

Avaliação da Influência de Solventes Orgânicos no Metabolismo de Micro-organismos Utilizados na Oxidação de Sulfetos Minerais de Cobre

Leticia Sobral Maia

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia, Universidade da Cidade

Renata de Barros Lima

Orientadora, Química, M. Sc.

Luis Gonzaga Santos Sobral

Co-orientador, Eng. Químico, Ph.D.

Resumo

A obtenção de cobre a partir de concentrados de flotação segue rota tecnológica convencional em função das especificidades mineralógicas de tal concentrado. Nesse caso, os sulfetos de cobre são convertidos diretamente em cobre *blister* (cobre metálico impuro), pelo processo *flash smelting* e, em seguida, refinado eletroliticamente.

Por outro lado, a biolixiviação possibilita o tratamento de grandes volumes de concentrado de flotação, cuja lixívia resultante pode seguir para a etapa de purificação e posterior eletrorrecuperação do cobre com alta pureza (99,99%). É sabido que solventes orgânicos, se presentes na fase aquosa atuante no processo biológico em questão, proveniente da etapa de extração por solventes (refinado), exercem, em geral, uma ação tóxica sobre os biocatalisadores, especialmente células vivas, ocasionando a desativação das mesmas. É necessário, então, o estudo dos fatores que levam à tolerância de células microbianas a solventes orgânicos para compreender o seu comportamento (Guinn, 1991), visando a potencialidade e otimização do processo.

1. Introdução

Nos tratamentos hidrometalúrgicos convencionais grande parte das impurezas metálicas é disponibilizada na forma de sulfato, ponto de partida para a recuperação dos metais de interesse, quer por cementação quer pela purificação/concentração (feita por extração por solvente), seguida da eletrorrecuperação dos mesmos. Além desses, a biolixiviação (*bioleaching*) já se configura como um processo extrativo de baixo custo, que utiliza micro-organismos endógenos na oxidação dos sulfetos minerais. Posteriormente, o cobre, elemento em estudo, uma vez em solução purificada, é eletrorrecuperado em sua forma pura.

A extração por solvente é um processo no qual um extratante orgânico, diluído em um solvente, a exemplo do querosene, seqüestra cátions contidos na fase aquosa, após contato íntimo das fases orgânica e aquosa. Esse processo é aplicável em qualquer sistema hidrometalúrgico onde se deseja extrair, seletivamente, um dado elemento em mistura com outras espécies metálicas catiônicas. A fase orgânica carregada com o elemento de interesse é, posteriormente, contatada com uma nova fase ácida aquosa, que culmina na eluição do cobre dessa fase aquosa, gerando a nova solução rica nesse elemento, dessa vez isenta das impurezas metálicas. O processo de eluição/re-extração regenera a fase orgânica, que volta ao início do processo de extração. Na

extração de cobre a classe de extratante mais utilizada é a dos extratantes quelantes, os quais têm a função de “aprisionar” o íon metálico, ou seja, o extratante orgânico se liga ao íon metálico que está disponível na solução.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a influência dos solventes orgânicos, utilizados no processo de extração por solventes, no metabolismo dos micro-organismos empregados na oxidação dos sulfetos minerais presentes no concentrado de flotação desses sulfetos, para conseqüente extração de cobre. Adicionalmente, comparar a atuação desses micro-organismos na presença de diferentes concentrações de solventes orgânicos, determinando qual a concentração máxima de solvente orgânico permitido sem que haja comprometimento do metabolismo dos mesmos.

3. Revisão Bibliográfica

Métodos de biotransformação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são bem conhecidos atualmente e, bastante úteis em síntese orgânica. Porém o entendimento da influência da natureza do solvente na enantiosseletividade de enzimas é, ainda, pouco conhecida, não havendo regras de aplicação geral para um melhor entendimento dos fatores envolvidos na ligação enzima-substrato, no estado de transição em solventes orgânicos. (Faber, 1997)

Problemas relacionados ao seu uso estão na dificuldade de se trabalhar com substâncias orgânicas pouco solúveis em meio aquoso, que é, em geral, o meio natural dos biocatalisadores, normalmente células vivas. Este problema tem sido contornado pela adição de um solvente orgânico insolúvel em água como uma segunda fase. A dificuldade está no fato que os solventes orgânicos são, em geral, tóxicos às células diminuindo rapidamente suas atividades biocatalíticas.

