

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP – Instituto de Química/Campus Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

DEBORA MARIA ALVES VIEGAS

**“AVALIAÇÃO DA CINÉTICA BACTERIANA NA BIOLIXIVIAÇÃO DE
CALCOPIRITA”**

Araraquara/SP
2016

DEBORA MARIA ALVES VIEGAS

**“AVALIAÇÃO DA CINÉTICA BACTERIANA NA BIOLIXIVIAÇÃO DE
CALCOPIRITA”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química - Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para a obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Profa. Dra. Denise Bevilaqua

**Araraquara/SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

V656a Viegas, Débora Maria Alves
Avaliação da cinética bacteriana na biolixiviação de
calcopirita / Débora Maria Alves Viegas. –
Araraquara : [s.n.], 2016
106 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Denise Bevilaqua

1. Lixiviação bacteriana. 2. Calcopirita. 3. Cisteína.
4. Correlação (Estatística). 5. Culturas mistas (Microbiologia).
I. Título.

DEBORA MARIA ALVES VIEGAS

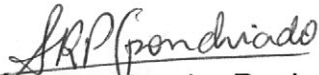
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 11 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Denise Bevilaqua (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Pompeiro Sponchiado
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Daniela Gomes Horta
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFAL / Poços de Caldas - MG

DADOS CURRICULARES

DEBORA MARIA ALVES VIEGAS

1. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 16/06/1992

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São José do Rio Preto/SP

Filiação: Noel Viegas Chanes e Rosely de Fátima Alves Viegas

Estado Civil: Solteira

Profissão: Química

Endereço: Avenida Altino Correa de Almeida Moraes, 49, apto 12. 14801-190, Araraquara/SP

e-mail: de-viegas@hotmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Química pela Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP, concluído em Dezembro de 2013.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Apresentação de trabalhos em congressos científicos

VIEGAS, D. M. A.; BEVILAQUA, D. Avaliação da cinética bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* na biolixiviação de calcopirita. In: VII Simpósio de Microbiologia do IBILCE, 2015, São José do Rio Preto/SP.

VIEGAS, D. M. A.; BEVILAQUA, D. Comparação da cinética bacteriana de

Acidithiobacillus ferrooxidans e *Leptospirillum ferrooxidans* na biolixiviação de calcopirita. In: I Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2015, Ribeirão Preto/SP.

VIEGAS, D. M. A.; BEVILAQUA, D. The inhibition of bacterial growth by cysteine. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis/SC.

3.2 Resumos publicados em anais de congressos científicos

VIEGAS, D. M. A.; BEVILAQUA, D. O efeito da adaptação de *At. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans* a calcopirita no ensaio de biolixiviação. In: 55º Congresso Brasileiro de Química, 2015, Goiânia/GO. Anais Virtuais, 2015.

3.3 Participação em eventos

- VII Simpósio de Microbiologia do IBILCE, São José do Rio Preto/SP, 2015.
- I Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, Ribeirão Preto/SP, 2015.
- 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis/SC, 2015.
- 55º Congresso Brasileiro de Química, Goiânia/GO, 2015.
- Workshop Hands-on, Campinas/SP, 2014.

3.4 Formação Complementar

- “Curso sobre Microscopia Eletrônica de Varredura e Preparação de Amostras”, oferecido pela ANACOM Científica em 29 de maio de 2014, no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

*Dedico este trabalho
à minha querida avó Manoela,
um ser de luz que tão cedo nos deixou,
uma homenagem especial.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, pelo incentivo, carinho e sabedoria, me encaminhando as melhores escolhas em todos os momentos de minha vida. Devo agradecer a Deus, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, me dando a oportunidade de crescer e ser alguém melhor ao lado de vocês.

A minha família, e principalmente aos meus irmãos que foram o suporte necessário me apoiando nas mudanças e nos desafios que escolhi e enfrentei durante a vida e ao longo desses anos longe de casa.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Denise Bevilaqua por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida e do meu trabalho, por ser exemplo de mulher e profissional, com tamanha competência, a qual sempre fará parte da minha vida.

Aos colegas de laboratório, que tem um espaço especial em meu coração, pela amizade e apoio constante fazendo com que os dias se tornassem de fácil e amável convivência, permitindo que a vida acadêmica fosse algo mais apaixonante do que esperei.

Aos meus amigos, que se tornaram o pilar mais forte para minha permanência em Araraquara, me proporcionando as melhores alegrias.

A minha segunda família da República *Malwee* pelo lar, pelo acolhimento e pelo que fizeram e fazem até hoje por mim. Especialmente as minhas pseudo-irmãs Mariana, Rebecca, Amanda, Alana e Ana Laura pela irmandade, por toda paciência, e por serem vocês, por serem meus melhores presentes e minha principal escolha na faculdade, de amor e de carinho, para uma vida inteira.

A equipe de futsal da UNESP de Araraquara, por representarem todo meu agradecimento pela Universidade que cursei, por todos os jogos e alegrias traçadas num caminho de muita garra e força, fazendo com que a amizade prevalecesse nos levando a vitórias e alcançando os objetivos que estiveram a nosso alcance.

Ao Instituto de Química, por toda estrutura e pelo ambiente familiar que o representa. Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram a minha vida e a esse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Você não sente, não vê

*Mas eu não posso deixar de dizer, meu amigo
Que uma nova mudança em breve vai acontecer*

*O que há algum tempo era novo, jovem
Hoje é antigo, e precisamos todos rejuvenescer.”*

Velha Roupa Colorida, Belchior.

RESUMO

O desenvolvimento tecnológico dos setores industriais associados à mineração e metalurgia vem crescendo nas últimas décadas devido à busca incessante por melhorias na qualidade de vida. Se por um lado a demanda por metais é crescente, por outro, a indústria de mineração está diante da problemática em relação ao esgotamento das reservas. Isso impõe a necessidade de se extrair metais a partir de minérios de baixos teores e também de rejeitos industriais. Para tanto são necessários processos que exijam baixos custos de investimento e de operação para que a extração se torne viável economicamente, e a biolixiviação é a tecnologia que aparece como a principal alternativa diante dos processos convencionais. O cobre tem sido um dos metais mais importantes por mais de cinco mil anos, devido a suas propriedades e formação de ligas metálicas. O cobre é um dos metais de maior interesse econômico. Cerca de 70% deste metal é encontrado na natureza na forma de calcopirita (CuFeS_2). É o mineral mais abundante entre todos os tipos de minérios de sulfeto de cobre. A biolixiviação de cobre a partir de calcopirita é considerada mais econômica e ambientalmente sustentável que o processo convencional pirometalúrgico, especialmente quando os minérios de sulfeto de cobre estão presentes em baixo teor. No entanto, a taxa de oxidação lenta bacteriana continua a ser um grande problema para ser resolvido na biolixiviação. Sendo assim, estratégias para melhorar a atividade bacteriana na superfície do sulfeto mineral têm sido amplamente exploradas por muitos autores. Recentemente a adição de substâncias de origem biológica como os aminoácidos também tem sido um fator testado em ensaios com o objetivo de melhorar o desempenho do processo, como a *L-cisteína*, um aminoácido importante sulfuroso que despertou grande interesse devido a sua capacidade de acelerar o processo de biolixiviação. O principal microrganismo envolvido neste processo é a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bactéria mesófila capaz de obter energia a partir da oxidação de íons ferrosos e de compostos de enxofre reduzidos. Além dessa, a *Leptospirillum ferrooxidans*, também mesófila e capaz de obter energia apenas a partir de oxidação de íons ferrosos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar estas diferentes espécies bacterianas isoladas e em consórcio quanto a capacidade de solubilizarem cobre a partir da calcopirita e avaliar a melhora da eficiência do processo com a adição de cisteína no meio. Foi realizado um ensaio prévio de oxidação de íons ferrosos na presença de cisteína para determinar a concentração inibitória do aminoácido para o crescimento das linhagens. Posteriormente realizou-se o ensaio de biolixiviação em frascos agitados a 150 rpm, 30 °C, na presença de 2,5% (m/m) de calcopirita em meio T&K, 5% (v/v) do inóculo e 10^{-3} mmol.L⁻¹ de cisteína. Avaliando a influência dos consórcios e das espécies isoladas no processo, determinou-se que os frascos que continham a bactéria *At. ferrooxidans* – LR adaptada apresentaram as maiores porcentagens de recuperação (23,2%), após 35 dias de ensaio. Os sistemas abióticos apresentaram uma recuperação ínfima de cobre, chegando a apenas 6%, em um potencial médio de 350 mV (Ag/AgCl). A adição de cisteína promoveu aumentos na recuperação de cobre, comparado à mesma condição na ausência de cisteína. Foram detectadas diferenças na extração de cobre nas diferentes condições inoculadas estabelecendo-se a seguinte ordem decrescente: *At. ferrooxidans* – LR + cisteína (25,3%) > *At. ferrooxidans* – LR > mutante + cisteína > *L. ferrooxidans* + cisteína > mutante > *L. ferrooxidans* (18,0%). Por fim uma análise estatística foi realizada para determinar a correlação entre os parâmetros estudados, pH, Eh e $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}]$ e a solubilização de cobre para cada microrganismo. Os resultados indicaram uma alta correlação (>75%) em 85% dos casos, onde para a bactéria *At. ferrooxidans* a maior correlação encontrada foi ao parâmetro $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ e diferentemente para a bactéria *L. ferrooxidans* que a maior correlação foi a que relacionou a solubilização com o pH.

Palavras-chave: Biolixiviação. Calcopirita. Cisteína.

ABSTRACT

Technological development of mining and metallurgical industries has increased in recent decades due to constant search for improving life quality. Mining industries are now facing an issue related to the depletion of reserves since the demand for metals is growing progressively year after year. Therefore, the need of extracting metals from low grade ores and industrial wastes become an important key to this sector. For this purpose, processes that require low investment and low operating costs for metal extraction are preferentially used for being economically feasible compared to conventional processes. Bioleaching is one of the main alternative technologies for extracting metals, such as copper one of the most important metals for over five thousand years, due to its properties and formation of metal alloys. Copper is one of the largest economic interest metals. About 70% of this metal is found in nature as chalcopyrite (CuFeS_2). This is the most abundant mineral among all types of copper sulfide ores. Copper bioleaching from chalcopyrite is considered more economically and environmentally sustainable than conventional pyrometallurgical processes. The main microorganisms involved in this process are the well-known *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mesophilic bacteria capable of using ferrous ions and reduced sulfur compounds as energy source through oxidative reactions *Leptospirillum ferrooxidans* also mesophilic and able to oxidize ferrous ions as energy source. The addition of carbohydrates, proteins and other substances of biological origin has also been a factor tested in assays aiming to improve the performance of the process. In this context, this study aimed to evaluate the ability to solubilize copper from chalcopyrite mediated by both *At. ferrooxidans* and *L. ferrooxidans* separately and combined, as a consortium. Besides, to evaluate the efficiency of the process adding cysteine in the growth medium. A previous study of oxidation of ferrous ions in the presence of cysteine was performed to determine the inhibitory concentrations for the growth of the strains. In general, bioleaching tests were performed in shake flasks at 150 rpm, 30 °C, in the presence of 2.5% (w/v) of chalcopyrite in T&K medium, 5% (v/v) inoculum and 10^{-3} mmol.L⁻¹ of cysteine. Evaluating the influence of the consortia and species isolated in the process, it was determined that the vials containing the *At. ferrooxidans* - LR adapted showed the highest recovery percentages (23.2%) after 35 days. Abiotic systems showed a negligible recovery of copper, reaching only 6% in an average potential of 350 mV (Ag / AgCl). The addition of cysteine promotes an increase in copper recovery compared to the same condition in the absence of cysteine. Differences were detected in the copper extraction in different conditions inoculated by establishing the following descending order: *At. ferrooxidans* - LR + cysteine (25.3%) > *At. ferrooxidans* - LR (23.5%) > mutant + cysteine (23.0%) > *L. ferrooxidans* + cysteine (20.3%) > mutant (20.0%) > *L. ferrooxidans* (18.0%). Finally a statistical analysis was performed to determine the correlation between the parameters studied, pH, Eh and $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ and copper solubilization for each microorganism. The results showed a high correlation (>75%) in 85% of cases, where for bacteria *At. ferrooxidans* the highest correlation was found to the parameter $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ and differently for the bacteria *L. ferrooxidans* the highest correlation it was related to the solubilization pH.

Keywords: Bioleaching. Chalcopyrite. Cysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da Produção Mineral Brasileira (PMB).....	20
Figura 2 - Consumo Mundial de Cobre – 2011.....	21
Figura 3 - Estrutura da calcopirita.....	22
Figura 4 - Esquema da interação do sulfeto mineral pirita com o aminoácido cisteína proposto por Rojas-Chapana e Tribush em 2000.....	28
Figura 5 - Difratoograma de raios X da amostra original de calcopirita. Os símbolos indicam C - calcopirita (CuFeS ₂). Os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Angstroms) característica de cada fase cristalina.....	33
Figura 6 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe ²⁺) na presença de <i>At. ferrooxidans</i> – LR e de diferentes concentrações de cisteína. (■) sem cisteína; (●) 10 ⁻¹ mol.L ⁻¹ de cisteína; (▲) 10 ⁻² mol.L ⁻¹ de cisteína; (▼) 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ de cisteína; (A) com adição de 2,5% de calcopirita (B) sem adição de calcopirita.....	43
Figura 7 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe ²⁺) na presença de mutante de <i>At. ferrooxidans</i> – LR e de diferentes concentrações de cisteína. (■) sem cisteína; (●) 10 ⁻¹ mol.L ⁻¹ de cisteína; (▲) 10 ⁻² mol.L ⁻¹ de cisteína; (▼) 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ de cisteína; (A) com adição de 2,5% de calcopirita (B) sem adição de calcopirita.....	44
Figura 8 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe ²⁺) na presença de <i>L. ferrooxidans</i> e de diferentes concentrações de cisteína. (■) sem cisteína; (●) 10 ⁻¹ mol.L ⁻¹ de cisteína; (▲) 10 ⁻² mol.L ⁻¹ de cisteína; (▼) 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ de cisteína; (A) com adição de 2,5% de calcopirita (B) sem adição de calcopirita.....	45
Figura 9 - Variação do pH no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) <i>At. ferrooxidans</i> – LR; (B) mutante; (C) <i>L. ferrooxidans</i>	48
Figura 10 - Variação do potencial de óxido-redução no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) <i>At. ferrooxidans</i> – LR; (B) mutante; (C) <i>L. ferrooxidans</i>	50
Figura 11 - Variação da concentração de íons ferrosos no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) <i>At. ferrooxidans</i> – LR; (B) mutante; (C) <i>L. ferrooxidans</i>	52
Figura 12 - Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) <i>At. ferrooxidans</i> – LR; (B) mutante; (C) <i>L. ferrooxidans</i>	53

- Figura 13** - Variação da concentração de cobre no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos) e não adaptadas (símbolos fechados). Utilizando (●) *At. ferrooxidans* – LR; (■) mutante; (□) *L. ferrooxidans*; (▲) controle abiótico..... 54
- Figura 14** - Variação do pH no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲). A seta representa a amostragem em que a correção ácida foi realizada. 55
- Figura 15** - Variação do potencial de oxido-redução no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲)..... 56
- Figura 16** - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲). 57
- Figura 17** - Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲)..... 58
- Figura 18** - Variação da concentração de cobre no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲)..... 59
- Figura 22** - Variação do pH no ensaio de biolixiviação no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (□), *L. ferrooxidans* (□) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína..... 60
- Figura 23** - Variação do potencial de oxido-redução no ensaio de biolixiviação. Utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (□), *L. ferrooxidans* (□) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína..... 61
- Figura 24** - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (□), *L. ferrooxidans* (□) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína. 62
- Figura 25** - Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (□), *L. ferrooxidans* (□) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína..... 63
- Figura 26** - Variação da concentração de cobre total no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (□), *L. ferrooxidans*

(□) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L ⁻¹ de cisteína.....	64
Figura 27 – Gráfico de dispersão do pH x concentração de cobre recuperado no ensaio de biolixiviação utilizando <i>At. ferrooxidans</i> – LR adaptada.....	67
Figura 28 – Gráfico de dispersão do Eh x concentração de cobre recuperado no ensaio de biolixiviação utilizando <i>At. ferrooxidans</i> – LR adaptada.....	68
Figura 29 – Gráfico de dispersão da $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ x concentração de cobre recuperado no ensaio de biolixiviação utilizando <i>At. ferrooxidans</i> – LR adaptada.....	70
Figura 30 - Média dos valores de coeficientes de correlação das regressões linear e polinomial das curvas de cada parâmetro pela concentração de cobre solubilizado utilizando (1) <i>At. ferrooxidans</i> – LR; (2) mutante; (3) <i>L. ferrooxidans</i>	71
Figura 31 – Gráfico de dispersão do pH x $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ no ensaio de biolixiviação utilizando <i>At. ferrooxidans</i> – LR adaptada.....	74
Figura 32 - Gráfico de dispersão da $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ x Eh no ensaio de biolixiviação utilizando <i>At. ferrooxidans</i> – LR adaptada.	75
Figura 33 – Gráfico de dispersão do pH x Eh no ensaio de biolixiviação utilizando <i>At. ferrooxidans</i> – LR adaptada.	76
Figura 34 - Média dos valores de coeficientes de correlação das regressões linear e polinomial das curvas dos parametros pH, Eh e $[Fe^{3+}]/[Fe^{2+}]$ dois a dois utilizando (1) <i>At. ferrooxidans</i> – LR; (2) mutante; (3) <i>L. ferrooxidans</i>	77
Figura 35 - Regressão linear das curvas nos primeiros quinze dias de ensaio. (A) Ensaio de biolixiviação – efeito da adaptação; (B) Ensaio de biolixiviação – consórcios; (C) Ensaio de biolixiviação – cisteína.	83
Figura 36 - Curva hiperbólica da concentração de cobre vs tempo e equação de ajuste hiperbólico com seus respectivos parâmetros.	87
Figura 37 - Ajustes hiperbólicos das curvas de solubilização de cobre e seus parâmetros. (A) Ensaio de biolixiviação – efeito da adaptação; (B) Ensaio de biolixiviação – consórcios; (C) Ensaio de biolixiviação – cisteína.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição pelos estados das reservas brasileiras de cobre.....	19
Tabela 2 - Ensaio de adaptação e suas respectivas densidades de polpa de calcopirita.	36
Tabela 3 - Ensaio de inibição a cisteína e as respectivas concentrações testadas.....	37
Tabela 4 - Diferentes condições utilizadas no ensaio de biolixiviação.	38
Tabela 5 - Coeficientes angulares referentes a linearização das curvas de oxidação de íons ferrosos na presença e ausência do mineral.....	46
Tabela 6 - Valores calculados do teste estatístico de análise de variância para o ensaio de biolixiviação das linhagens adaptadas e dos consórcios.	80
Tabela 7 - Valores de variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos calculados do teste estatístico de análise de variância para o ensaio de biolixiviação das linhagens adaptadas e dos consórcios.	80
Tabela 8 - Valores calculados do teste estatístico de análise de variância referentes a adição de cisteína para o ensaio de biolixiviação.	81
Tabela 9 - Valores de variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos calculados do teste estatístico de análise de variância para os valores ensaio de biolixiviação referentes a adição de cisteína.	82
Tabela 10 - Velocidades iniciais de solubilização e coeficientes de correlação da regressão linear dos primeiros 15 dias das curvas de solubilização de cobre.....	86
Tabela 11 - Parâmetros determinados a partir da equação dos ajustes hiperbólicos das curvas de solubilização de cobre em todas as condições do ensaio de biolixiviação.....	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Biolixiviação: CONTEXTUALIZAÇÃO.....	17
1.2	Cobre e a Indústria Mineral Brasileira	18
1.3	Mineral: Calcopirita	21
1.4	Microrganismos envolvidos na biolixiviação: características gerais e importância biotecnológica	24
1.5	Efeito da adição de aminoácidos no processo de biolixiviação	27
1.6	Contextualização: Estudos realizados com calcopirita pelo Grupo do laboratório de Biohidrometalurgia da UNESP de Araraquara	29
2	OBJETIVO.....	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Amostra mineral: Calcopirita	33
3.2	Material biológico	34
3.3	Manutenção das linhagens	34
3.4	A adaptação das linhagens a calcopirita.....	35
3.5	Oxidação de íons ferrosos na presença de cisteína	36
3.6	Ensaio de crescimento em frascos agitados.....	36
3.7	Procedimentos analíticos	39
3.7.1	Medidas de pH e potencial redox (Eh)	39
3.7.2	Determinação de íons ferrosos (Fe ²⁺) (VOGEL, 1981).....	39
3.7.3	Determinação de ferro total e cobre total.....	40
3.8	Análises estatísticas.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE ÍONS FERROS.....	40
4.2	ENSAIO DE BIOLIXIVIAÇÃO	47
4.2.1	Efeito da adaptação	47
4.2.2	Consórcios bacterianos	55
4.2.2	Cisteína.....	58
5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	66
5.1	Interferência estatística dos parâmetros na solubilização de cobre.....	66
5.1.1	pH	66
5.1.2	Potencial de óxido-redução (Eh)	68

5.1.3 [Fe ³⁺ /Fe ²⁺]	69
5.2 Interferência estatística dos parâmetros	73
5.2.1 pH e [Fe ³⁺ /Fe ²⁺]	73
5.2.2 [Fe ³⁺ /Fe ²⁺] e Eh	74
5.2.3 pH e Eh	76
5.3 Análises estatísticas das curvas de solubilização de cobre	79
5.3.1 Teste de análise de variância (ANOVA)	79
5.3.2 Velocidade inicial da solubilização de cobre	82
5.3.3 Estudos da cinética de oxidação da calcopirita	87
6 CONCLUSÃO	96
REFERENCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biolixiviação: CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente a demanda por metais é crescente devido ao desenvolvimento da indústria em geral, principalmente a metalúrgica e siderúrgica, para a produção de artefatos metálicos, assim com o consumo crescente pela sociedade.

Estudos vêm sendo realizados no sentido de recuperar esses metais a partir de jazidas de minérios de baixo teor e também de materiais como águas residuais, resíduos industriais e eletrônicos. A demanda mundial crescente por níquel e cobre gerou interesse no desenvolvimento de novos processos adequados para minérios complexos de baixo teor. Para tanto são necessários processos que demandem baixos custos de investimento e de operação para que a extração se torne viável economicamente.

Biominação é o termo genérico usado para descrever tecnologias que utilizam sistemas biológicos (principalmente microrganismos procariotos) para facilitar a extração e recuperação de metais a partir de minérios e materiais residuais (JOHNSON, 2014).

A biolixiviação, processo que utiliza microrganismos para a extração de metais a partir de minérios, ou rejeitos de baixos teores se apresenta como a principal alternativa aos processos convencionais.

Neste processo não é necessário à utilização de grandes quantidades de ácidos ou agentes oxidantes, pois a própria bactéria produz tais agentes a partir de substratos presentes no próprio minério, além da vantagem do baixo requerimento de energia, baixo investimento, redução da necessidade de mão de obra especializada e a não poluição atmosférica, por não emitir SO_2 , como no processo pirometalúrgico convencional (BEVILAQUA, 1999). É um campo multidisciplinar envolvendo a hidrometalurgia, processamento mineral, química, meio ambiente e microbiologia (AKCIL, 2004).

Atualmente não é apenas uma tecnologia promissora, mas sim, uma alternativa econômica real para o tratamento de minérios com minerais específicos. No entanto, viabilizar microrganismos que se adaptem e que demonstrem melhor desempenho nesse processo ainda é uma constante busca pelos estudiosos para que no futuro possam ser empregados comercialmente (ACEVEDO, 2002).

A biolixiviação de minérios primários, como a calcopirita (CuFeS_2), ainda é um desafio para as empresas mineradoras e os pesquisadores da área. Ocorre a formação de uma camada sobre a superfície da calcopirita em temperatura ambiente que consiste em enxofre

elementar, sulfetos de cobre secundários e jarositas. Esta camada atua como uma barreira de difusão e essencialmente protege a superfície da calcopirita de reações oxidativas por bactérias e oxidantes químicos (BEVILAQUA et al., 2013).

Neste contexto, o estudo deste mineral explorando alternativas microbiológicas e de processo é fundamental para o avanço do conhecimento e futura aplicação comercial desta que atualmente é a principal fonte de cobre no mundo.

1.2 Cobre e a Indústria Mineral Brasileira

O cobre é essencial para a vida moderna, um elemento substancial para a vida cotidiana. Transporta eletricidade e água limpa para as cidades e dá um importante contributo para o desenvolvimento sustentável. Faz parte de grande porcentagem da Indústria Metalúrgica devido à sua alta ductilidade, maleabilidade, condutividade térmica e elétrica, e resistência à corrosão (COPPER DEVELOPMENT ASSOCIATION Inc., 2015).

O cobre tem sido um elemento muito importante para o homem desde tempos pré-históricos. Na verdade, uma das principais "idades" ou estágios da história humana é nomeado para uma liga de cobre, bronze. Cobre e suas muitas ligas têm um importante papel desempenhado em muitas civilizações, desde os antigos egípcios, romanos até as culturas modernas em todo o mundo (COPPER DEVELOPMENT ASSOCIATION Inc., 2015).

Durante os últimos anos, o cobre tem sido um metal dominante, desde radiadores de alumínio até a fibra óptica em telecomunicações. A obtenção de cobre tem sido realizada por duas formas: extraído do minério e reciclado de resíduos (sucata) (MOSKALYK; ALFANTAZI, 2004).

As reservas mundiais de cobre são de 690 milhões de toneladas e as reservas brasileiras de cobre são de 17,3 milhões de toneladas, distribuídas por vários estados (Tabela 1), mas concentrados principalmente no Pará.

Tabela 1 - Distribuição pelos estados das reservas brasileiras de cobre

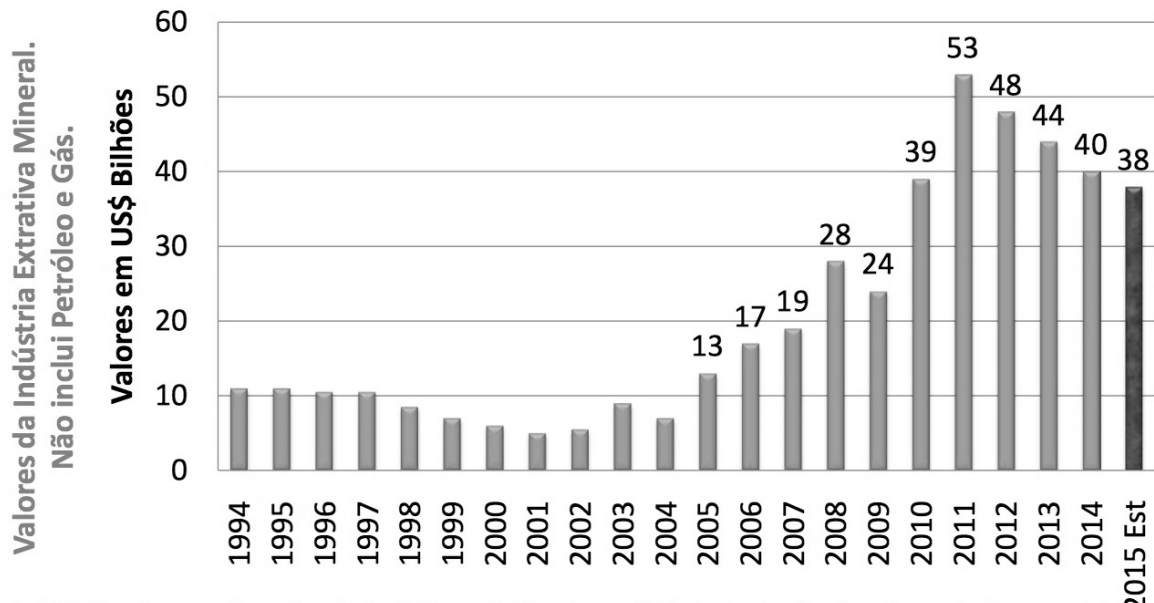
ALAGOAS	2,95%
BAHIA	3,79%
GOIAS	7,92%
MINAS GERAIS	0,02%
MATO GROSSO	0,05%
PARÁ	84,99%
RIO GRANDE DO SUL	0,19%
SAO PAULO	0,10%

Fonte: Instituto Brasileiro de Mineração, (2012)

A indústria mineral brasileira registrou ao longo da última década crescimento vigoroso graças a fatores como as profundas mudanças socioeconômicas e de infraestrutura que o país tem vivenciado, muito embora a atividade mineral tenha sofrido redução em suas expectativas em razão da crise internacional. Esse crescimento é impulsionado pelo processo de urbanização em países emergentes com expressivas áreas territoriais, alta densidade demográfica e alto PIB (Produto Interno Bruto), como os BRICs (Brasil, Rússia, Índia e China), os quais, coincidentemente, são de grande importância para a mineração mundial. (INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO, 2012)

A partir de 2000, o aumento da demanda por minerais, principalmente pelo elevado índice de crescimento mundial, impulsionou o valor da Produção Mineral Brasileira (PMB), que em uma década apresentou crescimento significativo. Com o processo de urbanização e o fortalecimento das economias mundiais, estima-se que a PMB continuará crescendo nos próximos anos. Em volume (tonelagem), o Brasil tem aumentado a produção de seus bens minerais como mostra-se a Figura 1 (INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO, 2015).

Figura 1 - Evolução da Produção Mineral Brasileira (PMB).

