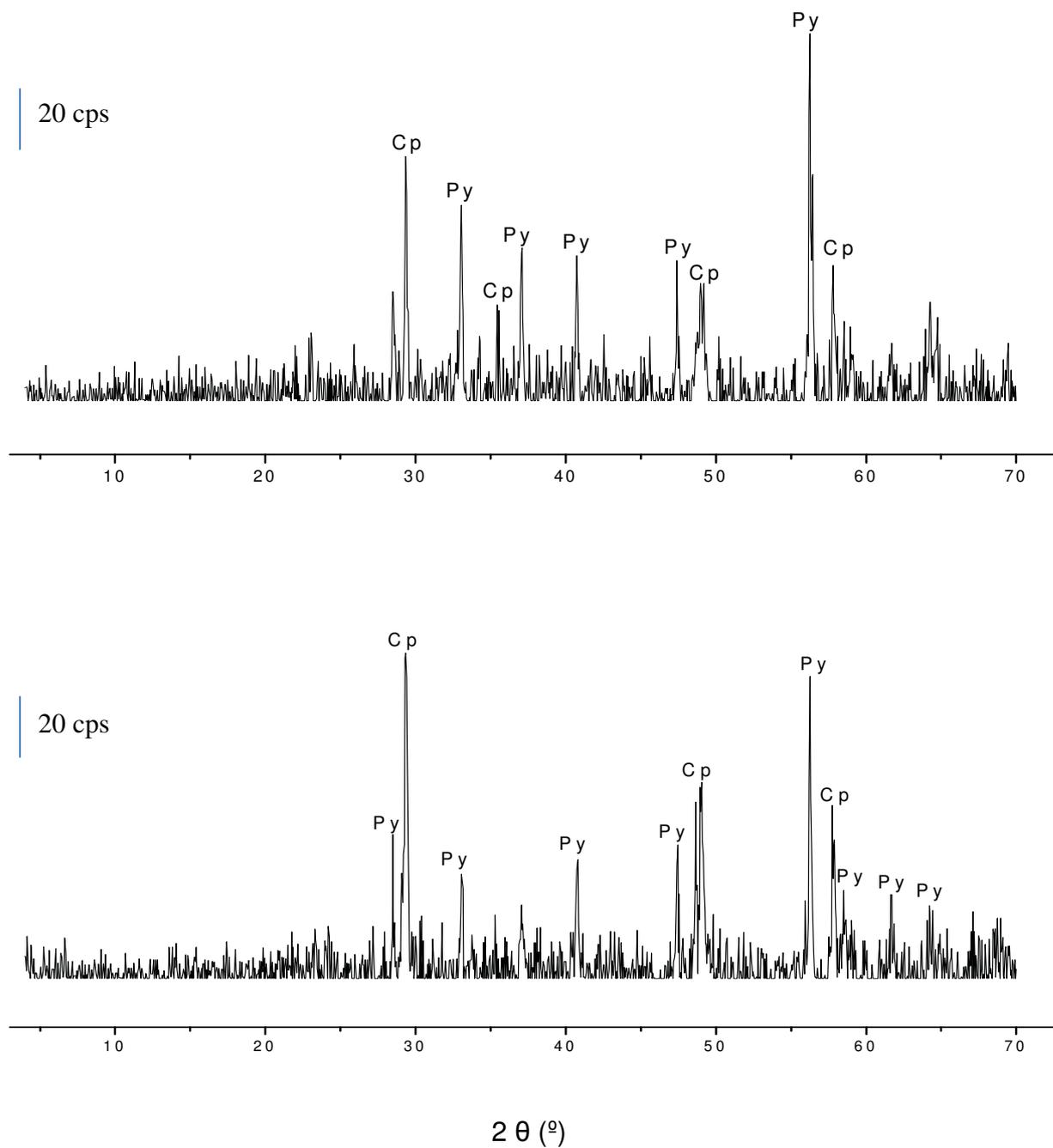
Fonte: O autor.

Figura 16: Difratoformas de raios-x para os resíduos provenientes dos ensaios de biolixiviação referente à condição 1Cp:3Py. O gráfico superior é referente ao ensaio abiótico e o inferior referente ao ensaio inoculado. Legenda: Cp: calcopirita; Py: pirita; S: enxofre. $\lambda_{CuK \alpha}$



Fonte: O autor.

