

ESTUDO DA OXIDAÇÃO DOS SULFETOS SINTÉTICOS MOLIBDÊNITA (MoS₂) E COVELITA (CuS) POR *Acidithiobacillus ferrooxidans* VIA RESPIROMETRIA CELULAR

Wilmo E. Francisco Junior*

Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Campus de Porto Velho, BR 364 km 9,5, 78912-190, Porto Velho – RO / Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP, Brasil

Denise Bevilaqua e Oswaldo Garcia Júnior

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 10/7/08; aceito em 4/2/09; publicado na web em 3/7/09

OXIDATION STUDY OF THE SYNTHETIC SULFIDES MOLYBDENITE (MoS₂) AND COVELLITE (CuS) BY *Acidithiobacillus ferrooxidans* USING RESPIROMETRIC EXPERIMENTS. This paper analyses the oxidation of covellite and molybdenite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR using respirometric experiments. The results showed that both sulfides were oxidized by *A. ferrooxidans*, however, the covellite oxidation was much higher than molybdenite. Regarding the kinetic oxidation, the findings revealed that just molybdenite oxidation followed the classical Michaelis-Menten kinetic. It is probably associated with the pathway which these sulfides react to chemistry-bacterial attack, what is influenced by its electronic structures. Besides, experiments conducted in the presence of Fe³⁺ did not indicate alterations in molybdenite oxidation. Thus, ferric ions seem not to be essential to the sulfide oxidations.

Keywords: sulfide oxidation; *A. ferrooxidans*; respirometric experiments.

INTRODUÇÃO

A lixiviação bacteriana, ou biolixiviação, é um processo biotecnológico que se fundamenta na utilização de micro-organismos capazes de solubilizar metais pela oxidação de sulfetos minerais. Uma das principais espécies utilizada neste processo é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma bactéria quimiolitotrófica que obtém sua energia, basicamente, pela oxidação do íon ferroso e de compostos reduzidos de enxofre, incluindo os sulfetos minerais. A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é utilizada pela espécie para a fixação do CO₂ atmosférico, sua fonte de carbono.¹ Além disso, o *A. ferrooxidans* é uma espécie mesofílica e acidofílica, sendo 30 °C a temperatura ótima de crescimento e o pH ótimo de crescimento situa-se em torno de 2,0.²

Sua capacidade em acelerar a dissolução oxidativa de sulfetos já foi demonstrada para diferentes amostras minerais como calcopirita³ (CuFeS₂), covelita⁴ (CuS), pirrotita⁵ (Fe_{1-x}S), pirita^{5,6} (FeS₂), galena⁷ (PbS), esfalerita⁸ (ZnS), dentre outros. Entretanto, a ação bacteriana sobre os sulfetos minerais ainda é um assunto controverso.⁹ Inicialmente, duas rotas para a oxidação dos sulfetos foram propostas: o mecanismo direto e o mecanismo indireto.¹⁰

O mecanismo direto caracteriza-se pela adesão obrigatória da bactéria à superfície do sulfeto durante a dissolução oxidativa do mineral. Segundo essa proposição, a solubilização do metal é promovida pelo ataque de um sistema enzimático presente na bactéria, diretamente sobre a superfície do mineral, ocasionando a oxidação do S²⁻ e a consequente solubilização do metal de interesse. Por outro lado, no mecanismo indireto, não há a adesão da bactéria sobre a superfície do mineral. Neste caso a bactéria produz agentes lixiviantes (íons Fe³⁺ e H⁺) pela oxidação de substratos solúveis, os quais oxidam quimicamente o sulfeto mineral. De tal modo, no mecanismo indireto, a bactéria participa somente com uma função catalítica. Contudo, esta categorização foi redefinida com a inclusão de um terceiro modelo:

o mecanismo indireto de contato.¹¹ A principal característica deste modelo é a hipótese de que íons férricos ou prótons são os únicos agentes lixiviantes dos sulfetos.

A partir de meados dos anos 90, no entanto, alguns trabalhos passaram a questionar a existência do mecanismo direto.^{12,13} Mais recentemente, vem sendo proposto que apenas duas rotas principais controlam a dissolução dos sulfetos minerais, o mecanismo dos polisulfetos e o mecanismo do tiosulfato, sendo a configuração eletrônica dos sulfetos aspecto determinante no caminho a ser seguido.¹⁴⁻¹⁷

De acordo com a Teoria do Orbital Molecular (TOM) e a Teoria da Ligação de Valência (TLV), os orbitais dos átomos ou moléculas constituem bandas com diferentes níveis energéticos, sendo a banda de mais alto nível de energia ainda preenchida com elétrons, designada banda de valência. No caso dos sulfetos minerais, quando esta banda de valência é derivada tanto do átomo metálico quanto do átomo de enxofre, a ligação metal-enxofre tem seu rompimento facilitado pelo ataque de prótons H⁺. Assim, sulfetos como covelita (CuS), calcocita (CuS₂) e esfalerita (ZnS), os quais possuem a banda de valência preenchida com elétrons do átomo metálico e do enxofre, são denominados solúveis em ácido. Como consequência, a solubilização destes sulfetos pode ocorrer tanto pela ação oxidante dos íons férricos quanto pelo ataque de prótons.