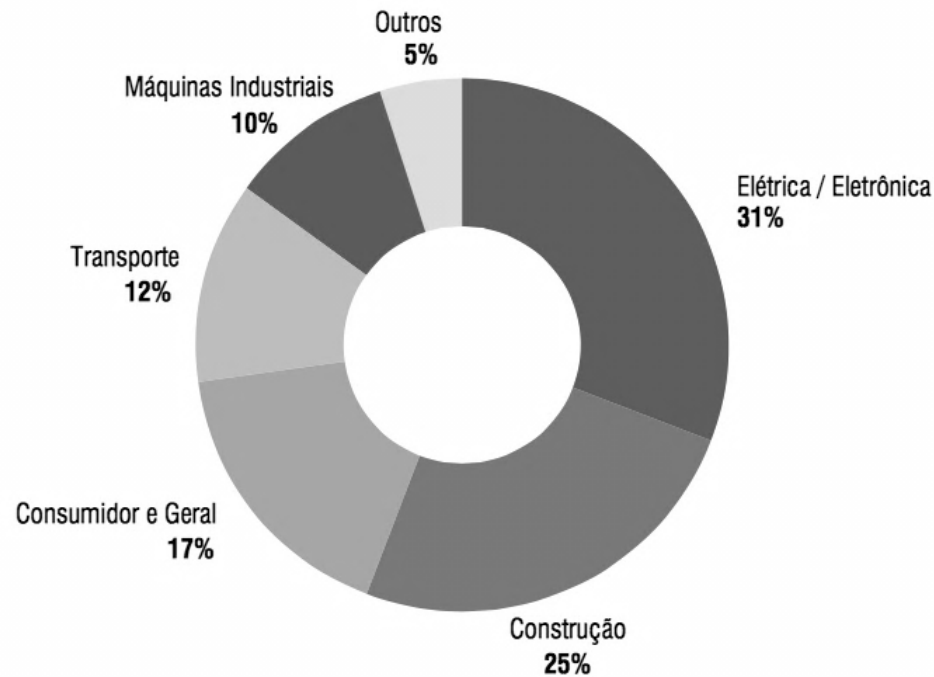


Fonte: Instituto Brasileiro de Mineração (2015)

A produção da indústria extrativa mineral, medida pelo Índice de Produção Mineral (IPM), em 2014 apresentou crescimento de 7,9% quando comparada a 2013. Esse comportamento positivo ocorreu principalmente em função da produção de minério de ferro, que apresentou aumento de 9,1% no ano de 2014. Outras substâncias minerais atuaram positivamente no setor, e o cobre alcança o terceiro lugar com +15,1% (BRASIL, 2014).

O maior consumidor do minério de cobre é a indústria metalúrgica, principalmente como fornecedora da área de construção civil e de cabos e fios (Figura 2). A demanda por cobre para a produção de fios e cabo deve crescer 39% até 2016 no Brasil, podendo atingir 295 mil toneladas do metal por ano ao final do período (INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO, 2012).

Figura 2 - Consumo Mundial de Cobre – 2011.



Fonte: Instituto Brasileiro de Mineração(2012).

Estima-se que 15% de cobre, 5% de ouro e pequenas quantidades de outros metais (por exemplo, níquel e zinco) são atualmente produzidas utilizando a biolixiviação (BRIERLEY; BRIERLEY, 2013). O processo também é utilizado em algumas minas ativas e abandonadas para recuperar metais a partir de rejeitos e de drenagem ácida de minas (JOHNSON, 2014).

1.3 Mineral: Calcopirita

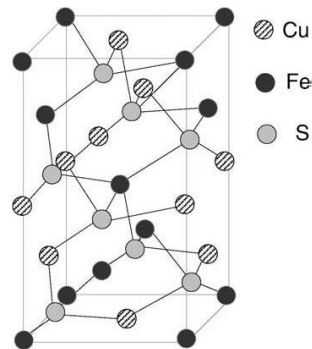
A principal fonte de metais não ferrosos para o uso industrial são os sulfetos minerais encontrados na natureza. Dentre eles, o cobre tem sido um dos metais mais importantes por mais de cinco mil anos, conforme destacado anteriormente.

Os minerais de sulfeto de cobre são amplamente classificados como sulfetos de cobre primários e secundários, com base na geologia do depósito de minério. A biolixiviação é amplamente utilizada na lixiviação de minerais de sulfeto de cobre secundário, porque estes minerais são altamente passíveis de solubilização por microrganismos. A biolixiviação de sulfetos de cobre primário é uma tecnologia emergente, devido a estes minerais serem altamente refratários e não solubilizarem bem sob condições ambientes. Devido a isso

inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos para um aprimoramento dessa tecnologia (BRIERLEY; BRIERLEY, 2013).

A calcopirita (CuFeS_2) é o mineral mais abundante entre todos os tipos de minérios de sulfeto de cobre (MARHUAL et al., 2008), e também o mais explorado na recuperação desse metal. Sua célula unitária é composta por quatro átomos de cobre, quatro átomos de ferro e oito átomos de enxofre. Cada átomo de enxofre é coordenado por um tetraedro de átomos de metais (dois átomos de ferro e dois átomos de cobre), enquanto cada metal é coordenado por um tetraedro de átomos de enxofre ligeiramente deslocados. A estrutura do cristal consiste relativamente em um arranjo tetragonal simples (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura da calcopirita.



Fonte: Cordoba et al. (2008)

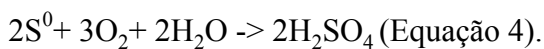
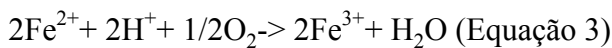
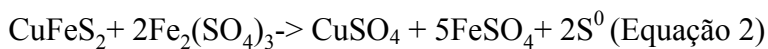
O estado de oxidação mais comum da calcopirita é $\text{Cu}^+\text{Fe}^{3+}(\text{S}^{2-})_2$ com a possibilidade de variar seu estado de oxidação para $\text{Cu}^{2+}\text{Fe}^{2+}(\text{S}^{2-})_2$ (Li, Y. et al., 2013). Apresenta uma cinética de oxidação extremamente lenta, e devido a isso ainda não existe aplicação comercial usando bioprocessos na indústria, por isso há uma necessidade de compreender melhor a cinética e o mecanismo de lixiviação de calcopirita para a implementação da lixiviação hidrometalúrgica industrial bem sucedida (AHMADI et al., 2011).

Tradicionalmente, o minério de calcopirita é fragmentado e concentrado através da flotação e tratado posteriormente, usando métodos pirometalúrgicos. No entanto, estes procedimentos são dispendiosos e causam poluição atmosférica através da descarga de dióxido de enxofre (SO_2), que é tóxico (DIMITRIJEVIC et al., 2009). Embora atualmente existam filtros que são empregados para recuperar parte do dióxido de enxofre para a formação de ácido sulfúrico.

A biolixiviação de cobre a partir de calcopirita é considerada mais econômica e ambientalmente sustentável que o processo convencional pirometalúrgico, especialmente

quando os minérios de sulfeto de cobre estão presentes em baixo teor (<1,0%) (PRADHAN et al., 2008). Apesar de haver aplicações industriais deste processo para minerais secundários de cobre, como por exemplo covelita (CuS), calcocita (Cu₂S) e bornita (Cu₅FeS₄), para a calcopirita ainda não se tem esta alternativa.

A dissolução da calcopirita ocorre por ataque bacteriano, que pode ser observado na equação 1. Além disso, ocorre também a lixiviação química na qual o sulfato férrico formado na oxidação do sulfeto pela bactéria, oxida diretamente a calcopirita, solubilizando o metal de interesse (cobre) e produzindo Fe²⁺ e S⁰, como apresentado na equação 2, estes que posteriormente são oxidados pela bactéria com produção de Fe³⁺ e ácido sulfúrico (equações 3 e 4) (BEVILAQUA; GARCIA JUNIOR, 2005).



Devido ao grande interesse comercial e industrial da calcopirita muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para aprimorar a eficiência do processo de biolixiviação e torna-lo mais favorável economicamente para a obtenção de cobre (AKCIL et al., 2007; AHMADI et al., 2011; BEVILAQUA et al., 2014; LI, Y. et al., 2015; LIANG et al., 2015).

Gericke et al. (2010) analisaram neste estudo estratégias de controle de potencial na biolixiviação com o objetivo de aumentar significativamente as taxas de lixiviação de cobre a partir de concentrados contendo calcopirita, usando termófilos moderados a 45 °C. O processo desenvolvido alcançou uma lixiviação seletiva e de alta velocidade, deixando um resíduo quase inteiramente de pirita. É evidente a partir do estudo que a dissolução de calcopirita é favorecida a um nível de potencial redox cerca de 420 mV em relação à lixiviação em cerca de 600 mV, enquanto o reverso é verdadeiro para a pirita.

Donget al. (2013) em um estudo comparativo sobre a biolixiviação, biossorção e passivação de minerais de sulfeto de cobre, demonstraram que a calcopirita foi o mineral mais dificilmente biolixiviado entre os minerais estudados.

Liu et al. (2015) estudaram o efeito da concentração de magnésio na biolixiviação de calcopirita, concluindo que com altas concentrações de Mg²⁺ na coluna de biolixiviação, as bactérias dificilmente mantem uma atividade de oxidação alta, e a extração de cobre é

severamente inibida. Sendo assim algumas modificações operacionais devem ser realizadas em processos para biolixiviação de rejeitos que possuam alta concentração deste metal (Mg^{2+}).

Recentemente, as pesquisas sobre a estrutura da comunidade microbiana em biolixiviação de calcopirita têm sido amplamente relatadas devido à estreita correlação com a eficiência de biolixiviação. (YU et al., 2014; PANDA et al., 2015)

Yu et al. (2014) analisaram a mudança da comunidade microbiana na biolixiviação de calcopirita sob o ajuste de diferentes valores de pH por eletroforese em gel, demonstrando maior concentração desses microrganismos em valores de pH extremamente ácidos ($pH < 2,0$).

Panda et al. (2015) analisaram o estado atual da biolixiviação de calcopirita, com informações para a compreensão da diversidade microbiana do processo. Além disso, relataram futuras aplicações para setores industriais com os progressos relacionados aos problemas de passivação e fatores ambientais.

Acredita-se que a ecologia microbiana está intimamente associada com os parâmetros bioquímicos chaves na biolixiviação (JOHNSON, 2014; VARDANYAN et al., 2015). Johnson (2014) descreveu os microrganismos e os mecanismos envolvidos nas operações de biomineração comercial, como a tecnologia que se desenvolveu nos últimos cinquenta anos e discutiu os desafios e oportunidades para a biotecnologia no século XXI. Embora exista ainda uma série de desafios não resolvidos em biomineração convencional, como por exemplo, a biolixiviação de calcopirita, as recentes inovações, como o bio-processamento redutor de minérios oxidados, sugerem que novas oportunidades para o desenvolvimento biotecnológico nos setores de mineração vão surgir no futuro próximo.

1.4 Microrganismos envolvidos na biolixiviação: características gerais e importância biotecnológica

A biolixiviação é uma maneira ambientalmente sustentável e econômica para recuperar metais dos minerais, especialmente de minérios refratários de baixo teor. É a reação complexa com microrganismos e bactérias autotróficas e heterotróficas.

O número de gêneros e espécies de microrganismos envolvidos na oxidação de sulfetos metálicos relatados tem aumentado substancialmente desde a década de 1970. Este aumento é atribuído principalmente a um maior número de pesquisadores que investigam os microrganismos e suas características fundamentais e desenvolvimento de novas tecnologias.

Atualmente muitos estudos estão sendo realizados a partir da análise de ambientes

extremos, como nascentes de água quente, regiões vulcânicas, e operações de mineração, que são suportados pelo crescimento e as atividade metabólica destes organismos (BRIERLEY; BRIERLEY, 2013).

Os microrganismos comumente utilizados para a extração de metais a partir de sulfetos são bactérias quimiolitotróficas, e, por conseguinte, apenas os compostos inorgânicos são necessários para o crescimento. Para o crescimento ótimo das bactérias, os compostos de ferro e enxofre podem ser complementados em conjunto com sais de fonte de nitrogênio, fosfato e magnésio (BOSECKER, 1997).

Microrganismos acidófilos desempenham um papel importante na biolixiviação. Dentre o grupo mesófilo, destacam-se as proteobactérias, especialmente as espécies *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*, como as *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* e *Leptospirillum ferrooxidans*, que são as mais ativas na oxidação de sulfetos minerais em temperaturas abaixo de 45 °C. (LI, L. L. et al., 2013)

A bactéria *At. ferrooxidans* é o microrganismo mais conhecido e mais comumente encontrado nestes processos biohidrometalúrgicos, apresentando características que a tornam específica para este tipo de processo que serão descritas a seguir.

Tal bactéria é Gram-negativa, não patogênica, utiliza CO₂ atmosférico como fonte de carbono e aeróbia, podendo em alguns casos ser considerada anaeróbia facultativa, já que foi conhecida a sua capacidade de reduzir íons férricos em ausência de oxigênio (PRONK, 1992). É também considerada acidófila, pois seu pH ótimo de crescimento é aproximadamente 2,0, podendo variar entre 1,2 e 4,0 (TUOVINEN; KELLY, 1972).

Como principais destaques entre as características da *At ferrooxidans* que as tornam tão interessantes nos processos industriais estão: o crescimento em condições ambientais extremas (acidez extrema e alta toxicidade); e significativa resistência a concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos, o que confere a esses microrganismos uma característica fisiológica marcante, que é a capacidade de tolerar concentrações de metais como Cu²⁺ (10 g.L⁻¹), Cr³⁺ (0,4 g.L⁻¹), Cd³⁺ (10 g.L⁻¹), Zn²⁺ (40 g.L⁻¹) e Ni²⁺ (15 g.L⁻¹) (CABRERA et al., 2005).

Durante o processo de biolixiviação, *At. ferrooxidans* é muitas vezes sujeita a mudanças no pH, temperatura e concentração de nutrientes do meio. Estas alterações podem influenciar na fisiologia bacteriana e, como consequência, na eficiência de biolixiviação (RIBEIRO et al., 2011).

É bem conhecido que a oxidação de íons ferrosos por *At. ferrooxidans* diminui rapidamente em valores de pH acima de 2,5 e na maior parte dos estudos a oxidação de

destes íons por acidófilas em catálise bacteriana é significativo apenas em valores de pH próximos a 1,5 (PESIC et al., 1989; MOLAEI et al., 2011).

A bactéria *Leptospirillum ferrooxidans* é também Gram-negativa, não patogênica, aeróbia, obrigatoriamente acidófila (pH<4,0) e a temperatura máxima de crescimento é em torno de 55°C. É uma espécie quimiolitotrófica, e obtém energia apenas pela oxidação de íons ferrosos (Fe²⁺). O CO₂ é fixado pelo Ciclo de Calvin (BALASHOVA et al., 1974; GOEBEL; STACKEBRANDT, 1994; CORAM; RAWLINGS, 2002; CORAM et al., 2005).

L. ferriphilum e *Leptospirillum* sp. estão presentes em ambientes de mina com pH mais baixos (<1,2) enquanto a *L. ferrooxidans* ocorre em ambientes de pH mais alto (1,0<pH<2,0) (BAKER; BANFIELD, 2003).

A seleção, o controle e o monitoramento das culturas microbianas na biomineração têm sido muitas vezes, mínimos ou inexistentes. Então, surge a possibilidade de se utilizar as populações microbianas agrupadas em operações comerciais, de forma a se obter consórcios mais adequados e eficientes. Existem diversos trabalhos que propõem a otimização do processo de biolixiviação para extração de cobre através da construção de consórcios com cepas selecionadas em diversas condições de temperatura frente a uma linhagem pura. Em alguns dos estudos realizados houve a predominância das espécies *At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, ambos em temperatura ambiente (AKCIL et al., 2007; FU et al., 2008).

Interesses crescentes relacionados à biolixiviação de sulfeto de metal por culturas mistas que são geralmente considerados mais eficientes na oxidação minerais do que as estirpes individuais estão (OKIBE; JOHNSON, 2004). Culturas mistas são geralmente compostas de mais de um indivíduo que pode oxidar ferro ou enxofre (ou ambos), e que pode fixar CO₂ (autotrófico) ou usar carbono orgânico (heterotróficos). Assim, essa diversidade é importante em um consórcio de biolixiviação mineral estável e eficaz (RAWLINGS; JOHNSON, 2007).

Além de culturas mistas outro fator tem causado grande interesse nos estudos atuais: a temperatura. A utilização de bactérias termófilas tem trazido grandes resultados para o processo já que o aumento da temperatura na biolixiviação provoca aumentos nas taxas de lixiviação (HE et al., 2009). Li et al. (2014) investigaram o efeito da temperatura (30, 35 e 40 °C) no ensaio de biolixiviação utilizando culturas mistas predefinidas de *At. ferrooxidans*, *At. caldus* e *At. thiooxidans* e os resultados sugeriram que *At. ferrooxidans* e *At. caldus* foram detectadas em todas as amostras tomadas. Já a população relativa de *At. thiooxidans* diminuiu gradualmente, e esta espécie não foi detectada após 30 dias (a 30 °C) ou 15 dias (a 35 °C).

Mousavi et al. (2005) utilizaram biorreatores aerados com reciclagem de fluxo e fizeram uma avaliação da temperatura, além de outros diversos parâmetros, como por exemplo, pH e densidade de polpa. A máxima recuperação de cobre foi obtida usando bactérias termófilas (85%) e mesófilas (70%).

1.5 Efeito da adição de aminoácidos no processo de biolixiviação

O processo de biolixiviação e sua eficiência são afetados por muitos fatores e a camada bacteriana sobre a superfície do mineral é um dos mais importantes entre eles. A aderência bacteriana em minerais é o primeiro passo na maioria dos processos de biolixiviação. A quantidade de células adsorvidas e a taxa de adsorção pode ser diretamente relacionada com as taxas de dissolução do metal (DONG et al., 2013).

A adição de aminoácidos tem sido amplamente testada em ensaios de biolixiviação com o objetivo de melhorar o desempenho dos processos. Foi demonstrado, por exemplo, que a dissolução de pirita pode ser acelerada pela adição de cisteína. A taxa de lixiviação da pirita foi aumentada três vezes em comparação com o processo sem adição de cisteína (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000).

Ghosh e Mukhopadhyay (2011) estudaram o efeito de aminoácidos na biolixiviação de minério de calcopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* e concluíram que baixas concentrações de L-serina (1,6 g/L) podem atuar como um agente eficaz na solubilização de Cu^{2+} na biolixiviação de calcopirita.

Li et al. (2013) estudaram o efeito de aminoácidos na biolixiviação de colofanito (colocar formula) por *At. ferrooxidans*, e resultados promissores indicaram que baixas concentrações (0,5 g/L) de L-glicina influenciaram positivamente no processo, aumentando a eficiência deste em aproximadamente 8,0%.

Pineda (2014) estudou o efeito da adição de cisteína e sais inorgânicos (FeCl_3 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) em processos biodessulfurização de carvão, obtendo um impacto positivo sobre a oxidação da pirita, produzindo um aumento máximo de 28,44% em relação aos controles com ausência de aminoácido.

A **L-cisteína**, que é um aminoácido importante sulfuroso, tem sido amplamente utilizada na medicina, indústria de alimentos e indústria de cosméticos. Tal aminoácido concentra-se no campo da metalurgia microbiana (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000; HU et al., 2004). É um aminoácido importante para microrganismos acidófilos. Intracelularmente, a sua biossíntese é importante para a formação de proteínas envolvidas na

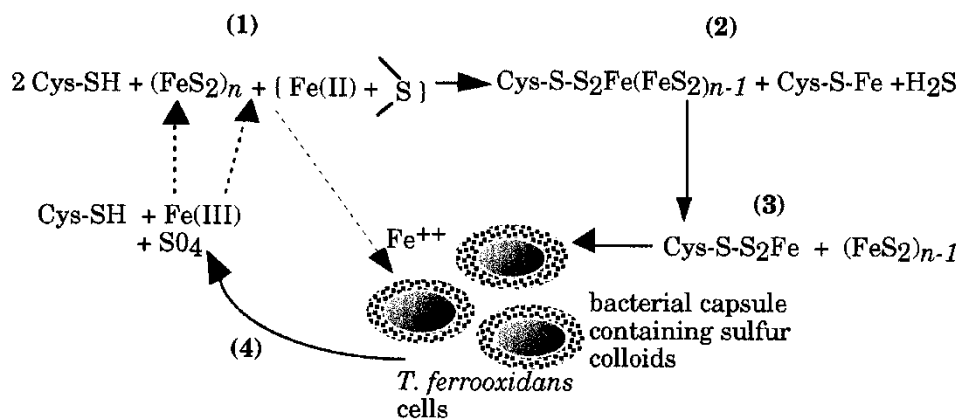
cadeia respiratória de transporte de elétrons do ferro em microrganismos como *At. ferrooxidans*, participando como um ligante no processo de assimilação dos complexos de Fe-S (ZENG et al., 2007).

No entanto, a cisteína também desempenha um papel importante no nível extracelular no biooxidação de sulfetos, especialmente na adesão de microrganismos pela ação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS - sigla em inglês), onde o contato entre a superfície e a célula são regulados (BLAKE et al., 2001).

A EPS pode realizar a mediação no contato entre a superfície e a célula, geralmente é composta por açúcares, lipídios e incluindo proteínas contendo resíduos de cisteína, muda sua composição quando cultivada em meio nutriente de íons ferrosos ou sulfetos, como pirita para se adequar ao ambiente (KINZLER et al., 2003; HARNEIT et al., 2006).

A *L-cisteína* poderia interagir espontaneamente com pirita, com a formação de interações semelhantes aos presentes em complexos ferredoxina de membrana biológica. Conseqüentemente, *L-cisteína* poderia interromper a ligação química de sulfeto ferroso e liberar “clusters” de enxofre e de ferro (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000). Essa interação pode ser observada na figura 4, porem a interação da cisteína com outros sulfetos minerais, como por exemplo, a calcopirita, ainda não está descrita na literatura até o momento.

Figura 4 - Esquema da interação do sulfeto mineral pirita com o aminoácido cisteína proposto por Rojas-Chapana e Tribush em 2000.



Fonte: Rojas-Chapana and Tributsch (2000).

Ainda existe uma grande distância para a aplicação da biolixiviação de calcopirita em escala industrial apesar dos vários trabalhos realizados, como alguns já citados. Sendo assim, esse trabalho procura testar a avaliação da cinética bacteriana na dissolução da calcopirita

através de culturas mistas e isoladas além da adição de compostos como a cisteína, que podem influenciar na eficiência da solubilização do metal de interesse.

1.6 Contextualização: Estudos realizados com calcopirita pelo Grupo do laboratório de Biohidrometalurgia da UNESP de Araraquara

Devido à complexidade do processo de biolixiviação de calcopirita diversos trabalhos foram realizados no laboratório de Biohidrometalurgia da UNESP – Campus Araraquara. Estes estudos tiveram enfoques distintos com o objetivo de aprofundar conhecimentos sobre esse processo de dissolução, químico e bacteriano.

No primeiro estudo realizado por Bevilaqua (1999) foi investigada a oxidação direta da calcopirita e da bornita (Cu_5FeS_4) através de diversas técnicas concluindo que a bornita é utilizada pela *At. ferrooxidans* (na época nomeada *T. ferrooxidans*) como substrato oxidável, e reforçando os dados da literatura que apontavam a calcopirita como um sulfeto mais refratário que a bornita.

A partir desse trabalho, muitos outros aspectos foram estudados aumentando o conhecimento do grupo em geral e permitindo o ganho de novos desafios para a obtenção de bons resultados. Bevilaqua (2003) investigou a interação bactéria-substrato utilizando técnicas eletroquímicas e de análise de superfície visando o conhecimento dos mecanismos envolvidos na dissolução bacteriana dos sulfetos minerais calcopirita e bornita. Observando que a bornita foi significativamente atacada pela presença da bactéria, o mesmo não ocorrendo com a calcopirita, confirmando a refratariedade do sulfeto. A adesão bacteriana e a formação de biofilme sobre o eletrodo de calcopirita modificaram o mecanismo de difusão das moléculas. A partir desses e outros resultados obtidos no trabalho, foi concluído que existem diferenças marcantes no comportamento da calcopirita e da bornita na presença de *At. ferrooxidans*.

Trabalhos com a adição de compostos ao processo que, em determinadas condições, podem promover um aumento da solubilização do metal de interesse também foram realizados. Blauth (2008) que estudou o efeito do aminoácido cisteína utilizando as linhagens *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*, obteve resultados relativamente baixos de solubilização de cobre devido à refratariedade da calcopirita, com a adição ou não do aminoácido.

Ribeiro Neto (2007) avaliou o efeito de agentes químicos como o Cl^- , Ag^+ e um surfactante (Tween 80) na biolixiviação do minério de cobre de baixo teor da mina de Sossego, PA, da Vale S. A., através de técnica da biolixiviação em frascos agitados. Todos os parâmetros analisados indicaram que a presença da bactéria é decisiva no aumento da

solubilização de cobre. Dentre os agentes avaliados, apenas Ag^+ mostrou eficiência, que pode estar associado à formação de um composto chamado argentita (Ag_2S).

Horta (2008) investigou o efeito da adição de íons Cl^- na dissolução de calcopirita através de técnicas eletroquímicas e ensaios de biolixiviação em frascos. Os resultados confirmaram um aumento na taxa de dissolução de calcopirita com a adição de íons Cl^- e células bacterianas.

Trabalhos com ênfase no metabolismo microbiológico como o de Novello (2008) que realizou uma análise proteômica diferencial de *At. ferrooxidans* em resposta a mudança do substrato íon ferroso para os sulfetos minerais calcopirita ou bornita evidenciaram que a calcopirita e a bornita afetam de maneira distinta o metabolismo de *At. ferrooxidans* - LR. Em uma segunda parte do trabalho foi investigado o efeito de uma proteína putativa recombinante contendo cisteína na atividade oxidativa de *At. ferrooxidans* - LR na calcopirita, comprovando o aumento da velocidade de oxidação na presença dessa proteína, o que pode ser contribuído a presença de cisteína e/ou outros aminoácidos.

Estudos genômicos desenvolvidos por Henao (2010) analisou a adesão da bactéria a superfície mineral e o reconhecimento de grupos tióis na linhagem *At. ferrooxidans* - LR em presença de sulfeto de cobre calcopirita (CuFeS_2). Concluiu-se que o processo de adesão e reconhecimento de grupos tióis é favorecido nas primeiras horas de incubação com a calcopirita, tempo no qual provavelmente as células estão mais aptas para se aderir ao minério.

E também destaca-se o trabalho realizado por Arena (2010) que realizou ensaios de lixiviação em biorreatores e frascos agitados utilizando um concentrado de flotação de calcopirita com adições sucessivas de íons cloreto obtendo resultados de porcentagem de recuperação de cobre baixas para ambos os ensaios, porém estudos eletroquímicos dos resíduos sólidos gerados no ensaio em frascos mostraram alterações na camada de enxofre formada durante essa oxidação.

Garcia (2013) estudou o efeito dos consórcios bacterianos na solubilização de calcopirita. Apesar dos consórcios oxidantes de ferro determinarem uma melhor dissolução da calcopirita em comparação ao consórcio oxidante de enxofre, não houve diferença significativa entre os consórcios e a linhagem *At. ferrooxidans* - LR.

Costa (2014) obteve novas linhagens mutantes utilizando técnicas da genética clássica (radiação ultravioleta) a partir da bactéria *At. ferrooxidans* e as avaliou quanto à capacidade de produção de ácido na presença de enxofre elementar e quanto às velocidades iniciais (v_0) na cinética de oxidação dos íons ferrosos. Todas as linhagens mutantes apresentaram maior

solubilização de cobre em relação à linhagem selvagem nos primeiros 14 dias de ensaio. A partir desse e de outros resultados concluiu-se que houve uma contribuição favorável quanto à capacidade de biolixiviação pelas bactérias quando submetidas à radiação UV, incentivando o uso de ferramentas da genética clássica como instrumento para o estudo e aprimoramento de microrganismos biolixiviantes.

Firmino (2013) avaliou as linhagens da coleção do laboratório de Biohidrometalurgia *At. ferrooxidans* – LR, *At. thiooxidans*, entre outras quanto à solubilização de cobre na presença e na ausência de íons cloreto. No entanto, essas diferenças quanto à solubilização não parecem estar relacionadas à tolerância de cloreto observado nos ensaios precedentes. As diferenças entre as solubilizações de cobre na presença e na ausência de cloreto poderiam ter sido mais significativas se o período de adaptação destas bactérias tivesse sido mais longo.

Santos (2014) avaliou a influência do potencial de óxido-redução na solubilização de cobre a partir da calcopirita. Os resultados obtidos por este trabalho mostraram evidências conclusivas que a manutenção de baixos valores de potencial redox, obtidos pela adição de íons ferrosos, exerce uma influência positiva sobre a recuperação de cobre quando na ausência de bactérias e confirmam os dados da literatura, os quais determinam uma faixa de potencial crítico para uma lixiviação mais favorável desde mineral.

As realizações desses diferentes estudos permitiram aprofundar o conhecimento do grupo em relação aos processos de biolixiviação de calcopirita, nos trazendo novas ideias para futuros estudos relacionados a esse mineral.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as linhagens *At. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans*, e a mutante de *At. ferrooxidans* (30'' - obtida em trabalho anterior do grupo (COSTA, 2013) e os diferentes consórcios quanto à capacidade de biolixiviar calcopirita na presença e ausência de cisteína.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de oxidação de Fe^{+2} para as linhagens: *At. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans* e a mutante de *At. ferrooxidans* (30'').
- Realizar ensaios de biolixiviação da calcopirita na presença das linhagens isoladas e na forma de diferentes consórcios.
- Realizar ensaios de biolixiviação da calcopirita com adição de cisteína.