Figura 16: Difratogramas de raios-x para os resíduos provenientes dos ensaios de biolixiviação referente à condição 3Cp:1Py. O gráfico superior é referente ao ensaio abiótico e o inferior referente ao ensaio inoculado. Legenda: Cp: calcopirita; Py: pirita; S: enxofre. $\lambda_{CuK\alpha}$



Fonte: O autor.

5.2 Ensaio utilizando *A. ferrooxidans*-LR adaptadas à calcopirita

5.2.2 Ensaio de biolixiviação em frascos agitados

5.2.2.1 Análise do pH

Na FIGURA 18 são apresentados os dados referentes ao monitoramento do pH durante os experimentos utilizando bactérias previamente adaptadas à calcopirita, caracterizado por um leve consumo inicial de ácido no meio reacional em todas as condições experimentadas, inclusive nos ensaios abióticos.

Após 5 dias decorridos do início do experimento, observamos o início da ação oxidativa bacteriana nos frascos contendo o *A. ferrooxidans* adaptado à calcopirita. Esse fato é justificado através da diminuição do pH nesses frascos inoculados com o micro-organismo, pois, através do processo oxidativo dos sulfetos metálicos, há a liberação de ácido em solução e a consequente redução nos valores de pH.

Assim como no experimento utilizando de bactérias não adaptadas à calcopirita, neste ensaio também observamos que a condição de 1Cp:3Py, devido à menor refratariedade da pirita que está presente em maior concentração no meio, liberando maior quantidade de ácido no meio.

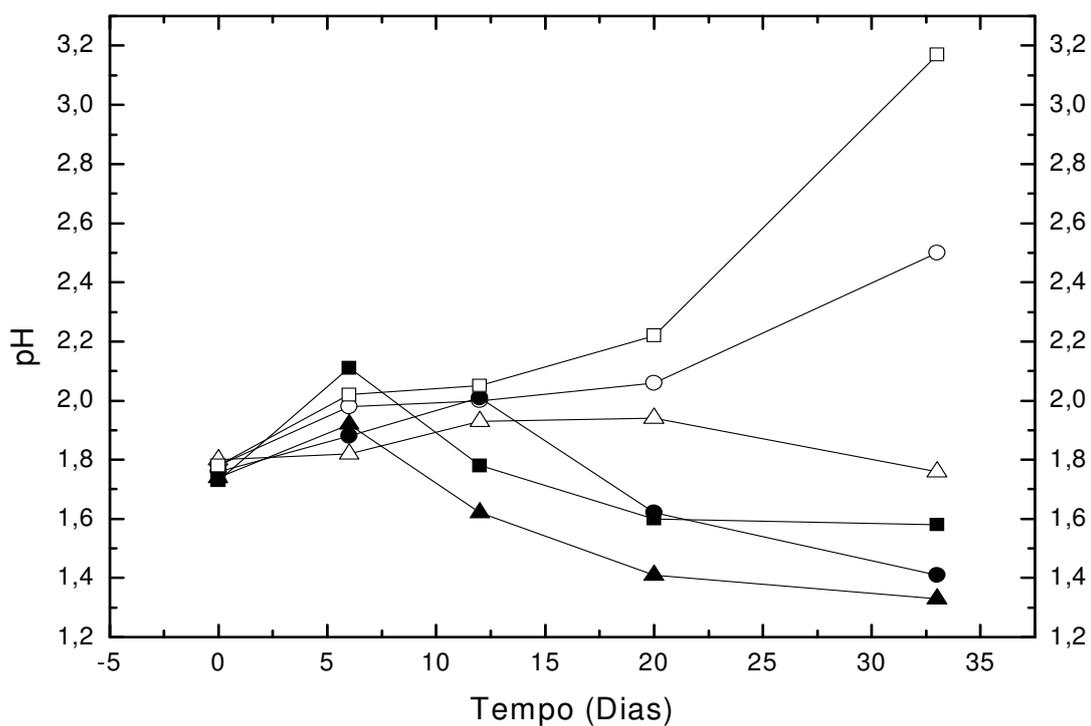
A condição inoculada 3Cp:1Py, na qual o sulfeto calcopirita que está em maior quantidade, apresentou valores maiores de pH durante praticamente todo o experimento. Esse fato se justifica pela alta refratariedade deste sulfeto frente à pirita, sendo um dos grandes problemas para a ação oxidativa bacteriana ocorrer no meio e levar à recuperação do cobre.