3.1. Solventes Orgânicos

A maioria dos solventes que usamos é de origem orgânica (benzeno, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol, etanol etc.). São substâncias capazes de dissolver outras substâncias e formar uma solução, sendo utilizadas como diluentes, dispersantes ou agentes de solubilização.

Como características comuns a todos esses solventes, podemos citar que são todos voláteis, inflamáveis, lipossolúveis e lipofílicos. A sua toxicidade varia conforme a molécula ou a mistura utilizada, tendo uma aplicação variada em nosso cotidiano. Didaticamente são divididos em: hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos ou halogenados; álcoois; cetonas; éteres e outros.

3.1.1. Seleção do Solvente Orgânico

As bioconversões em sistemas bifásicos requerem que a enzima seja protegida do contato com o solvente, pois o mesmo pode desnaturá-la (Ramos, 1999; Cabral *et al.*, 2003).

O principal critério observado na seleção de um solvente orgânico está na conservação da biocatálise e a interação de células microbianas. O solvente não poderá ter interações com a camada de hidratação da enzima, sendo esta necessária para que não haja uma desativação biocatalítica (Barros, 2002). Abaixo, são descritas os demais critérios:

Tabela 1 - Critérios para a seleção do solvente orgânico

Físico-Químicos	Capacidade para solubilização do substrato e do produto; Densidade; Pontos de Fusão e Ebulição; Tensão Superficial; Viscosidade.
Biológicos	Toxicidade para o biocatalizador.
Segurança	Toxicidade; Inflamabilidade.
Logísticos	Facilidade de obtenção; Eliminação de resíduos.
Econômicos	Custo.

Fonte: Hall, G. F. 1998

3.1.2. Toxicidade do Solvente Orgânico

Uma das formas mais simples de se verificar a toxicidade de um solvente em relação a um determinado micro-organismo é a medida do crescimento do mesmo em meio bifásico, com esse solvente como a segunda fase.

O efeito tóxico do solvente pode ser devido a dois processos: um resultante da difusão de moléculas de solvente através da membrana citoplasmática (toxicidade molecular); e outro associado ao contato entre o biocatalizador e o solvente orgânico (toxicidade de fase) (Lima, 1998). Portanto, o grau de utilidade dos solventes orgânicos é proporcional ao cuidado que eles exigem.

3.2. Micro-organismos Termofílicos

Os micro-organismos termofílicos têm aplicação biotecnológica, pois são umas das únicas fontes de enzimas com propriedades não usuais, utilizadas em fermentação a altas temperaturas, em processos de tratamento de rejeitos e em lixiviação mineral (Brock, 1986; Kelly *et al.*, 1994).

Entre os micro-organismos Termófilos, existem grupos fisiologicamente distintos. Alguns Termófilos geram energia reduzindo enxofre e hidrogênio para formar sulfeto de hidrogênio (Pool, 1990). São classificados como Termófilos moderados, Termófilos extremos, e hipertermófilos (Han, 1998).

Espécies hipertermófilas são capazes de suportar temperaturas de até 90°C, com temperatura ótima de crescimento de 80°C ou acima. Os Termófilos extremos suportam temperaturas entre 70°C e 90°C e organismos Termófilos moderados, na faixa de 50°C a 70°C (Kelly *et al.*, 1994).

4. Metodologia

4.1. Micro-organismos empregados nos ensaios – Consórcio de Termófilos moderados (50°C).

O consórcio utilizado nesse estudo é constituído de diferentes grupos de micro-organismos provenientes da

DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - coleção de cultura alemã) e ATCC (*American Type Culture Collection* - coleção de cultura estadunidense).

Foi decidida, para a realização desse estudo, a utilização do consórcio de micro-organismos Termófilos moderados, por ser esse o grupo mais atuante nos ensaios de biolixiviação em pilha, de sulfetos minerais.

4.2. Refinado

O solvente orgânico (extratante + diluente), presente no refinado do processo de extração por solventes, é composto de 85% de diluente (querosene) e 15% de agente extratante (composto quelante). O refinado utilizado neste estudo é proveniente da planta de extração por solvente pertencente à Mineração Caraíba S.A. e tem cerca de 30ppm de orgânicos, com a mesma composição da mistura extratante inicial.

