

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ESTATÍSTICA E
MODELAGEM QUANTITATIVA**

Raulim de Oliveira Galvão

**MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DA
ESFALERITA POR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EM
FRASCOS AGITADOS.**

Santa Maria, RS

2023

Raulim de Oliveira Galvão

**MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DA ESFALERITA
POR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EM FRASCOS AGITADOS.**

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Especialização em Estatística e Modelagem Quantitativa, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Especialista em Estatística e Modelagem Quantitativa.**

Dra. Ana Lúcia Souza Silva Mateus (Orientadora)

Santa Maria, RS

2023

Raulim de Oliveira Galvão

**MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DA ESFALERITA
POR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EM FRASCOS AGITADOS.**

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Especialização em Estatística e Modelagem Quantitativa, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Especialista em Estatística e Modelagem Quantitativa.**

Aprovado em 05 de abril de 2023:

Dra. Ana Lúcia Souza Silva Mateus
Orientadora (UFSM)

Dr. Augusto Maciel da Silva
Avaliador (UFSM)

Dr. Fernando de Jesus Moreira Junior
Avaliador (UFSM)

Santa Maria, RS

2023

RESUMO

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DA ESFALERITA POR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EM FRASCOS AGITADOS.

AUTOR: Raulim de Oliveira Galvão

ORIENTADORA: Dra. Ana Lucia Souza Silva Mateus

A demanda mundial por zinco, assim como de diversos outros metais como cobre e chumbo, apresenta elevadas tendências de aumento. No entanto, apenas uma pequena parcela destes metais advém da reciclagem, sendo ainda, a exploração mineral a sua principal fonte. Em face disso, adscrito às questões ambientais em adotar rotas de processamentos mais eficientes, o emprego da biolixiviação, torna-se uma técnica economicamente de baixo custo para a recuperação de metais em minérios de baixos teores, rejeitos ou mesmo concentrados. Dessa forma objetivou-se identificar e quantificar a interação entre parâmetros físico-químicos importantes – concentração de Fe^{+2} , porcentagem de sólidos, pH e percentual de inóculo – em um processo de biolixiviação de um concentrado de esfalerita, utilizando metodologia superfície resposta (MSR). Devido às limitações quanto a viabilidade de realização de quantidade excessiva de experimentos, como os que ocorrem nos planejamentos fatoriais completos, utilizou-se o delineamento composto central (CCD), com 8 pontos centrados na face e 4 pontos centrais, objetivando a otimização do processo de extração de zinco. Para obtenção de maiores extrações de zinco, a fixação da % de sólido, na faixa de 4–5,5%, não sofreu o efeito de variação da concentração de Fe^{+2} . De forma contrária, os valores para a extração de zinco em % de sólidos elevadas, se mostrou sensível às variações de pH. Por fim, ainda que a regressão curvilínea não tenha se mostrado significativa, a apresentação dos resultados com a Metodologia Superfície Resposta ajudou na visualização e melhor interpretação da extração de zinco dentro das condições experimentais estudadas.

Palavras-chave: Mineração, Planejamento de experimentos, Metodologia Superfície Resposta, Zinco.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação de um modelo geral de processo.	18
Figura 2: Comparação de três tipos de Planejamentos Compostos Centrais (CCD)	20
Figura 3: Relação entre os valores de extração de prata preditos e observados do planejamento composto central esférico. Quadrado médio do erro puro = 58,24.	28
Figura 4: Gráfico de probabilidade normal para os resíduos. Quadrado médio do erro puro =58,24.....	28
Figura 5: a), b), c), d), e) e f) superfícies de resposta e superfícies de contorno obtidas para a variável extração de zinco (%). a) Interação % sólido e concentração de Fe^{+2} b) interação pH e Concentração de Fe^{+2} c) interação % de inóculo e Concentração de Fe^{+2} d) Interação % sólido e pH e) interação % inóculo e pH e f) Interação % inóculo e % sólido.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limite de tolerância da <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> para determinados íons metálicos.....	16
Tabela 2: Estrutura de um Planejamento Composto Central CCF	21
Tabela 3: Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial CCD para a biolixiviação da esfalerita. O nível 0 corresponde ao ponto central do planejamento.....	23
Tabela 4: Resultados da extração de Zn (%) do planejamento fatorial completo CCF com quadruplicata no ponto central. Os valores em parênteses representam os níveis decodificados.....	24
Tabela 5: Tabela ANOVA para o modelo matemático quadrático obtido para o planejamento CCF com quadruplicata no ponto central.....	25
Tabela 6: Valores dos efeitos, coeficientes e parâmetros p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento composto central CCF com quadruplicata no ponto central. Os valores dos efeitos e coeficientes em negrito são os que se mostraram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$).....	25
Tabela 7: Valores observados e preditos para cada ensaio realizado no planejamento composto central CCF, e o respectivo resíduo	27

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	7
1.1 Objetivos do Estudos	9
1.1.1 Objetivo geral	9
1.2.2 Objetivos específicos	9
2- REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 BIOLIXIVIAÇÃO DE SULFETOS	10
2.2.1 Bactérias oxidantes de ferro e enxofre	11
2.2.2 Biolixiviação da esfalerita	13
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOLIXIVIAÇÃO	13
2.3.1 pH	13
2.3.2 Potencial de oxidação-redução (Eh).....	14
2.3.3 Temperatura.....	15
2.3.4 Disponibilidade de O ₂ e CO ₂	15
2.3.5 Concentração de íons metálicos e de nutrientes na lixívia	15
2.3.6 Composição do mineral e tamanho da partícula.....	17
2.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	17
2.5.1 Planejamento composto central (CCD)	19
3- EXPERIMENTAL	21
3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MINÉRIO	21
3.2 MICROORGANISMOS	22
3.3 ENSAIOS DE BIOLIXIVIAÇÃO.....	22
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA METODOLOGIA SUPERFÍCIE RESPOSTA (RSM)	22
4 RESULTADOS	23
6- CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

1- INTRODUÇÃO

Determinar a influência de uma ou mais variáveis independentes sobre uma variável resposta em um processo biotecnológico, especialmente na biolixiviação de minérios, é um pré-requisito para o êxito na avaliação e compreensão dos diversos fenômenos que ocorrem. Isto é ainda mais importante quando a realização destes processos envolve fenômenos químicos e físicos. Um exemplo de tal processo é a biolixiviação do mineral de zinco, esfalerita.