Diferentemente dos ensaios utilizando-se de bactérias não adaptadas à calcopirita, nesse experimento observou-se uma diferença significativa nos valores de pH para os respectivos controles abióticos em todas as condições testadas.

O experimento abiótico 3Cp:1Py apresentou os maiores valores de pH, devido à necessidade maior de consumo de ácido para oxidação da calcopirita que está presente de forma mais abundante nesta condição.

A condição 1Cp :3Py se comportou como no experimento inoculado, onde devido à maior quantidade de pirita, temos uma menor refratariedade no meio, além de termos um geração maior de ácido com a oxidação química.

Figura 18: Variação do pH no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR adaptadas à calcopirita, em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; △/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

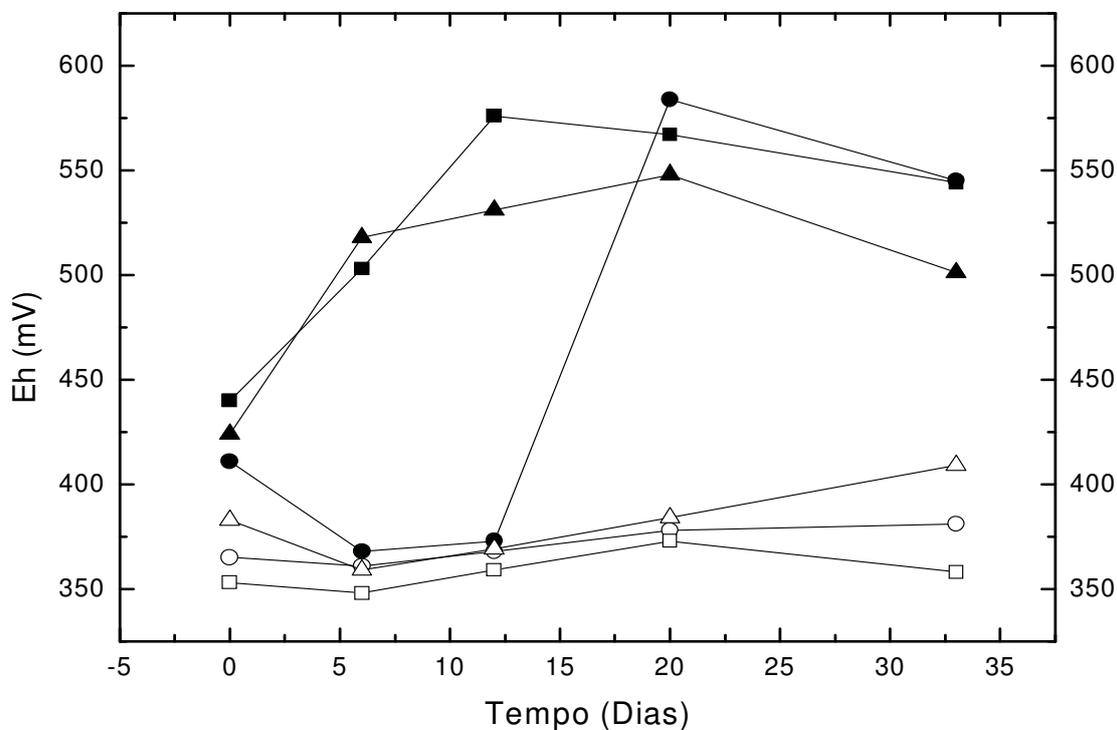
5.1.3.2 Análise do Eh

A FIGURA 19 representa o comportamento das alíquotas coletadas durante os experimentos, evidenciando a evolução do potencial de oxi-redução (Eh), para os experimentos utilizando bactérias adaptadas à calcopirita.

Observa-se claramente o efeito positivo do *A. ferrooxidans* no processo oxidativo, pois os meios inoculados contendo todas as proporções testadas atingem potenciais superiores a 500 mV, fato este justificado pela oxidação obtida no meio reacional.

Os controles abióticos mantiveram-se durante todo o experimento abaixo dos 410 mV, evidenciando que não há uma oxidação significativa no meio reacional como verificado nos experimentos inoculados.