Em contrapartida, este mecanismo de reação via ataque de prótons não é válido quando a banda de valência do sulfeto não é derivada dos orbitais 3p do átomo de enxofre, mas sim dos orbitais 'd' do átomo metálico, fato que dificulta a quebra da ligação metal-enxofre. Importantes exemplos são o MoS₂, WS₂ e FeS₂, os quais são classificados como sulfetos insolúveis em ácido. Logo, estes sulfetos, cujos valores de K_{ps} são mais elevados, apresentam maior resistência ao ataque bacteriano e à oxidação química.¹⁴

Neste contexto, os fundamentos bioquímicos da lixiviação bacteriana assim como a função do íon férrico durante o processo são objetos de intensas investigações. Estudos sobre a cinética de biolixiviação de sulfetos minerais podem fornecer importantes informações

*e-mail: wilmojr@bol.com.br

a respeito da ação bacteriana, além de alguns parâmetros, tais como a velocidade máxima de oxidação, a concentração ótima de sulfeto e a concentração de saturação, os quais podem ser extrapolados para ensaios em escalas maiores.

Baseado nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar, via respirometria celular, a atividade de oxidação do *A. ferrooxidans* frente aos sulfetos sintéticos de molibdenita e covelita, bem como estudar o efeito da concentração e a cinética de oxidação de ambos os sulfetos durante a atividade bacteriana. O intuito de se empregar sulfetos sintéticos calca-se no elevado grau de pureza destes, o que possibilita analisar mais detalhadamente as interações entre a bactéria e os sulfetos minerais sem que haja interferência de outros minerais, bem como de eventuais íons férricos em solução, na oxidação das amostras em estudo.

PARTE EXPERIMENTAL

Linhagem bacteriana e amostras minerais

Nos estudos de oxidação dos sulfetos minerais foi utilizada a linhagem bacteriana *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR, isolada de licor de lixiviação ácida de minério de urânio proveniente da mina de Lagoa Real, Bahia.¹⁸ Na manutenção periódica da linhagem bacteriana, assim como na obtenção de células para a realização dos estudos de oxidação do sulfeto utilizou-se o meio de cultura T&K, o qual contém ferro II como fonte energética.¹⁹ Como substratos para a bactéria foram utilizados dois sulfetos sintéticos, covelita (CuS) e molibdenita (MoS₂), fornecidos pela Aldrich Chemical Company Incorporation (Milwaukee, EUA). A granulometria das amostras foi 100% < 0,2 mm e a pureza > 99,0%. As amostras dos sulfetos minerais também foram caracterizadas por difratometria de Raios-X em equipamento X D5000 – Siemens. A análise dos difratogramas (dados não mostrados) revelou, como esperado, apenas a presença destes sulfetos, uma vez que ambos possuem elevado grau de pureza.

Estudos de respirometria celular

Para a investigação da oxidação da covelita e da molibdenita pelo *A. ferrooxidans* foram conduzidos ensaios de respirometria celular.²⁰ A técnica de respirometria celular indica rapidamente a capacidade, ou não, da bactéria em oxidar sulfetos minerais ou outros substratos. Nessa técnica, o sistema reacional é mantido fechado à temperatura controlada e, à medida que a bactéria utiliza substratos oxidáveis, o consumo de oxigênio é acusado pela mudança da pressão no frasco de reação. Os ensaios respirométricos foram conduzidos na presença de suspensão celular de *A. ferrooxidans* LR desacoplada de crescimento, ou seja, por limitação de CO₂ não se encontra em processo de divisão celular. Para a obtenção da suspensão celular, a cultura do *A. ferrooxidans* LR foi crescida em meio T&K e, em seguida, filtrada em membrana (0,45 mm de poro) para a retirada de precipitados do meio. A seguir centrifugou-se a solução (rotor JA-10, centrífuga Beckman Avanti J-25) à temperatura de 4 °C e 10.000 g durante 30 min.