A obtenção comercial do metal zinco advém do emprego de técnicas pirometalúrgica e hidrometalúrgica de concentrados de minerais sulfetados. Esta forma de obtenção é amplamente discutida pois, em um contexto de exaurimento das reservas de teores mais elevados e iminentes demandas de emprego de tecnologias ambientalmente mais sustentáveis, torna ser desafiador a continuidade do emprego deste tipo de rota industrial. Por outro lado, um processo alternativo já amplamente aplicado na indústria do cobre e no processamento de minérios de urânio e de ouro refratário é a biolixiviação (GARCIA JR.; URENHA, 2001). A biolixiviação é o ramo da hidrometalurgia que utiliza microrganismos, como as bactérias, para catalisar a oxidação de minérios sulfetados, resultando na sua dissolução (OLLAKKA; RUUSKA; TASKILA, 2016). Este processo bioquímico, que naturalmente ocorre em ambientes de minerações de sulfetos e em regiões carboníferas, pode ser utilizado para a recuperação de metais a partir de minérios, concentrados ou rejeitos, assim como de materiais reciclados, sendo vista como uma alternativa promissora, ambientalmente amigável e economicamente aceitável para o processamento metalúrgico de minérios metálicos de baixos teores (CONIĆ *et al.*, 2014; KAKSONEN *et al.*, 2018).

Diversas são as variáveis que afetam o processo de biolixiviação. Garcia Jr. e Urenha (2001) citam o pH (potencial hidrogeniônico), Eh (potencial eletroquímico), temperatura, concentração de nutrientes, a própria composição do minério e o seu tamanho de partícula, além das interações galvânicas e estrutura química e cristalina entre as fases minerais presentes, entre outras. Mais adiante, Ghorbani et al., (2011) categorizou estas diversas variáveis em parâmetros, físicos, químicos, biológicos, mineralógicos e operacionais de processo.

Os estudos da avaliação e aplicação da biolixiviação em escala industrial partem, inicialmente, de testes em escala de bancada. Nesta fase preliminar, os ensaios objetivam estudar a condição ótima para o desenvolvimento bacteriano e as suas condições gerais são

comumente relatadas em função de um menor número de variáveis. Estes ensaios são normalmente realizados em frascos agitados (Erlenmeyer), considerados simples, econômicos e rápidos para se avaliar o potencial de aplicação da biolixiviação na dissolução de um minério (GARCIA JR.; URENHA, 2001).

No entanto, ainda que estes ensaios permitam a compreensão do processo de biolixiviação em função de um número menor e delimitado de variáveis, muitas destas apresentarão alto grau de inter-relacionamento. À vista disso, Montgomery (2020) apresenta o planejamento fatorial de experimentos (DOE-Design of experiments), como uma metodologia capaz de dar uma resposta a essa questão. Existem planejamentos fatoriais completos e fracionários; o primeiro fornece as informações mais completas sobre a interação entre parâmetros, mas o número de experimentos torna-se excessivos quando o número de fatores ou seus níveis se torna relativamente grande. Além disso, as interações de ordem superior geralmente são estatisticamente insignificantes e, conseqüentemente, as informações sobre elas não são muito úteis.

No que diz respeito as limitações quanto a inviabilidade de realização de quantidade excessiva de experimentos com os planejamentos fatoriais completos, Montgomery (2020) aponta alternativamente a utilização de técnicas como o delineamento composto central (CCD). Planejamentos fatoriais como o CCD são capazes de considerar simultaneamente vários fatores em diferentes níveis e fornecer uma análise adequada para a interação entre os vários fatores com um menor número de experimentos (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Neste sentido a aplicação dessas ferramentas de análises na biolixiviação de minérios de zinco permite uma abordagem sistemática para avaliar e otimizar as variáveis do processo. Ao investigar a interação entre diferentes parâmetros físico-químicos, é possível identificar condições ideais para maximizar a eficiência de extração de metais e minimizar a utilização de recursos. Essa abordagem contribui para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e economicamente viáveis, permitindo o avanço na utilização da biolixiviação como uma alternativa promissora na indústria mínero-metalúrgica.

1.1 OBJETIVOS DO ESTUDOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi identificar e quantificar a interação entre parâmetros físico-químicos importantes (concentração de Fe^{+2} , porcentagem de sólidos, pH e percentual de inóculo) em um processo de biolixiviação de um concentrado de esfalerita, utilizando metodologia superfície resposta (MSR).

1.2.2 Objetivos específicos

Identificar quais fatores têm um efeito significativo sobre a variável resposta de interesse (extração de zinco) no processo de biolixiviação;

Determinar os melhores níveis de cada fator para maximizar a extração de zinco e otimizar o processo de biolixiviação.

Avaliar os efeitos curvilíneos e de interação dos fatores - concentração de Fe^{+2} , porcentagem de sólidos, pH e percentual de inóculo – na extração de zinco em um processo de biolixiviação.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLIXIVIAÇÃO DE SULFETOS

A biolixiviação é uma técnica já praticada há muitos séculos, mesmo quando não se conhecia os mecanismos bioquímicos de atuação das bactérias, a produção natural da lixívia já era atribuída a qualidade intrínseca de alguns minérios ou a condições geomorfológicas especiais (GARCIA JR.; URENHA, 2001). Uma das características marcantes, só elucidadas a partir dos anos 1950, é que estes microrganismos, classificados como autotróficos, quimiotróficos e acidófilos conseguem ter o seu desenvolvimento celular a partir da oxidação e dissolução de componentes na amostra mineral, como íons de enxofre e ferro.