Figura 19: Variação do potencial de óxi-redução no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR adaptadas à calcopirita em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

5.2.2.3 Determinação de íons Fe^{3+}

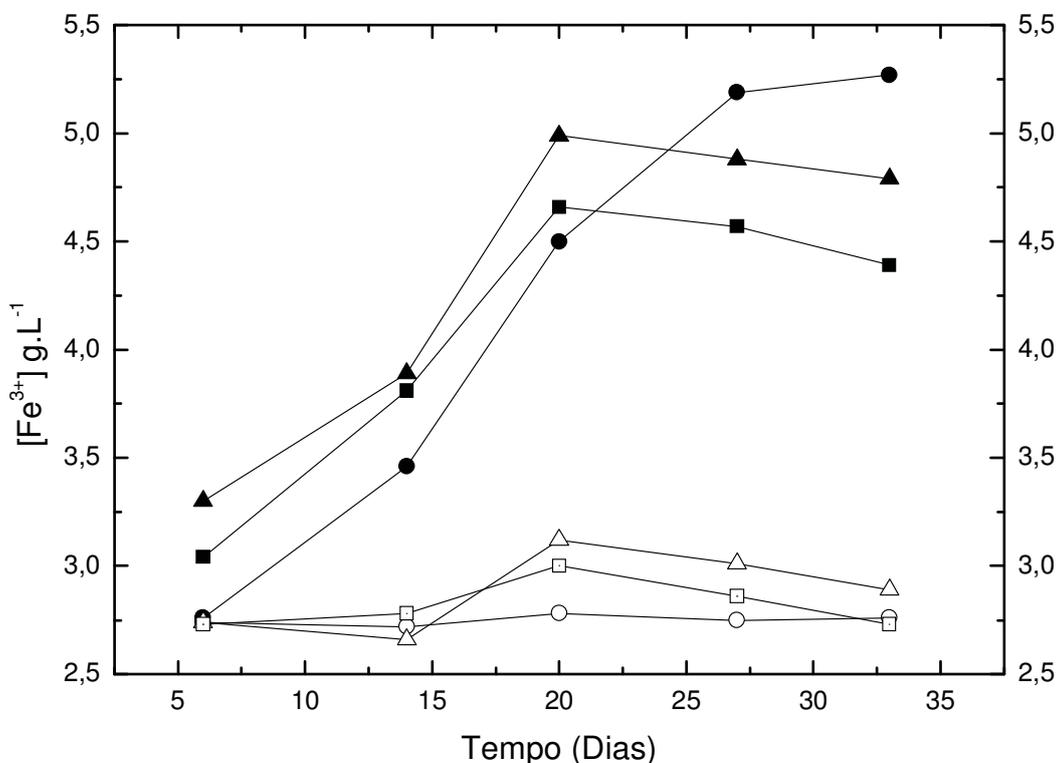
Uma das diferenças relevantes entre os ensaios com bactérias adaptadas e sem adaptação pode ser observada na FIGURA 20, que apresenta os valores para a concentração de íons férricos entre os meios reacionais que continham o *A. ferrooxidans* e os frascos controles abióticos, caracterizando mais uma vez o efeito positivo da bactéria em oxidar os sulfetos minerais.

Outra questão a ser destacada, é o aumento na velocidade de oxidação do meio reacional, visto que nos experimentos sem a prévia adaptação ao sulfeto mineral, a concentração máxima de íons férricos obtida foi de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ com mais de 30 dias de ensaio, apenas para a condição 1Cp:3Py.

Já no presente ensaio, conseguimos alcançar valores superiores a estes logo após 20 dias do início do experimento, evidenciando dessa forma a otimização conseguida através da prévia adaptação da bactéria ao substrato mineral.

Porém, como já ressaltado anteriormente, esta atmosfera mais oxidante não provocou um aumento na recuperação de cobre.

Figura 20: Variação na concentração de Fe^{3+} no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR adaptadas à calcopirita em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp / 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