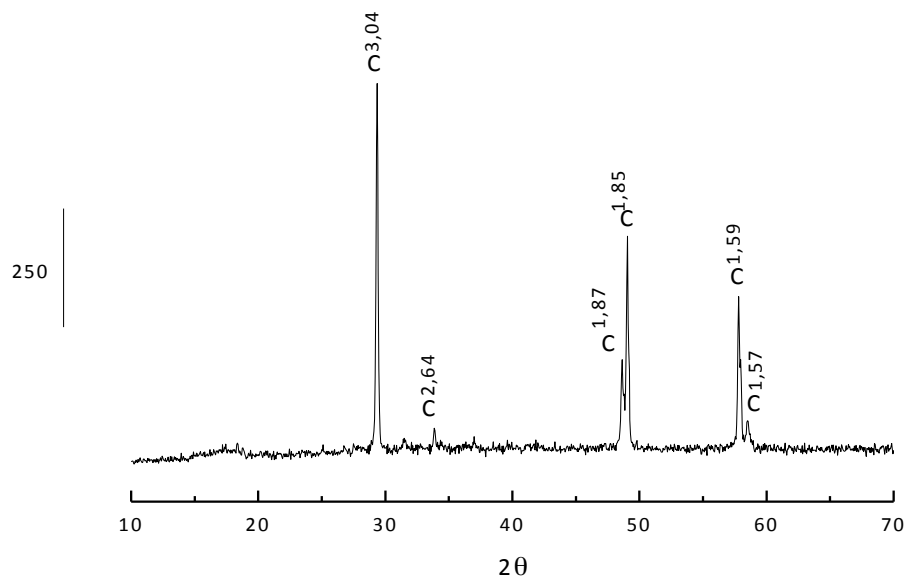
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra mineral: Calcopirita

Foi utilizado uma amostra de calcopirita (CuFeS_2) proveniente da localidade de La Chorrera, no município de Cisneros, na Antioquia, Colômbia, cedido gentilmente pelo Prof. Marco Antônio Marquez da Universidad de Medellin, Colômbia.

O mineral recebido foi inicialmente processado em moinho de bola (MLW – KM1) até atingir uma granulometria de $100\% < 125 \mu\text{m}$ (120 mesh). A fim de se conhecer as fases cristalinas e a quantidade dos principais metais presentes na amostra, foi realizada, respectivamente, a análise de difratometria de raios X (DRX) e espectrometria de absorção atômica (AA) após a digestão ácida. A DRX revelou a presença de calcopirita como único sulfeto mineral presente. E a AA determinou a porcentagem de metais presentes na amostra (Cu e Fe), obtendo-se 30,86% de cobre e 24,04% de ferro (SANTOS, 2014).

Figura 5 - Difratograma de raios X da amostra original de calcopirita. Os símbolos indicam C - calcopirita (CuFeS_2). Os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Angstroms) característica de cada fase cristalina.



Fonte: Santos (2014).

3.2 Material biológico

At. ferrooxidans, linhagem LR, isolada de uma lixívia ácida de mineral de urânio de Lagoa Real – BA (GARCIA JUNIOR, 1991).

L. ferrooxidans linhagem DSM 2705 fornecida pela Companhia Vale junto ao Leibniz-Institut DSMZ GmbH.

Mutante de *At. ferrooxidans*, linhagem LR (COSTA, 2013). Neste trabalho foi utilizada técnica da genética clássica de exposição a radiação ultravioleta em vários tempos e os mutantes obtidos foram avaliados quanto à capacidade de produção de ácido na presença de enxofre elementar e quanto às velocidades iniciais (v_0) na cinética de oxidação dos íons ferrosos. A linhagem escolhida foi exposta a 30 segundos e se destacou na produção de ácido.

3.3 Manutenção das linhagens

O meio de cultura T&K, desenvolvido por Tuovinen e Kelly (1973) foi utilizado para a manutenção periódica das linhagens bacterianas.

Meio de cultura T&K modificado (TUOVINEN; KELLY, 1973)

Este meio contém sais minerais (Solução A) e sulfato ferroso (Solução B) como fonte de energia, e pH 1,8 corrigido com H_2SO_4 concentrado (TUOVINEN; KELLY, 1973). Esse mesmo meio foi utilizado para o crescimento e manutenção da cepa de *L. ferrooxidans*.

Solução A: $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g

O pH foi ajustado com H_2SO_4 concentrado para 1,8 e completou-se com água destilada para 800 mL.

Solução B: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 33,3 g.

O pH foi ajustado com H_2SO_4 concentrado para 1,8 e completou-se com água destilada até 200 mL.

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

3.4 A adaptação das linhagens a calcopirita

As linhagens *At. ferrooxidans* - LR, *L. ferrooxidans* e a mutante de *At. ferrooxidans* (30'') foram adaptadas para crescerem diretamente no mineral, sem fonte suplementar de energia. A bactéria *At. ferrooxidans* obtém energia através da oxidação de Fe^{2+} e/ou compostos reduzidos de enxofre. E a linhagem *L. ferrooxidans* apenas obtém energia através da oxidação de Fe^{2+} . Porém, para que a biolixiviação de calcopirita seja melhorada é necessário que as linhagens possam obter energia diretamente da oxidação desse mineral biolixiviado.

Por esta razão, as linhagens, que estavam mantidas em meio contendo ferro, foram adaptadas para o consumo de mineral através de 4 repiques em meio T&K contendo como fonte de energia a calcopirita em densidade de polpa crescente a cada repique realizado e consequentemente uma diminuição gradual na adição de Fe^{2+} ao meio (Tabela 2). O pH foi monitorado periodicamente (intervalos de 5 dias) e medidas de pH em torno de 1,8 indicavam crescimento bacteriano nesse meio

O cultivo em minério foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 5% (v/v) de inóculo das linhagens, sendo o valor de pH inicial de 1,8. O crescimento foi conduzido em mesa agitadora a 150 rpm e temperatura de 30°C, sendo o volume final da solução de 100 mL. A evaporação de cada frasco foi estimada pela perda de peso e compensada pela adição de água destilada esterilizada.

Além disso, para comprovar o crescimento das linhagens na presença do mineral a cada repique ao final de cada etapa as linhagens foram inoculadas em meio fresco contendo Fe^{2+} (120 mmol.L⁻¹), comprovando seu crescimento, já que todas as linhagens conseguiram oxidar totalmente o Fe^{2+} adicionado no tempo previsto na literatura (2 dias para a *At. ferrooxidans* e 5 dias para a *L. ferrooxidans*).

Tabela 2 - Ensaio de adaptação e suas respectivas densidades de polpa de calcopirita.

Etapas de Adaptação	Densidade de polpa (m/v)	Fe²⁺ (mmol.L⁻¹)
1ª etapa	1,0%	60
2ª etapa	1,5%	30
3ª etapa	2,0%	15
4ª etapa	2,5%	0

Fonte: Autor

Todas as etapas foram feitas em duplicata, verificando a cada nova etapa o crescimento das linhagens em meio fresco contendo ferro.

3.5 Oxidação de íons ferrosos na presença de cisteína

Os ensaios de dose-resposta pelas linhagens *At. ferrooxidans* – LR, *L. ferrooxidans* e a mutante de *At. ferrooxidans* (30'') foram realizados com o objetivo de detectar qual seria a concentração inibitória de cisteína ao crescimento dessas linhagens.

O cultivo foi realizado em condições ótimas na presença e ausência de minério com diferentes concentrações de cisteína de acordo com a Tabela 3. Foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 5% (v/v) de inóculo das linhagens, sendo o valor de pH inicial de 1,8. O crescimento foi conduzido em mesa agitadora a 150 rpm e temperatura de 30°C, sendo o volume final da solução de 100 mL. A evaporação de cada frasco foi estimada pela perda de peso e compensada pela adição de água destilada esterilizada.

Tabela 3 - Ensaio de inibição a cisteína e as respectivas concentrações testadas.

Condições do ensaio de inibição	Concentração de cisteína (mol.L⁻¹)
1^a condição	0
2^a condição	10 ⁻¹
3^a condição	10 ⁻²
4^a condição	10 ⁻³

Fonte: Autor

A cinética de oxidação dos íons ferrosos foi acompanhada com o tempo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.6 Ensaio de crescimento em frascos agitados

Para os ensaios de biolixiviação foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo a solução A do meio T&K, 5% (v/v) de inoculo e 2,5% (m/v) de calcopirita e 10⁻³ mol.L⁻¹ de cisteína, resultando num volume final de 150 mL, sendo mantido sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 35 dias. A evaporação do meio líquido de cada frasco foi estimada pela perda de massa e compensada pela adição de água destilada esterilizada. Este controle foi feito a cada sete dias e as condições experimentais testadas foram em meio inoculado com 5% (v/v) da cada cepa, meio inoculado com o consórcio das cepas e um controle abiótico como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Diferentes condições utilizadas no ensaio de biolixiviação.

Linhagens inoculadas (5% v/v)
<i>At. ferrooxidans</i> - LR
<i>L. ferrooxidans</i>
mutante de <i>At. ferrooxidans</i> (30'')
<i>At. ferrooxidans</i> - LR adaptada
mutante adaptada
<i>L. ferrooxidans</i> adaptada
Consórcio: <i>At. ferrooxidans</i> e mutante (30'')
Consórcio: <i>At. ferrooxidans</i> e <i>L. ferrooxidans</i>
Consórcio: <i>L. ferrooxidans</i> e mutante (30'')
Controle (Sem adição de microrganismos)

Fonte: Autor

Todas as condições de ensaio foram realizadas em duplicata.

Os ensaios de biolixiviação foram acompanhados por amostragens periódicas da suspensão homogênea dos frascos. A separação das fases sólida e líquida foi realizada por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 minutos, sob refrigeração a 4°C (Centrifuge 5702R – Eppendorf).

Foram realizadas periodicamente medidas de pH, potencial de óxido-redução (Eh) e determinação de Fe²⁺. Uma alíquota das amostras foi armazenada em ácido nítrico 2% (1:1) para determinação de Cu_{total} e Fe_{total} por espectrometria de absorção atômica (Agilent Technologies 200 - Series AA). Este ensaio foi realizado em duplicata.

Foi feita uma correção ácida (H₂SO₄ 1:1 esterilizado) de pH para valor próximo a 2,0 no primeiro dia de amostragem.

3.7 Procedimentos analíticos

3.7.1 Medidas de pH e potencial redox (Eh)

O pH foi mensurado com o auxílio do pHmetro Corning 430 e o potencial de óxido-redução da solução (Eh) foi medido contra o eletrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ equipamento Micronal B374. Ambas as medidas foram realizadas no sobrenadante das amostras em intervalos de tempo pré-determinados.

3.7.2 Determinação de íons ferrosos (Fe^{2+}) (VOGEL, 1981)

A determinação dos íons Fe^{2+} foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando o método da 1,10-fenantrolina, que consiste na formação do complexo Fe (II)-fenantrolina, de coloração vermelha. Foram utilizadas as seguintes soluções:

A) Solução de monohidrato de 1,10-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)*: fenantrolina (0,2g); Água destilada (qsp 100 mL)

* A solução de fenantrolina foi estocada em recipientes protegidos da luz, para evitar sua oxidação.

Tampão acetato (pH=3,2):

B) Solução de ácido acético 2 mol.L^{-1} : CH_3COOH (11,46 mL); água destilada (qsp 100 mL)

C) Solução de acetato de sódio anidro 2 mol.L^{-1} : CH_3COONa anidro (8,2 g); água destilada (qsp 50 mL)

O tampão acetato é formado pela mistura das soluções B e C nas devidas proporções indicadas.

D) Solução padrão de íons Fe^{2+} : $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,07 g); H_2SO_4 concentrado (2,5 mL); água destilada (qsp 1000 mL)

Para a obtenção da curva analítica, foram preparadas soluções com concentrações crescentes de Fe^{2+} (0,00; 0,50; 1,25; 2,50; 4,50; 6,25 mg.L^{-1}). A estas soluções foi adicionado

10,0 mL de tampão acetato e 20,0 mL da solução de fenantrolina. Completa-se o volume de todas as soluções para 50 mL com água destilada. Para a construção da curva analítica será traçado um gráfico de absorbância em função da concentração de íons Fe^{2+} .

Nos ensaios em frascos agitados foi utilizada uma alíquota de 1,0 mL de amostra (diluída) com adição de 2,0 mL de solução de fenantrolina e 1,0 mL da solução de tampão acetato e o volume será completado a 5,0 mL com água destilada. A leitura das absorbâncias foi realizada em um espectrofotômetro 600S Femto, utilizando um comprimento de onda de 510 nm.

3.7.3 Determinação de ferro total e cobre total

A concentração de ferro e cobre totais foram analisadas por espectrometria de absorção atômica, utilizando um espectrômetro Agilent. A faixa de concentração do padrão de ferro utilizado foi entre 0,06 e 15 ppm e de cobre entre 0,06 e 15 ppm. O comprimento de onda utilizado para as leituras de ferro foi de 324,7 nm e de 248,3 nm para as leituras do cobre.

3.8 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em duplicata e os valores médios foram utilizados nas análises de dados. O erro padrão foi calculado e está presente como barras de erro.

Os dados foram analisados pelo software OriginPro versão 8.0 e pelo Assistatic 7.7 beta (SILVA, F. A. S., AZEVEDO, 2009). Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva e testes de normalidade (Shapiro-Wilk) One-way ANOVA com o intuito de analisar a diferença estatística dos valores de solubilização de cobre nos ensaios inoculados.

Os coeficientes correlação das regressões lineares ($y=ax+b$) e polinomiais de segundo grau ($y=B_1x + B_2x^2 + b$) foram utilizados para verificar se existe correlação linear entre os parâmetros pH, Eh e $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ e a solubilização de cobre. Também foram utilizados para verificar se existe correlação linear nos parâmetros pH, Eh e $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ entre si.

Para o estudo da cinética de oxidação dos sulfetos minerais, as curvas de solubilização de cobre dos inoculados foram ajustadas para o modelo hiperbólico, que é classificado como elástico não linear e o modelo assume que as curvas de solubilização de Cobre vs tempo podem ser razoavelmente aproximadas por hipérbolos e assim calculadas através dos

parâmetros da equação da curva ($C_{\text{cobre}}=(P1*t)/(P2+t)$) as concentrações máximas de cobre solubilizado (P1) e o tempo em que metade da concentração de cobre máxima foi solubilizada (P2).

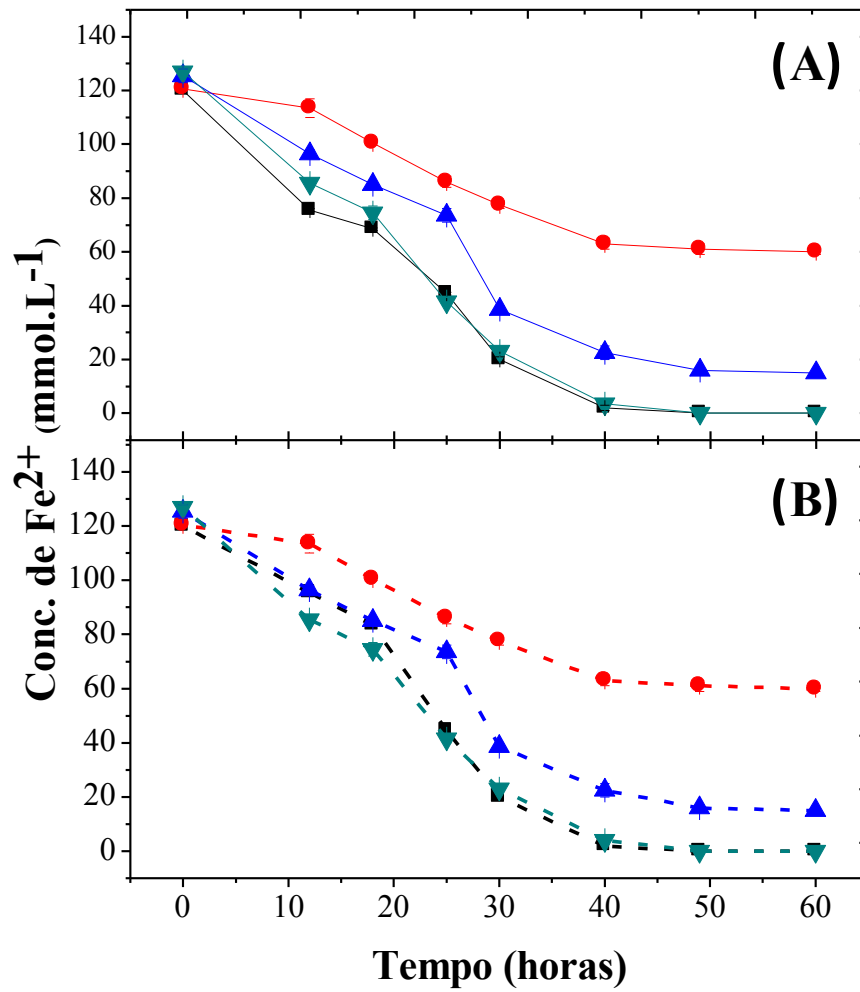
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DA INIBIÇÃO POR CISTEÍNA

Foi realizado um ensaio preliminar com o objetivo de determinar a concentração máxima de cisteína que não provocava a inibição do metabolismo bacteriano para as linhagens *At. ferrooxidans* - LR e *L. ferrooxidans*, através da oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) na presença de diferentes concentrações do aminoácido. Além disso, também era de interesse verificar se a presença do mineral influenciava na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}), por isso os mesmos ensaios foram realizados na presença e na ausência de calcopirita.

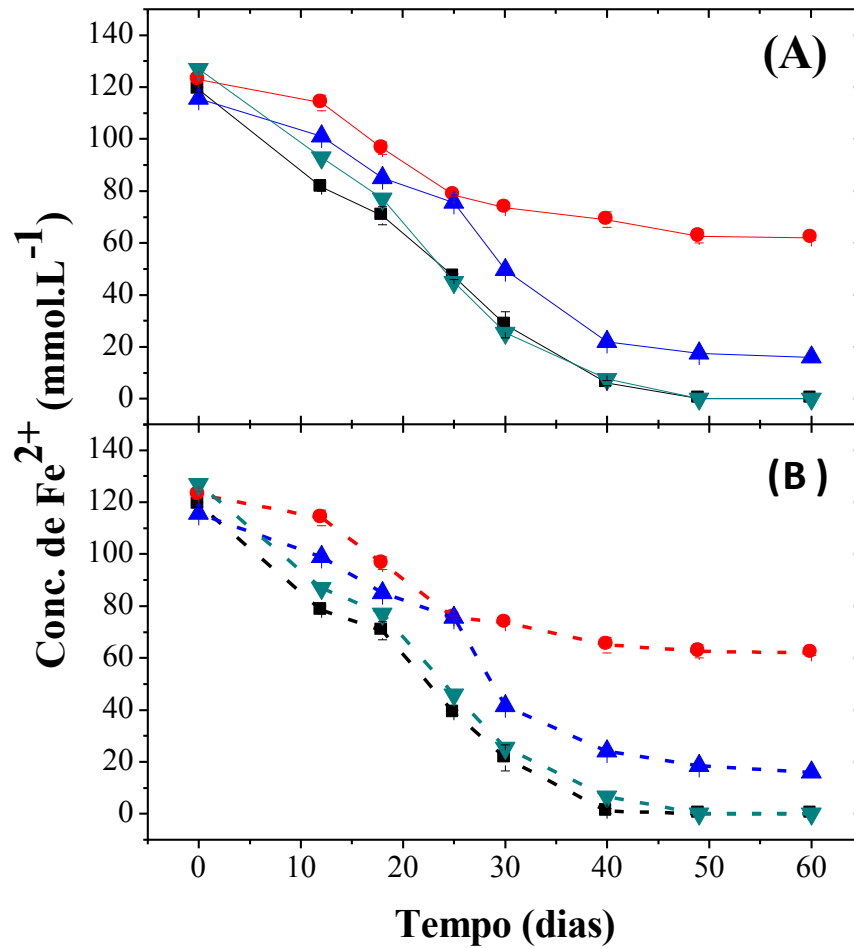
Nas Figuras 6, 7 e 8 estão apresentados os valores da concentração de Fe^{2+} durante o ensaio de oxidação de íons ferrosos na presença e ausência de calcopirita para as diferentes linhagens: *At. ferrooxidans* - LR, mutante de *At. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans*, respectivamente.

Figura 6 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) na presença de *At. ferrooxidans* – LR e de diferentes concentrações de cisteína. (■) sem cisteína; (●) 10^{-1} mol L^{-1} de cisteína; (▲) 10^{-2} mol L^{-1} de cisteína; (▼) 10^{-3} mol L^{-1} de cisteína; (A) com adição de 2,5% de calcopirita (B) sem adição de calcopirita.



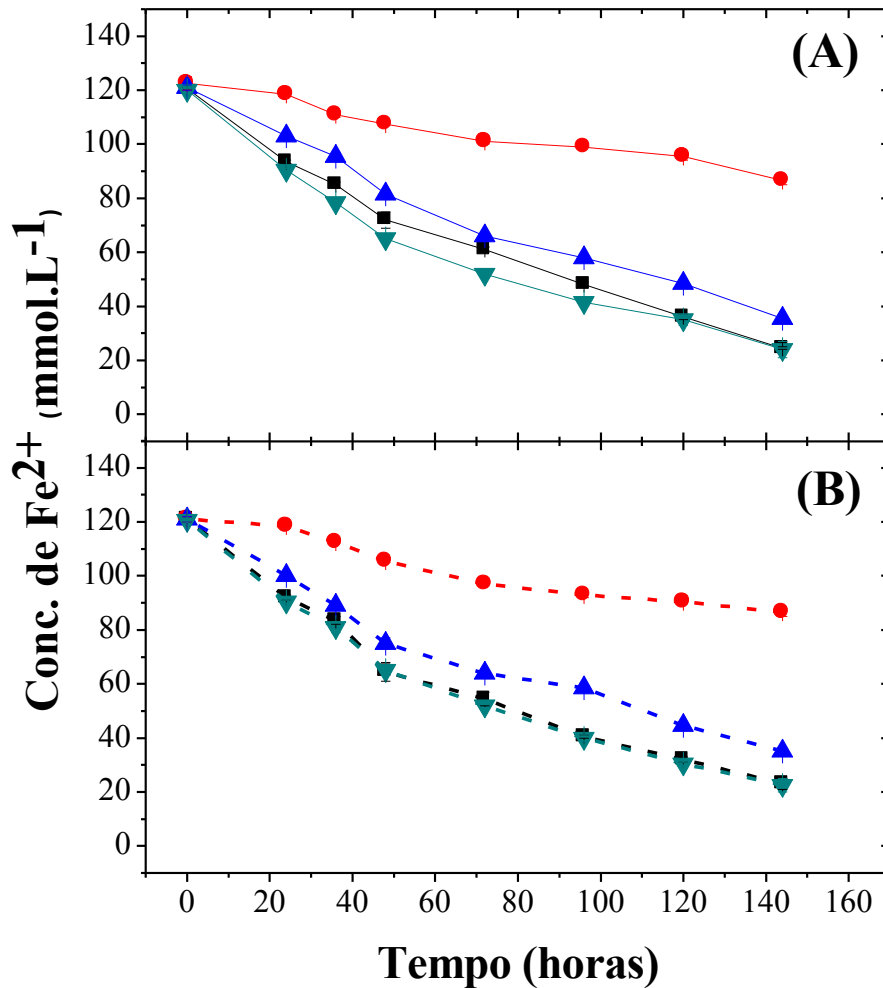
Fonte: Autor

Figura 7 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) na presença de mutante de *At. ferrooxidans* – LR e de diferentes concentrações de cisteína. (■) sem cisteína; (●) 10^{-1} mol L^{-1} de cisteína; (▲) 10^{-2} mol L^{-1} de cisteína; (▼) 10^{-3} mol L^{-1} de cisteína; (A) com adição de 2,5% de calcopirita (B) sem adição de calcopirita.



Fonte: Autor

Figura 8 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) na presença de *L. ferrooxidans* e de diferentes concentrações de cisteína. (■) sem cisteína; (●) 10^{-1} mol L^{-1} de cisteína; (▲) 10^{-2} mol L^{-1} de cisteína; (▼) 10^{-3} mol L^{-1} de cisteína; (A) com adição de 2,5% de calcopirita (B) sem adição de calcopirita.



Fonte: Autor

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 6-8 todas as linhagens testadas (*At. ferrooxidans* – LR, *L. ferrooxidans* e mutante de *At. ferrooxidans* (30^{''})) apresentaram comportamento semelhante, onde a concentração de 10^{-3} mol.L⁻¹ foi a que não apresentou inibição do metabolismo bacteriano, com comportamento de oxidação do Fe^{2+} muito próximo do controle, sem adição do aminoácido.

Foi realizado como já mencionado acima, o mesmo ensaio com a presença de calcopirita, para que fosse possível verificar alguma diferença na oxidação dos íons ferrosos provocado pelo mineral. De acordo com todos os resultados, a calcopirita não modificou o

resultado final, para todas as linhagens a concentração inibitória continuou sendo 10^{-2} mol.L⁻¹ cisteína.

Sendo assim o ensaio de crescimento foi realizado com a concentração de 10^{-3} mol.L⁻¹ cisteína para em posteriores análises demonstrar-se o efeito desse aminoácido na biolixiviação de calcopirita.

Foi realizada também de acordo com os resultados indicados na Tabela 5 uma análise estatística, para verificar se a presença de calcopirita poderia influenciar na cinética da oxidação desses íons. As curvas que representam as condições que não foram inibidas pela cisteína (na presença e ausência do mineral) foram linearizadas, obtendo assim o coeficiente linear que representa a taxa de oxidação desses íons, ou seja, a velocidade em que os íons ferrosos (Fe²⁺) foram oxidados a íons férricos (Fe³⁺).

Tabela 5 - Coeficientes angulares referentes a linearização das curvas de oxidação de íons ferrosos na presença e ausência do mineral

Linhagens bacterianas	Coeficiente angular da curva (Ausência de calcopirita)	Coeficiente angular da curva (Presença de calcopirita)
<i>At. ferrooxidans</i>	-15,243	-16,300
<i>L. ferrooxidans</i>	-16,557	-16,657
mutante	-14,743	-14,757

Fonte: Autor

Por fim podemos, principalmente através dos valores da Tabela 5, observar que não se obteve diferença entre os valores de coeficiente para todas as linhagens na presença e ausência do mineral. Esse resultado indica que presença da calcopirita não modificou a cinética de oxidação dos íons ferrosos para todas as linhagens.

Em comparação entre as linhagens mostra-se que a *L. ferrooxidans* possui uma taxa de oxidação dos íons ferrosos muito menor que a *At. ferrooxidans* – LR e mutante de *At. ferrooxidans*(30”). O que já era esperado, como pode ser visto que a bactéria *At. ferrooxidans* quando não inibida, demora cerca de 48 horas para provocar a oxidação completa dos íons ferrosos (Figura 6 e 7), diferentemente da *L. ferrooxidans*, que mesmo em condições de não inibição demorou cerca de 140 horas para provocar a oxidação completa dos íons ferrosos

(Figura 8). Os valores negativos indicam a diminuição da concentração de Fe^{2+} com o tempo.

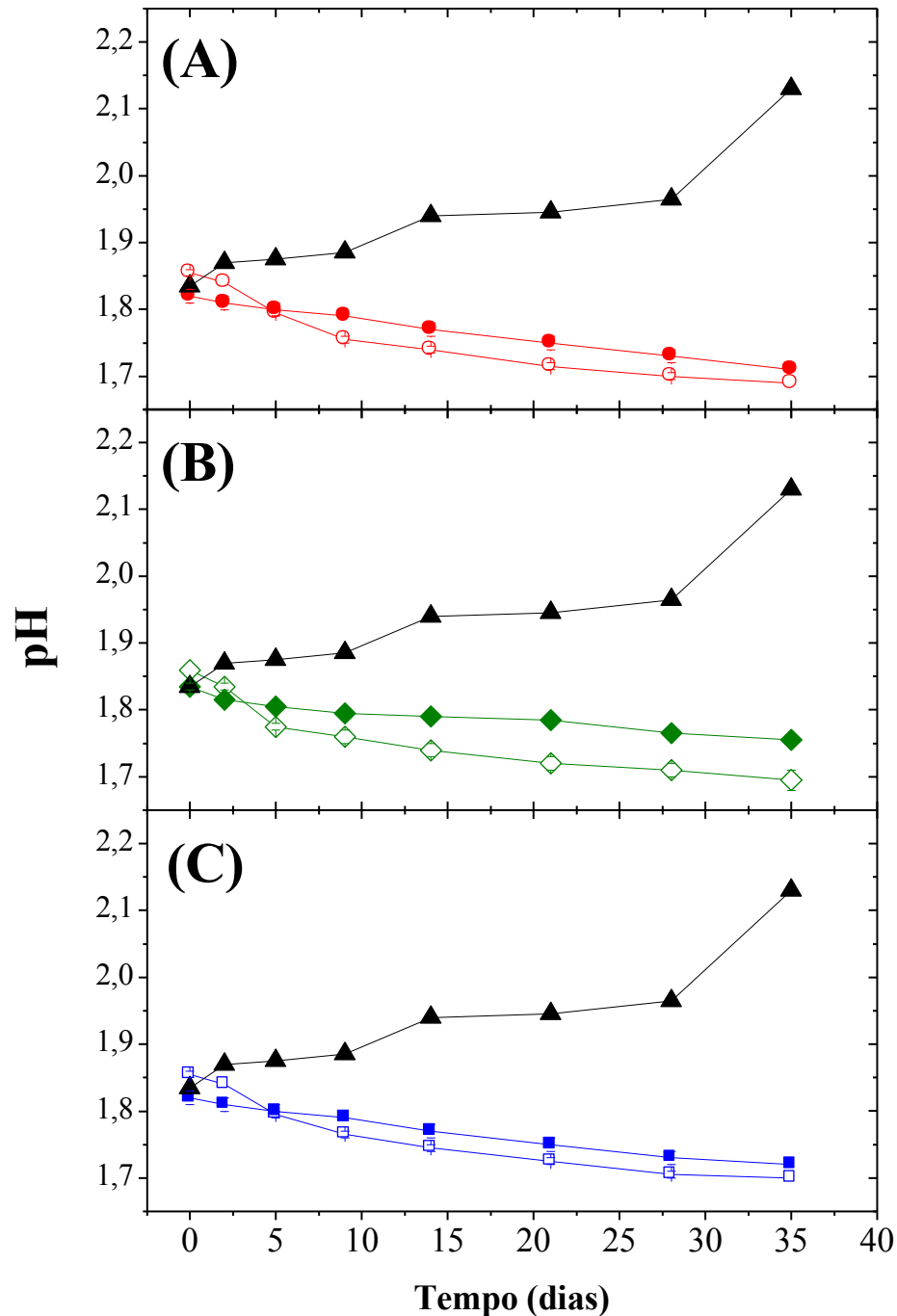
4.2 ENSAIO DE BIOLIXIVIAÇÃO

Os resultados do ensaio de biolixiviação foram fragmentados para uma melhor compreensão, inicialmente iremos demonstrar os observados com o intuito de determinar a influência da adaptação dessas linhagens ao sulfeto mineral na solubilização de cobre e nos demais parâmetros (pH, Eh, $[\text{Fe}^{2+}]$, Fe_{TOTAL}).