Uma bactéria comum na dissolução de minerais sulfetados é a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, formalmente conhecida como *Thiobacillus ferrooxidans* (FREE, 2013). A dissolução dos sulfetos a partir da ação destas bactérias podem ocorrer por ação direta ou indireta com a utilização do elétron da resultante da oxidação no seu metabolismo bioquímico, gerando como produto um sulfato metálico, conforme a reação geral de oxidação da Equação. 1 (FREE, 2013; GARCIA JR.; URENHA, 2001).



O modelo aceito da atuação destas bactérias sob o substrato mineral é a solubilização seletiva por adesão preferencial em falhas e em desuniformidades da estrutura cristalina (GARCIA JR.; URENHA, 2001). Outra característica importante destes processos biotecnológicos é que a solubilização mineral pode se dar por dois mecanismos: indireto ou direto. No mecanismo indireto o microrganismo não atua como um agente oxidante na superfície do mineral e sim, sob a atividade eletroquímica de íons Fe^{+3} , produto da atividade bacteriana, que são reduzidos na superfície em Fe^{+2} . Ciclicamente as bactérias atuam na oxidação e retorno do Fe^{+2} em Fe^{+3} tendo o oxigênio como o acceptor final destes dentro da porção do citoplasma. No mecanismo direto a ação da bactéria ocorre diretamente na superfície mineral sem a precipitação biológica de um sulfato férrico (RIVADENEIRA, 2011).

Sucintamente, quatro fases podem ser entendidas neste processo: (1) adesão da bactéria aos minerais com posterior processo de colonização (SAND et al., 1995, apud

RIVADENEIRA, 2011, p. 17); (2) destruição da estrutura cristalina; (3) captação e transporte dos íons até a célula; (4) oxidação dos íons e liberação no ambiente dos produtos da oxidação.

2.2.1 Bactérias oxidantes de ferro e enxofre

A maioria dos estudos que se propuseram na identificação dos microrganismos responsáveis pela oxidação de minerais sulfetados foram voltadas às questões ambientais nos processos de formação de drenagens ácidas de minas (DAM) (OLIVEIRA, 2014). A DAM é um fenômeno de ocorrência natural que ocorre após remobilização e exposição de minerais sulfetados à água e oxigênio, tendo a sua catalização acelerada em milhares de vezes por intermédio da atuação das bactérias.

Muitas são as bactérias responsáveis pela formação da DAM. No quadro 1 é possível a identificação de uma lista de bactérias caracterizadas e encontradas em minas de Storz e King's (Noruega), Ynysarwed e Parys (País de Gales), Wheal Jane (Inglaterra), Rio Tinto (Espanha) e Iron Mountain (Califórnia) (JOHNSON & HALLBERG, 2003, apud OLIVEIRA, 2014, p. 21).

Quadro 1: Microrganismos encontrados em ambientes ácidos de minas, com classificação quanto à temperatura de crescimento.

(Continua)

Microorganismo	Classificação quanto à temperatura de crescimento
1. Oxidantes de ferro	
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Mesófila
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Mesófila
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Moderadamente termofila
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Mesófila
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Mesófila
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Mesófila
2. Oxidantes de enxofre	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Mesófila
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Moderadamente termofila
<i>Thiomonas cuprina</i>	Mesófila
<i>Hydrogenobacter acidophilus</i>	Moderadamente termofila
<i>Metallosphaera spp.</i>	Termofila extrema
<i>Sulfolobus spp</i>	Termofila extrema
3. Oxidantes de ferro e enxofre	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Mesófila

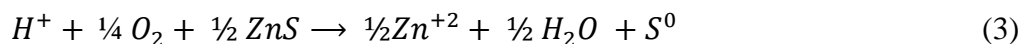
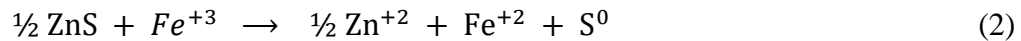
<i>Acidianus spp.</i>	Termofila extrema
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Termofila extrema
4. Redutores de ferro	
<i>Acidiphilium spp.</i>	Mesófila
5. Oxidantes e redutores de ferro	
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mesófila
6. Oxidantes e redutores de ferro e oxidantes de enxofre	
<i>Sulfobacillus spp.</i>	Mesófila e moderadamente termofila
7. Acidófilo heterotrófico	
<i>Acidocella spp.</i>	Mesófila
<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	Mesófila
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Mesófila
<i>Acidomonas methanolica</i>	Mesófila
<i>Alicyclobacillus spp.</i>	Mesófila
<i>Picrophilus spp.</i>	Moderadamente termofila
<i>Thermoplasma spp.</i>	Moderadamente termofila
8. Anaeróbica obrigatória	
<i>Stygiolobus azoricus</i>	Termofila extrema
<i>Acidilobus aceticus</i>	Termofila extrema

Fonte: Adaptada de Johnson & Hallberg (2003) *apud* Oliveira, L.E. L, (2014).

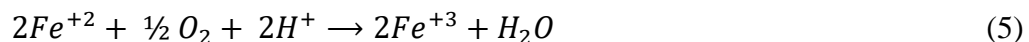
Apesar dessa variabilidade, a *Acidithiobacillus ferrooxidans* é a principal espécie envolvida no processo de dissolução oxidativa e, em função dessa potencialidade e da grande quantidade de trabalhos já publicados torna-se importante apresentar as características gerais desta bactéria. Inicialmente, cabe destacar que a *T. ferrooxidans* é não patogênica, com morfologia que se assemelha a bastonetes de dimensões que variam de 0,5 a 0,8 micrômetros de largura por 0,9 a 1,5 micrômetro de comprimento; reproduzindo-se por divisão binária e movimentação por meio da presença de um flagelo polar e cílios (“pili”). Adicionalmente, possuem a temperatura em 30°C e pH 2, ótimos para o seu desenvolvimento, e como fonte de nutrientes, a espécie necessita basicamente dos substratos inorgânicos, Fe⁺² ou formas reduzidas de enxofre, de nitrogênio, fósforo e magnésio. Por fim, outra notável característica fisiológica é a alta resistência às altas concentrações de metais: 0,37 mol/L de Al, 0,15 mol/L de Zn, 0,17 mol/L de Co, 0,18 mol/L de Mn, 0,16 mol/L de Cu, 0,1 mol/L de Cr (GARCIA JR.; URENHA, 2001).