5.6.2.4 Concentração de Cu

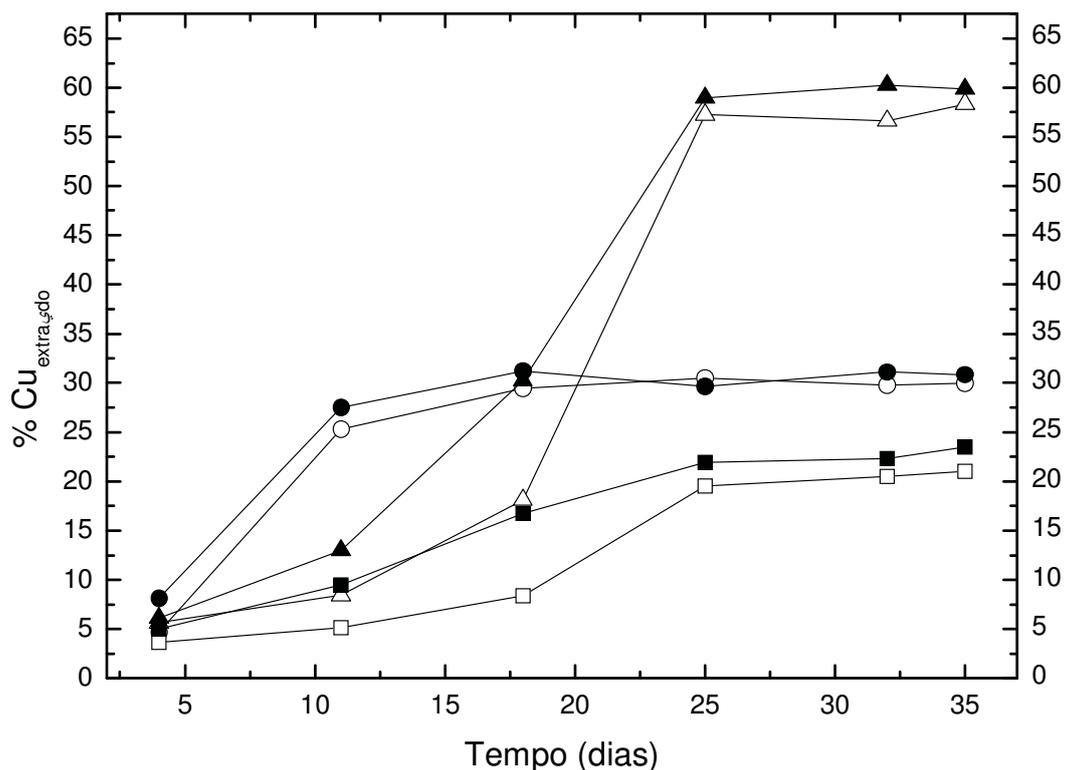
Assim como para o ensaio utilizando-se de bactérias não adaptadas, temos uma maior recuperação de cobre para a condição 1Cp:3Py, de aproximadamente 60 % de cobre presente na amostra inicial.

Foi observada também uma significativa variação em relação à velocidade inicial com que algumas condições se oxidaram, e de forma conseguinte, liberaram o cobre em solução, destacando-se os ensaios inoculados, evidenciando a oxidação bacteriológica em sinergia com a interação galvânica.

Para exemplificar o efeito positivo da adaptação bacteriana ao sulfeto mineral, juntamente com o efeito galvânico, podemos observar que a condição 1Cp : 3Py aumentou de 10 % para 30 % o valor da concentração de cobre em

solução, ambas as alíquotas coletadas após 18 dias de experimento. Podemos observar na FIGURA 21, a evolução da concentração de Cu em solução.

Figura 21. Recuperação de cobre (%) no ensaio de biolixiviação por *A. ferrooxidans* LR em diferentes proporções (m/m) dos sulfetos minerais: ■/□: 3 Cp / 1 Py; Δ/▲: 1 Cp / 3 Py; ●/○: 1 Cp/ 1 Py. Os símbolos fechados representam os ensaios inoculados e os abertos os respectivos controles abióticos.



Fonte: O autor.

6 CONCLUSÕES

Os ensaios respirométricos foram conclusivos no sentido de poder afirmar que a interação galvânica, originada da composição da mistura entre calcopirita e pirita em diferentes proporções, favoreceu o efeito oxidativo bacteriológico dos substratos minerais. Fato esse evidenciado pelo aumento no consumo final de oxigênio em 2 ensaios inoculados testados (1Cp:3Py e 3Cp:1Py) e um aumento na cinética inicial na condição 1Cp : 1Py em relação ao ensaio controle que continha somente a calcopirita.

A adição de íons cloreto (100 e 200 mmol)inibiu o processo oxidativo nos ensaios respirométricos em todas as condições testadas. Uma particularidade foi a condição com a adição de 100 mmol de íons Cl^- e a relação de 1Cp: 3Py, na qual verificamos a formação de gases devido à durantes as medições do consumo de oxigênio durante o experimento, fato este não elucidado cabendo ainda alguns estudos a respeito.