O precipitado contendo a suspensão celular foi então lavado por três vezes em água acidificada (pH 1,8) com H₂SO₄ e ressuspenso novamente em água de pH 1,8. Previamente à utilização das células no experimento, quantificou-se a proteína total como indicativo da biomassa celular.²¹ Os frascos de reação continham, além de 0,5 mL da suspensão celular do *A. ferrooxidans* LR, uma massa de sulfeto que variou de 10 a 300 mg (10, 20, 50, 100, 200 e 300 mg) e 2,0 mL de água ácida (pH 1,8). Frascos sem a presença de células foram utilizados como controles químicos. Os ensaios foram conduzidos a 30 ± 2 °C, sendo todos realizados em triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio respirométrico com *A. ferrooxidans* LR

A Figura 1 mostra o consumo de oxigênio de covelita na presença e ausência do *A. ferrooxidans* LR. Para todas as massas utilizadas pode ser observado um maior consumo de oxigênio nos ensaios realizados na presença de bactéria, quando comparados aos respectivos ensaios realizados como controles químicos. Este fato evidencia a capacidade do *A. ferrooxidans* LR em aumentar a velocidade de oxidação da covelita (CuS), como já demonstrado por outros trabalhos.^{4,22,23} Outro aspecto que merece ser ressaltado é o aumento do consumo de oxigênio pela bactéria na medida em que se aumenta a massa de sulfeto utilizada no ensaio, o que sugere uma cinética de saturação pelo substrato.

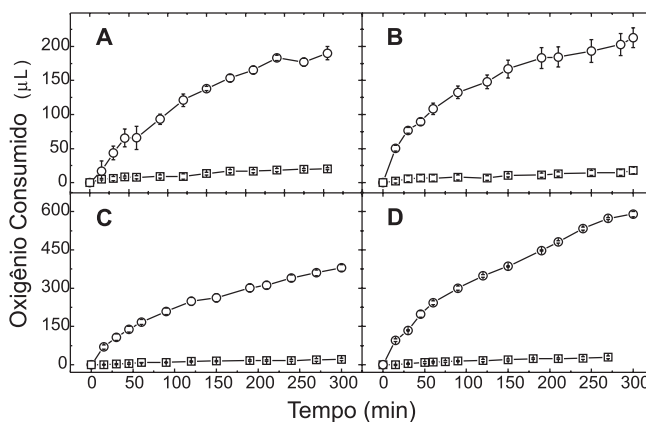


Figura 1. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (500 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A), 150 mg (B), 200 mg (C) e 300 mg (D) de covelita como substrato oxidável. (O) inoculado, (□) controle químico

Já em relação aos ensaios realizados com o sulfeto de molibdeno, não se observou atividade de oxidação no mesmo, caracterizado pelo não consumo de oxigênio durante os experimentos (dados não mostrados). Tal fato deve estar associado à elevada hidrofobicidade apresentada pela molibdenita,²⁴ não permitindo, portanto, o ataque da bactéria ao sulfeto. Para contornar tal problema testou-se a utilização do agente surfactante Tween 80 nos ensaios respirométricos. Foram testadas as concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5%. Concentrações deste surfactante superiores a 1% provocam a inibição da atividade bacteriana.²⁴ O melhor comportamento se deu para a concentração de 0,5% de Tween 80 (dados não mostrados). Similarmente, Pistaccio *et al.*²⁴ reportaram que esta concentração de surfactante foi a que apresentou os melhores resultados, tanto na solubilização de molibdeno quanto na adesão bacteriana.

Como mostra a Figura 2, na presença do surfactante, a atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR em molibdenita foi observada devido à diminuição da hidrofobicidade do sulfeto. Entretanto, em nenhum dos experimentos o O₂ consumido atinge valores elevados, permanecendo sempre abaixo dos 100 µL. Alguns estudos já haviam revelado a natureza refratária da molibdenita em ensaios de lixiviação bacteriana, nos quais a solubilização de molibdeno foi menor do que 1%.^{25,26} Em relação à concentração do substrato, embora o aumento da massa de sulfeto não tenha afetado significativamente o consumo de oxigênio, a velocidade inicial de oxidação é aumentada até atingir a saturação, como apontam os dados de cinética de oxidação (Figura 4B).