2.2.2 Biolixiviação da esfalerita

Em relação aos mecanismos que atuam na biolixiviação da esfalerita, é proposto que a sua biodissolução ocorra por mecanismo de contato indireto, sendo as principais reações químicas destacadas por Haghshenas et al., (2009) nas Equações 2 e 3.



Os produtos gerados dessa oxidação mineral são biologicamente reoxidados a sulfatos e Fe^{+3} , promovendo o retorno ao ciclo oxidativo mineral (GIAVENO; URBIETA; DONATI, 2010).



Em síntese, a dissolução do mineral esfalerita ocorre devido ao ataque oxidativo dos íons Fe^{3+} (Equação 2), gerando como produto Zn^{2+} , S^0 e Fe^{2+} . A continuidade do processo é mediada e acelerada pela *Ac. Ferrooxidans*. Esta, por sua vez, atua na reoxidação dos íons Fe^{2+} (Equação 5) utilizando como fonte energética a troca de elétrons da oxidação do (S^0) na reação com o elemento oxidante (O_2) (Equação 4).

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOLIXIVIAÇÃO

Os principais fatores que interferem no processo de biolixiviação são: pH, potencial de oxidoredução (Eh), temperatura; disponibilidade de O_2 e CO_2 ; concentração de íons metálicos e de nutrientes na lixívia e a composição do mineral, assim como a granulometria das partículas (GARCIA JR.; URENHA, 2001).

2.3.1 pH

A bioxidação mineral é um processo intrinsecamente dependente da atividade e desenvolvimento da população bacteriana na superfície dos minerais sulfetados. O sucesso do processo exige que o pH ótimo esteja no valor entre 1,1 e 1,5 com a descrição de alguns reatores

comerciais operando no limite de 1,8. O valor elevado de pH diminui a extensão de oxidação da superfície devido ao efeito *coating* pela precipitação de sais metálicos. Garcia Jr e Urenha (2001) afirma que os íons férricos poderão precipitar-se na forma de hidróxidos ou óxidos tais como, Fe_2O_3 , $Fe(OH)SO_4$, $H\{Fe(SO_4)_2 \cdot 2Fe(OH)_3\}$, $Fe(OH)_3$ ou ainda, quando o teor de sulfato for elevado, na forma da jarosita, cuja fórmula aproximada é $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, onde M pode ser K^+ , NH_4^+ ou H^+ . Somados a estes efeitos a elevação do pH acima de 2, há o risco de eliminação das bactérias o que pode resultar na morte de toda a cultura bacteriana (ASWEGEN; NIEKERK; OLIVIER, 2006).

2.3.2 Potencial de oxidoredução (Eh)

O potencial de oxidoredução é um indicativo do crescimento da atividade microbiológica, assim como a sua adaptação sobre a oxidação da matéria sulfetada (HU *et al.*, 2017). A ação da bactéria *T. Ferrooxidans* sobre o sulfeto pode ser quantificada através da equação de Nernst (Equação 6) pela reação mais comum que é a conversão do Fe^{+2} (reduzida) para Fe^{+3} (oxidada) (GARCIA JR.; URENHA, 2001).

$$Eh = E^0 + \frac{2,3 * R * T}{n * F} * \log \left(\frac{[Fe^{+2}]}{[Fe^{+3}]} \right) \quad (6)$$

Onde: Eh = Potencial de oxidoredução da lixívia (V); E^0 =Potencial de oxidoredução padrão (V); R = Constante dos gases perfeitos [J/(mol.K)]; T = Temperatura (K); n = número de moles de elétrons trocados na reação; F =Constante de Faraday [J/(mol.V)] e $[]$ = concentrações molares das espécies iônicas.

Estudos desenvolvidos por Pina *et al.*, (2005) objetivando compreender os efeitos dos íons ferrosos e férrico na biolixiviação de concentrado esfalerita obteve decréscimo do potencial eletroquímico no início dos ensaios com elevação subsequente após alguns dias até estacionar no valor de 500-530 mV após 150 horas. O estudo concluiu que o potencial elétrico variou em função da razão dos íons Fe^{+3}/Fe^{+2} , sendo que houve decaimento nos primeiros dias, decorrente das taxas lentas de oxidação do íon ferroso. Constatou-se que além da baixa atividade microbiológica nestas primeiras horas, as bactérias demandam certo tempo para se adaptarem na superfície dos sulfetos.

Neste ponto cabe destacar a abordagem de Garcia Jr. e Urenha (2001) acerca do potencial de equilíbrio entre 700 mV e 760 mV para o potencial crescimento do *T Ferrooxidans* em meio que contém Fe^{+2} como fonte de energia e pH menor que 2,5. A manutenção do Eh em torno de 750 mV contribui para gerar o ambiente oxidante necessário para aumentar a eficiência do processo.

2.3.3 Temperatura

A oxidação dos sulfetos é caracterizada por serem reações exotérmicas (GARCIA JR.; URENHA, 2001) e para a continuidade destas é necessário resfriamento constante nos reatores para o controle da temperatura. Neste ponto cabe destacar a classificação dos microrganismos quanto a temperatura ótima para o desenvolvimento das culturas. No entanto muitos reatores, como os desenvolvidos pela BIOXTM, operam na faixa de temperaturas de 30-45°C com curtos períodos que atingem temperaturas acima de 50°C, adaptados para culturas mistas de bactérias mesofílicas (ASWEGEN; NIEKERK; OLIVIER, 2006). Apesar dos microrganismos suportarem em curtos períodos temperatura mais elevada há uma faixa ótima que fica entre 35°/45°C para espécies *Thiobacillus/Leptospirillum* e de 45°/55°C para as bactérias moderadamente termofílicas (BRIERLEY, 1997).