O querosene utilizado, com o nome comercial de *Escaid* 110, é composto quase que totalmente de orgânicos alifáticos podendo ter até 1% de aromáticos. Juntamente com seus resíduos pode ser reprocessado ou incinerado em instalações adequadas.

O extratante orgânico é o Acorga 5850, que é uma aldoxima derivada da salicilaldoxima em mistura de solvente. É um líquido de cor âmbar claro, inodoro, insolúvel em água e com alta toxicidade para organismos aquáticos. Pode ser reciclado, recuperado ou reutilizado e, quando necessário, incinerado em instalações adequadas.

Os produtos Acorga são produtos químicos organo-sintéticos produzidos, especificamente, para apresentarem alta seletividade na extração de cobre, na presença de outros íons metálicos, a partir do *PLS* (*Pregnant Leaching Solution*). Devido a essa seletividade, a separação da nova fase orgânica da fase aquosa (refinado) é favorecida, tornando viável uma posterior eluição dessa nova fase orgânica, pelo contato da mesma com uma solução ácida, e liberação do metal de interesse, em sua forma pura e concentrada, nessa nova fase aquosa.

A fase orgânica extratante é insolúvel na fase aquosa, permitindo, por conseguinte, a quase total separação dessas fases. Para ajudar em tal separação, o produto Acorga supracitado é diluído em um solvente contendo hidrocarbonetos, a exemplo do querosene. Esse diluente orgânico atua, simplesmente, como um meio carreador do extratante propriamente dito (Spence, 1999).

As características físico-químicas do refinado utilizado são: 0,15 a 0,5 g/L em cobre; 0,4 a 1 g/L em ferro; 7 a 9 g/L em acidez livre e pH variando de 1,1 a 1,2.

4.3. Preparo do Meio de Cultura:

Os testes foram realizados utilizando o meio de cultura MKM - *Modified Kelly Medium* (concentração dupla, com pH 1,7 corrigido com H₂SO₄ concentrado) (Olson *et al.*, 2003), como fonte de nutriente, cuja composição desse meio é: (NH₄)₂SO₄: 0,4 g/L, MgSO₄.7H₂O : 0,4 g/L e K₂HPO₄ : 0,04 g/L; e, como fonte de energia, foram utilizados 10 g/L de FeSO₄.7 H₂O; 10g/L de Calcopirita (CuFeS₂); 5g/L de S⁰; 2g/L de Extrato de Levedura. Para a manutenção da taxa de evaporação dos ensaios utilizou-se água deionizada.

4.4. Procedimento dos ensaios

Para avaliar a influência dos solventes orgânicos no metabolismo microbiano foram realizados testes com diferentes concentrações de refinado (Tabela 2) visando determinar a concentração máxima deste solvente permitida para tal metabolismo.

Inicialmente foi produzido um inóculo fresco de consórcio de micro-organismos termófilos moderados, onde, a partir do mesmo, foram realizadas novas propagações em meio de cultura MKM, contendo diferentes concentrações de refinado.

Tabela 2. Condições dos ensaios para a avaliação da influência de solventes orgânicos no metabolismo microbiano.

Composição	0%	5%	10%	15%	20%	25%	50%	100%
Rafinado (mL)	0,0	17,5	35	52,5	70	87,5	157,5	315
Inóculo (mL)	35	35	35	35	35	35	35	35
Meio de Cultura (mL)	315	297,5	280	262,5	245	227,5	157,5	0,0

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade e mantidos em incubadora, com agitação de 150 rpm, a temperatura de 50°C. Foram realizados em duplicata e em batelada, mantendo um volume total de 350 mL, onde foram aferidos, periodicamente, os parâmetros operacionais como: pH e potencial redox das misturas, além das concentrações de cobre e espécies iônicas de ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}).

4.5. Quantificação microbiana

A quantificação microbiana foi aferida por contagem de células móveis em câmara de *Thoma*. Esta é constituída de um compartimento com dimensões definidas e dotada de divisões quadrangulares.