4.2.1 Efeito da adaptação

Na Figura 9, estão apresentados os valores de pH e potencial redox, entre as linhagens que foram adaptadas e as originais não adaptadas.

Figura 9 - Variação do pH no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) *At. ferrooxidans* – LR; (B) mutante; (C) *L. ferrooxidans*.



Fonte: Autor

Como pode ser observado pela Figura 9 acima, para todas as condições contendo microrganismos o pH diminui continuamente não ultrapassando a faixa de 1,7. A elevação ou diminuição dos valores de pH em sistemas de biolixiviação pode indicar respectivamente, o consumo ácido pela amostra mineral ou a geração do mesmo através de reações bacterianas

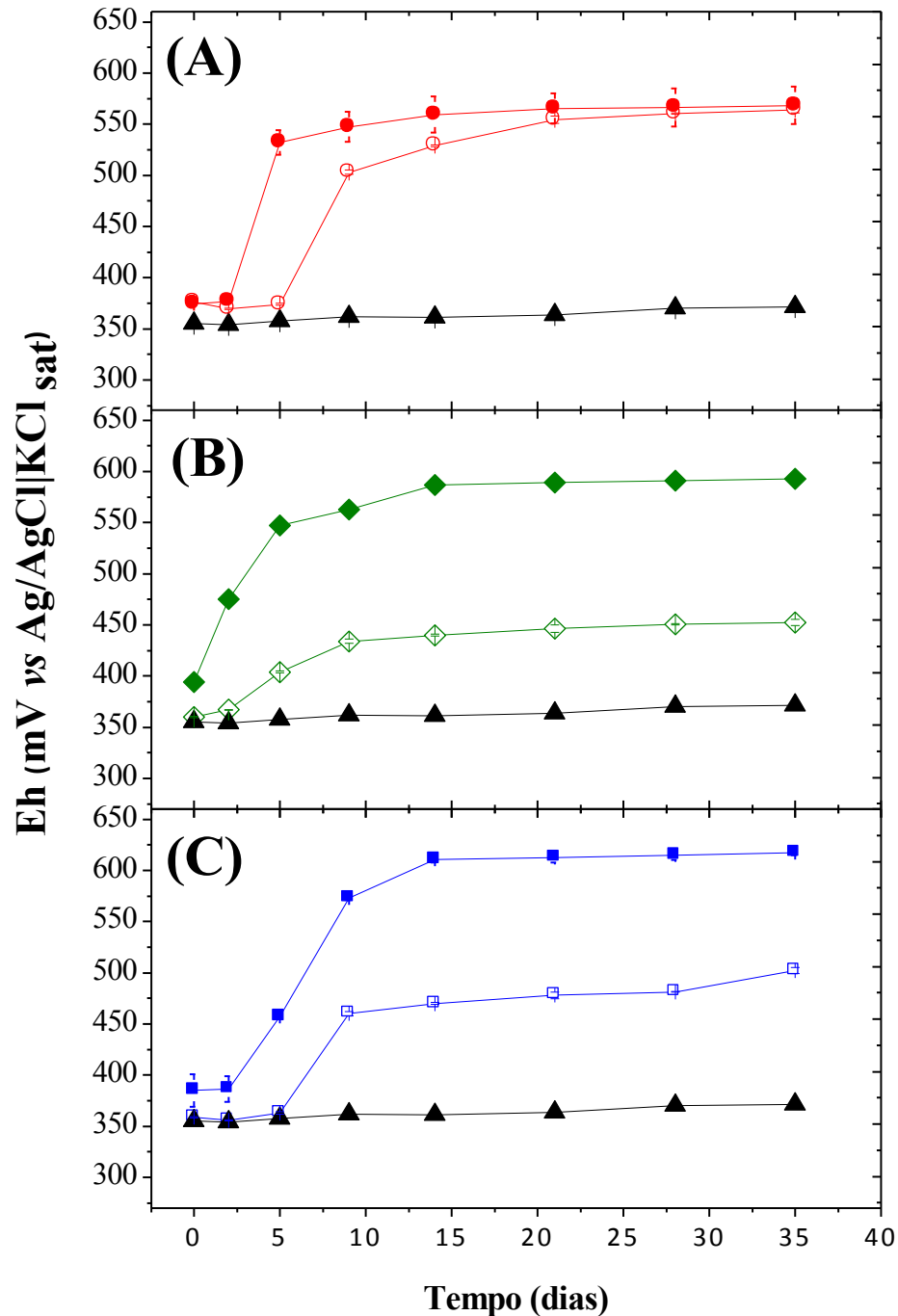
de oxidação de sulfeto (BEVILAQUA, 1999).

A correção ácida foi realizada apenas na primeira amostragem, pois nesses primeiros dois dias os valores estavam em torno de 2,0 para todas as amostras. Os ajustes foram realizados na forma de evitar a precipitação de ferro na forma de jarosita, o que pode interferir na solubilização do metal de interesse, isso pode ocorrer por se depositar na superfície do minério, além de que a diminuição do pH mantém as condições ótimas para o crescimento e atividade bacteriana (próximo a 1,8) (WATLING, 2006).

Os frascos controles (ausência de microrganismos) obtiveram um aumento do pH, chegando em torno de 2,1 no final do ensaio para os dois frascos. Isso ocorreu porque com ausência de microrganismos, há apenas a lixiviação química, e não as reações biológicas (em meios bióticos) de produção de ácido (equação 4) fazendo com que o pH do meio aumente.

De maneira geral os valores finais de pH diminuíram mais significativamente para as linhagens adaptadas, especialmente para a linhagem mutante.

Figura 10 - Variação do potencial de óxido-redução no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos fechados), não adaptadas (símbolos abertos) e controle abiótico (triângulo). (A) *At. ferrooxidans* – LR; (B) mutante; (C) *L. ferrooxidans*.



Fonte: Autor

O parâmetro analisado na figura 10 foi o potencial de óxido-redução ou potencial redox, medida do potencial de oxidação e redução do meio, que representa a tendência de uma solução ser oxidada ou reduzida, ou seja, sua capacidade de capturar ou liberar elétrons.

Como podemos observar nas medidas de potencial de óxido-redução, os frascos inoculados tiveram uma elevação continua dos valores de Eh estabilizando-se em torno de 550 mV para todas as linhagens ao fim do ensaio de biolixiviação. Dando destaque para as linhagens adaptadas, que logo na primeira amostragem realizada (2 dias), apresentaram um aumento significativo, chegando em torno de 450 mV, diferentemente das linhagens não adaptadas que obtiveram esse aumento apenas após 10 dias.

Destaca-se a linhagem adaptada de *L. ferrooxidans* (Figura 10) que alcançou valores próximos a 650 mV, enquanto a não adaptada alcançou cerca de 500 mV no mesmo período. Altos valores de potencial são considerados uma indicação da atividade bacteriana, uma vez que acinética de oxidação dos íons ferrosos pela bactéria é cerca de 500.000 vezes maior que a cinética química (SANTOS, 2014).

Os controles abióticos não demonstraram variação significativa no potencial de oxido-redução, estabilizando-se em valores muito próximos do inicial, cerca de 350 mV.

O potencial redox permite inferir, assim como o pH, sobre a atividade metabólica bacteriana. O potencial da solução se dá em função do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Seu valor pode ser calculado segundo a equação de Nerst:

$$E = E_{\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]}$$

onde, E: potencial de óxido-redução do meio, V;

E^0 : potencial de óxido-redução padrão, 0,77V para $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$;

R: constante dos gases perfeitos, 8,314 J/mol.K;

T: temperatura, K;

n: número de moles de elétrons trocados na reação;

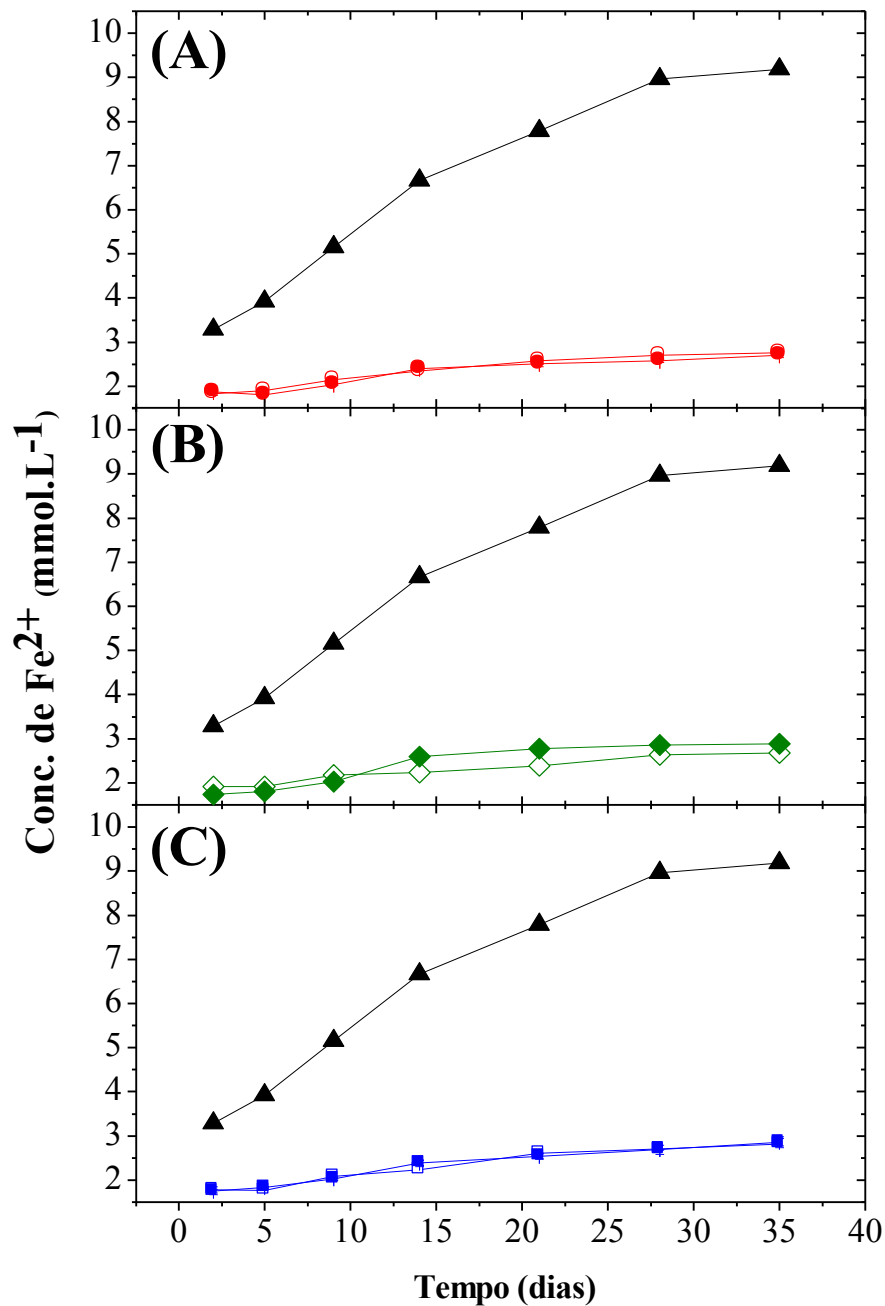
F: constante de Faraday, 96,485 C/mol e^- ;

[]: concentração das espécies iônicas.

Na figura 11 estão demonstrados os valores de concentração de íons ferrosos como tempo para as diferentes condições avaliadas. Quantidades muito baixas foram detectadas no

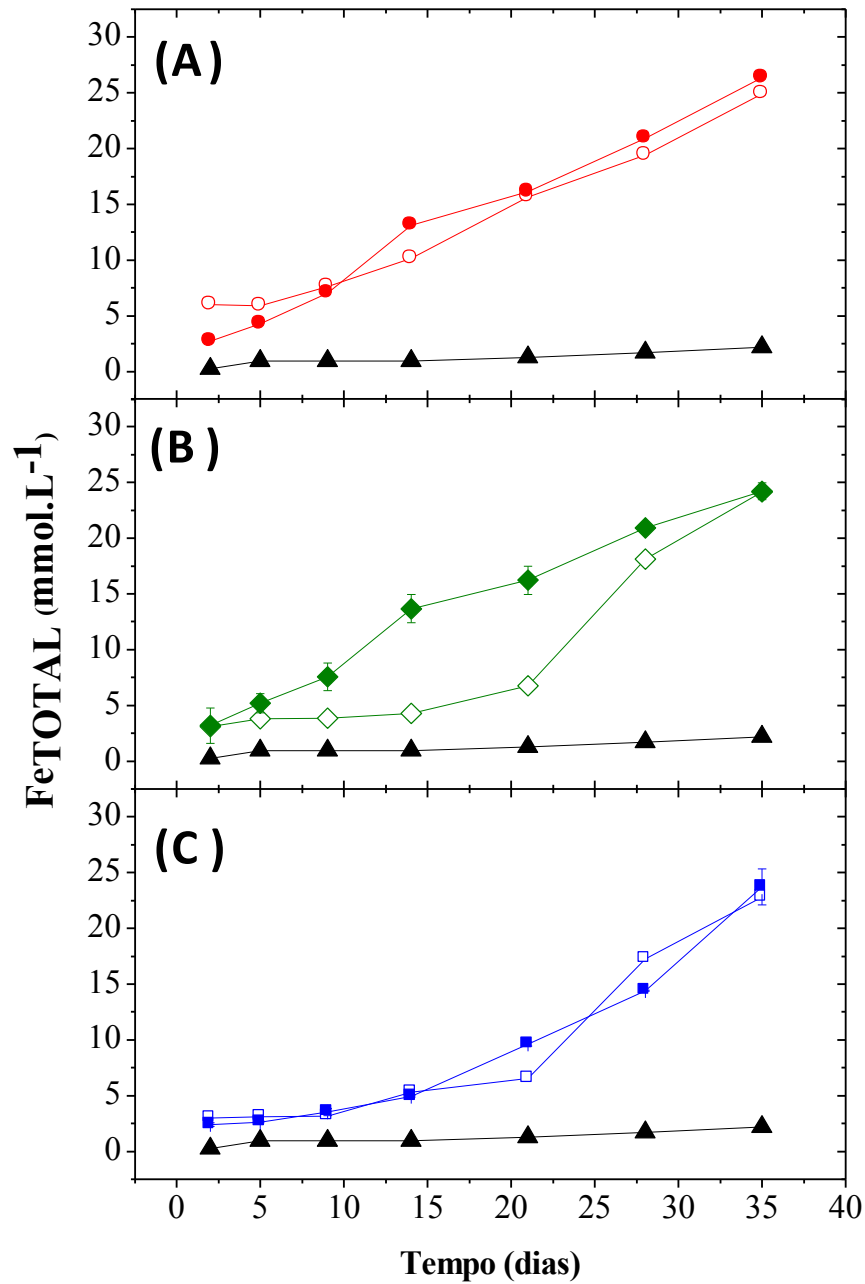
meio para os frascos inoculados ($< 3 \text{ mmol.L}^{-1}$). Este comportamento indica que as bactérias estão ativas, uma vez que a fonte de energia (íons ferrosos) está sendo consumida continuamente. Nos frascos controle elevou-se continuamente atingindo $8,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ no final do ensaio.

Figura 11 - Variação da concentração de íons ferrosos no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) *At. ferrooxidans* – LR; (B) mutante; (C) *L. ferrooxidans*.



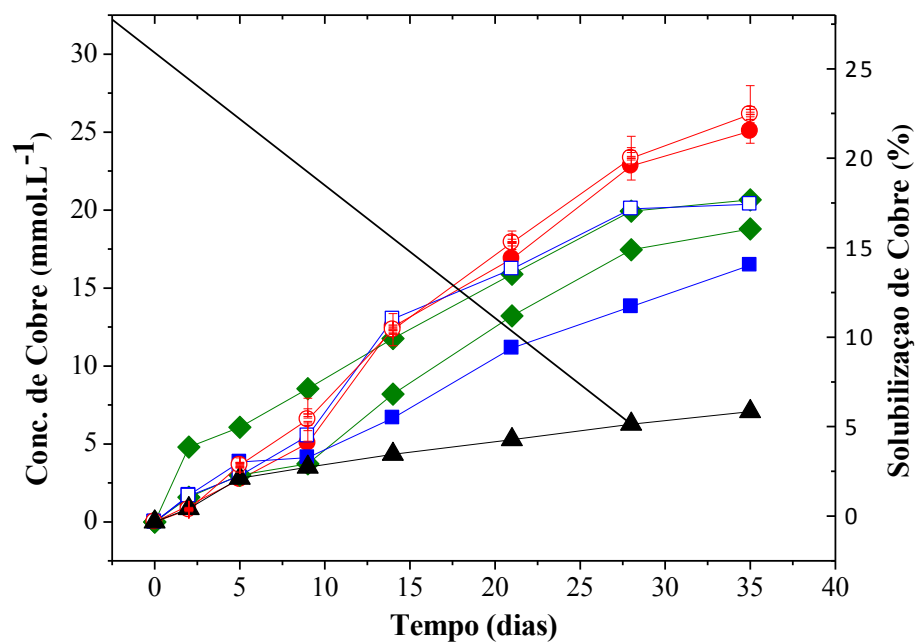
O parâmetro demonstrado na figura 12 é concentração de ferro total ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$), que aumentou significativamente durante o ensaio, atingindo cerca de 25 mmol.L^{-1} após 35 dias, o que nos indica um aumento da concentração de Fe^{3+} , comprovando a oxidação da fonte de energia pra bactéria.

Figura 12 - Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos), não adaptadas (símbolos fechados) e controle abiótico (triângulo). (A) *At. ferrooxidans* – LR; (B) mutante; (C) *L. ferrooxidans*.



O último parâmetro analisado para que pudéssemos comparar as linhagens adaptadas com as não adaptadas foi a eficiência no processo de biolixiviação, ou seja, a solubilização do metal de interesse (cobre). A variação da concentração de cobre está representada na Figura 13.

Figura 13 - Variação da concentração de cobre no ensaio de biolixiviação para linhagens adaptadas (símbolos abertos) e não adaptadas (símbolos fechados). Utilizando (●) *At. ferrooxidans* – LR; (■) mutante; (□) *L. ferrooxidans*; (▲) controle abiótico.



Fonte: Autor

Todos os parâmetros monitorados, principalmente pH e potencial de oxido-redução, variaram significativamente quando comparado entre as linhagens adaptadas e não adaptadas. Para a solubilização de cobre não foi diferente, com exceção da linhagem mutante. A linhagem *At. ferrooxidans* – LR adaptada solubilizou cerca de 23,2% de cobre enquanto a não adaptada alcançou 22,9%. O que representa um aumento maior de 2%. Para linhagem *L. ferrooxidans* adaptada solubilizou cerca de 18,5% de cobre enquanto a não adaptada alcançou 15,5%. O que representa um aumento maior de 15%.

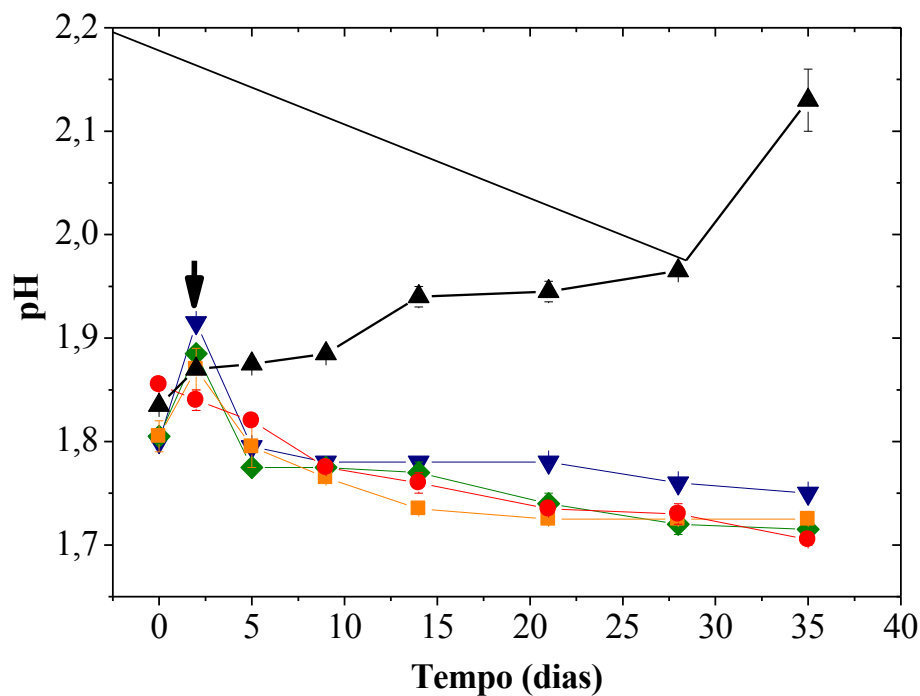
4.2.2 Consórcios bacterianos

Os dados seguintes foram agrupados de maneira a avaliar os consórcios dessas linhagens na biolixiviação da calcopirita, comentando os efeitos positivos e negativos nos parâmetros estudados.

Na Figura 14 estão apresentados os valores de pH para os ensaios de biolixiviação com os consórcios bacterianos montados como descritos na Tabela 4.

Os resultados das linhagens adaptadas e originais não serão repetidos nas figuras abaixo, apenas a *At. ferrooxidans* - LR para uma comparação de valores já que foi a mais eficiente nos resultados já apresentados.

Figura 14 - Variação do pH no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲). A seta representa a amostragem em que a correção ácida foi realizada.



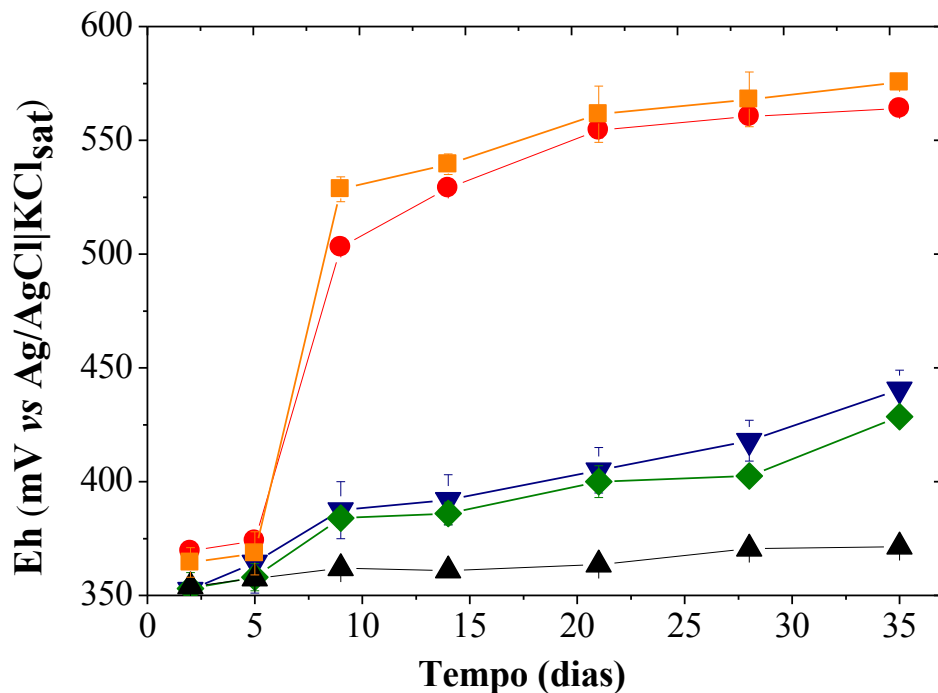
Fonte: Autor

Não houve diferenças relevantes entre os diferentes consórcios e a linhagem LR quanto a evolução dos valores de pH no período de ensaio (Figura 9).

Os frascos inoculados com LR e LR /30'' apresentaram elevação contínua do potencial

atingindo cerca de 550 mV depois de 20 dias. Os frascos inoculados LR/*L.f* e *L.f* /30” apresentaram comportamento semelhante atingindo cerca de 400 mV no final do experimento. O frasco controle manteve-se ao redor de 360 mV por todo o período de ensaio (Figura 15).

Figura 15 - Variação do potencial de oxido-redução no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30” (◆), consórcio LR/ 30” (■) e o controle (▲).

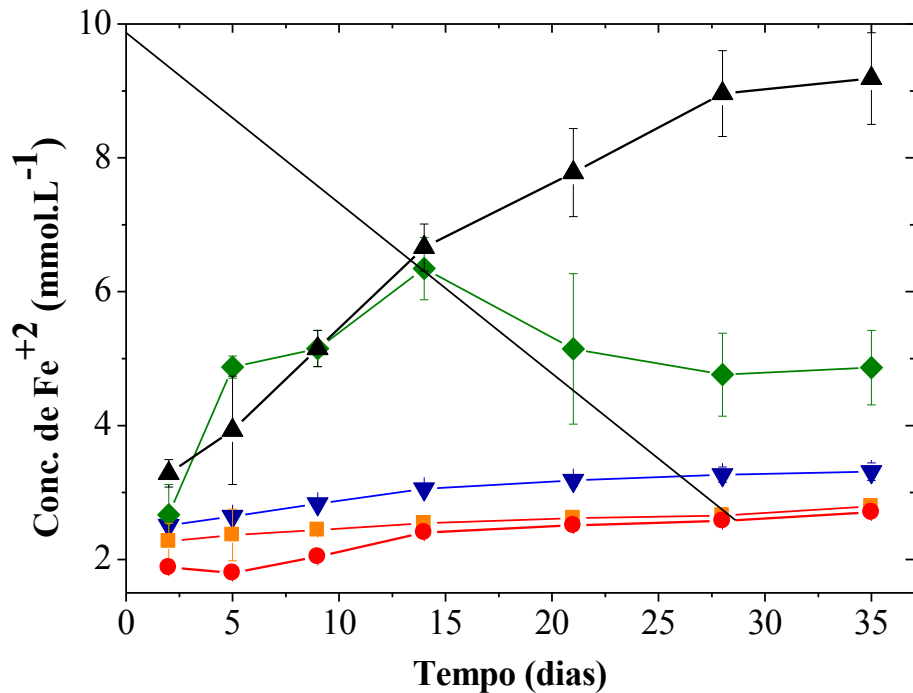


Fonte: Autor

Observando os valores das linhagens originais não adaptadas verificou-se que a *L. ferrooxidans* também foi a que apresentou valores mais baixos de potencial (497 mV) ao fim do experimento. Os consórcios contendo *L. ferrooxidans* apresentaram comportamento comparável (Figura 7 e 15).

As figuras (16 e 17) demonstram a variação da concentração de íons ferrosos e a concentração de ferro total ($Fe^{2+} + Fe^{3+}$) respectivamente.

Figura 16 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲).



Fonte: Autor

Como já se esperava a fonte de energia (Fe^{2+}) foi praticamente consumida por completo nas condições inoculadas, onde os valores encontrados para todos os consórcios esteve em torno de 3 mmol.L^{-1} durante todo período do ensaio de frascos agitados. Com exceção do consórcio *L.f*/30'' que até a segunda semana se comportou semelhante ao controle químico, indicando pouca ou nenhuma atividade bacteriana neste período.

Na figura 17 podemos observar que a concentração de ferro total foi crescente, também comprovando a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} comprovando a biolixiviação como mostrado na equação 3 que é mediada pelas bactérias do processo.