2.3.4 Disponibilidade de O₂ e CO₂

O suprimento de oxigênio representa os maiores custos de capital e de operação em uma planta de biooxidação. O oxigênio é fundamental nas reações químicas de oxidação dos sulfetos e no metabolismo das bactérias como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória. (GARCIA JR.; URENHA, 2001). Dependendo da mineralogia valores típicos variam entre 1,8 e 2,6 kg de oxigênio por kg de sulfeto oxidado (ASWEGEN; NIEKERK; OLIVIER, 2006). O gás carbônico é a fonte de carbono para o crescimento celular das bactérias e a injeção de ambos os gases deve ser cuidadosamente controlada (ASWEGEN; NIEKERK; OLIVIER, 2006).

2.3.5 Concentração de íons metálicos e de nutrientes na lixívia

A concentração dos nutrientes presentes na lixívia é essencial para o desenvolvimento celular das bactérias. Estes são classificados em macronutrientes (nitrogênio, cálcio, magnésio, sódio, potássio, fósforo, enxofre e cloro) e em micronutrientes (ferro, iodo, cobre, zinco,

cobalto, molibdênio, selênio, vanádio, níquel, cromo, estanho, flúor, silício e arsênio) (GARCIA JR.; URENHA, 2001). Em geral, pela própria condição ácida da lixívia e da concentração de íons férricos boa parte dos micros e dos macronutrientes tornam-se solúveis e disponíveis para o desenvolvimento dos microrganismos. No entanto, cabe ressaltar que a depender das espécies presente a concentração de alguns destes metais pode ser tóxico para a espécie.

Um das características das bactérias da linhagem *Acidithiobacillus ferrooxidans* é a alta resistência a estes metais. Alguns trabalhos reportam adaptações a ambientes nas concentrações de Co^{+2} (30 g/L); Cu^{+2} (55 g/L), Ni^{+2} (72 g/L); Zn^{+2} (120 g/L); $\text{U}_3\text{O}_8^{+2}$ (12 g/L) e Fe^{+2} (160 g/L) (RAWLINGS, 1997). No entanto, sensibilidades maiores foram indicadas para os cátions Hg^{+2} , Ag^+ , As^{+3} e Mo^{+6} , assim como para os ânions Cl^- , Br^- e NO_3^- . Alguns destes limites são apresentados na Tabela 1 (FREE, 2013).

Tabela 1: Limite de tolerância da *Acidithiobacillus ferrooxidans* para determinados íons metálicos

Metal	Limite de tolerância (mg/L)
As	>20.000
Sb	80-300
Fe	> 50.000
Zn	3000-80000
Cu	>100
Pb	20
Se	80
Ca	>200
Mg	>200

Fonte: (FREE, 2013).

A adaptação destas bactérias a estes meios tóxicos pode ser alcançada por exposição contínua e sequencial aos meios com concentração elevada ou por bioengenharia genética na formulação de novas cepas. Por exemplo, no processo para tratamento de ouro refratário da BIOX a adaptação por exposição contínua, bactérias resistentes se desenvolveram em meios com concentrações de arsênio maiores que 13 g/L e mais recentemente, genes resistentes ao

arsênio da bactéria *T. Calvus* foram identificados e manipulados por bioengenharia genética na bactéria *T. Ferrooxidans* ATCC 33020 (RAWLINGS, 1997).

2.3.6 Composição do mineral e tamanho da partícula

A composição mineralógica está associada a presença de minerais que facilmente são consumidores de ácidos (carbonatos, fosfatos, óxidos metálicos e argilas) que trarão dificuldades no controle e estabilização do pH ou quando da sua dissolução tornar o meio tóxico ao desenvolvimento das bactérias. Na variável tamanho de partícula e morfologia, as dificuldades têm sido reportadas nos efeitos de permeabilidade da lixívia e fluidização do meio, pois o processo de biolixiviação demanda contato íntimo entre o mineral e a lixívia (GARCIA JR.; URENHA, 2001).

2.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Dentre os objetivos da realização de experimentos, está a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável resposta. Para tal, o experimentador trabalha com a realização de diversos ensaios na qual mudanças em uma ou mais variáveis (fatores) são realizadas para observar os seus efeitos em uma ou mais variáveis de resposta. A partir de um desenho (estatístico) de experimentos (DOE) se obtém dados que subsidiam conclusões válidas e objetivas. Inicialmente, o DOE começa com a determinação das respostas de interesse do experimento e a seleção dos fatores para o estudo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O planejamento de experimentos pode ser compreendido a partir da apresentação de um sistema com vários fatores de entrada discretos ou contínuos que podem ser controlados - que é variado à vontade pelo experimentador - e uma ou mais respostas de saída medidas, conforme apresentado na Figura 1 (ANTONY, 2003). Para este modelo, $X_1; X_2; \dots; X_n$, representam as variáveis de entrada controláveis como uma combinação de máquinas, métodos, pessoas e outros recursos que transformam entrada (geralmente materiais) em saída, que tem uma ou mais variáveis respostas. As variáveis de entrada não controláveis $Z_1; Z_2; \dots; Z_n$, são características experimentais não controladas, seja por desconhecimento da existência delas ou pelo alto custo para controlá-las, tais variáveis constituem o erro experimental.