Outro aspecto importante foi o consumo bem superior de oxigênio nos ensaios realizados na presença de covelita em relação aos ensaios com molibdenita (em torno de 10 vezes). A maior susceptibilidade da covelita em relação à molibdenita frente ao ataque químico-bacteriano é

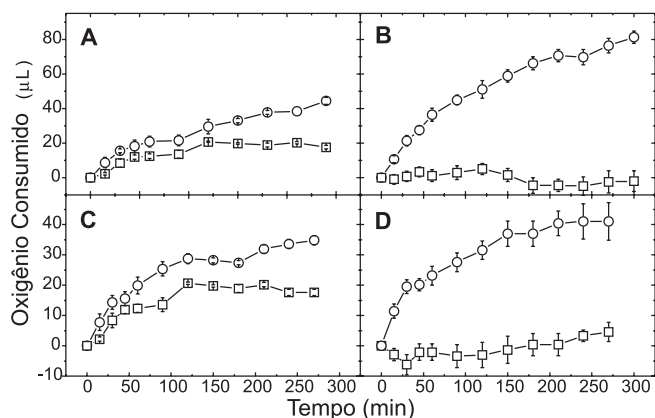


Figura 2. Atividade de respiração da *A. ferrooxidans* LR (420 µg de proteína total) na presença de massas de 20 mg (A), 50 mg (B), 100 mg (C) e 200 mg (D) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%). (○) inoculado, (□) controle químico

apontada também por Tributsch e Bennet.²⁷ Possivelmente, tal comportamento está associado às estruturas eletrônicas destes sulfetos, como assinalado por Sand *et al.*,¹⁴ o que influencia também a energia de rede desses minerais. Como consequência, a covelita, cujo valor de Kps é da ordem 10⁻³⁵, possui maior solubilidade em ácido quando comparada à molibdenita, cujo valor de Kps é mais baixo, da ordem de 10⁻⁴⁸.

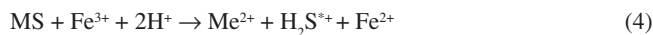
Por tais motivos, a covelita é classificada como um sulfeto solúvel em ácido.^{14,15} Para este tipo de sulfeto, o ataque de prótons gera grupos SH⁻ em sua superfície, devido à protonação de átomos de enxofre. Tais grupos SH⁻ são caracterizados por estados eletronicamente diferentes dos átomos de enxofre não protonados, enfraquecendo a ligação com a estrutura cristalina. A formação desta ligação enfraquecida permite que um posterior ataque de prótons remova uma molécula de H₂S,²⁷ como representado pela Equação 1.



Na presença de bactérias como o *A. ferrooxidans*, este H₂S gerado pode ser oxidado tanto quimicamente quanto microbiologicamente a enxofre, o qual é posteriormente oxidado a sulfato.



No caso do ataque pelos íons férricos, o rompimento das ligações químicas entre o metal e o enxofre pode ser provocado pela remoção de um elétron do átomo de enxofre. Este passo, segundo alguns autores,¹⁴⁻¹⁷ acontece concomitantemente ao ataque de prótons, pelo qual é formado o radical H₂S^{•+}, como representado pela Equação 4:

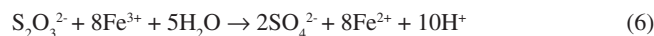
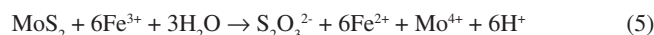


Posteriormente, como apontam Sand *et al.*¹⁴ e Steudel,²⁸ ocorre uma série de reações envolvendo a formação de polissulfetos radicais até a formação de enxofre elementar. Por isso este mecanismo foi denominado de “polissulfetos”.

Em contrapartida, a molibdenita pertence à classe dos sulfetos insolúveis em ácido, não podendo ser atacada por prótons.¹³⁻¹⁷ Este fator parece ser preponderante na eficiência da oxidação de um e outro sulfeto, e mostra ser a principal razão para as diferentes suscetibilidades dos sulfetos ao ataque químico-bacteriano. Romano *et al.*^{25,26} assinalam que o potencial redox necessário para a decomposição da

molibdenita é virtualmente impossível de ser alcançado. Em estudo recente, Olson e Clark²⁹ apontam que a solubilização do molibdênio ocorre apenas em potenciais de 750 a 800 mV. Os mesmos autores argumentam que o ataque microbiológico sobre a molibdenita requer organismos capazes de gerar um alto potencial. Todavia, o potencial redox é altamente dependente do teor de íons férricos no meio, atingindo valores elevados apenas em soluções cuja concentração desses íons é alta. Em casos nos quais a concentração de Fe³⁺ é baixa, como no presente estudo, o potencial também será baixo e, consequentemente, a solubilização de molibdênio também.