Nos ensaios de biolixiviação em frascos agitados, os frascos controles e inoculados não apresentaram diferenças significativas na recuperação de cobre apesar da diferença de potencial de óxido-redução entre as condições, o que demonstra que um ambiente mais oxidante não significa necessariamente maior recuperação do metal.

O efeito galvânico extremamente positivo gerado pela mistura de calcopirita e pirita, mais especificamente a condição de 1Cp:3Py ficou evidente pelo fato de conseguirmos recuperar aproximadamente 60 % de todo o cobre presente na amostra inicial.

Com a adaptação bacteriana à calcopirita, conseguimos um aumento na taxa de solubilização do cobre, que se elevou de aproximadamente 10 % para 30 % após 18 dias de experimento, para a condição de 1Cp : 3 Pyna presença de células adaptadas. A condição de maior dificuldade frente ao ataque químico e biológico (3Cp : 1Py) devido à maior relação de calcopirita (mais refratário) também apresentou elevação nos valores de solubilização de cobre

com um aumento de 8 % para 15 % aproximadamente, para o mesmo tempo de experimento (18 dias).

As análises de íons férricos (Fe^{3+}), Eh e pH foram bastante semelhantes nos ensaios com o *A. ferrooxidans* adaptado e não adaptado à calcopirita. Houve a diferenciação entre eles, assim como no caso da recuperação de cobre, pelo fato de conseguirmos alcançar valores para potenciais e concentração de íons Fe^{3+} mais rapidamente com a utilização das bactérias provenientes da etapa prévia de adaptação, assim como a obtenção de valores menores para o pH, durante praticamente todo o experimento.

Com os resíduos provenientes do ensaio de biolixiviação em frascos sem a adaptação bacteriana, realizamos os testes para detecção de novas fases, possíveis de serem geradas após a lixiviação. Devido à semelhança entre os picos originais da amostra e os picos das possíveis novas fases cristalográficas, como o enxofre, não podemos afirmar através dessa técnica que existe a formação do mesmo. Podemos afirmar que as condições utilizadas nestes ensaios não propiciaram a formação de precipitados, fato comum em ensaios de lixiviação com a presença de ferro.

A termogravimetria realizada com os resíduos finais dos ensaios de biolixiviação, foi capaz de nos mostrar que ao final do processo, temos cerca de 10 % em massa de compostos oxidados contendo enxofre, enfatizando a limitação causada pelo enxofre, e amplamente discutida na literatura em termos do seu efeito passivador na superfície dos minerais, inibindo uma maior recuperação do cobre.

O sucesso do trabalho se deu principalmente por conseguirmos um aumento de quase 100 % na recuperação do metal em relação à outros estudos já realizados e descritos pela literatura, revelando-se um processo promissor.

REFERÊNCIAS

ABRAITIS, P. K.; PATTRICK, R. A. D.; KELSALL, G. H.; VAUGHAN, D. J. Acid leaching and dissolution of major sulfide ore minerals: process and galvanic effects in complex systems. **Electrochem. Soc. Proc**, v. 2003, p. 143-154, 2003.

ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C. Bioleaching of minerals - a valid alternative for developing countries. **J. Biotechnol.**,v.31, p. 115-123, 1993.

AHONEN, L.; TUOVINEN, O. H. Redox-potential-controlled bacterial leaching of chalcopyrites ores. In: HOLE, J. **Biohydrometallurgical technologies**. Wyoming: TMS, 1993. v. 1, p. 571-578.

ALBUQUERQUE JUNIOR, C. R. F.; DUTRA, A. J. B.; MONTE, M. B. M. Estudo eletroquímico da interação galvânica entre pirita e arsenopirita. **Tecnologia em Metalurgia e Materiais**, v. 2, p. 30-33, 2006.

BALLESTER, A.; CORDOBA, E. Hidrometalurgia de la calcopirita: innovations in the hydrometallurgical processing of sulphides. In: HYDROCOPPER, 4th., 2005, Santiago. **Proceedings...** Santiago, 2005.

BERTHELOT, D.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. Temperatures studies of iron-oxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs isolated from uranium mines. **Can. J. Microbiol.**,v. 39, p. 384-388, 1993.