5. Resultados e Discussão

Como pode ser observado na Figura 1 B, quando comparada com a Figura 1 A, as variações das concentrações das espécies iônicas de ferro não foram substanciais, indicando que o refinado supramencionado não interferiu, de maneira significativa, no perfil dessas espécies, o que espelha a boa atuação dos micro-organismos utilizados. Essa afirmação pôde ser corroborada analisando a Figura 2 C, onde é possível observar que durante todo o processo, no ensaio contendo 100 % de refinado, os valores de potencial redox são superiores a 0,600 V vs. EPH. Quando avaliados os resultados dos demais ensaios, contendo 5, 10, 15, 20, 25 e 50% de refinado (v/v), dados omitidos devido ao resultado obtido com a utilização de 100% desse refinado, como mostrado na Figura 2C, ocorre uma quase sobreposição dos perfis de potencial redox com os valores de Eh do ensaio 100%.

Por último, analisando a Figura 2 D, podemos afirmar que, mesmo utilizando a máxima concentração de refinado, não houve interferência substancial na atividade dos micro-organismos utilizados, em função da elevada taxa populacional aferida naquele teste, que foi da ordem de 10^7 cel./mL.

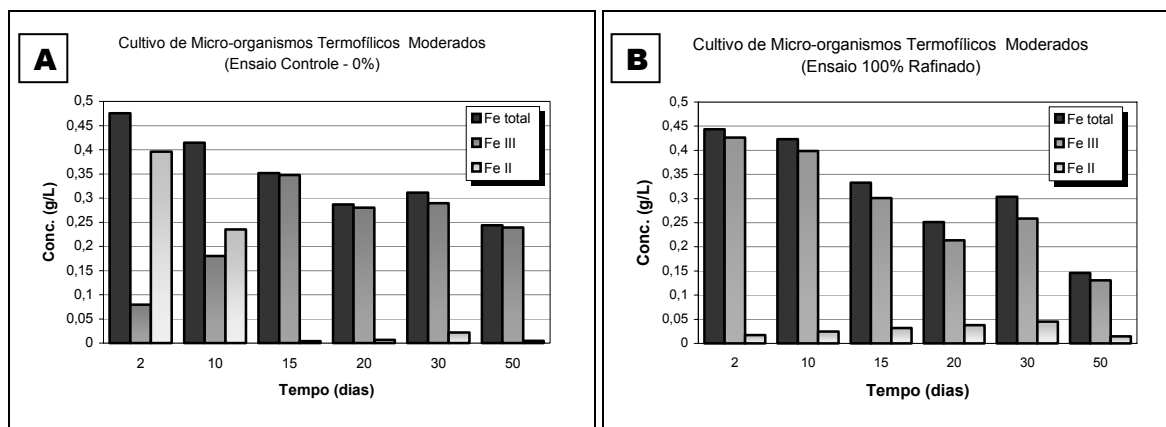


Figura 1 – Concentração das espécies iônicas de ferro (g/L) no ensaio controle [A] e no ensaio contendo 100% de refinado [B]

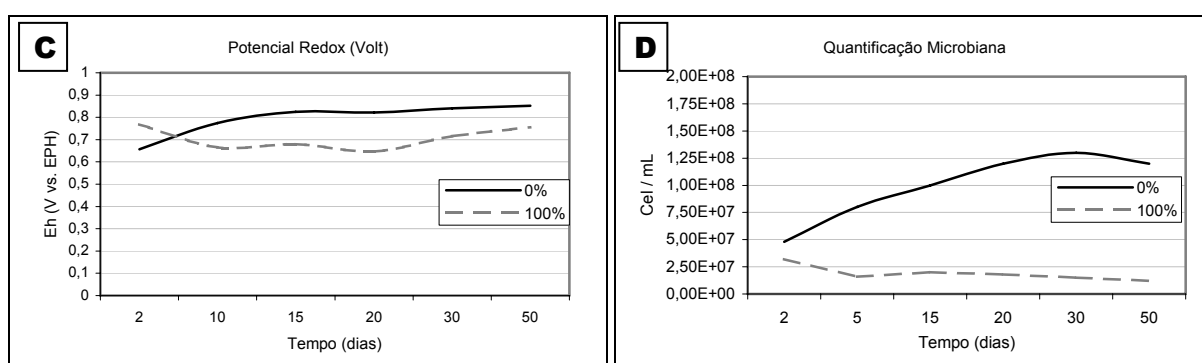


Figura 2 - Valores de potencial redox (V vs. EPH) [C] e quantificação microbiana (cel / mL) [D].