Devido a isso, uma série de trabalhos¹³⁻¹⁷ argumenta que na ausência de íons férricos o *A. ferrooxidans* não é capaz de oxidar a molibdenita. Segundo esses trabalhos, para a molibdenita, o rompimento da ligação química metal-enxofre ocorre após seis passos sucessivos de extração de elétrons por íons férricos, com a consequente formação de tiosulfato. As Equações 5 e 6 resumizam essa proposta, denominada de mecanismo do tiosulfato.



Nesse sentido, ensaios de respirometria celular da molibdenita também foram conduzidos com suplementação de íons férricos (120 mMol L⁻¹), uma vez que a adição dos mesmos pode aumentar a velocidade de oxidação do referido sulfeto.^{29,30} Teoricamente, os íons férricos, como agentes oxidantes, são capazes de iniciar a oxidação do sulfeto mineral, e os íons ferrosos e/ou compostos reduzidos de enxofre resultantes são posteriormente oxidados pela bactéria num processo cíclico, o que resulta em uma rápida elevação do consumo de oxigênio e da velocidade de oxidação. Lizama e Suzuki³⁰ obtiveram um considerável aumento no consumo de O₂ durante a oxidação da pirita após a adição de íons férricos. Entretanto, os resultados aqui obtidos (Figura 3) não apresentaram nenhum acréscimo, seja no consumo de oxigênio seja na velocidade de oxidação. Ainda que o potencial possa ter atingido os valores necessários à oxidação do MoS₂, provavelmente devido à rapidez do ensaio (cerca de 300 min), o tempo foi insuficiente para a oxidação do MoS₂ pelos íons férricos. Isto sugere a não oxidação do sulfeto por íons Fe³⁺ devido a um processo de cinética lenta e, como consequência, a não regeneração dos íons férricos pela bactéria.

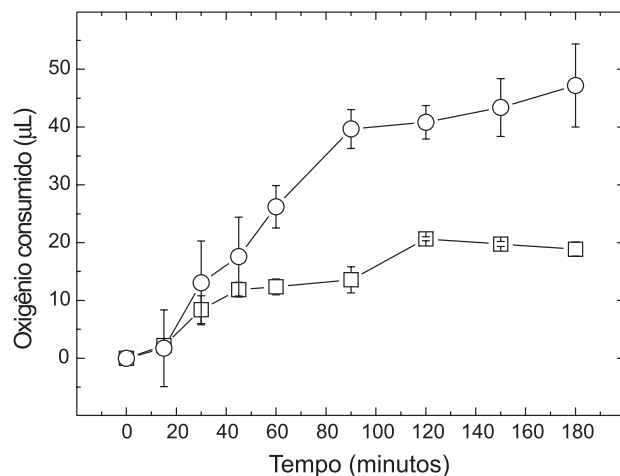


Figura 3. Atividade de respiração da *A. ferrooxidans* LR (300 µg de proteína total) na presença de molibdenita (100 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%) com suplementação de 120 mMol L⁻¹ de Fe³⁺. (○) inoculado, (□) controle químico

Dessa forma, os resultados obtidos contrariam a teoria na qual os íons férricos complexados aos EPS desempenham papel fundamental na dissolução dos sulfetos denominados insolúveis em ácido. Estes são indícios de que o metabolismo do *A. ferrooxidans* é responsável pela oxidação, ainda que baixa, da molibdenita, visto que os resultados não se alteraram independente da presença ou não de íons férricos. Este é um passo importante na elucidação do papel do *A. ferrooxidans* durante a oxidação dos sulfetos, haja vista a quantidade de trabalhos que defendem piamente a necessidade de íons Fe^{3+} .

Trabalhos recentes vêm apontando resultados similares, defendendo, portanto, a existência do mecanismo direto.^{31,32} Todavia, tais estudos utilizaram covelita³¹ e pentlandita,³² sulfetos classificados como solúveis em ácido, o que, no mínimo, deixa dúvida se a oxidação verificada pelos autores se deu realmente pela ação bacteriana ou foi ocasionada pelo ataque ácido. Daí a necessidade de se empregar, em estudos dessa natureza, sulfetos classificados como insolúveis em ácido, como é o caso da molibdenita.

Estudos da cinética de oxidação da covelita e da molibdenita

Para o estudo da cinética de oxidação dos sulfetos minerais foram calculadas as velocidades iniciais de oxidação em cada massa de sulfeto utilizada e, a partir destas, construída uma curva das velocidades de oxidação em relação à massa de substrato. As velocidades iniciais de oxidação foram obtidas a partir do coeficiente angular da parte linear (30 primeiros min) das curvas de consumo de oxigênio de ambos os sulfetos, conforme também apresentam outros estudos.^{3,5,33}

Como observado pela Figura 4A, a covelita apresenta um típico comportamento de saturação pelo substrato, uma vez que acima de 300 mg sua velocidade de oxidação não se altera significativamente. A biolixiviação de CuS tem densidade de polpa ótima em torno de 12%.