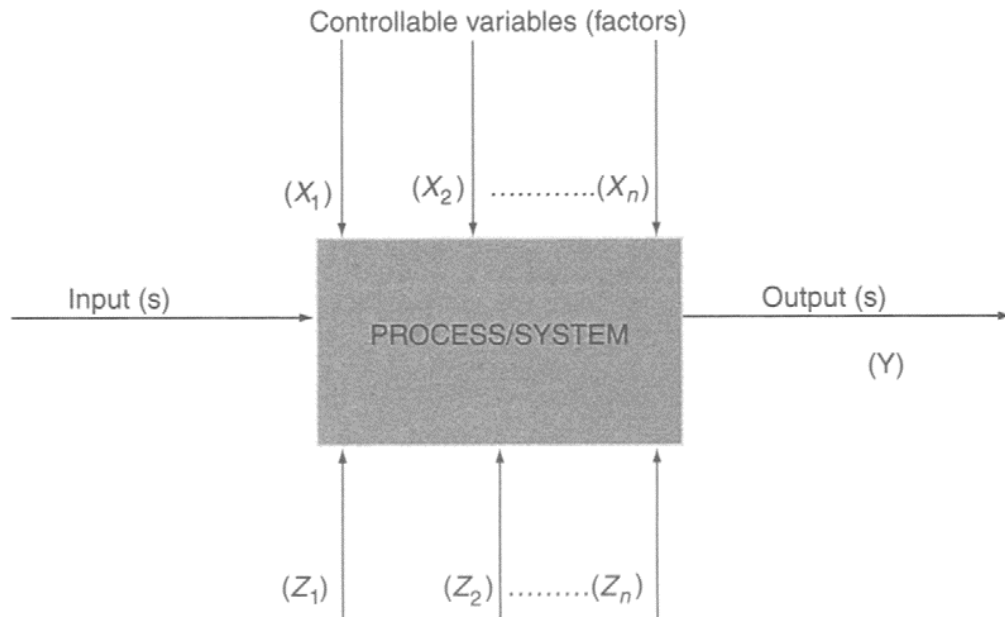


Figura 1: Representação de um modelo geral de processo.

Fonte: ANTONY, (2003)

A relação matemática entre a variável resposta e as variáveis independentes pode inicialmente ser pensada a partir dos modelos empíricos lineares ou quadráticos. Esses modelos comumente se ajustam aos dados experimentais. Um modelo linear com dois fatores, X_1 e X_2 , pode ser escrito como (CALADO; MONTGOMERY, 2003):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \text{erro experimental} \quad (7)$$

Onde: Y é a resposta para determinados níveis dos principais efeitos X_1 e X_2 e o termo $X_1 X_2$ é adicionado para explicar um possível efeito da interação entre X_1 e X_2 . A constante β_0 é a resposta de Y quando ambos os efeitos principais são 0. Adicionalmente, para um modelo linear com três fatores X_1 ; X_2 e X_3 e uma resposta, Y , a equação pode ser descrita de maneira semelhante (se todos os termos possíveis fossem inclusos no modelo).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \text{erro experimental} \quad (8)$$

Onde: Os três termos com um único "X" são os efeitos principais, com $k(k-1)/2 = 3*2/2 = 3$ termos de interação bidirecional e 1 termo de interação tridirecional. Neste sentido, quando se analisa os dados experimentais, dentro do escopo de um DOE, todos os coeficientes

desconhecidos " β " são estimados e testados para ver quais são significativamente diferentes de 0.

Por fim, quando um modelo linear não conduzir em interpretações condizentes, ou seja, havendo curvatura no sistema, deve-se partir para um modelo de segunda ordem (quadrático), foco usado no DOE deste trabalho, cuja expressão geral para duas variáveis, é:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \text{erro experimental} \quad (9)$$

2.5.1 Planejamento composto central (CCD)

O planejamento composto central (CCD, do inglês *Central Composite Design*) é uma técnica estatística utilizada em experimentos para avaliar o efeito de variáveis independentes (fatores) sobre uma variável dependente (resposta). O CCD é uma extensão do planejamento fatorial 2^k , que inclui pontos adicionais em locais específicos ao redor do centro do espaço de planejamento. A principal vantagem do CCD é que ele permite avaliar efeitos curvilíneos e de interação com um número relativamente pequeno de experimentos. Além disso, ele é capaz de avaliar múltiplos fatores ao mesmo tempo, o que pode economizar tempo e recursos em comparação com experimentos que avaliam cada fator isoladamente. No geral, este tipo de planejamento é montado com a seguinte configuração: (i) uma parte referente ao planejamento fatorial 2^k com n_f corridas; (ii) $2k$ corridas axiais ou estrela e (iii) n_c corridas centrais (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Este tipo de planejamento foi introduzido durante a década de 1950, também chamados de planejamentos Box-Wilson, consistem em um planejamento fatorial completo ou fracionário com pontos centrais com adição de pontos “estrelas” que permitem estimar a curvatura. Os pontos “estrelas” se distanciam do centro do planejamento fatorial em diversas formas, a depender de certas propriedades desejadas para o projeto e de o número de fatores envolvidos. Se esta distância é ± 1 unidade para cada fator, a distância do centro do espaço de projeto a um o ponto da estrela é $|\alpha| > 1$ (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Em termos do delineamento de planejamentos compostos centrais, há uma variedade de desenhos, da qual sua designação depende da localização dos pontos estrelas. A Figura 2 ilustra os três tipos de Planejamentos Compostos Centrais para dois fatores. Nota-se que no desenho

CCC (*Central Composite Circumscribed*) há uma exploração maior do espaço de processo enquanto o oposto ocorre para o CCI (*Central Composite Inscribed*). Tanto o CCC quanto o CCI são projetos rotativos, mas o CCF (*Central Composite Face*) não é. No experimento CCC, os pontos de projeto descrevem um círculo circunscrito em torno do quadrado fatorial. Para três fatores, os pontos de projeto CCC descrevem uma esfera em torno do fatorial cubo (NIST/SEMATECH, 2012).

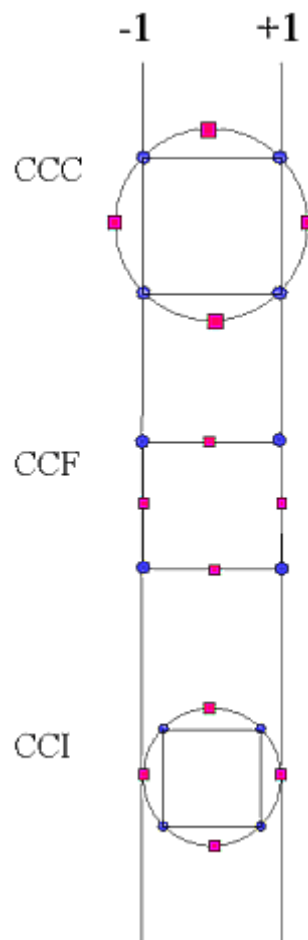


Figura 2: Comparação de três tipos de Planejamentos Compostos Centrais (CCD)

Fonte: NIST/SEMATECH (2012)

A Tabela 2 ilustra uma estrutura de planejamento Composto Central com pontos na face centrada CCF, comum para um desenho quadrático de um planejamento com 4 fatores. Note-se que os pontos axiais estão na face e são representados por um * e a sigla PC significa ponto Central.