BEVILAQUA, D. **Solubilização da calcopirita (CuFeS₂) e da bornita (Cu₅FeS₄) por *Tiobacillus ferrooxidans***. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

BEVILAQUA, D. **Estudoda interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS₂) e bornita (Cu₅FeS₄)**. 2003. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BHATTACHARYYA, S.; CHAKRABARTY, B. K.; DAS, A.; KUNDU, P. N.; BANERJEE, P. C. *Acidiphilium symbioticum* sp.nov., an acidophilic heterotrophic bacterium from *Thiobacillus ferrooxidans* cultures isolated from Indian mines. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 78-85, 1991.

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.

CIMINELLI, V. S. T. Hidrometalurgia. In: FERNANDES, R. C. Tendências tecnológicas Brasil 2005 – geociências e tecnologia mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. Cap. 4, p. 157-174.

CRUNDWELL, F. K. How do bacteria interact with minerals? **Hidrometallurgy**, v. 71, p. 75-81, 2003.

DAOUD, J.; KARAMANEV, D. Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Min. Engineering**, v. 19, p. 960-967, 2006.

DAS, A.; MISHRA, A. K. Role of *Thiobacillus ferrooxidans* and sulphur (sulphide) - dependent ferric-ion-reducing activity in the oxidation of sulfide minerals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.45, p. 377-382, 1996.

DEVASIA, P.; NATARAJAN, K. A.; SATHYANARAYANA, D. N.; RAO, G. R. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. **App. and Environ. Microbiology**, v. 59, p. 4051-4055, 1993.

DISPIRITO, A. A.; SILVER, M.; VOSS, L.; TUOVINEN, O. H. Flagella and pilli of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from an uranium mine in northern Ontario, Canada. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 1196-1200, 1982.

DIXON, D. G.; MAYNE, D. D.; BAXTER, K. G. Galvanox: a novel galvanically assisted atmospheric leaching technology for copper concentrates. **Canadian Metallurgical Quarterly**, v. 47, n. 3, p. 327-336, 2008.

EKMEKÇI, H.; DEMIREL, H. Effects of galvanic interaction on collectorless flotation behavior of chalcopyrite and pyrite. **Inter. J. Mineral Processing**, v. 52, n. 1, p. 31-48, Nov. 1997.

ELSHERIEF, A. E. The influence of cathodic reductions, Fe²⁺ and Cu²⁺ ions on the electrochemical dissolution of chalcopyrite in acid solution. **Min. Engineering**, v. 15, p. 215-223, 2002.

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

GARCIA JUNIOR, O.; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. In: LIMA, U. A. Biotecnologia industrial. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 22, p. 485-512.

GUPTA, C. K.; MUKHERJEE, T. K. Hydrometallurgy in extraction processes. New York: CRC Press, 1990. v. 2, p. 228-242.

HANSFORD, G. S.; VARGAS, T. Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 135-145, 2001.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1994. p. 436.

HUTCHINS, S.R.; DAVIDSON, M. S.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Microorganisms in reclamation of metals. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 311-336, 1986.

JOHNSON, D. B.; KELSO, W. I. Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by subculturing in media containing CuSO₄. **J. Gen. Microbiol.**, v.129, p. 2969-2972, 1983.

JOHNSON, D. B.; BACELAR-NICOLAU, P.; BRUHN, D. F.; ROBERTO, F.F. Iron-oxidizing heterotrophic acidophiles: ubiquitous novel bacteria in leaching environments. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM, 11., 1995, Viña del Mar. **Proceedings**...Santiago: University of Chile, 1995. v. 1, p. 47-56.

KAI, T.; SUENAGA, Y.; MATSUDA, K.; TAKAHASHI, T. Enhancement of specific growth rate of iron-oxidizing bacteria by glucose. **Biotechnol. Lett.**, v.18, p. 403-406, 1996.

KARAMANEV, D. G.; NIKOLOV, L. N.; MAMATARKOVA, V. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. **Min. Engineering**, v. 15, p. 341-346, 2002

KLEIN, C.; HURLBT, C. S. **Manual of mineralogy**. 21st ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 681 p.

KUNDLER, O.; ZILLIG, W. **Archaeobacteria 85**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1986.

LAHTI, H. **Chalcopyrite bioleaching using mesophiles with emphasis on surface passivation**. 2009. 121f. Thesis (Master of Science), Tampere University of Technology, Tampere, 2009.

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

LEDUC, L. G.; TREVORS, J. T.; FERRONI, G. D. Thermal characterization of different isolates of *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 108, p. 189-194, 1993.