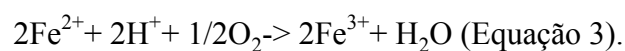
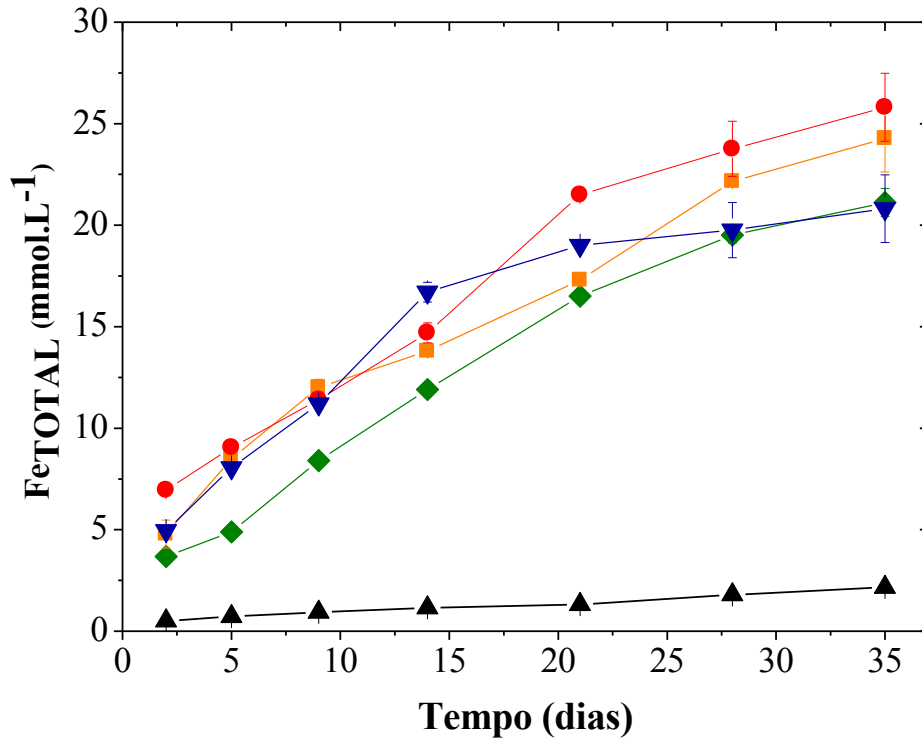


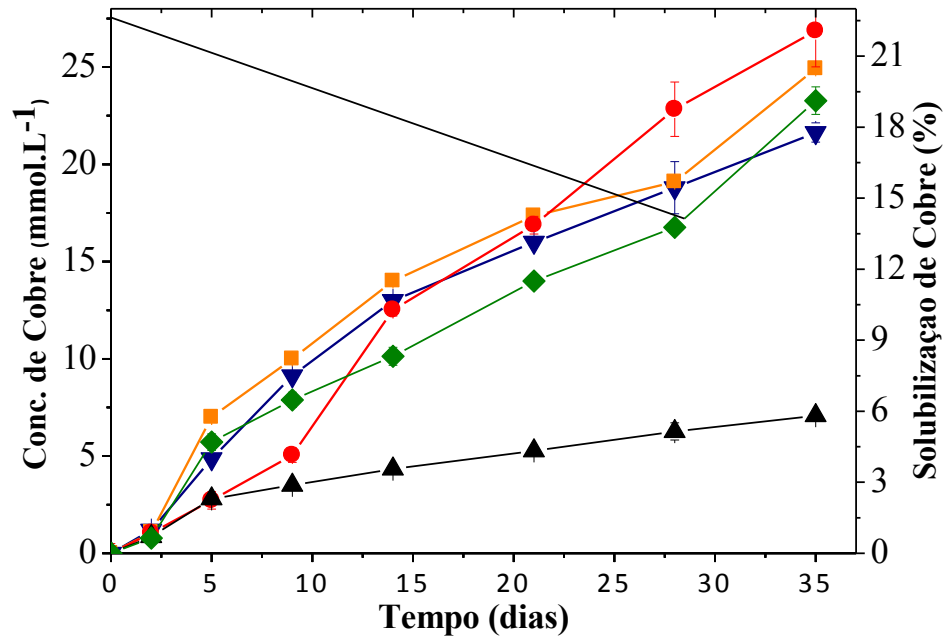
Figura 17 - Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f* 30" (■), consórcio LR/ 30" (■) e o controle (▲).



Fonte: Autor

A concentração do ferro total ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$), nos ensaios em frascos agitados aumentou continuamente no decorrer do ensaio para todas as condições testadas, com exceção dos frascos controle, como mostrado na Figura 17. Estes resultados estão diretamente relacionados à oxidação da calcopirita que resulta na liberação de íons ferrosos, e na habilidade destes microrganismos oxidarem íons férricos.

Figura 18 - Variação da concentração de cobre no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (●), consórcio LR/ *L.f* (▼), consórcio *L.f*/ 30'' (■), consórcio LR/ 30'' (■) e o controle (▲).



Fonte: Autor

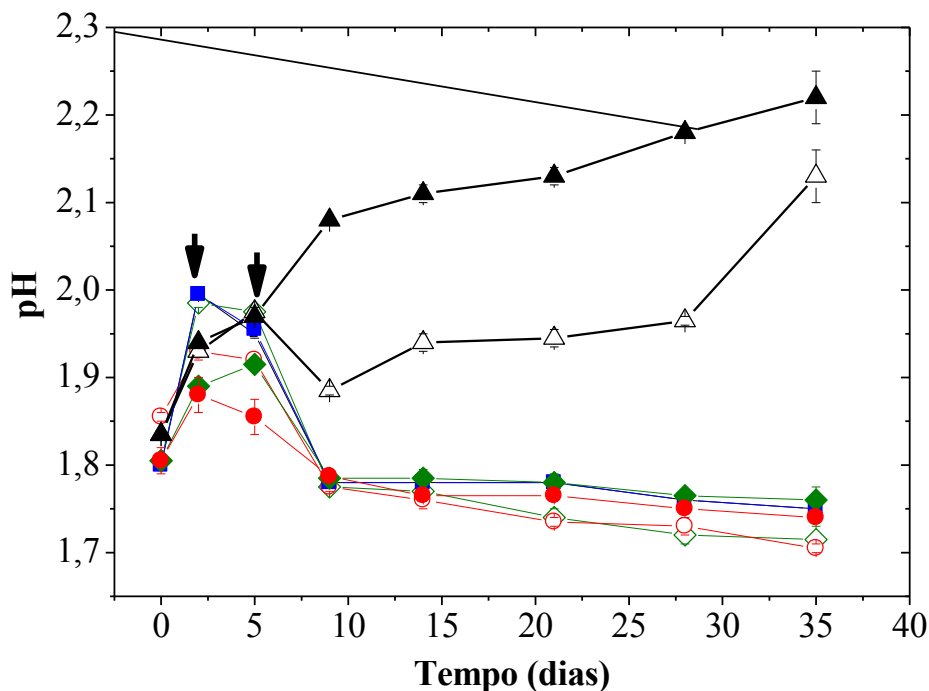
A solubilização de cobre foi outro parâmetro acompanhado durante o ensaio de biolixiviação e está demonstrado na Figura 18. Não foi possível observar diferenças significativas entre os diferentes consórcios testados, porém pôde-se destacar os consórcios que obtiveram os maiores valores, podendo ser comparado em valores próximos apenas com a *At. ferrooxidans*-LR. Dentre as culturas, o consórcio LR/ 30'' alcançou a maior extração de 21,1% (1,57 g.L⁻¹) em relação a 23,2% (1,72 g.L⁻¹) da linhagem selvagem LR.

A menor extração foi observada para a linhagem *L. ferrooxidans* (15,5%), o que pode ser explicado pelo fato de obter energia apenas através da oxidação de Fe²⁺, quando comparada com os valores da bactéria *At. ferrooxidans* que obtém energia através da oxidação de Fe²⁺ e/ou compostos reduzidos de enxofre.

4.2.3 Cisteína

O efeito de L-cisteína na biolixiviação de Cu^{2+} a partir de minério de calcopirita está apresentado nas Figuras 22, 23, 24, 25 e 26 que se seguem através dos valores de pH, de potencial redox, a concentração de Fe^{2+} e ferro total além da concentração de cobre, respectivamente.

Figura 19 - Variação do pH no ensaio de biolixiviação no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (\circ), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (\square), *L. ferrooxidans* (\square) e controle abiótico (\triangle) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína.



Fonte: Autor

Como pode ser observado pela Figura 22 acima, para todos as condições exceto os controles abióticos, o pH sofreu uma ligeira queda, não ultrapassando a faixa de 1,75.

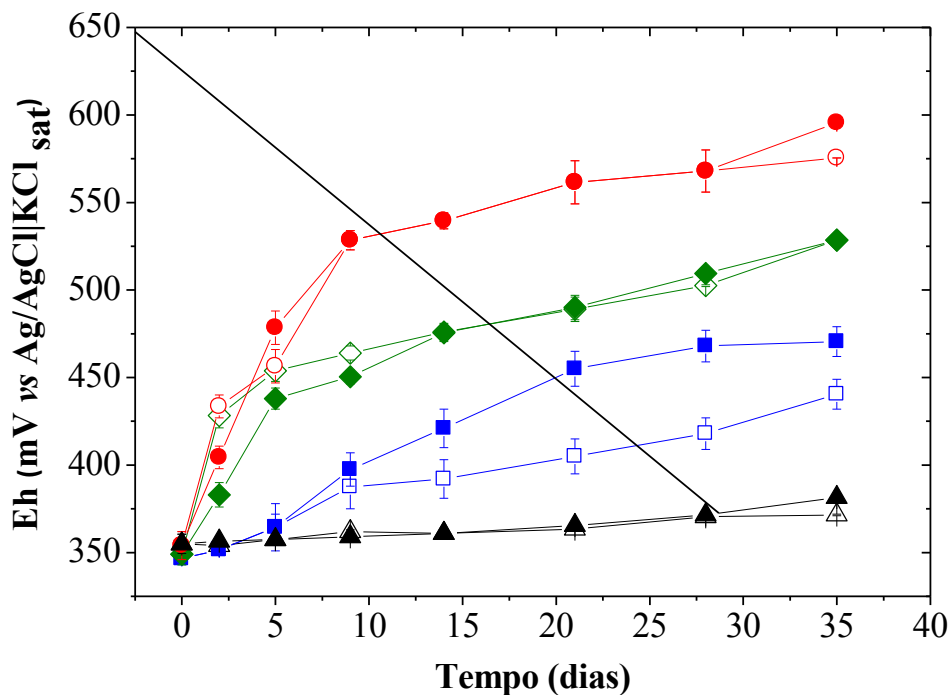
Comparando-se os frascos que continham o aminoácido com os que foram utilizados de controle com apenas as bactérias e o mineral, os primeiros não apresentaram uma grande mudança no valor do pH, mostrando que a cisteína pode influenciar esse parâmetro de alguma forma a fazer com que a produção de ácido não seja tão perceptível em todas as amostragens.

A correção ácida foi realizada nas duas primeiras amostragens (5 dias), pois nesses

primeiros dias o valores estavam em torno de 2,0 para todas as amostras.

Como podemos observar na Figura 23, através das medidas de potencial de oxido-redução, os frascos que continham bactéria, tiveram uma elevação continua dos valores de Eh, estabilizando-se em torno de 500 mV para a linhagem *At. ferrooxidans* – LR e mutante. Já a linhagem *L. ferrooxidans* como no ensaio de biolixiviação realizado anteriormente também não acompanhou a linhagem *At. ferrooxidans*, estabilizando-se em torno de 450 mV.

Figura 20 - Variação do potencial de oxido-redução no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (◻), *L. ferrooxidans* (◻) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína.

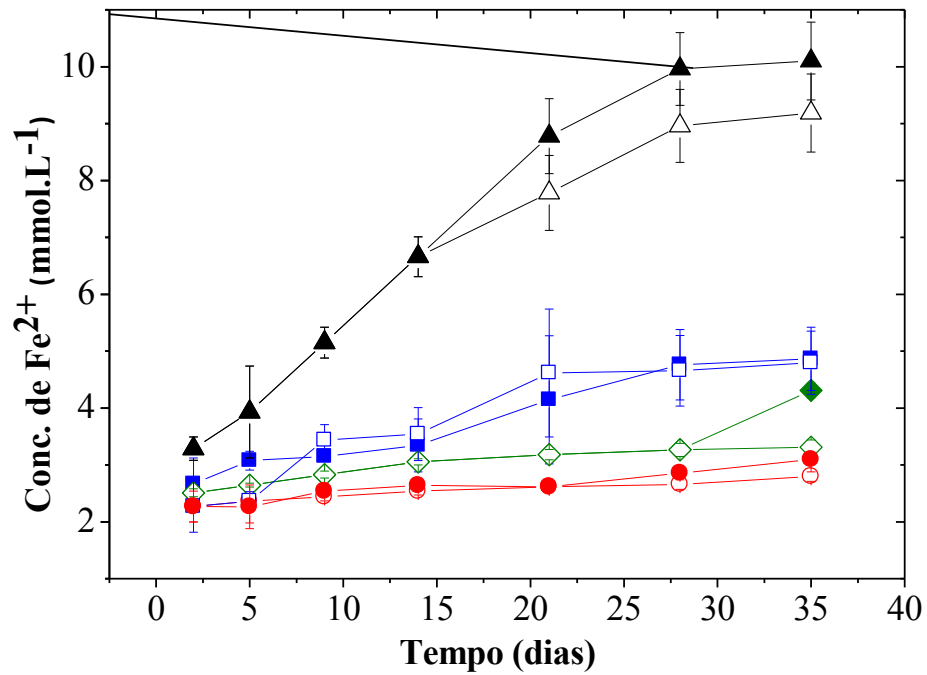


Fonte: Autor

Não foi possível observar grandes diferenças nesse parâmetro para os frascos que continham a L-cisteína. Dando destaque para as linhagem *At. ferrooxidans* na presença de L-cisteína, que ao longo de todo o ensaio as amostras tiveram um aumento significativo do Eh, chegando em torno de 600 mV.

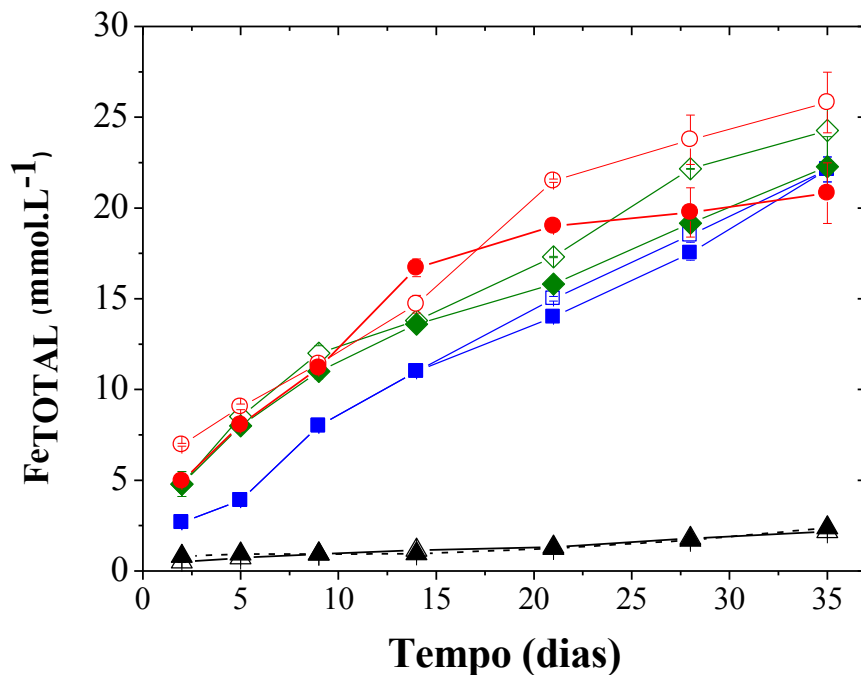
Lembrando que o ensaio foi realizado na presença das linhagens já adaptadas ao mineral fazendo com que na primeira amostragem (2 dias) todos os parâmetros já apresentassem grande evolução.

Figura 21 - Variação da concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (\circ), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (\square), *L. ferrooxidans* (\square) e controle abiótico (\triangle) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de cisteína.



Fonte: Autor

Figura 22 - Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (◊), *L. ferrooxidans* (◻) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína.



Fonte: Autor

Na figura 24 estão demonstrados os valores de concentração de íons ferrosos como tempo para as diferentes condições avaliadas (Fe^{2+}). Quantidades muito baixas foram detectadas no meio para os frascos inoculados na presença e ausência do aminoácido (<5 mmol.L⁻¹). Este comportamento indica que as bactérias estão ativas, uma vez que a fonte de energia (íons ferrosos) está sendo consumida continuamente.

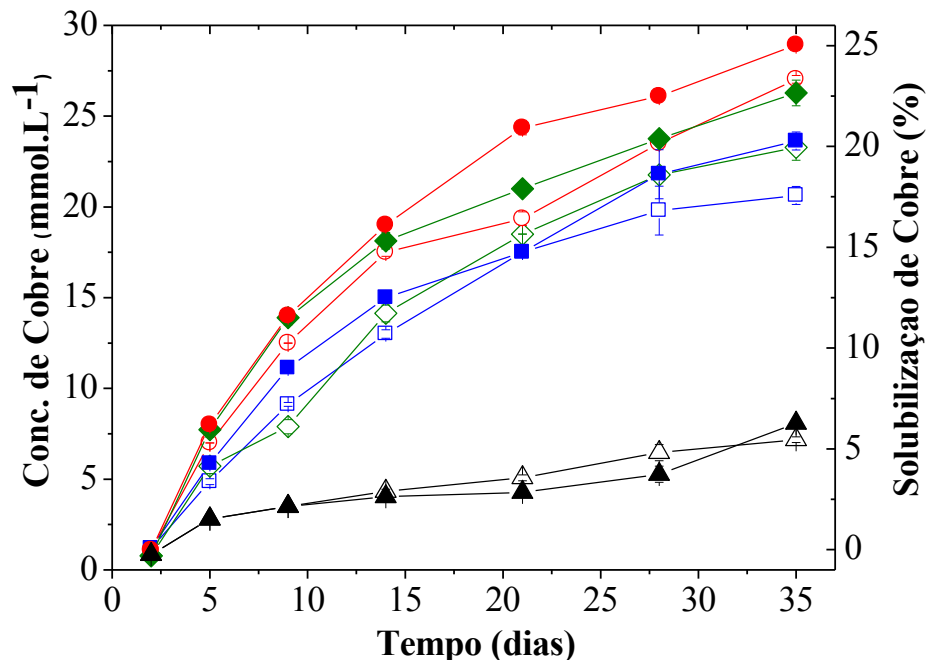
Nos frascos controle elevou-se continuamente atingindo 10,5 mmol.L⁻¹ no final do ensaio.

O parâmetro demonstrado na figura 25 é concentração de ferro total ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$), e os valores para todas as linhagens também foi condizente com o esperado mostrando que grande quantidade de Fe^{2+} foi oxidado a Fe^{3+} , comprovando o metabolismo bacteriano, chegando a valores próximos a 30 mmol.L⁻¹.

Para os frascos que continham o aminoácido L-cisteína no meio, os valores apresentados de Fe^{3+} foram maiores, isso indica que uma maior quantidade de Fe^{2+} foi oxidado a Fe^{3+} , mostrando assim uma maior solubilização da calcopirita. O último parâmetro

analisado para que pudéssemos verificar a eficiência no processo de biolixiviação, ou seja, a solubilização do metal de interesse (cobre). Foi demonstrado na figura 21 a variação da concentração de cobre para todas as linhagens na presença de aminoácido e seus respectivos controles (ausência de aminoácido).

Figura 23 - Variação da concentração de cobre total no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (○), mutante de *At. ferrooxidans* – LR (30'') (◻), *L. ferrooxidans* (◻) e controle abiótico (△) na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos) de 10^{-3} mol.L⁻¹ de cisteína.



Fonte: Autor

Pode ser visto que na presença de L-cisteína no meio de lixiviação acelerou significativamente a lixiviação de Cu²⁺ a partir de minério de calcopirita por todas as linhagens.

A concentração máxima de Cu²⁺ foi lixiviada a partir do minério em soluções contendo 10^{-3} mol.L⁻¹ de L-cisteína. Valores esses 10% maiores do que o obtido na solução de controle (ausência de cisteína) durante o mesmo período de tempo. A concentração de Cu²⁺ dissolvido na presença de 10^{-5} mol.L⁻¹ de L-cisteína também influenciou positivamente na eficiência do processo, obtendo valores finais 15% maiores que o a solução controle (ausência de cisteína).

Dando destaque para a linhagem *At. ferrooxidans* - LR na presença de L-cisteína, que ao longo de todo o ensaio as amostras tiveram um aumento significativo da concentração de cobre solubilizado, chegando em torno de 29 mmol.L⁻¹, valor aproximadamente 10% maior que na ausência do aminoácido (26,5 mmol.L⁻¹).

Assim, a L-cisteína pode ser usada como um reagente de potencial durante a biolixiviação de Cu²⁺ a partir de minério de calcopirita por *At. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans*. Este resultado está de acordo com os estudos encontrados na literatura. Ghosh e Mukhopadhyay (2011) estudaram o efeito de aminoácidos na biolixiviação de minério de calcopirita por *Thiobacillus ferrooxidans* e concluíram que baixas concentrações de L-serina (1,6 g/L) podem atuar como um agente eficaz na solubilização de Cu²⁺ na biolixiviação de calcopirita.

Li et al. (2013) estudaram o efeito de aminoácidos na biolixiviação de colofanito (rocha a qual ocorre mais de 80% da mineralização de fosfato-urânio), e resultados promissores indicaram que baixas concentrações (0,5 g/L) de L-glicina influenciaram positivamente no processo, aumentando a eficiência deste em aproximadamente 8,0%.

He et al. (2009) determinaram os efeitos da L-cisteína na biolixiviação de sulfeto Ni-Cu por *Acidithiobacillus caldus*. Como principais resultados foi observado que concentrações de Cu²⁺ nas soluções de lixiviação aumentaram com o tempo, exceto no controle abiótico. Certas quantidades de L-cisteína melhoraram significativamente a biolixiviação de sulfeto Ni-Cu, atingindo uma concentração máxima do cobre dissolvido quando adicionado 0,05 g/L (10⁻³ mol.L⁻¹) de L-cisteína.

5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A partir dos dados obtidos nos ensaios de biolixiviação foi realizado um estudo para determinar a interferência estatística dos parâmetros na solubilização do metal de interesse e a correlação entre si desses parâmetros.

5.1 Interferência estatística dos parâmetros na solubilização de cobre

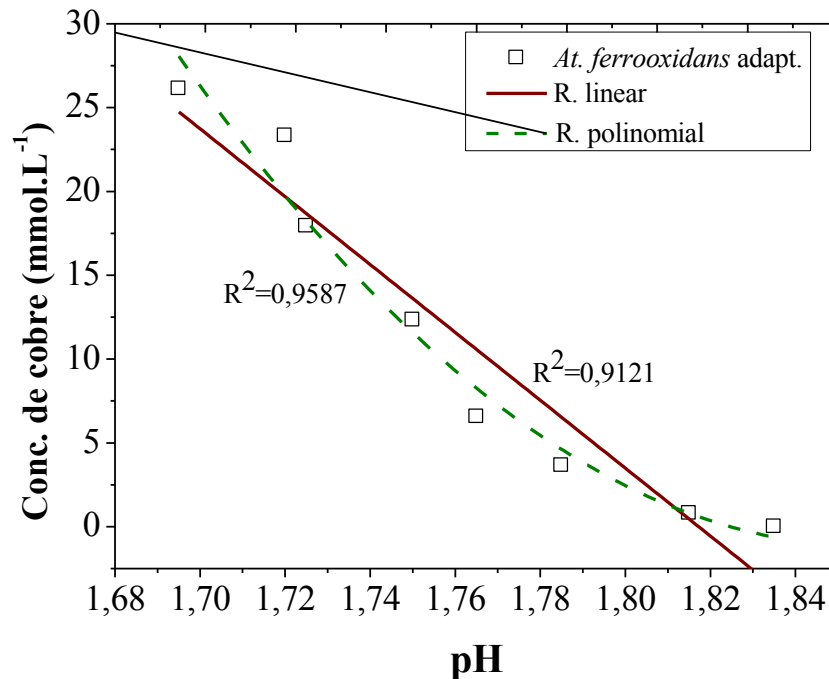
5.1.1 pH

Para determinar a interferência do pH na solubilização de cobre, os valores de pH (variável independente) e concentração de cobre recuperado (variável dependente) foram inseridos no gráfico e a partir disso foi realizado uma regressão linear e uma regressão polinomial dessa curva.

A regressão linear foi realizada para determinar a correlação direta linear entre os dois parâmetros. A regressão polinomial de segundo grau ($y=ax + a_2*x^2 + b$) foi realizada com o intuito de que através dos números dos coeficientes de correlação pudéssemos entender a forma apresentada pela curva, ou seja, se esses dois parâmetros se correlacionam mais proximamente de forma linear ou não-linear (polinomial, por ex), e se é que existe correlação entre eles.

A figura 27 é uma demonstração de como esse estudo foi realizado a partir dos dados da *At. ferrooxidans* – LR adaptada.

Figura 24 – Gráfico de dispersão do pH x concentração de cobre recuperado no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR adaptada.



Fonte: Autor

Foi realizada uma análise preliminar dos dados através da observação e das curvas que representam suas regressões linear e polinomial de segundo grau, assim foi possível observar que nesse caso específico os pontos da curva se aproximam mais da regressão polinomial que dá regressão linear, isso pode ser comprovado com os valores de coeficiente de determinação ($R^2_{r.linear}=0,9121$ e $R^2_{r.polinomial}=0,9587$).

Pode-se verificar que os valores de coeficiente de correlação das regressões polinomiais apresentaram valores mais altos que os das regressões lineares exceto para a linhagem *L. ferrooxidans* na ausência de cisteína. Sendo assim, é possível concluir que em 97% dos casos a regressão polinomial da curva pH x concentração de cobre recuperado representa melhor a inferência do pH na eficiência do processo de biolixiviação.

Os valores de coeficiente de correlação referentes as curvas das linhagens adaptadas foram mais altos em comparação com as linhagens não adaptadas. O maior valor foi observado para a mutante ($R^2_{r.polinomial}=0,9981$), conseqüentemente a maior correlação dos dois fatores. Comparando-se as linhagens e os consórcios bacterianos, em todos os casos as linhagens isoladas obtiveram maiores valores de correlação que os consórcios, demonstrando que a combinação das linhagens afetou negativamente na correlação do pH com a concentração de cobre solubilizado. Com exceção apenas de um caso (Consórcio LR/ 30'')

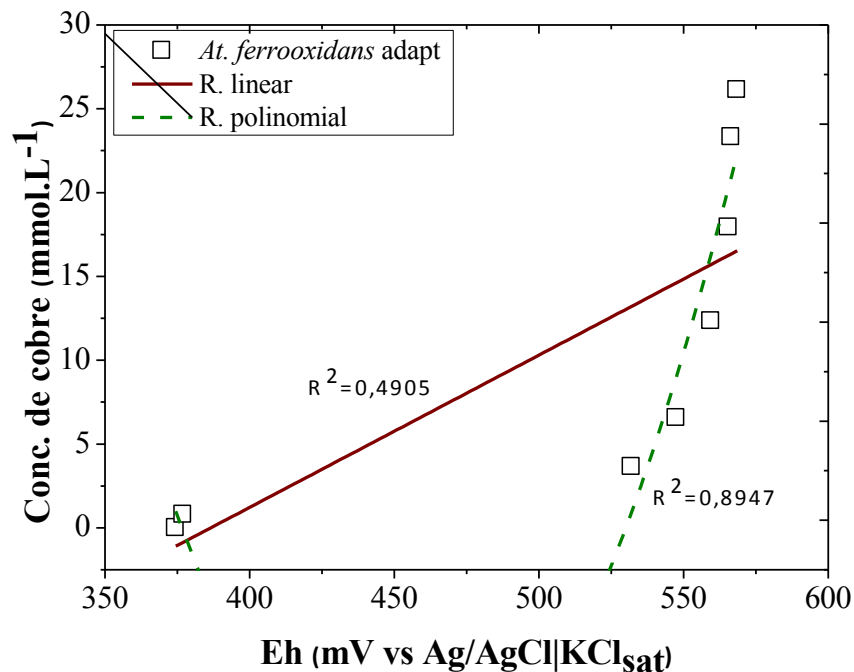
todos os casos obtiveram valores de coeficientes de determinação maiores que 0,7, o que determina uma alta correlação linear entre o pH e a Concentração de cobre recuperado (>70%).

5.1.2 Potencial de óxido-redução (Eh)

Para determinar a interferência do Eh na solubilização de cobre, os valores de Eh (variável independente) e concentração de cobre recuperado (variável dependente) foram inseridos no gráfico e a partir disso foi realizado uma regressão linear e uma regressão polinomial dessa curva.

A figura 28 é uma demonstração de como esse estudo foi realizado a partir dos dados da *At. ferrooxidans* – LR adaptada.

Figura 25 – Gráfico de dispersão do Eh x concentração de cobre recuperado no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR adaptada.



Fonte: Autor

As observações iniciais da figura 28 demonstram que a regressão polinomial corresponde uma condição muito melhor em relação à regressão linear, isso pode ser

comprovado com os valores de coeficiente de determinação ($R^2_{r.linear} = 0,4905$ e $R^2_{r.polinomial} = 0,8947$).

Essa grande diferença dos valores de coeficiente de correlação pode ser atribuída ao fato de que os valores de Eh se estabilizam em cerca de 10 dias de ensaio, enquanto a concentração de cobre continua em uma crescente até o dia 20, aproximadamente, fazendo com que a regressão linear seja ainda menos eficiente para esse parâmetro, portanto uma baixa correlação entre os valores de potencial de óxido-redução e os valores de concentração de cobre recuperado é observada (Figura 10, Figura 15 e Figura 23).