Tabela 2: Estrutura de um Planejamento Composto Central CCF

Número do experimento	Fatores			
	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17*	-1	0	0	0
18*	+1	0	0	0
19*	0	-1	0	0
20*	0	+1	0	0
21*	0	0	-1	0
22*	0	0	+1	0
23*	0	0	0	-1
24*	0	0	0	+1
25 (PC)	0	0	0	0
26 (PC)	0	0	0	0
27 (PC)	0	0	0	0
28 (PC)	0	0	0	0

* Pontos na face e PC ponto Central.

Fonte: NIST/SEMATECH (2012)

3- EXPERIMENTAL

3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MINÉRIO

O concentrado mineral foi obtido de uma mina de sulfeto de zinco brasileira. Após homogeneização e quarteamento, uma amostra 100% passante em 45 micrômetros foi obtida para os ensaios. A análise de Difração de Raios X (DRX) mostrou que o concentrado era composto principalmente de esfalerita com principais elementos presentes Zn (41,51%), S (31,02%) e Fe (12,12%) (PINA *et al.*, 2005b).

3.2 MICROORGANISMOS

A caracterização e condições da preparação dos microrganismos utilizados no estudo foram reportados em trabalhos anteriores e consistirão em bactérias do gênero *A. ferrooxidans*, isolados da Mina Morro Agudo (zinco Votorantim) (DAMAN *et al.*, 2002). Essas bactérias foram cultivadas aerobiamente em um meio seletivo por mais de 4 anos na presença de Fe (II) e de sulfeto de Zn (ZnS), a 307 K (34°C), cujo meio apresentava a seguinte composição: (NH₄)₂SO₄: 0.2 g/L; MgSO₄ · 7H₂O: 0.4 g/L e K₂HPO₄: 0.1 g/L e água destilada, em pH 1.8–2.0 Ferro (II) (FeSO₄ · 7H₂O) (DE SOUZA; PINA; LEÃO, 2007).

3.3 ENSAIOS DE BIOLIXIVIAÇÃO

Todos os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de solução. Os experimentos foram conduzidos com controle de agitação em 180 rpm e temperatura fixa em 32°C. O pH do meio foi monitorado e regulado diariamente com ácido sulfúrico concentrado (98%) ou de NaOH 2,5M (equipamento Hanna HI931400). O potencial de oxidação foi constantemente mensurado com o Equipamento Digimed DM20. Durante os experimentos, água destilada foi adicionada periodicamente aos frascos para compensar a perda de evaporação. Por fim, os teores de zinco e ferro nos licores foram analisados por Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA METODOLOGIA SUPERFÍCIE RESPOSTA (RSM)

Um planejamento fatorial com delineamento composto central (CCD) foi adotado para o estudo do efeito das variáveis independentes (i) concentração de Fe⁺², (ii) % de sólido, (iii) pH e (iv) % Inóculo. O estudo consistiu em 28 ensaios, sendo 16 fatoriais completos, 8 centrados na face e 4 pontos centrais. As variáveis independentes e os níveis estudados neste planejamento estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial CCD para a biolixiviação da esfalerita. O nível 0 corresponde ao ponto central do planejamento.

	Variáveis	Níveis		
		-1	0	+1
Var 1	Fe ⁺² g.L ⁻¹	2,5	5	7
Var 2	% sólido	1,0	3,0	5,0
Var 3	pH	1,5	1,75	2,0
Var 4	% inóculo	10	15	20

Adicionalmente, um modelo de regressão polinomial quadrática (Equação 10) foi escolhido para prever a variável resposta em termos das quatro variáveis independentes.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j \quad (10)$$

Onde Y é a variável resposta (ou seja, concentração de Zn em g L⁻¹ ao final de 14 dias de biolixiviação), b_0 , b_i , b_{ii} e b_{ij} são os termos coeficientes dos intercepto, linear, quadrático e de interação, respectivamente, e X_i ; ... ; X_j representam as quatro variáveis independentes (ou seja, concentração de Fe⁺², % sólido, pH e % inóculo). Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para compreensão da significância estatística dos coeficientes preditores dos modelos quadráticos completos. A significância e a magnitude das estimativas de efeitos para cada variável e todas as suas possíveis interações lineares e quadráticas também foram determinadas. O nível de significância empregado foi de 5%.

Por fim, a partir do emprego deste tipo de planejamento será possível prever as condições ótimas do emprego dos fatores que resultam em taxas de dissolução de Zn máximas. Toda a análise foi realizada utilizando o *software Statistica 10*.

4 RESULTADOS

A Tabela 4 lista os valores da taxa de extração de Zn após 55 dias de biolixiviação em cada uma das 28 combinações de níveis fatoriais. Os valores variaram de 19,16 a 54,71 g L⁻¹. As maiores taxas de extração foram de 54,71%; 49,33%; 48,76% para os ensaios 7, 14 e 16, respectivamente. Observou-se que as maiores taxas de extração foram obtidas quando se empregou o nível +1 (pH =2). Desta maneira, é de se esperar que a variável resposta apresente uma dependência mais elevada em relação ao pH que às demais independentes. Os pontos

centrais da otimização, ensaios 25, 26, 27 e 28, não apresentaram valores de extração de zinco próximos (23,48%, 36,57%, 40,15% e 28,14%, respectivamente), dando evidências de má repetibilidade do sistema.