LUNDGREN, D. G.; SILVER, M. Ore leaching by bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 34, p. 263-283, 1980.

MELO, W.C.M.A. **Biossolubilização da calcopirita na presença de íons cloreto e ácidos orgânicos**. 2010. 121f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

METHA, A. P.; MURR, L. E. Fundamental studies of the contribution of galvanic interactions to acid-bacterial leaching of mixed metal sulfides. **Hydrometallurgy**, v. 9, p. 235-256, 1983.

MOUSAVI, S. M.; YAGHMAEI, S.; SALIMI, F.; JAFARI, A. Influence of process variables on biooxidation of ferrous sulfate by an indigenous *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Part I: Flask experiments. **Fuel**, v. 85, p. 2555-2560, 2006.

NATARAJAN, K. A. Electrochemical aspects of bioleaching of base-metal sulfides. In: ERLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. (Ed.). **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 79-106.

NOWAK, P.; KRAUS, E.; POMIANOWSKI, A. The electrochemical characteristics of the galvanic corrosion of sulfide minerals in short-circuited model galvanic cells. **Hydrometallurgy**, v. 12, p. 95-110, 1984.

OLSON, G. J.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 249-257, 2003.

PIVOVAROVA, T.A.; GOLOVACHEVA, R. S. Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry. In: KARAVAIKO, G. I.; GROUDEV, S. N. (Ed.). **Biogotecnology of metals**. Moscow: Centre of International Projects, 1985. p. 27-55.

POZZO, R. L.; MALICSI, A. S.; IWASAKI, I. Pyrite–pyrrhothite-grinding media contact and its effect on flotation. **Min.and Metall. Proc.**, v. 7, p. 16-21, 1990.

PRONK, J. T.; JOHNSON, D. B. Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. **J. Geomicrobiol.**, v. 10, p.153-171, 1992.

RAWLINGS, D. E. Heavy metal mining using microbes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 65-91, 2002.

RAWLINGS, D.E. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 51, p. 267-275, 1981.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; TRIBUTSCH, H. Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 291-300, 2001.

SAND, W.; GERKE, T.; HALLMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism - a critical evaluation of bacterial leaching. **App.Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 961-966, 1995.

SAND, W.; GEHRKE, T.; GORG JOZSA, P.; SCHIPPERS, A. (Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 159-175, 2001.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* 1: An improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields. **J. Bacteriol.**, v. 77, p. 642-647, 1959.

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.

SMITH, J. R.; LUTHY, G. R.; MIDDLETON, A. C. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **J. Wat. Pollut. Control. Fed.**, v. 60, p. 518-530, 1988.

TEMPLE, K. L.; COLMER, A. R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, v. 62, p. 605-611, 1951.

TRIBUTSCH, H.; BENNETT, J.C. Semiconductor-electrochemical aspects of bacterial leaching. I. Oxidation of metal sulphides with large energy gaps. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 31, p.565-577, 1981a.

TRIBUTSCH, H.; BENNETT, J.C. Semiconductor-electrochemical aspects of bacterial leaching. II. Survey of rate-controlling sulphide properties. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 31, p. 627-635, 1981b.

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.

TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A.; TSUSHUJA, H. M. Nitrogen requirements of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 954-958, 1979.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. F. In: _____. **Manometric & biochemical techniques**. 5th ed. Minneapolis: Burgess, 1972. p. 290-305.

VALE. **Cobre**. Disponível em: <<http://www.vale.com/pt-br/o-que-fazemos/mineracao/cobre/paginas/default.aspx>> Acesso em: 27 jan. 2011.

VOGEL, A. Determinação de cobre em um minério. In: _____. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981. p. 282.

WHITE, D. P. **QUÍMICA**: a ciência central. 9. ed. 2005. Disponível em: <http://www.dfq.feis.unesp.br/docentes/NewtonII/Metais_e_metalurgia.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.

WATLING, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, p. 81-108, 2006.

YAMANAKA, T. Mechanisms of oxidation of inorganic electron donors in autotrophic bacteria. **PlantCell Physiol.**, v.37, p. 569-574, 1996.

ZAMANI, M.A.; VAGHAR, R.; OLIZADEH, M. Selective copper dissolution during bioleaching of molybdenite concentrate. **Intern. J. Min. Processing**, v. 81, p.105-112, 2006.