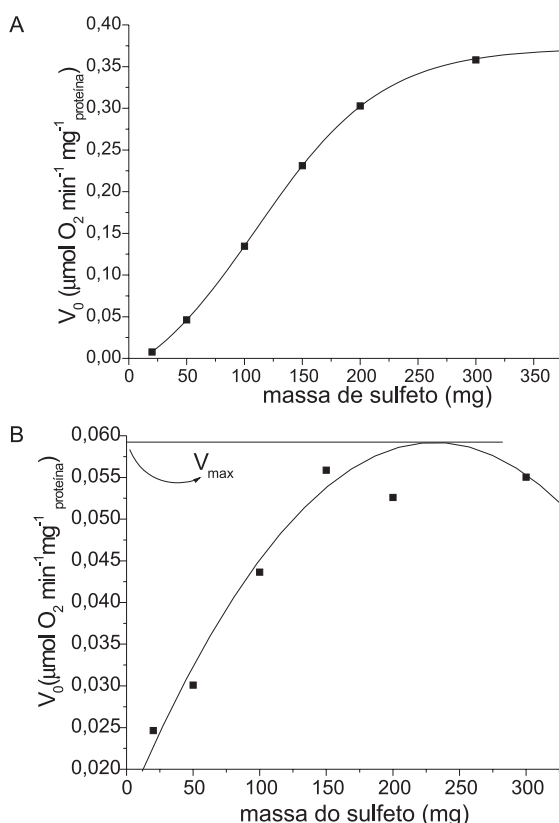


Figura 4. Curva da velocidade inicial de oxidação em função da massa de covelita (A) e curva de Michaelis-Menten para a molibdenita (B)

Os dados também revelaram que a oxidação da covelita não segue a clássica cinética de Michaelis-Menten. Isso indica que o início da oxidação facilita a continuação do processo. A relação sigmoideal entre a velocidade de oxidação e a concentração do substrato pode ser avaliada pela Equação de Hill.³⁴ Esta equação foi derivada da interação entre a hemoglobina e o oxigênio, que mostra um clássico comportamento sigmoideal.

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}}[S]^n}{K^{1/2} + [S]^n}$$

onde V_0 é a velocidade inicial de oxidação, n é a constante de Hill cujo valor é igual ao número de sítios ativos de uma enzima e $K^{1/2}$ representa a concentração de substrato na qual a velocidade é a metade da velocidade máxima da reação. Esta equação pode ser rearranjada para:

$$\log \frac{V_0}{V_{\text{max}} - V_0} = n \log[S] - \log k^{1/2}$$

a qual apresentará uma relação linear com os dados experimentais caso exista um grau de cooperatividade envolvido. No caso da covelita, a curva da Equação logarítmica de Hill é linear (coeficiente de correlação igual a 0,98) sugerindo, portanto, que existe alguma forma de cooperatividade para a oxidação deste sulfeto.

Esta cooperatividade pode ser medida pela razão entre a concentração de substrato necessária para alcançar 90% da velocidade máxima de reação ($0,9V_{\text{max}}$) e a concentração de substrato necessária para atingir 10% da velocidade máxima ($0,1V_{\text{max}}$).³⁴ Esta razão é denominada R_s . Para cinéticas de reação com comportamentos sigmoideais, o valor de R_s pode distinguir cooperatividades positivas e negativas. Valores de R_s menores do que 81 indicam que o sistema se comporta com uma cooperatividade positiva, ou seja, após o início da reação a velocidade tende a aumentar. Em contraste, quando o valor de R_s for maior do que 81, a cooperatividade será negativa e, após o início da reação, a velocidade desta tende a diminuir.

O valor de R_s obtido para a reação de oxidação da covelita foi de aproximadamente 5, o que sugere uma cooperatividade positiva. A partir da Equação de Hill foram obtidos os valores da constante de Hill e do $k^{1/2}$. Os resultados mostraram um valor de 2,55 para a constante de Hill, sugerindo que pode haver dois tipos de ação oxidante no sistema. O valor de $k^{1/2}$ foi igual a 104 mg de CuS , o que indica a massa de covelita na qual a velocidade de oxidação tem metade de seu valor máximo. Por sua vez, o V_{max} para a covelita foi de 0,37 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$.