Adicionalmente, a Tabela 3 mostra a confirmação da elevada densidade de micro-organismos ao final dos ensaios supramencionados.

Tabela 3. Quantificação, em número de célula por mL (cel/mL), utilizando câmara de Thoma

Ensaio	0%	5%	10%	15%	20%	25%	50%	100%
Cel/mL	1,2x10 ⁸	6,2x10 ⁷	5,6x10 ⁷	4,7x10 ⁷	3,7x10 ⁷	2,5x10 ⁷	2,4x10 ⁷	1,2x10 ⁷

6. Conclusões

A partir dos resultados supracitados, concluiu-se que o refinado utilizado não se mostrou tóxico suficiente para interferir, substancialmente, no metabolismo microbiano, com densidade populacional sempre superior a 10⁷ cel / mL, ao final dos ensaios com o refinado utilizado. Em comparação com o ensaio controle (0% de refinado), no ensaio contendo 100 % de refinado, não foi observada diferença substancial nas concentrações das espécies iônicas de ferro e nos valores de potencial redox, que se manteve superior a 0,600 V vs. EPH, durante todo o ensaio. Portanto, observa-se que não houve contato do solvente orgânico com a camada de hidratação da enzima presente na membrana celular dos micro-organismos. Pelos aspectos apresentados, pode-se concluir que ainda não há um parâmetro que possa refletir as múltiplas interações entre enzima-solvente orgânico que permita prever, com sucesso, a atividade biocatalítica ótima em meio não aquoso.

7. Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Renata de Barros Lima e Luis Gonzaga Santos Sobral pelo apoio e incentivo; ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica/CNPq, pela bolsa concedida e a todos do CETEM

8. Referências Bibliográficas

BARROS, Maria R.A. **Biocatálise em Solvente orgânico: ensino em biotecnologia**. *Boletim da Sociedade portuguesa de Biotecnologia*. nº 72. p. 22 e 29, 2002.

BROCK, T. D. *The Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology*. **John Wiley & Sons**, New York, 1986.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. LIDEL – Edições Técnicas, Lisboa PT, p. 121-140, 2003.

FABER, K.; **Pure Appl. Chem.** 1997, 69, 1613.

GUINN, R. M.; SKERKER, P. S.; KAVANAUGH, P.; CLARK, D. S. **Biotechnol. Bioeng.**1991, 37, 303.

HALL, G.F.; BEST, D.J. and TURNER, A.P.F. **Anal. Chim. Acta**, 213 (1988) 113

HAN, C. J.. **Physiological Studies of Extremely Thermoacidophilic Microorganisms under Normal and Stressed Conditions**. Dissertação (Mestrado). Graduate Faculty of North Carolina State University, 1998.

KELLY, R. M., PEEPLES, T. L., HALIO, S. B., RINKER, K. R., DUFFAUD, G. D. Extremely thermophilic microorganisms: metabolic strategies, genetic characteristics and biotechnological potential. *An. New York Ac. Sci.* **745**: 409-425, 1994.

LIMA, Antonio W. O., ANGNES, L. **Biocatálise em meios aquo-restritos** Química Nova, Vol 22, 49-52, 1998.

OLSON, G. J.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Bioleaching review B: processing in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p.249 – 257, 2003.

POOL, R. 1990. Pushing the envelope of life. **Science**. 247: 158-160, 1996.

RAMOS, Caroline; VECCHIA, Roberto D.; RODRIGUES, Clóvis A. **Esterificação do ácido láurico catalisado por diferentes lipases frente a variação de temperatura, utilizando dois sistemas diferentes de proteção da enzima**. Livro de Resumos da 22. Reunião Anual da SBQ, QO-016. Poços de Caldas – MG, 1999.

SPENCE, J.R.; SODERSTROM, M.D. **Practical Aspects of Copper Solvent Extraction from Acidic Leach Liquors**. Edited by Gerald V. Jergensen II. Copper Leaching, Solvent Extraction, and Electrowinning Technology, Published by the Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc., 1999, p. 239-241