Os valores de coeficiente de correlação das regressões polinomiais foram mais altos que os das regressões lineares, porém em menor escala comparado aos valores de pH. Através de cálculos, verificou-se que em 85% dos casos a regressão polinomial da curva Eh x concentração de cobre recuperado representa melhor a inferência do Eh na eficiência do processo de biolixiviação.

A maior média calculada dos fatores de correlação foi a obtidas para a linhagem mutante na presença de cisteína ($R^2_{r.polinomial} = 0,9730$), como consequência da maior correlação dos dois fatores, Eh e concentração de cobre. A adição de cisteína os valores de Eh tiveram um aumento um pouco menor (Figura 23), isso faz com que a parte crescente da curva também seja menor, concluindo que a estabilização do Eh nesse caso interferiu menos que nos casos onde ocorreu um aumento muito grande nos valores ao decorrer dos dias, podendo dar como exemplo os dados demonstrados na figura 23, onde para essa linhagem o coeficiente de determinação para a regressão linear foi o menor obtido em toda a análise ($R^2_{r.linear} = 0,4905$).

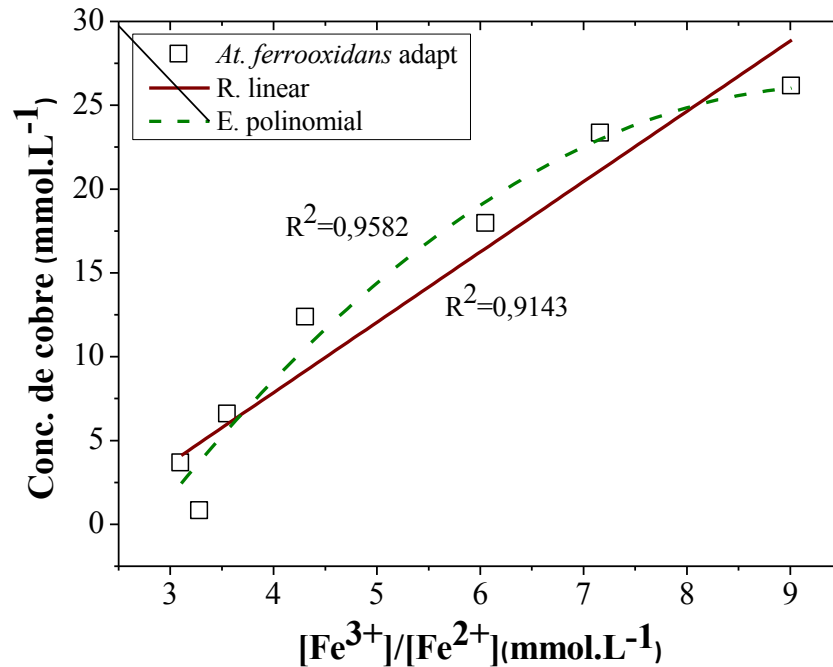
Comparando-se as linhagens isoladas e os consórcios bacterianos, a linhagem *L. ferrooxidans* foi a que obteve a maior média (Eh e concentração de cobre) dos coeficientes de correlação ($R^2_{r.polinomial} = 0,9517$).

5.1.3 $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$

Para determinar a interferência da $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ na solubilização de cobre, os valores calculados de $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ (variável independente) e concentração de cobre recuperado (variável dependente) foram inseridos no gráfico e a partir disso foi realizado uma regressão linear e uma regressão polinomial dessa curva.

A figura 29 é uma demonstração de como esse estudo foi realizado a partir dos dados da *At. ferrooxidans* – LR adaptada.

Figura 26 – Gráfico de dispersão da $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ x concentração de cobre recuperado no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR adaptada.



Fonte: Autor

Os valores de coeficiente de correlação das regressões polinomiais apresentaram valores mais altos que os das regressões lineares, porém em menor escala comparado aos valores de pH e Eh. Através de cálculos, verificou-se que em 65 % dos casos a regressão polinomial da curva $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ x concentração de cobre recuperado representa melhor a inferência da $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ na eficiência do processo de biolixiviação.

A maior média calculada foi a que representa a linhagem *At. ferrooxidans* na presença de cisteína ($R^2_{\text{r.linear}}=0,9821$), conseqüentemente a maior correlação dos dois fatores ($[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ x concentração de cobre recuperado).

A $[\text{Fe}^{2+}]$, permanece muito baixa para todas as linhagens em todas as condições inoculadas durante todo o ensaio (Figura 7, Figura 11 e Figura 19), fazendo com que a relação $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ seja máxima. Além disso, os valores de $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ aumentam durante o ensaio como também aumentaram os valores de concentração de cobre solubilizado fazendo com que essa relação tenha uma forte correlação linear ($>0,8$).

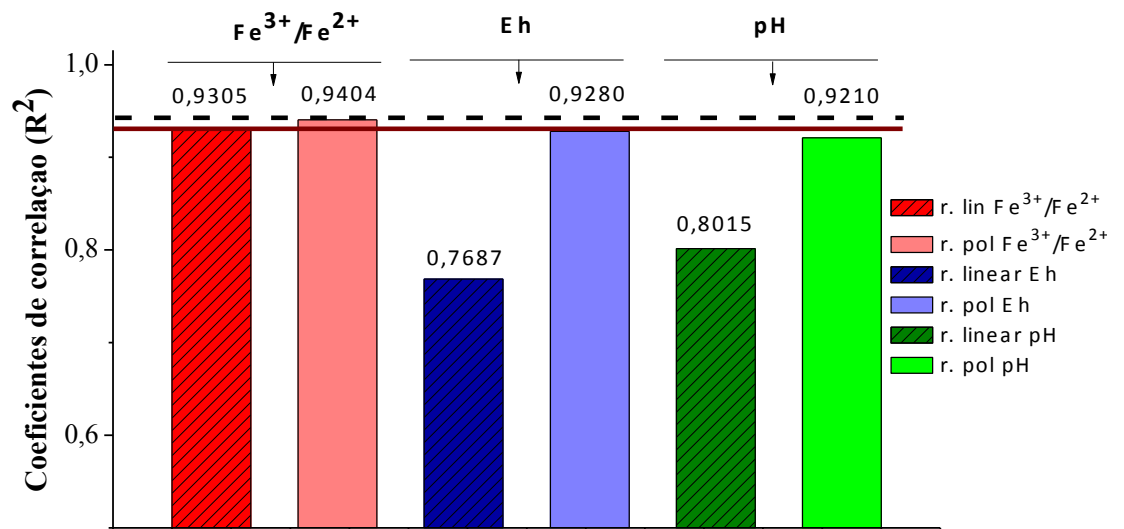
Os menores valores foram encontrados para a linhagem mutante na ausência de cisteína, onde foi mostrada pouca correlação linear e polinomial entre a $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ e a concentração de cobre solubilizado.

Sendo assim foi determinada a maior correlação entre os parâmetros (pH, Eh e $[\text{Fe}^{3+}]$) e a concentração de cobre solubilizado para todas as linhagens, considerando todas as condições avaliadas no ensaio de biolixiviação..

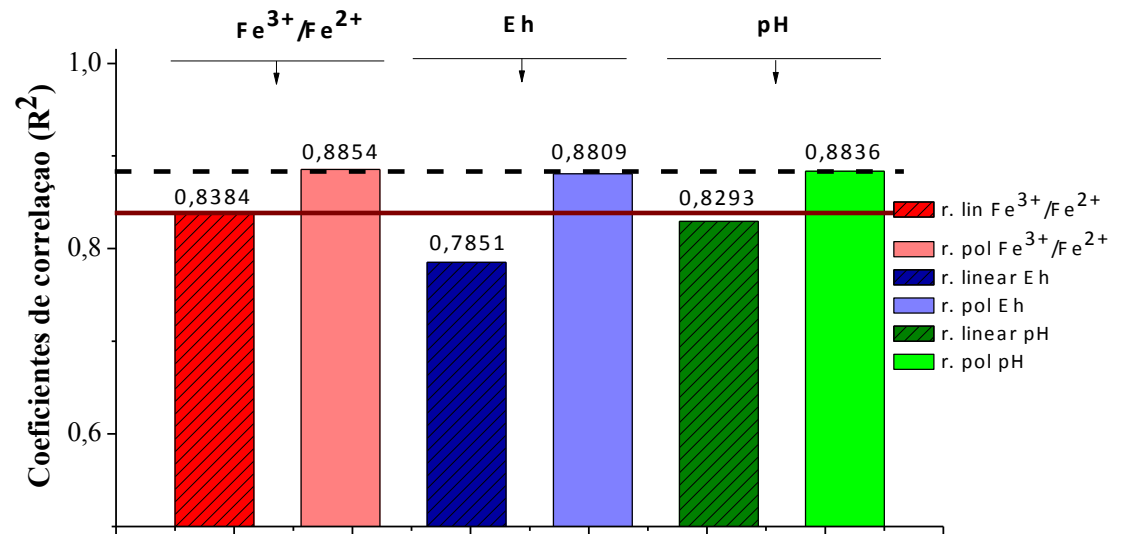
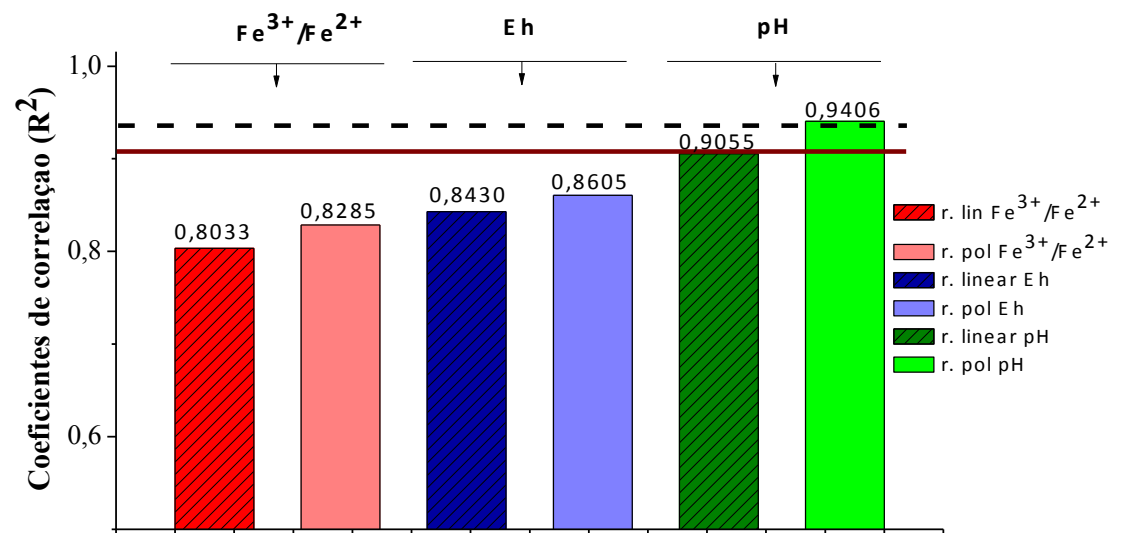
A média dos valores calculados da correlação de cada parâmetro para cada linhagem estão demonstrados na figura 30.

Figura 27 - Média dos valores de coeficientes de correlação das regressões linear e polinomial das curvas de cada parâmetro pela concentração de cobre solubilizado utilizando (1) *At. ferrooxidans* – LR; (2) mutante; (3) *L. ferrooxidans*.

1. *At. ferrooxidans*



2. mutante

3. *L. ferrooxidans*

Fonte: Autor

Como anteriormente foi possível discutir cada valor individualmente, podendo analisar onde ocorreu a menor correlação e maior correlação em cada parâmetro, dessa vez o intuito da análise de acordo com a figura 30 é basicamente determinar para cada linhagem o quanto cada parâmetro se correlacionou com a concentração de cobre solubilizado, para que fosse possível observar a diferença entre as linhagens e a interferência de cada um deles.

No caso da *At. ferrooxidans* - LR e da mutante de *At. ferrooxidans* a maior correlação tanto na regressão linear quanto na regressão polinomial foi determinada na curva de $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ x concentração de cobre solubilizado. Esses resultados podem mostrar que nesse caso a mutação não interferiu na correlação dos parâmetros para essa linhagem específica.

Já para a linhagem *L. ferrooxidans* o pH foi disparado o parâmetro que melhor se correlacionou com a concentração de metal recuperado. Isso pode ter acontecido porque se observarmos os valores de pH durante os ensaios, essa linhagem foi a que apresentou menor diminuição nos valores de pH com o passar dos dias, e também teve a menor recuperação de cobre, podendo ter se correlacionado melhor que os demais parâmetros.

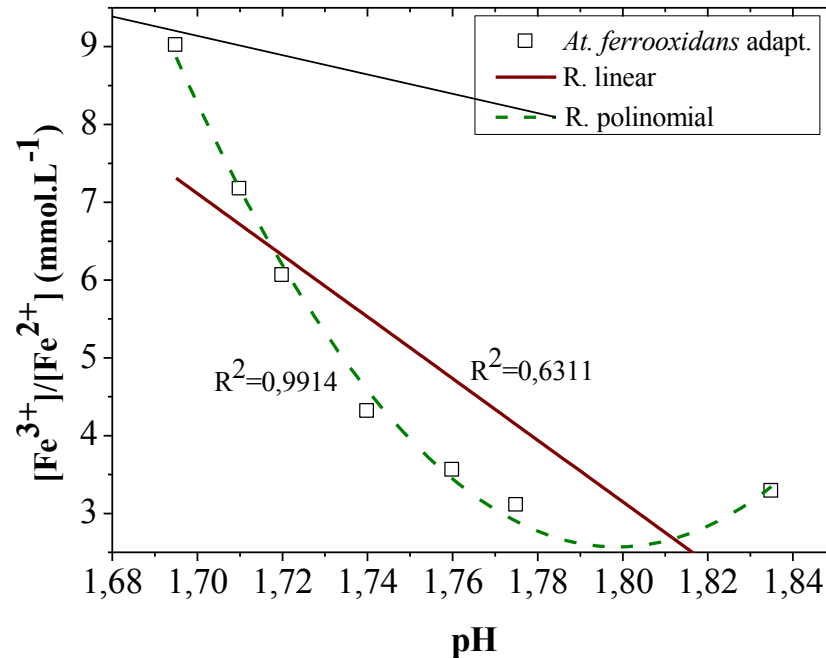
5.2 . Interferência estatística dos parâmetros

5.2.1 pH e $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$

Para determinar a interferência do pH x $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$, os valores de pH (variável independente) e Concentração de Fe^{3+} / Concentração de Fe^{2+} (variável dependente) foram inseridos no gráfico e a partir disso foi realizado uma regressão linear e uma regressão polinomial dessa curva.

A figura 31 é uma demonstração de como esse estudo foi realizado a partir dos dados da *At. ferrooxidans* – LR adaptada.

Figura 28 – Gráfico de dispersão do pH x $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR adaptada.



Fonte: Autor

Pode-se verificar que os valores de coeficiente de determinação das regressões polinomiais apresentaram valores mais altos que os das regressões lineares na maioria dos casos. Sendo assim, é possível concluir que em 90% dos casos a regressão polinomial da curva do pH x $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ recuperado representa melhor a inferência do pH na eficiência do processo de biolixiviação.

O maior valor calculado foi para a linhagem mutante não adaptada no ensaio de biolixiviação ($R^2_{\text{r.polinomial}}=0,9690$), e conseqüentemente a maior correlação dos dois fatores.

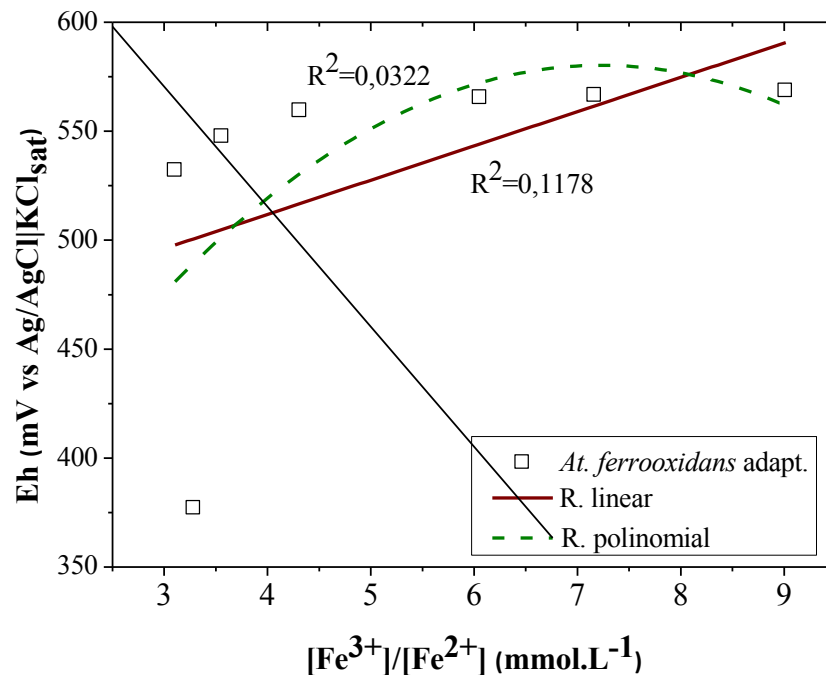
No entanto, em geral os valores de coeficientes de correlação linear foram muito baixos para praticamente todas as condições de ensaio, demonstrando uma baixa correlação entre esses dois parâmetros.

5.2.2 $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ e Eh

Para determinar a interferência da $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ no Eh, os valores calculados da relação $[\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}]$ (variável independente) e Eh (variável dependente) foram inseridos no gráfico e a partir disso foi realizada uma regressão linear e uma regressão polinomial dessa curva.

A figura 32 é uma demonstração de como esse estudo foi realizado a partir dos dados da *At. ferrooxidans* – LR adaptada.

Figura 29 - Gráfico de dispersão da $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ x Eh no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR adaptada.



Fonte: Autor

Como podemos observar no gráfico os dados não apresentaram nesse caso correlação linear nem polinomial, podendo-se verificar através dos baixos valores de coeficiente de determinação.

A maior diferença desse caso para os outros é que as linhagens adaptadas foram as únicas que obtiveram valores muito baixos de correlação tanto linear quanto polinomial. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a adaptação dessas linhagens promove um aumento mais brusco desse Eh (nos primeiros dias de ensaio) (Figura 10), fazendo com que sua estabilização de valores seja ainda mais rápida, podendo ser um fato que tenha influenciado negativamente na correlação desses dois parâmetros.

Deve-se lembrar que o valor de potencial é calculado através da atividade dos pares redox do meio e não de sua concentração, desse modo atinge-se um valor máximo de Eh nos

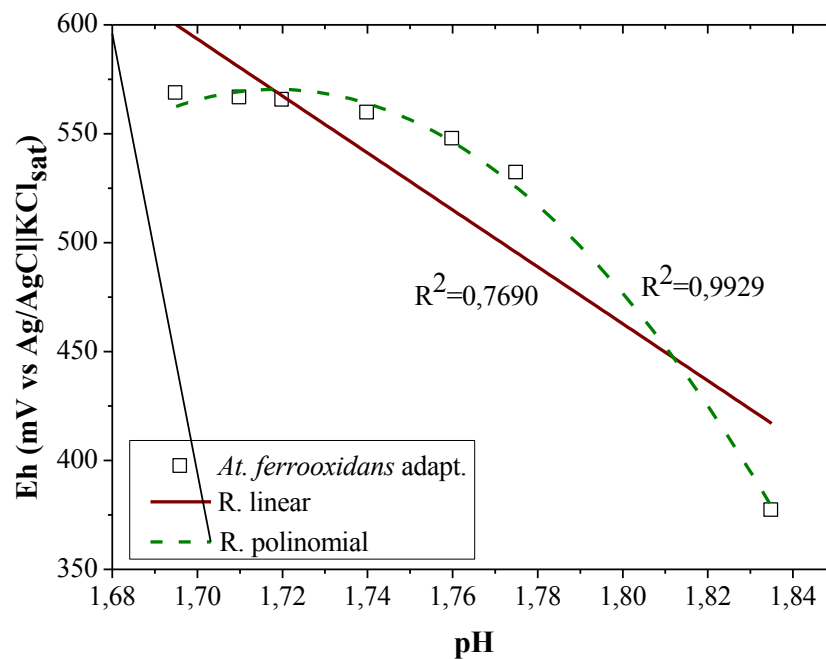
primeiros dias de ensaio enquanto a concentração de Fe^{3+} continua crescente até o final o ensaio.

5.2.3 pH e Eh

Para determinar a interferência do pH no Eh, os valores de pH (variável independente) e Eh (variável dependente) foram inseridos no gráfico e a partir disso foi realizado uma regressão linear e uma regressão polinomial dessa curva.

A figura 33 é uma demonstração de como esse estudo foi realizado a partir dos dados da *At. ferrooxidans* – LR adaptada.

Figura 30 – Gráfico de dispersão do pH x Eh no ensaio de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR adaptada.



Fonte: Autor

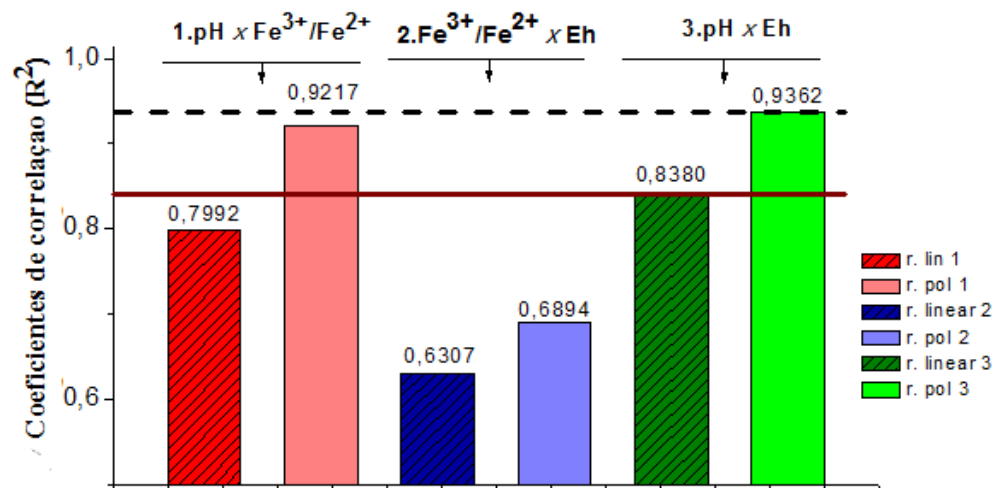
A maior diferença dessa condição para as outras condições avaliadas neste parâmetro é que as linhagens adaptadas foram às únicas que obtiveram valores muito altos de correlação polinomial. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a adaptação dessas linhagens promove um aumento mais repentino desse Eh, fazendo com que sua estabilização de valores

seja ainda mais rápida, e também promove essa diminuição repentina do pH, influenciando positivamente nesse caso (Figura 9 e 10).

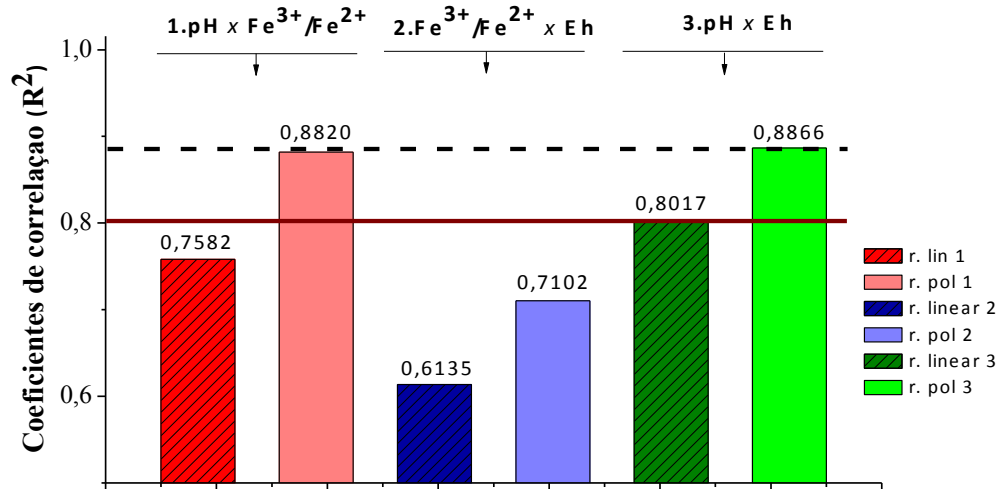
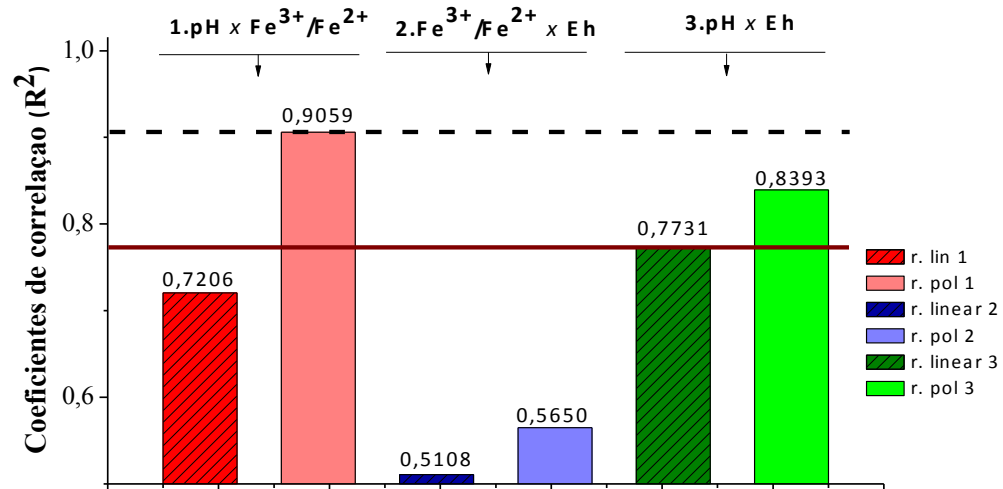
Com exceção de dois casos (*At. ferrooxidans* – LR não adaptada e mutante na ausência de cisteína), todas as condições apresentaram médios valores de coeficiente de correlação, ou seja, regular correlação tanto linear quanto polinomial dos dois parâmetros ($R^2 < 0,7$).

Figura 31 - Média dos valores de coeficientes de correlação das regressões linear e polinomial das curvas dos parâmetros pH, Eh e $[Fe^{3+}]/[Fe^{2+}]$ dois a dois utilizando (1) *At. ferrooxidans* – LR; (2) mutante; (3) *L. ferrooxidans*.

1. *At. ferrooxidans*



2. mutante

3. *L. ferrooxidans*

Fonte: Autor

Verificou-se a partir dos resultados uma regular correlação linear em 80% dos casos ($R^2 < 0,800$).

A linhagem mutante apresentou valores muito próximos aos obtidos para a linhagem *At. ferrooxidans*- LR, o que permite concluir que a mutação não influenciou nesse fator. Para todos as linhagens os parâmetros pH e Eh foram os que melhor se correlacionaram linearmente (maiores valores de R^2). Comparando-se os valores de correlação linear e

polinomial, verifica-se que as curvas possuem maior tendência a se correlacionarem polinomialmente ($R^2_{r.linear} < R^2_{r.polinomial}$).

Esse é o primeiro trabalho do grupo que tenta estabelecer correlações estatísticas não possibilitando maiores comparações com outros resultados referentes aos mesmos parâmetros em outras condições e materiais.

5.3 Análises estatísticas das curvas de solubilização de cobre

5.3.1 Teste de análise de variância (ANOVA)

Foi realizada uma análise dos dados de solubilização de cobre para determinar se existe diferença estatística entre os valores iniciais (2 dias de ensaio), após 15 dias e ao final do ensaio (35 dias) para determinar se existe diferença no valor final da solubilização e se essa diferença permanece ao longo do ensaio.

Essa análise foi realizada através do teste de análise de variância (**ANOVA**), que testa a hipótese de que as médias de duas ou mais populações são iguais.

Análises **ANOVA** testam a importância de um ou mais fatores comparando as médias das variáveis de resposta em diferentes níveis dos fatores. A hipótese nula afirma que todas as médias das populações (médias dos níveis dos fatores) são iguais, enquanto a hipótese alternativa afirma que pelo menos uma é diferente (MINITAB, 2016).

Para facilitar a apresentação dos resultados, os dados do ensaio de biolixiviação foram divididos em: linhagens adaptadas e consórcios; e adição de cisteína.

Os resultados foram tabelados e estão listados na Tabela 6 para o ensaio de biolixiviação em linhagens adaptadas e consórcios.

Tabela 6 - Valores calculados do teste estatístico de análise de variância para o ensaio de biolixiviação em linhagens adaptadas e consórcios.

	Média 2 dias	σ^2	Média 15 dias	σ^2	Média 30 dias	σ^2
<i>At.f</i> - LR	1,085	0,0001	17,49	0,0902	27,15	0,2312
<i>At.f</i> - LR + cisteína	1,085	0,0001	18,89	0,0264	28,96	0,0612
mutante	0,78	0,0007	14,13	0,0423	23,28	0,9904
mutante + cisteína	0,78	0	17,98	0,0561	26,28	0,0924
<i>L.f</i>	1,19	0,0072	12,99	0,1104	20,64	0,0491
<i>L.f</i> + cisteína	1,19	0,0072	14,99	0,1104	23,64	0,0491

Fonte: Autor

Posteriormente a ANOVA basicamente divide a variabilidade em variabilidade *Entre Grupos* (Grupo 0) e variabilidade *Dentro de Grupos* (Grupo 1), e compara as duas.