Provavelmente, a dissolução da covelita é governada tanto pelo ataque das células bacterianas aderidas à superfície do mineral, quanto pelas células bacterianas em suspensão (que regeneram os agentes oxidantes), fato condizente com o valor obtido para a constante de Hill ($n = 2,55$) e com resultados experimentais de outros autores.^{4,22,23} Assim, quando as bactérias aderidas ao sulfeto mineral iniciam a oxidação do mesmo, são liberados substratos intermediários para a solução (H_2S , HS^- etc),¹⁴ os quais são oxidados pelas células livres originando o aumento do consumo de oxigênio e, por conseguinte, o comportamento sigmoideal verificado. Neste caso se estabelece uma cooperação entre as células bacterianas aderidas no sulfeto e as células em suspensão. Novamente se têm evidências de que o papel do *A. ferrooxidans* não é somente regenerar íons Fe^{3+} e H^+ , caso contrário a cooperatividade verificada não ocorreria.

Em relação à molibdenita, como mostra a Figura 4B, a mesma também apresentou um comportamento de saturação pelo substrato.

Contudo, diferentemente da covelita, o MoS₂ segue a clássica cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração testada. Como a molibdenita é classificada como sulfeto insolúvel em ácido, nenhum intermediário oxidável pela bactéria seria liberado em solução. Por conseguinte, a oxidação do MoS₂ só pode acontecer com a aderência das células bacterianas sobre a superfície do mineral. Uma vez que não há outro oxidante no meio capaz de oxidar o sulfeto, dado que não existem íons férricos e o MoS₂ é insolúvel em ácido, somente a adesão governa a velocidade de oxidação.

Por sua vez, a velocidade de oxidação aumenta quase proporcionalmente com o aumento da concentração de substrato até a saturação em cerca de 200 mg de sulfeto (8% de densidade de polpa). Com base nisso, foi construído o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, o que permitiu a obtenção de importantes parâmetros cinéticos, como a velocidade máxima de oxidação (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m), respectivamente $5,7 \times 10^{-2} \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína e 28,0 mg de MoS₂.

Estudos cinéticos da oxidação da molibdenita e da covelita não foram encontrados, o que impossibilita uma comparação entre os resultados aqui obtidos com dados da literatura. Por outro lado, estudos cinéticos similares foram obtidos para a pirita³⁰ e revelaram que a mesma também segue uma cinética de Michaelis-Menten. O valor de K_m obtido para a pirita foi de 2,5% de densidade de polpa,³⁰ o que corresponderia a 62,5 mg de MoS₂ no presente estudo. O valor inferior de K_m para a molibdenita sugere que a mesma alcança a oxidação máxima em um menor intervalo de tempo se comparada à pirita. Não obstante, há de se considerar também que o oxigênio consumido é bem inferior no caso do MoS₂ e, portanto, enquanto a oxidação da molibdenita já cessou a pirita ainda continua sob ação oxidante. Em escalas industriais, portanto, a oxidação da molibdenita apenas pela ação bacteriana seria inviável devido à baixa eficiência do processo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciam uma clara diferença no comportamento do *A. ferrooxidans* LR em relação a cada um dos sulfetos minerais estudados, sendo a oxidação do MoS₂ possível apenas com adição de um agente surfactante, devido a sua alta hidrofobicidade. Apesar dos resultados indicarem que ambos os sulfetos são utilizados como substrato oxidável pela bactéria, o consumo de oxigênio na presença de covelita é bastante superior quando comparado ao consumo de O₂ na presença de molibdenita. Isto decorre das diferentes estruturas eletrônicas de ambos os sulfetos, o que facilita a solubilização do CuS em ácido e a consequente liberação de intermediários (H₂S, HS⁻, entre outros) passíveis de oxidação pelo *A. ferrooxidans* LR, fato que não ocorre com a molibdenita.

Em relação aos estudos da cinética de oxidação, estes revelaram que ambos os sulfetos seguem uma cinética de saturação de substrato. Contudo, apenas a molibdenita segue uma cinética de Michaelis-Menten, possivelmente por este processo ser governado apenas pela aderência das células bacterianas à superfície do sulfeto. Por sua vez, a oxidação da covelita pode se dar tanto pelas células imobilizadas ao mineral, quanto pelas células em suspensão de forma indireta.

Entretanto, o aspecto mais marcante parece ser a oxidação da molibdenita pelo *A. ferrooxidans* como fruto do metabolismo bacteriano e não da ação oxidante de íons férricos, uma vez que ensaios utilizando íons férricos não mostraram alterações nos resultados. Ao contrário do que argumentam alguns trabalhos citados anteriormente, o papel do íon férrico não parece ser tão preponderante na oxidação dos sulfetos classificados como insolúveis em ácido. Todavia, estudos complementares necessitam ser conduzidos para melhor esclarecer tais aspectos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (bolsa de produtividade em pesquisa - Dr. O. Garcia Jr. e bolsa de Mestrado - W. E. Francisco Jr.). À Companhia Vale pela bolsa de pesquisador (Dra. D. Bevilaqua). Ao Dr. D. C. de Lima pelo auxílio na discussão dos resultados sobre a cinética de oxidação.

REFERÊNCIAS

- Leduc, L.G.; Ferroni, G.D.; *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *14*, 103.
- Pivovarova, T. A.; Golovacheva, R. S. Em *Biogeochemistry of metals*; Karavaiko, G. I.; Groudev, S. N., eds.; Centre of International Projects: Moscow, 1985, cap. 1.
- Bevilaqua, D.; Leite, A. L. L. C.; Garcia Jr., O.; Tuovinen, O. H.; *Process Biochem.* **2002**, *38*, 587.
- Monteiro, V. F.; Garcia Jr., O.; Tuovinen, O. H.; *Proceedings of 13th International Bihydrometallurgy Symposium*, Madrid, Espanha, 1999.
- Francisco Jr., W. E.; Bevilaqua, D.; Garcia Jr., O.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 1095.
- Garcia Jr., O.; Bigham, J. M.; Tuovinen, O. H.; *Miner. Eng.* **2007**, *20*, 98.
- Garcia Jr., O.; Bigham, J. M.; Tuovinen, O. H.; *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 578.
- Garcia Jr., O.; Bigham, J. M.; Tuovinen, O. H.; *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 508.
- Francisco Jr., W. E.; Bevilaqua, D.; Garcia Jr., O.; *Química no Brasil* **2008**, *2*, 117.
- Silverman, M. P.; Ehrlich, H. L.; *Adv. Appl. Microbiol.* **1964**, *6*, 153.
- Silverman, M. P.; *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 1046.
- Sand, W.; Gehrke, T.; Hallmann, R.; Schippers, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 961.
- Schippers, A.; Jozsa, P.; Sand, W.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3424.
- Sand, W.; Gehrke, T.; Jozsa, P. G.; Schippers, A.; *Hydrometallurgy* **2001**, *59*, 159.
- Kinzler, K.; Gehrke, T.; Telegdi, J.; Sand, W.; *Hydrometallurgy* **2003**, *71*, 83.
- Rohwerder, T.; Gehrke, T.; Kinzler, K.; Sand, W.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *63*, 239.
- Sand, W.; Gehrke, T.; *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 49.
- Garcia Jr., O.; *Rev. Microbiol.* **1991**, *20*, 1.
- Tuovinen, O. H.; Kelly, D. P.; *Arch. Microbiol.* **1973**, *88*, 285.
- Umbreit, W. W.; Burris, R. H.; Stauffer, J. F.; *Manometric & biochemical techniques*, 5th ed., Burgess: Minneapolis, 1972.
- Hartree, E. F.; *Anal. Biochem.* **1972**, *48*, 422.
- Pogliani, C.; Curutchet, G.; Donati, E.; Tedesco, P. H.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 515.
- Falco, L.; Pogliani, C.; Curutchet, G.; Donati, E.; *Hydrometallurgy* **2003**, *71*, 31.
- Pistaccio, L.; Curutchet, G.; Donati, E.; Tedesco, P.; *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 189.
- Romano, P.; Blazquez, M. L.; Alguacil, F. J.; Munoz, J. A.; Ballester, A.; Gonzalez, F.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *196*, 71.
- Romano, P.; Blazquez, M. L.; Ballester, A.; Munoz, J. A.; Gonzalez, F.; Alguacil, F. J.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, *76*, 723.
- Tributsch, H.; Bennet, J. C.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1981**, *31*, 565.
- Studel R.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **1996**, *35*, 1417.
- Olson, G. J.; Clark, T. R.; *Hydrometallurgy* **2008**, *93*, 10.
- Lizama, H. M.; Suzuki, I.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2918.
- Lilova, K.; Karamanev, D.; *Hydrometallurgy* **2005**, *80*, 147.
- Zhang, G.; Fang, Z.; *Hydrometallurgy* **2005**, *80*, 159.
- Novo, M. T. M.; Garcia Jr., O.; Ottoboni, L. M. M.; *Curr. Microbiol.* **2003**, *47*, 492.
- Whitaker, J. R.; *Principles of enzymology for the food sciences*, Marcel Dekker: New York, 1972.