Quanto maior for a primeira comparada à segunda, maior é a evidência de que existe variabilidade entre grupos, ou seja, médias diferentes. A partir disso os resultados serão expressos na Tabela 7, para determinar se existe diferença entre as médias.

Tabela 7 - Valores de variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos calculados do teste estatístico de análise de variância para o ensaio de biolixiviação em linhagens adaptadas e consórcios.

	Grupo 0	Grupo 1	ρ -valor	F
2 dias	20,89	0,03	$2,59 \cdot 10^{-8}$	75,77
15 dias	75,02	0,84	$8,84 \cdot 10^{-6}$	24,05
35 dias	138,89	6,93	$0,06 \cdot 10^{-8}$	18,93

Fonte: Autor

O valor F que é calculado da seguinte maneira: variância *Entre os Grupos*/ variância *Dentro dos Grupos*, indicando que quanto maior esse valor, maior a diferença entre os grupos.

O valor de ρ é a probabilidade de seu resultado ser algo puramente ao acaso. Se o valor ρ é baixo (seu valor típico é de 0,05) então é bastante provável que qualquer diferença entre os grupos é uma diferença real e não algo que aconteceu ao acaso.

O resultado de uma **ANOVA** lhe dá o valor estatístico de F. Nesse caso o valor de F ou a variância entre os três grupos é 75,77 (2 dias), 24,05 (15 dias), 18,93 (35 dias). Para saber se os resultados nesse exemplo são significativos (isto é, se a probabilidade p tiver um valor inferior a 0,05), o valor de F precisa ser pelo menos 3.354 (quer dizer, o valor crítico de F) (HOFFMANN, 1942).

O grande problema enfrentado nessa análise foi o grau de liberdade, devido ao fato de que o ensaio foi realizado em duplicata, diminuindo a confiabilidade dos resultados, porém como já citado, os valores de variância entre os grupos foram muito altos, isso faz com que seja possível dizer que estatisticamente os valores tanto iniciais, com 15 dias ou finais são diferentes entre si.

O mesmo teste foi realizado para os valores do ensaio de biolixiviação referentes a adição de cisteína, os resultados foram tabelados e estão listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores calculados do teste estatístico de análise de variância referentes a adição de cisteína para o ensaio de biolixiviação.

	Média 2 dias	σ^2	Média 15 dias	σ^2	Média 30 dias	σ^2
<i>At.f</i> - LR	1,09	0,0480	12,51	0,0040	25,06	0,0480
<i>At.f</i> - LR adapt.	0,79	0,0002	12,22	0,0420	26,13	0,0002
mutante	4,79	0,1922	11,74	0,0024	20,66	0,1922
mutante adapt.	1,55	0,0578	7,69	0,0562	18,64	0,0578
<i>L.f</i>	1,71	0,0549	6,65	0,0450	16,46	0,0576
<i>L.f</i> adapt.	1,66	0,0023	13,02	0,1860	20,25	0,4320

Fonte: Autor

Valores de variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos calculados do teste estatístico de análise de variância para o ensaio de biolixiviação. Os valores expressos na tabela 15 determinam se existe diferença entre as médias.

Tabela 9 - Valores de variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos calculados do teste estatístico de análise de variância para os valores ensaio de biolixiviação referentes à adição de cisteína.

	Grupo 0	Grupo 1	p-valor	F
2 dias	0,3635	0,0216	$1,09.10^{-3}$	4,39
15 dias	56,0667	1,3248	$8,10.10^{-5}$	4,38
35 dias	91,7214	2,3590	$1,00.10^{-4}$	4,38

Fonte: Autor

Da mesma forma os resultados também apresentaram altos valores de variância entre os grupos, iniciando que para baixos valores de p como na tabela pode-se concluir que existe diferença significativa entre as médias em todas as condições, comprovando a melhora no processo com a adição de cisteína para todas as linhagens estudadas.

5.3.2 Velocidade inicial da solubilização de cobre

A partir da conclusão de que as médias dos valores de solubilização de cobre são diferentes nos dois ensaios e em todas as condições, outra análise estatística foi realizada. Dessa vez o intuito é analisar se existe diferença na velocidade inicial da solubilização desse metal.

Para isso a parte linear da curva de solubilização (15 dias) foi linearizada, a partir disso foi calculado o valor do coeficiente angular da reta, podendo tirar conclusões sobre a inclinação da reta e por fim da velocidade de solubilização de cada linhagem para cada condição, como no esquema a seguir:

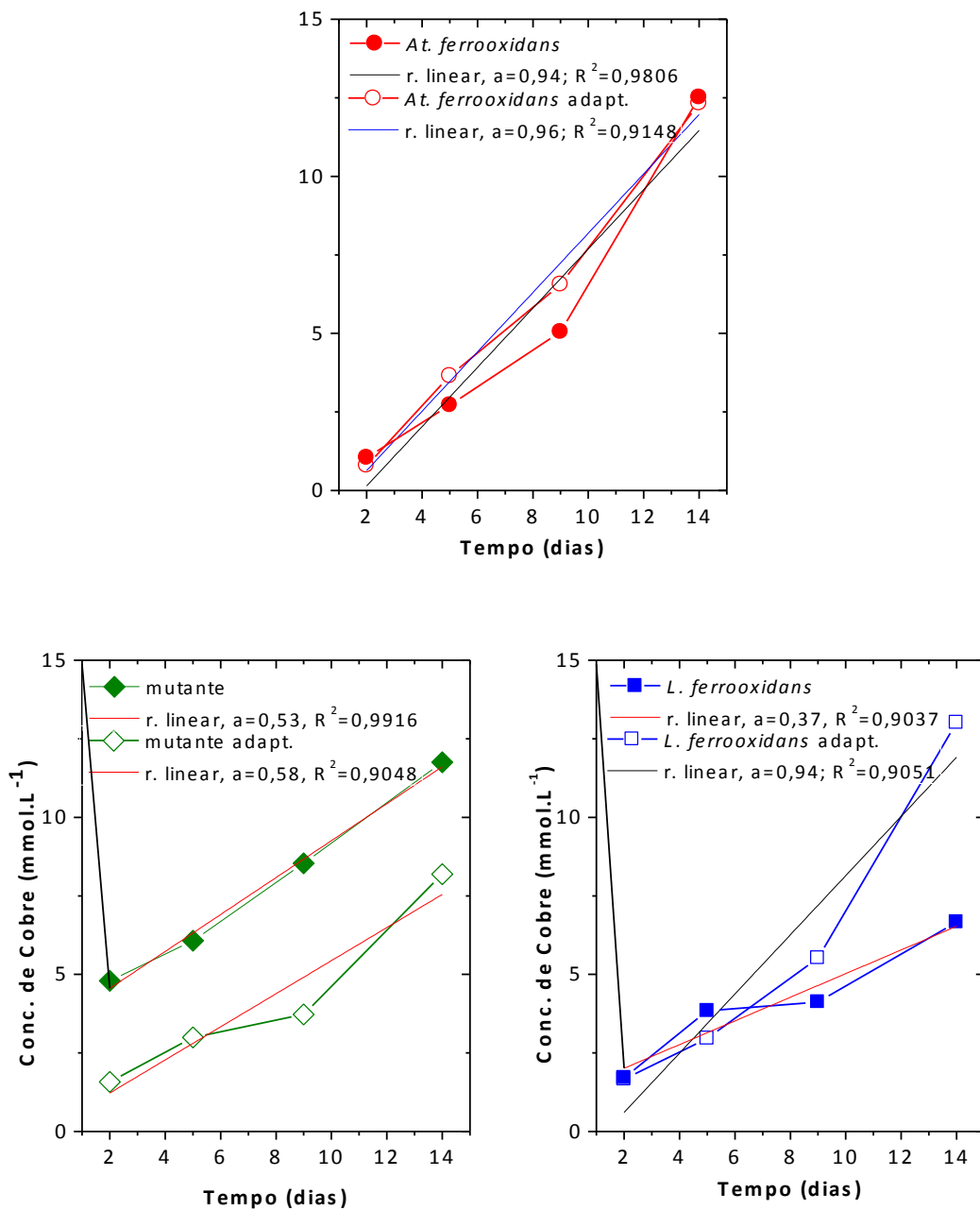
$$[Cu] = a*t + b$$

$$d[Cu]/dt = a = \text{Velocidade inicial de solubilização (mmol.L}^{-1}\text{/dias)}$$

Também foi relacionado o coeficiente de determinação dessas curvas a fim de poder concluir se a parte inicial da curva é ou não linear para que seja possível a realização.

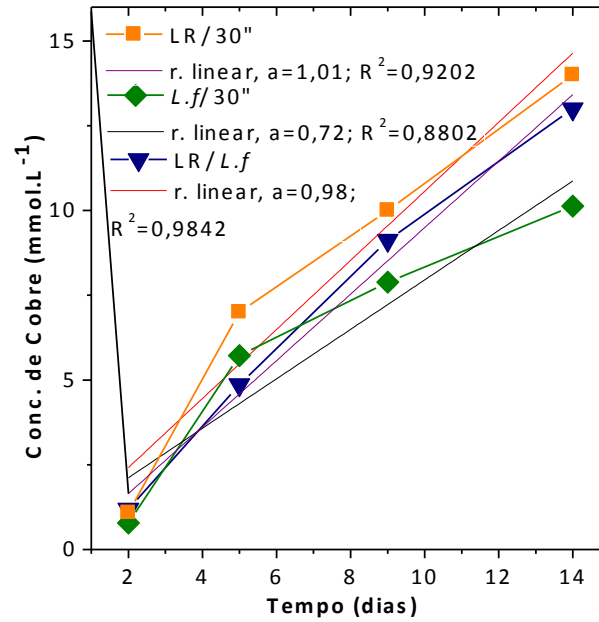
Figura 32 - Regressão linear das curvas nos primeiros quinze dias de ensaio. (A) Ensaio de biolixiviação – efeito da adaptação; (B) Ensaio de biolixiviação – consórcios; (C) Ensaio de biolixiviação – cisteína.

(A) Ensaio de biolixiviação – efeito da adaptação. Utilizando as seguintes condições: (●) *At. ferrooxidans* – LR, (■) mutante, (□) *L. ferrooxidans* adaptadas (símbolos abertos) e não adaptadas (símbolos fechados).



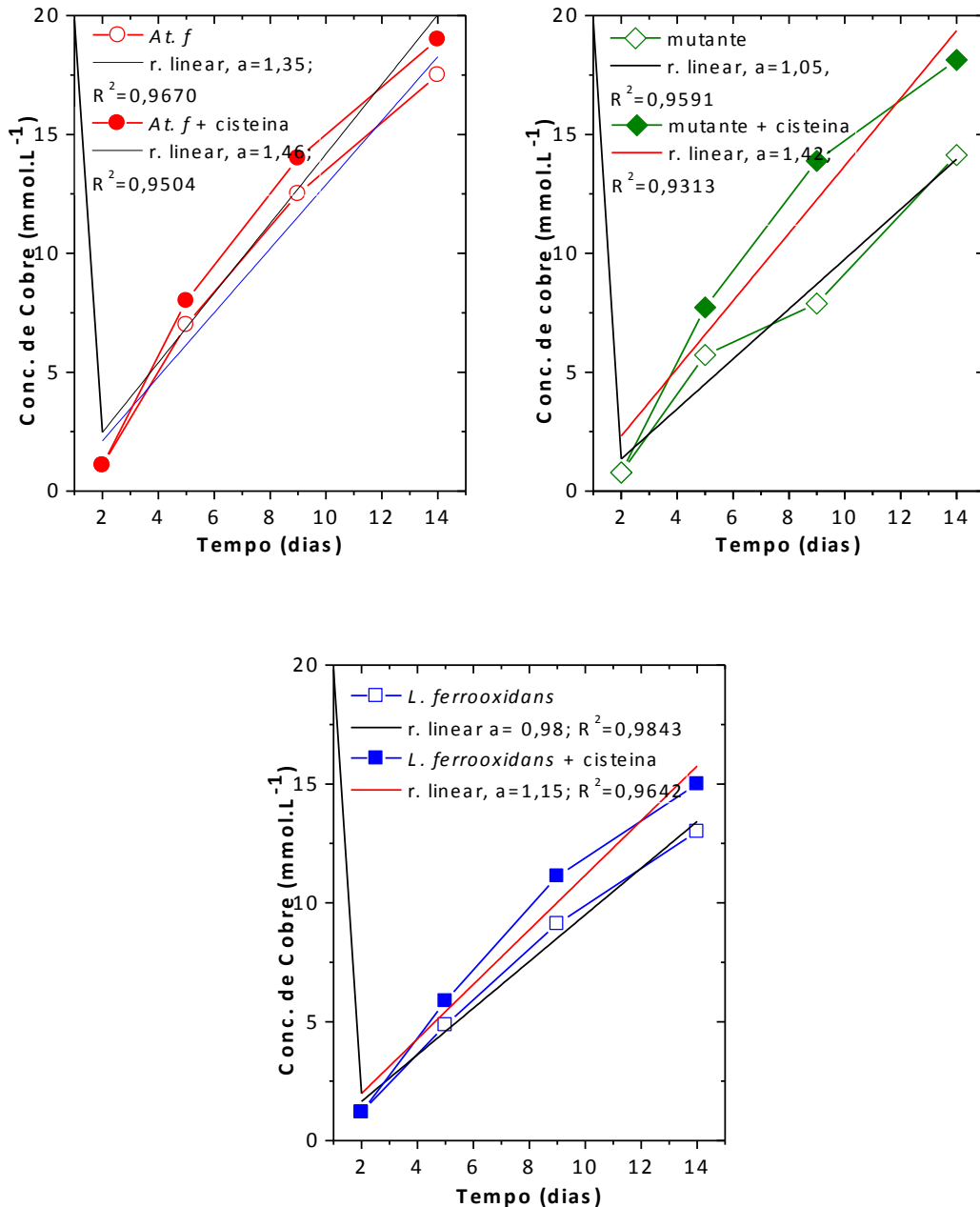
Fonte: Autor

(B) Ensaio de biolixiviação – consórcios. Utilizando as seguintes condições: consórcio LR/*L.f* (▼), consórcio *L.f*/30'' (■), consórcio LR/30'' (■) e o controle abiótico (▲).



Fonte: Autor

(C) **Ensaio de biolixiviação – cisteína.** Utilizando as seguintes condições: (●) *At. ferrooxidans* – LR; (◻) mutante; (■) *L. ferrooxidans*; na presença (símbolos fechados) e ausência (símbolos abertos).



Fonte: Autor

Como se pôde verificar através de todos os resultados os valores do coeficiente de determinação (R^2) ficaram em torno de 0,9. Isso demonstra uma linearidade das curvas em todos os casos. Sendo assim foi feita a comparação dos coeficientes angulares calculados.

A partir da realização da regressão linear das curvas os valores calculados de velocidade inicial e coeficientes de correlação foram listados na Tabela 10.

Tabela 10 - Velocidades iniciais de solubilização e coeficientes de correlação da regressão linear dos primeiros 15 dias das curvas de solubilização de cobre.

Linhagens	Velocidades iniciais de solubilização (mmol.L⁻¹/dias)	R²
<i>At. ferrooxidans</i>	0,94	0,9806
<i>At. f adapt</i>	0,96	0,9148
<i>L. ferrooxidans</i>	1,01	0,9037
<i>L. f adapt</i>	0,72	0,9051
mutante	0,53	0,9916
mutante adapt	0,58	0,9049
LR / 30	1,01	0,9202
LR / <i>L.f</i>	0,98	0,9842
<i>L.f</i> / 30	0,72	0,8902
<i>At. ferrooxidans</i>	1,35	0,9670
<i>At. f cisteína</i>	1,46	0,9504
<i>L. ferrooxidans</i>	0,98	0,9843
<i>L. f cisteína</i>	1,15	0,9642
mutante	1,05	0,9591
mutante cisteína	1,42	0,9313

Fonte: Autor

De acordo com a Tabela 10 a adaptação influenciou positivamente em todos os casos, aumentando a velocidade inicial de solubilização de cobre nos primeiros quinze dias. Para a bactéria *L. ferrooxidans* essa diferença foi ainda mais significativa, o valor do coeficiente angular da curva que representa a bactéria adaptada foi o dobro da não adaptada.

Comparando-se os controles (Figura 30 – (B)) em comparação aos resultados obtidos em relação as linhagens isoladas (Figura 30 – (A)) os valores das velocidade inicial de solubilização foram mais altos, podendo dizer que os consórcios nesse caso tiveram um efeito positivo, aumentando a solubilização de cobre mais rapidamente nos primeiros quinze dias. Como já vimos ao final do ensaio ao final do ensaio (Figura 13 e 18) os valores dos consórcios principalmente contendo *At. ferrooxidans* - LR não se diferenciaram das linhagens isoladas.

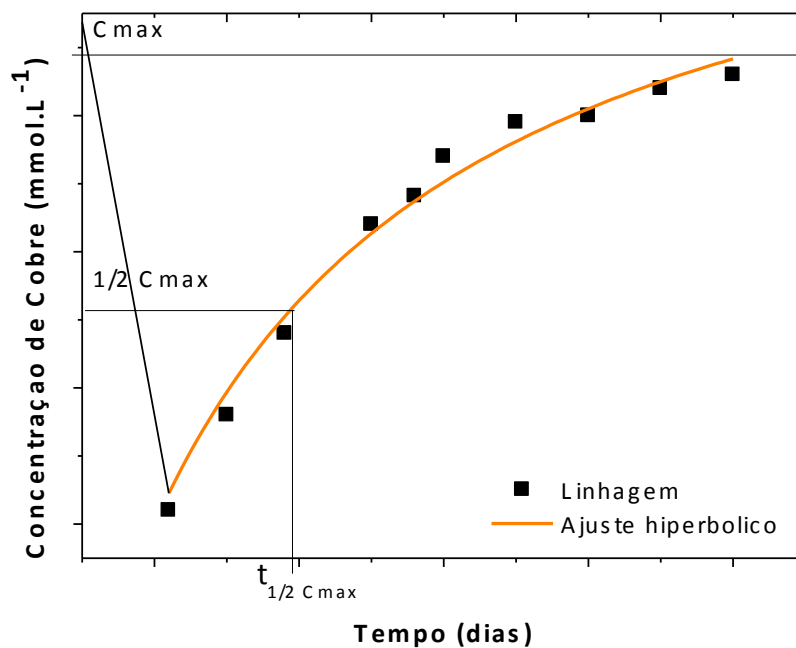
As linhagens na presença de cisteína obtiveram os resultados mais altos do trabalho em todos os casos (Figura 30 – (C)). Nesse caso os resultados finais também indicaram um aumento na solubilização de cobre, o que demonstra que a cisteína além de promover uma maior recuperação ao fim do ensaio também aumenta a taxa inicial dessa solubilização.

5.3.3 Estudos da cinética de oxidação da calcopirita

Para o estudo da cinética de oxidação dos sulfetos minerais as curvas de solubilização de cobre foram ajustadas para o modelo hiperbólico. A Figura 37 representa os ajustes realizados para todas as condições do ensaio de biolixiviação.

A base para esse estudo se deu de acordo com que as bactérias envolvidas no processo de biolixiviação em determinadas situações se comportam como enzimas michaelianas, ou seja, curvas *Velocidade inicial de oxidação x Massa de sulfeto* são ajustadas hiperbolicamente (FRANCISCO JUNIOR et al., 2009); (FRANCISCO JUNIOR et al., 2007). Sendo assim foi realizada uma adaptação desse método para as curvas de solubilização e assim determinado os novos parâmetros de acordo com a figura 36.

Figura 33 - Curva hiperbólica da concentração de cobre vs tempo e equação de ajuste hiperbólico com seus respectivos parâmetros.



Equação da curva: $y = (P1*t) / (t+P2)$

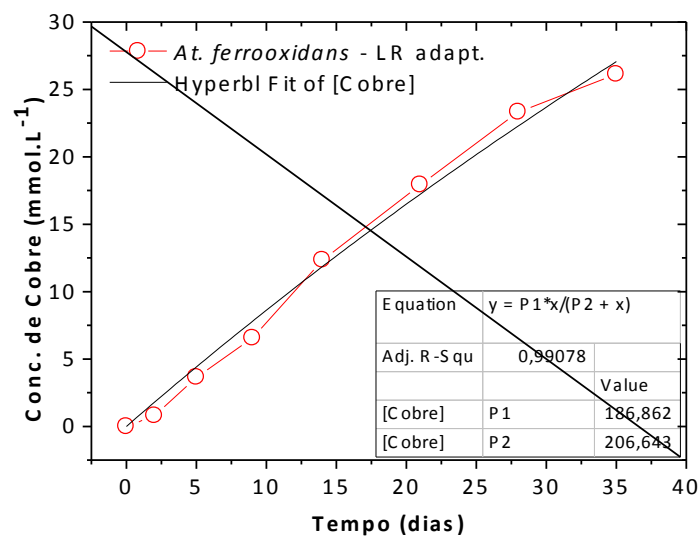
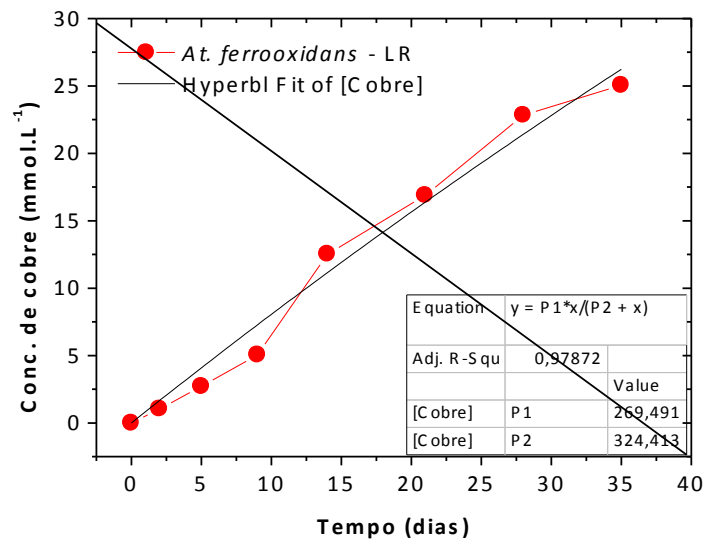
Onde: y = Concentração de cobre solubilizado

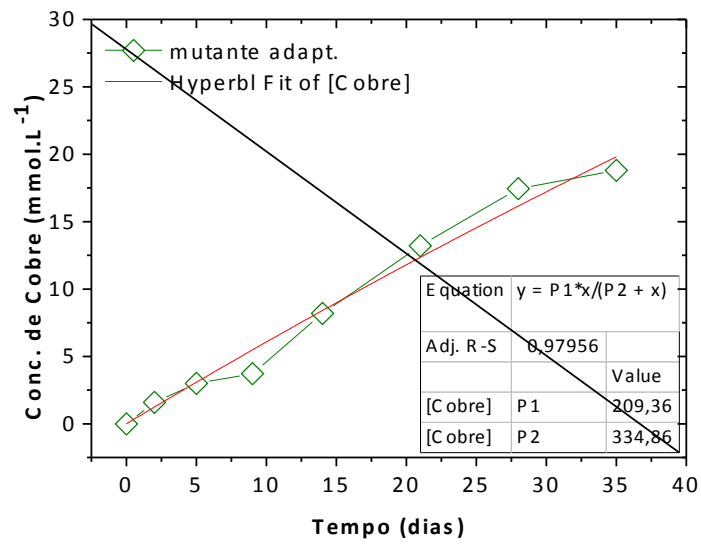
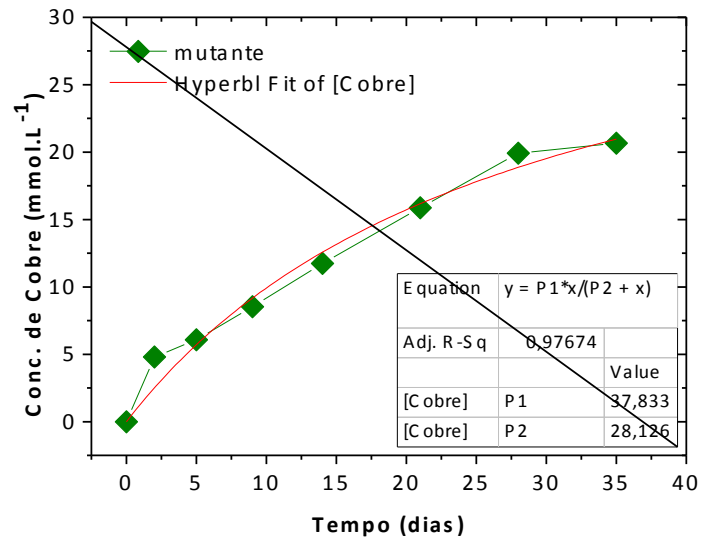
$P1$ ($C_{máx}$) = Concentração máxima de cobre a ser solubilizado

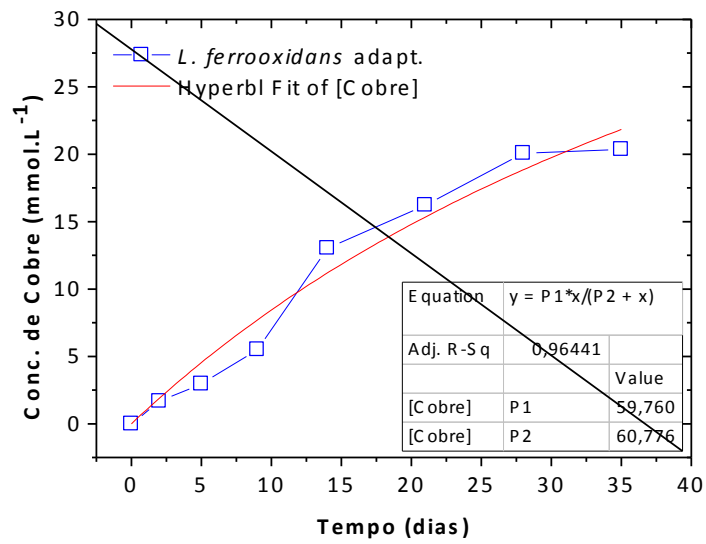
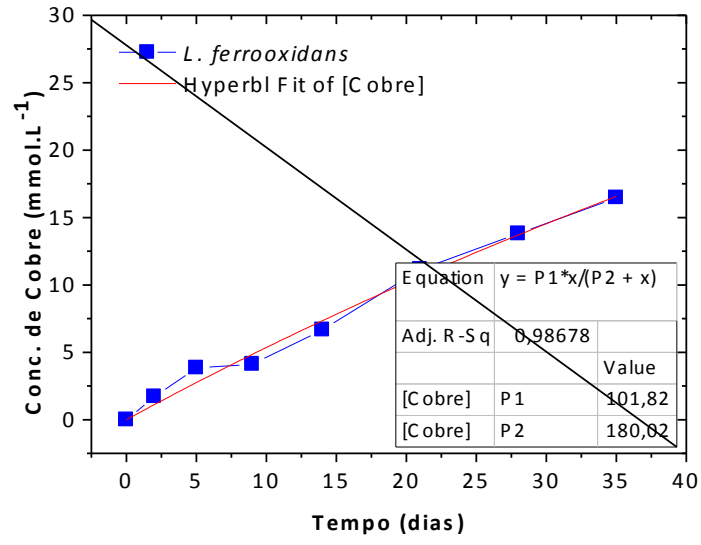
$P2$ ($t_{1/2C_{máx}}$) = Tempo em que metade da concentração máxima de cobre seria solubilizada

Figura 34 - Ajustes hiperbólicos das curvas de solubilização de cobre e seus parâmetros. (A) Ensaio de biolixiviação – efeito da adaptação; (B) Ensaio de biolixiviação – consórcios; (C) Ensaio de biolixiviação – cisteína.

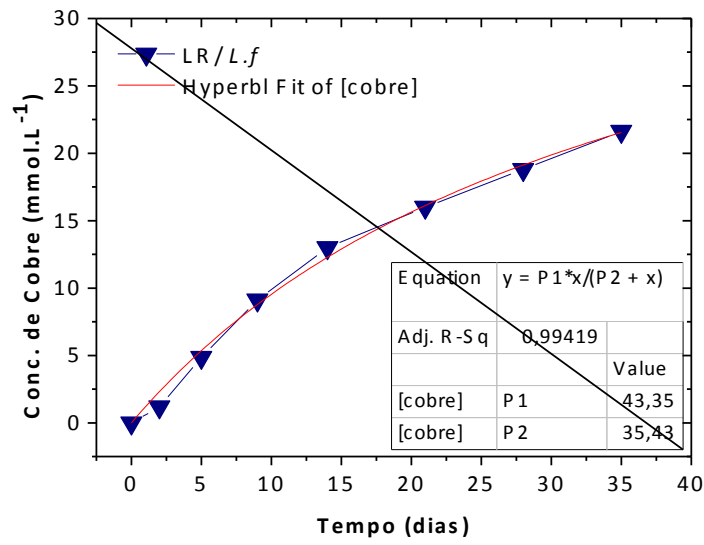
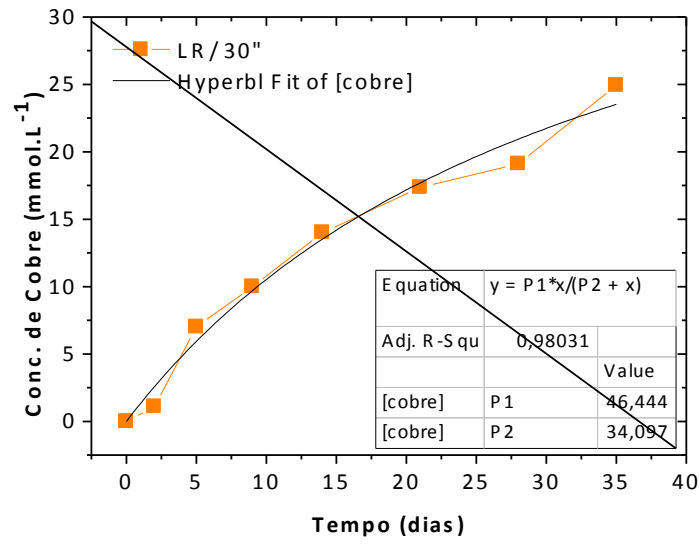
(A) Ensaio de biolixiviação – efeito da adaptação

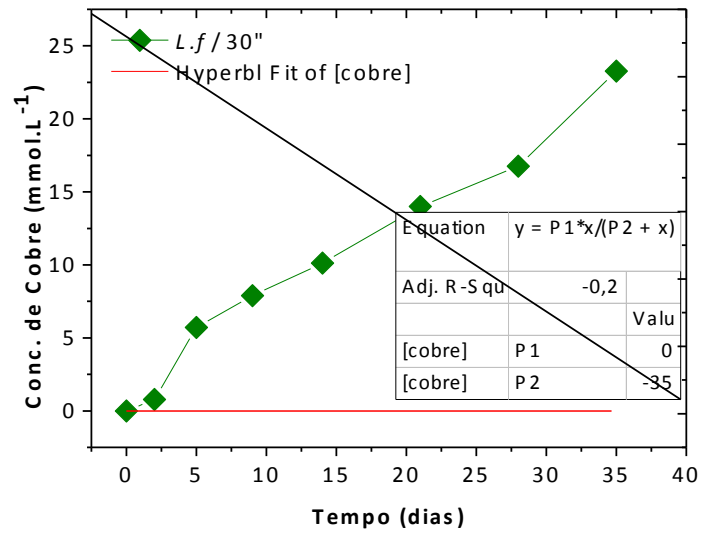






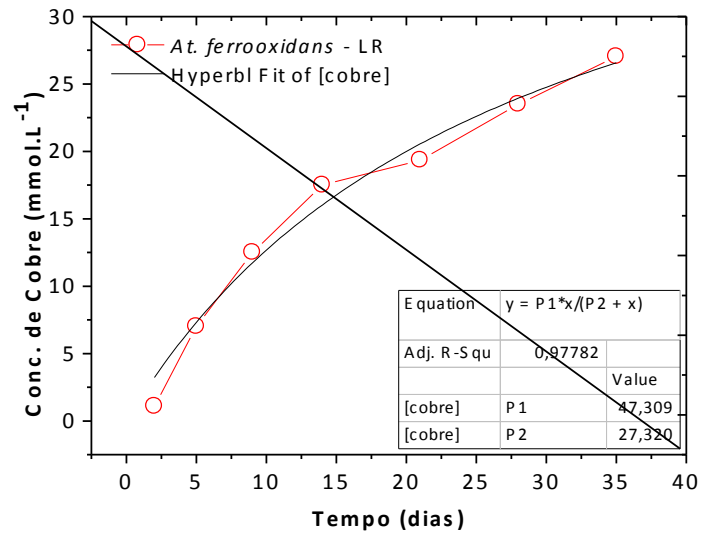
(B) Ensaio de biolixiviação – consórcios

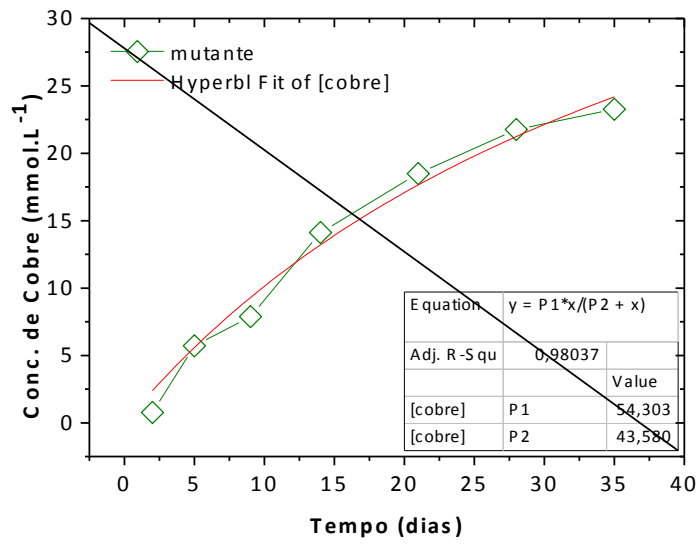
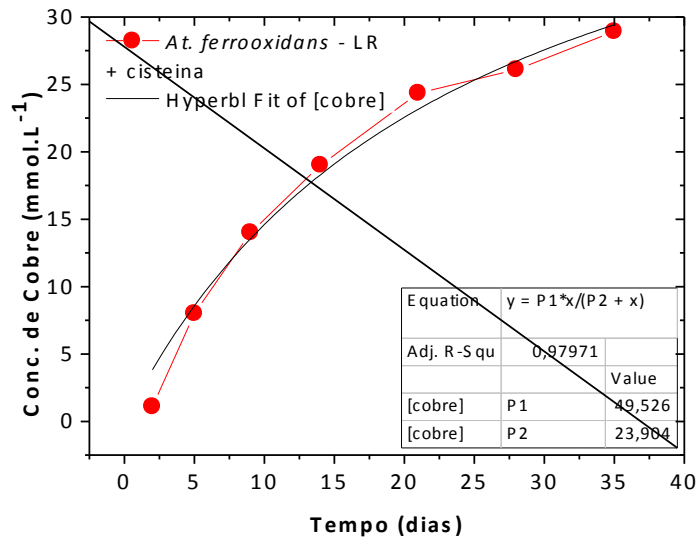


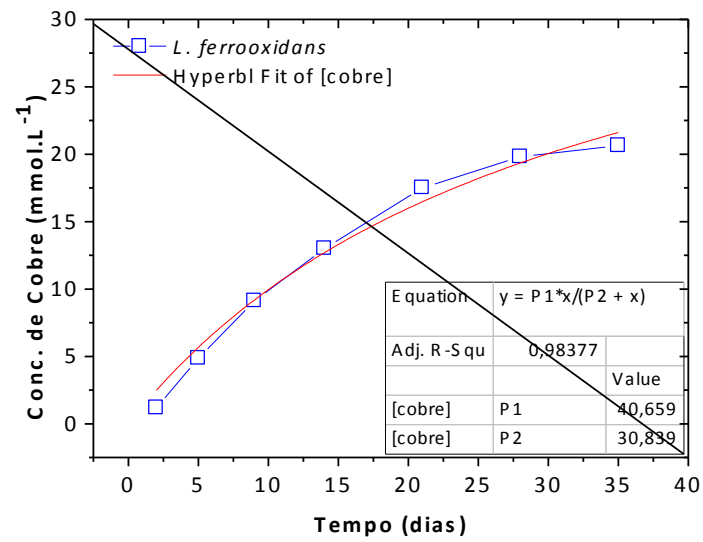
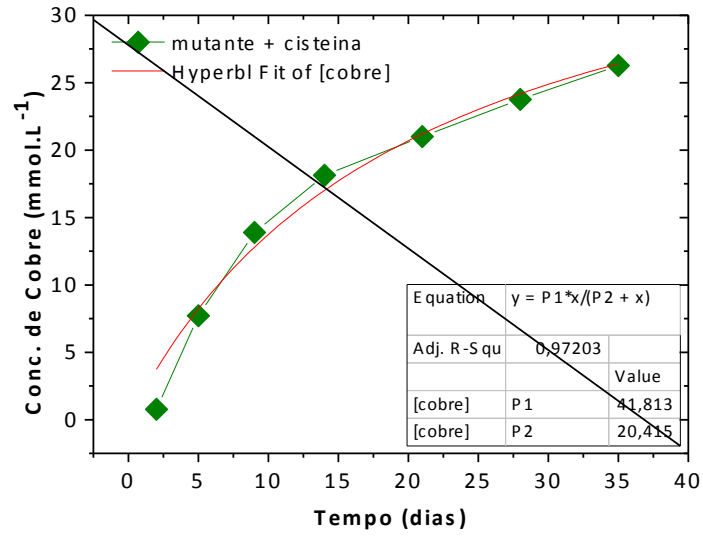


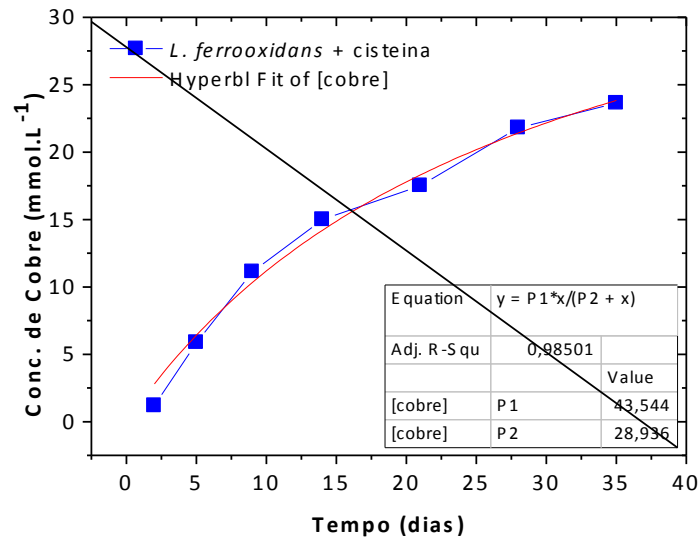
Não foi possível a realização do ajuste dessa curva pelo modelo hiperbólico.

(C) Ensaio de biolixiviação – cisteína









Fonte: Autor

Foram determinados os parâmetros através dos ajustes hiperbólicos realizados das curvas de solubilização (Figura 37), estes foram tabelados e estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros determinados a partir da equação dos ajustes hiperbólicos das curvas de solubilização de cobre em todas as condições do ensaio de biolixiviação.

Linhagens	C _{máx} (mmol.L ⁻¹)	t _{1/2C_{máx}} (dias)	R ²
<i>At. ferrooxidans</i>	269,5	324,4	0,9787
<i>At. f adapt</i>	185,8	206,6	0,9907
<i>L. ferrooxidans</i>	101,8	180,0	0,9868
<i>L. f adapt</i>	59,8	60,7	0,9644
mutante	37,8	28,1	0,9767
mutante adapt	209,5	334,9	0,9795
<i>At. ferrooxidans</i>	269,5	324,4	0,9787
LR / 30	45,4	34,1	0,9803
LR / <i>L.f</i>	43,4	35,4	0,9942
<i>L.f</i> / 30	-	-	-
<i>At. ferrooxidans</i>	47,3	27,4	0,9797
<i>At. f cisteína</i>	49,5	23,9	0,9803
<i>L. ferrooxidans</i>	40,6	30,8	0,9837
<i>L. f cisteína</i>	43,5	28,9	0,9850
mutante	54,3	43,6	0,9804

Fonte: Autor

A partir dos resultados (Tabela 11) pode-se verificar que para as curvas das linhagens adaptadas e não adaptadas, apesar do alto valor de coeficiente de correlação (R^2) de todas as curvas o valor da concentração máxima e da taxa de produção de cobre foram muito altos, fora da realidade (>100% de solubilização), ou seja, existiria a solubilização máxima de cobre maior que o valor adicionado e demoraria muito tempo para que isso pudesse ocorrer.

Observando as curvas é possível perceber que os últimos valores ainda são crescente e portanto apresentaram um patamar, o que fez com que a projeção do valor máximo fosse muito maior que o real (>100%). Sendo assim apesar da demonstração de que nesse caso a adaptação tenha prejudicado os valores finais de solubilização, ou seja, a concentração máxima para as linhagens adaptadas foi menor que a concentração máxima para as linhagens não adaptadas, os valores finais do ajuste não foram condizentes com a realidade (Figura 32).

Com exceção a linhagem *L. ferrooxidans*, que demonstrou total solubilização da calcopirita com valores bem próximos a 100% de solubilização e que a adaptação dessa linhagem apesar de ter aumentado a taxa de produção de cobre para 50 dias diminuiu significativamente a concentração máxima.

Em alguns casos ocorreu a estabilização das curvas ao final de 35 dias de ensaio, como por exemplo, para os consórcios (Figura 32 – (B)), onde os valores de coeficiente de correlação foram ainda mais altos e os ajustes foram muito bons, com exceção do consórcio *L.fl 30* onde o ajuste não foi possível de ser realizado. O segundo e último ensaio para a *At. ferrooxidans* – LR, demonstrou que a adição de cisteína fez com que fosse possível aumentar tanto os valores finais de solubilização quanto a taxa de produção de cobre, obtendo resultados com cerca de 45% de solubilização em cerca de 50 dias. Da mesma forma, para a bactéria *L. ferrooxidans* com adição de cisteína foram obtidos resultados de cerca de 45% de solubilização em 60 dias. Nesse caso a única exceção foi para a mutante que não obteve melhora nos valores finais com a adição de cisteína.

Essa análise em si foi realizada com o intuito de determinar aproximadamente em quantos dias para as diferentes linhagens a solubilização total da calcopirita seria realizada e qual a concentração final de cobre, determinando assim a influência da adição de cisteína e da adaptação das linhagens, porém é importante enfatizar que em várias condições esses resultados, por motivos já citados, não são válidos.

Em linhas gerais verificou-se resultados satisfatórios máximos de solubilização na maioria dos casos (cerca de 45% de solubilização), porém percebe-se que mesmo em um longo período de ensaio, nenhuma condição levaria a solubilização total da calcopirita.

Para o ensaio de biolixiviação – consórcios (Figura 32 – (B)) os valores de coeficiente de determinação foram ainda mais altos e os ajustes foram muito bons com exceção do consorcio *L.f/ 30*” onde o ajuste não foi possível de ser realizado. Os dois consórcios que tinham a presença da linhagem *At. ferrooxidans*– LR iriam solubilizar cerca de 47% da calcopirita em cerca de dois meses de ensaio, podendo comparar com os valores com o das linhagens com adição de cisteína que foram muito próximos ao dos consórcios, demonstrando que a linhagem *At. ferrooxidans* – LR pode ter se destacado em relação as outras duas.

No segundo e último ensaio para a *At. ferrooxidans* – LR, a adição de cisteína provocou um aumento nos valores finais de solubilização e nas de cobre, obtendo resultados com cerca de 45% de solubilização em cerca de 50 dias. Da mesma forma para a bactéria *L. ferrooxidans* com adição de cisteína que obteve resultados de cerca de 45% de solubilização em 60 dias. Nesse caso a única exceção foi para a mutante que não obteve melhora nos valores finais com a adição de cisteína.

Essa análise em si foi realizada com o intuito de determinar aproximadamente em quantos dias para as diferentes linhagens a solubilização total da calcopirita seria realizada e qual a concentração final de cobre, determinando assim a influência da adição de cisteína e da adaptação das linhagens.

Em linhas gerais verificou-se resultados satisfatórios de solubilização na maioria dos casos (cerca de 45 %), porém mesmo em cerca de dois meses de ensaio a calcopirita não seria totalmente solubilizada.

6 CONCLUSÃO

As linhagens *At. ferrooxidans*, mutante de *At. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans* não apresentaram inibição na oxidação de íons ferrosos em concentrações menores que 10^{-2} mol.L⁻¹ de cisteína. A adição de calcopirita não modificou esse resultado.

A adaptação das linhagens ao mineral influenciou positivamente na velocidade inicial da solubilização de cobre e também interferiu na evolução dos parâmetros nos primeiros dias de ensaio. A adaptação influenciou positivamente na solubilização de cobre, com exceção da linhagem mutante.

A combinação das diferentes bactérias não apresentou uma maior solubilização de cobre.

A adição de cisteína no processo de biolixiviação aumentou significativamente os valores finais de solubilização de cobre para todas as linhagens, chegando a obter diferenças até 10% maiores que o respectivo controle.

Os testes de correlação determinaram que as curvas de $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}] \times$ concentração de cobre em todos os casos apresentaram valores de coeficiente de correlação da regressão polinomial maiores que na regressão linear, exceto para a linhagem *L. ferrooxidans* sem adição de cisteína.

A relação entre os parâmetros pH, Eh e $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ demonstrou baixos valores de correlação linear.

Os valores de $C_{\text{máx}}$ para os ajustes hiperbólicos em algumas condições foram fora do real (>100%). Se os valores tivessem sido tomados após a estabilização da curva eles seriam mais coerentes.

Foram detectadas diferenças na extração de cobre nas diferentes condições inoculadas, estabelecendo-se a seguinte ordem decrescente: *At. ferrooxidans* – LR + cisteína (25,3%) > *At. ferrooxidans* – LR (23,5%) > mutante + cisteína (23,0%) > *L. ferrooxidans* + cisteína (20,3%) > mutante (20,0%) > *L. ferrooxidans* (18,0%).

Esse é o primeiro trabalho do grupo que tenta estabelecer correlações estatísticas não possibilitando maiores comparações com outros resultados referentes aos mesmos parâmetros em outras condições e materiais.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, F. Present and future of bioleaching in developing countries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 196-199, 2002.
- AHMADI, A.; SCHAFFIE, M.; PETERSEN, J.; SCHIPPERS, A.; RANJBAR, M. Conventional and electrochemical bioleaching of chalcopyrite concentrates by moderately thermophilic bacteria at high pulp density. **Hydrometallurgy**, v. 106, n. 1/2, p. 84-92, 2011.
- AKCIL, A. Potential bioleaching developments towards commercial reality: Turkish metal mining's future. **Minerals Engineering**, v. 17, n. 3, p. 477-480, 2004.
- AKCIL, A.; CIFTCI, H.; DEVECI, H. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. **Minerals Engineering**, v. 20, n. 3, p. 310-318, 2007.
- BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. **Fems Microbiology Ecology**, v. 44, n. 2, p. 139-152, 2003.
- BALASHOVA, V. V.; VEDENINA, I. Y.; MARKOSYAN, G. E.; ZAVARZIN, G. A. Auxotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. **Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 491-494, 1974.
- BEVILAQUA, D. Bacterial and chemical leaching of chalcopyrite concentrates as affected by the redox potential and ferric/ferrous iron ratio at 22 degrees C. **International Journal of Mineral Processing**, v. 132, p. 1-7, 2014.
- BEVILAQUA, D. **Estudo da interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS_2) e bornita (Cu_5FeS_4)**. 2003. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- BEVILAQUA, D. **Solubilização da calcopirita (CuFeS_2) e da bornita (Cu_2FeS_4) por *Thiobacillus ferrooxidans***. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.
- BEVILAQUA, D.; GARCIA JÚNIOR, O. Oxidación de sulfuros de cobre por *A. ferrooxidans*: análisis de los productos de las fases líquidas y sólidas. In: ACEVEDO, F. E.; GENTINA, J. C. M. (Ed.). **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005. Cap. 4, p. 63-77.
- BEVILAQUA, D.; LAHTI, H.; SUEGAMA, P. H.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V.; PUHAKKA, J. A.; TUOVINEN, O. H. Effect of Na-chloride on the bioleaching of a chalcopyrite concentrate in shake flasks and stirred tank bioreactors. **Hydrometallurgy**, v. 138, p. 1-13, 2013.
- BLAKE, R. C.; SASAKI, K.; OHMURA, N. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite? **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2/3, p. 357-372, 2001.

BLAUTH, P. L. **Oxidação da calcopirita (CuFeS₂) por *Acidithiobacillus ferrooxidans* em presença de cisteína e *Acidithiobacillus thiooxidans***. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

BOSECKER, K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3/4, p. 591-604, 1997.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Informe Mineral 2º/2014. **Sumário Mineral**, jul./dez. 2014. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/dnpm/informes/informe_mineral_2014-02.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2015.

BRIERLEY, C. L.; BRIERLEY, J. A. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7543-7552, 2013.

CABRERA, G.; GOMEZ, J. M.; CANTERO, D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2683-2687, 2005.

COPPER DEVELOPMENT ASSOCIATION Inc. **History of copper**. Disponível em: <<http://www.copper.org/education/history/>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

CORAM, N. J.; RAWLINGS, D. E. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp nov dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 838-845, 2002.

CORAM, N. J.; VAN ZYL, L. J.; RAWLINGS, D. E. Isolation, sequence analysis, and comparison of two plasmids (28 and 29 kilobases) from the biomining bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* ATCC 49879. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7515-7522, Nov 2005.

CORDOBA, E. M.; MUNOZ, J. A.; BLAZQUEZ, M. L.; GONZALEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: general aspects. **Hydrometallurgy**, v. 93, n. 3/4, p. 81-87, 2008.

COSTA, M. A. **Obtenção e avaliação de mutantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* quanto à capacidade de lixiviar minérios de cobre**. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

DELFINO, F. A. A. **Espectroscopia de impedância eletroquímica da biodissolução de calcopirita na presença de íons ferrosos**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

DIMITRIJEVIC, M.; KOSTOV, A.; TASIC, V.; MILOSEVIC, N. Influence of pyrometallurgical copper production on the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2/3, p. 892-899, 2009.

DONG, Y.; LIN, H.; XU, X. F.; ZHANG, Y.; GAO, Y. J.; ZHOU, S. S. Comparative study on the bioleaching, biosorption and passivation of copper sulfide minerals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 29-34, 2013.

FIRMINO, S. M. **Biodissolução da calcopirita na presença de íons cloreto**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

FRANCISCO JUNIOR, W. E.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Microbiological oxidative dissolution of a complex mineral sample containing pyrite (FeS_2), pyrrhotite ($\text{Fe}(1-x)\text{S}$) and molybdenite (MoS_2). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1095-1099, 2007.

FRANCISCO JUNIOR, W. E.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidation study of the synthetic sulfides molybdenite (MoS_2) and covellite (CuS) by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using respirometric experiments. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1477-1481, 2009.

FU, B.; ZHOU, H. B.; ZHANG, R. B.; QIU, G. Z. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. and *Leptospirillum ferriphilum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 109-115, 2008.

GARCIA, I. G. **Consórcios microbianos associados a ambientes de minas: obtenção, avaliação fisiológica e molecular**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

GARCIA JUNIOR, O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 1991.

GERICKE, M.; GOVENDER, Y.; PINCHES, A. Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 3/4, p. 414-419, 2010.

GHOSH, B.; MUKHOPADHYAY, P. Effect of amino acids on bioleaching of chalcopyrite ore by *Thiobacillus ferrooxidans*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1991-1996, 2011.

GOEBEL, B. M.; STACKEBRANDT, E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial-populations found in natural and commercial bioleaching environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1614-1621, 1994.

HARNEIT, K.; GOEKSEL, A.; KOCK, D.; KLOCK, J. H.; GEHRKE, T.; SAND, W. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1/4, p. 245-254, 2006.

HE, Z.; ZHAO, J. C.; LIANG, W. J.; HU, Y. H.; QIU, G. Z. Effects of L-cysteine on Ni-Cu sulfide and marmatite bioleaching by *Acidithiobacillus caldus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1383-1387, 2009.

HENAO, D. M. O. **Estudo de genes envolvidos no processo de adesão do *Acidithiobacillus ferrooxidans* em calcopirita (CuFeS₂)**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

HOFFMANN, R. **Estatística para economistas**. 4. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

HORTA, D. G. **Influência da adição da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* e de íons Cl na dissolução da calcopirita**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

HU, Y. H.; HE, Z. G.; HU, W. X.; PENG, H.; ZHONG, H. Effect of two kinds of amino-acids on bioleaching metal sulfide. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 14, n. 4, p. 794-797, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Evolução da produção mineral brasileira - 2014**. [Brasília, DF], 2015. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00005475.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 7. ed. [Brasília, DF], 2012. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2015.

JOHNSON, D. B. Biomining - biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 24-31, 2014.

KINZLER, K.; GEHRKE, T.; TELEGGI, J.; SAND, W. Bioleaching - a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). **Hydrometallurgy**, v. 71, n. 1/2, p. 83-88, 2003.

LI, L. L.; LV, Z. S.; YUAN, X. L. Effect of L-glycine on bioleaching of collophanite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 156-165, 2013.

LI, S. Z.; ZHONG, H.; HU, Y. H.; HE, Z. G.; GAO, F. L.; GU, G. H. Microbial community shifts during the process of marmatite bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 149, p. 127-131, 2014.

LI, Y. Kinetics and roles of solution and surface species of chalcopirite dissolution at 650 mV. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 161, p. 188-202, 2015.

LI, Y.; KAWASHIMA, N.; LI, J.; CHANDRA, A. P.; GERSON, A. R. A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopirite. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 197, p. 1-32, 2013.

LIANG, Y.-T.; ZHU, S.; WANG, J.; AI, C. B.; QIN, W. Q. Adsorption and leaching of chalcopirite by *Sulfolobus metallicus* YN24 cultured in the distinct energy sources. **International Journal of Minerals Metallurgy and Materials**, v. 22, n. 6, p. 549-552, 2015.

LIU, X.; WEN, J. K.; WU, B.; LIU, S. Magnesium-rich gangue dissolution in column bioleaching of chalcopyrite. **Rare Metals**, v. 34, n. 5, p. 366-370, 2015.

MARHUAL, N. P.; PRADHAN, N.; KAR, R. N.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8331-8336, 2008.

MINITAB. **O que é anova?** Disponível em: <<http://support.minitab.com/pt-br/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/anova/basics/what-is-anova>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

MOLAEI, S.; YAGHMAEI, S.; GHOBADI, Z. A study of *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSMZ 583 adaptation to heavy metals. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 133-144, 2011.

MOSKALYK, R. R.; ALFANTAZI, A. M. Review of copper pyrometallurgical practice: today and tomorrow. **Minerals Engineering**, v. 17, n. 1, p. 103-103, 2004.

MOUSAVI, S. M.; YAGHMAEI, S.; VOSSOUGH, M.; JAFARI, A.; HOSEINI, S. A. Comparison of bioleaching ability of two native mesophilic and thermophilic bacteria on copper recovery from chalcopyrite concentrate in an airlift bioreactor. **Hydrometallurgy**, v. 80, n. 1/2, p. 139-144, 2005.

NOVELLO, A. P. F. **Análise Proteômica diferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos sulfetos minerais calcopirita e bornita e efeito de uma proteína recombinante de *At. ferrooxidans* LR contendo cisteína na oxidação bacteriana da calcopirita.** 2008. 189 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

OKIBE, N.; JOHNSON, D. B. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 5, p. 574-583, 2004.

PANDA, S.; BISWAL, A.; MISHRA, S.; PANDA, P. K.; PRADHAN, N.; MOHOPATRA, U.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. K.; AKCIL, A. Reductive dissolution by waste newspaper for enhanced meso-acidophilic bioleaching of copper from low grade chalcopyrite: a new concept of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 153, p. 98-105, 2015.

PESIC, B.; OLIVER, D. J.; WICHLACZ, P. An electrochemical method of measuring the oxidation rate of ferrous to ferric iron with oxygen in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 4, p. 428-439, 1989.

PINEDA, G. A. C. **Estudio del efecto de aditivos químicos como potenciadores de procesos de biodesulfurización de carbones con alto contenido de azufre - evaluación a escala de laboratorio.** 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia - Ciência e Tecnologia dos materiais) - Faculdade de Minas, Universidade Nacional da Colômbia, Medellín, 2014.

PRADHAN, N.; NATHSARMA, K. C.; RAO, K. S.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. K. Heap bioleaching of chalcopyrite: a review. **Minerals Engineering**, v. 21, n. 5, p. 355-365, 2008.

PRONK, J. T. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2227-2230, 1992.

RAWLINGS, D. E.; JOHNSON, D. B. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. **Microbiology-Sgm**, v. 153, p. 315-324, 2007.

RIBEIRO, D. A.; MARETTO, D. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; SILVA, M. J.; CAMPOS, F. A. P.; DOMONT, G. B.; POPPI, R. J.; OTTOBONI, L. M. M. Heat and phosphate starvation effects on the proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1469-1479, 2011.

RIBEIRO NETO, W. A. **Biolixiviação de minério de cobre da mina de Sossego PA - Companhia Vale do Rio Doce**. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; TRIBUTSCH, H. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 815-824, 2000.

SANTOS, A. L. A. **Efeito do potencial de óxido-redução na biolixiviação da calcopirita**. 2014. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES, 7th, 2009, Reno. **Proceedings...** Nevada: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. 4 p.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to microbiological leaching of sulfide ores. **Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie**, v. 12, n. 4, p. 311-346, 1972.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with ¹⁴C₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archiv Fur Mikrobiologie**, v. 88, n. 4, p. 285-298, 1973.

VARDANYAN, A.; STEPANYAN, S.; VARDANYAN, N.; MARKOSYAN, L.; SAND, W.; VERA, M.; ZHANG, R. Y. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching systems. **Minerals Engineering**, v. 81, p. 167-172, 2015.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WATLING, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, n. 1/2, p. 81-108, 2006.

YU, R.; SHI, L. J.; GU, G. H.; ZHOU, D.; YOU, L.; CHEN, M.; QIU, G. Z.; ZENG, W. M. The shift of microbial community under the adjustment of initial and processing pH during bioleaching of chalcopyrite concentrate by moderate thermophiles. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 300-307, 2014.

ZENG, J.; ZHAO, W. J.; LIU, Y. D.; XIA, L. X.; LIU, J. S.; QIU, G. Z. Expression, purification and characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein, IscU, from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1965-1972, 2007.