Tabela 4: Resultados da extração de Zn (%) do planejamento fatorial completo CCF com quadruplicata no ponto central. Os valores em parênteses representam os níveis decodificados

Número do experimento	Fatores				Taxa de extração de Zn (g.L ⁻¹)
	Fe (II) g.L ⁻¹	% Sólido	pH	% Inóculo	
1	-1(2,5)	-1(1,0)	-1(1,5)	-1(10)	19,16
2	+1(7,5)	-1(1,0)	-1(1,5)	-1(10)	35,23
3	-1(2,5)	+1(5,0)	-1(1,5)	-1(10)	29,82
4	+1(7,5)	+1(5,0)	-1(1,5)	-1(10)	21,75
5	-1(2,5)	-1(1,0)	+1(2,0)	-1(10)	46,47
6	+1(7,5)	-1(1,0)	+1(2,0)	-1(10)	41,89
7	-1(2,5)	+1(5,0)	+1(2,0)	-1(10)	54,71
8	+1(7,5)	+1(5,0)	+1(2,0)	-1(10)	41,70
9	-1(2,5)	-1(1,0)	-1(1,5)	+1(20)	28,40
10	+1(7,5)	-1(1,0)	-1(1,5)	+1(20)	30,06
11	-1(2,5)	+1(5,0)	-1(1,5)	+1(20)	25,97
12	+1(7,5)	+1(5,0)	-1(1,5)	+1(20)	29,94
13	-1(2,5)	-1(1,0)	+1(2,0)	+1(20)	30,73
14	+1(7,5)	-1(1,0)	+1(2,0)	+1(20)	49,33
15	-1(2,5)	+1(5,0)	+1(2,0)	+1(20)	39,91
16	+1(7,5)	+1(5,0)	+1(2,0)	+1(20)	48,76
17	-1(2,5)	0(3,0)	0(1,75)	0(15)	23,83
18	+1(7,5)	0(3,0)	0(1,75)	0(15)	42,19
19	0(5,0)	-1(1,0)	0(1,75)	0(15)	46,06
20	0(5,0)	+1(5,0)	0(1,75)	0(15)	25,93
21	0(5,0)	0(3,0)	-1(1,5)	0(15)	23,21
22	0(5,0)	0(3,0)	+1(2,0)	0(15)	43,95
23	0(5,0)	0(3,0)	0(1,75)	-1(10)	38,86
24	0(5,0)	0(3,0)	0(1,75)	+1(20)	35,23
25	0(5,0)	0(3,0)	0(1,75)	0(15)	23,48
26	0(5,0)	0(3,0)	0(1,75)	0(15)	36,57
27	0(5,0)	0(3,0)	0(1,75)	0(15)	40,15
28	0(5,0)	0(3,0)	0(1,75)	0(15)	28,14

A avaliação da qualidade do modelo estatístico, utilizado na etapa de metodologia superfície resposta (MSR), é analisada por uma ANOVA, apresentado na Tabela 5. A regressão do modelo não foi considerada significativa, apresentando um valor de $p > 0,05$ e o valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 45 %, o que mostrou baixa razoabilidade na explicação dos dados. O teste F (Fisher) para a falta de ajuste indicou que esta não teve significância estatística, uma vez que apresentou F_{cal} inferior ao valor do $F_{tabelado}$ (8,81). Além disso, observa-

se que a falta de ajuste apresentou p-valor superior ao nível de significância adotado de 5% e, por isso, indicando que o modelo ajustado está adequado.

Tabela 5: Tabela ANOVA para o modelo matemático quadrático obtido para o planejamento CCF com quadruplicata no ponto central.

FV	SQ	GL	QM	Fcal	Valor-p
Regressão	1132,67	14	80,90	0,77	0,685
Resíduos	1369,02	13	105,30		
Falta de ajuste	1194,28	10	119,43	2,05	0,301
Erro puro	174,73	3	58,24		
SQ total	2501,69	27,00			
Coeficiente de determinação (R^2) = 0,45					

Neste sentido, embora o modelo adotado na etapa de MSR não tenha apresentado boa significância estatística, ainda assim, foram calculados os valores dos efeitos e dos coeficientes de regressão, com seus respectivos valores de p, conforme apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores dos efeitos, coeficientes e parâmetros p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento composto central CCF com quadruplicata no ponto central. Os valores dos efeitos e coeficientes em negrito são os que se mostraram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$)

Variável	Efeito	Coeficiente	p*	Coeficiente de regressão	p**
Média	33,39	33,39	0,001	-29,47	0,902
(1) Conc. de Fe ⁺² (L ¹)	1,19	0,60	0,762	-0,18	0,986
Conc. de Fe ⁺² (Q ²)	-2,51	-1,25	0,809	-0,20	0,809
(2) % sólido (L ¹)	12,56	6,28	0,040	-2,40	0,832
% sólido (Q ²)	3,47	1,74	0,739	0,43	0,739
(3) pH (L ¹)	3,56	1,78	0,396	66,70	0,819
					(Conclusão)
pH (Q ²)	-1,37	-0,68	0,895	-10,93	0,895
(4) % inóculo (L ¹)	2,21	1,10	0,583	-0,62	0,929
% inóculo (Q ²)	5,57	2,79	0,599	0,11	0,599
1(L) x 2(L)	-3,06	-1,53	0,481	-0,31	0,481
1(L) x 3(L)	0,10	0,05	0,980	0,08	0,980
1(L) x 4(L)	5,33	2,67	0,257	0,21	0,257
2(L) x 3(L)	2,75	1,38	0,523	2,75	0,523
2(L) x 4(L)	-0,47	-0,24	0,910	-0,02	0,910
3(L) x 4(L)	-5,00	-2,50	0,281	-2,00	0,281

L¹: variável linear.

Q²: variável quadrática.

*Valores de p para os coeficientes de regressão em termos das variáveis escalonadas.

**Valores de p para os coeficientes de regressão em termos das variáveis originais.

Pela análise da Tabela 6, pode-se inferir que o efeito mais significativo foi o da variável linear (i) % de sólido (12,56). No entanto, a variável quadrática % sólido não foi significativa, uma vez que o valor de p ($p = 0,739$) foi superior ao nível de significância adotado (5%). Vale ressaltar que os valores negativos indicaram que o efeito da variável sobre a resposta é inversamente proporcional, ou seja, a diminuição da concentração de Fe^{+2} favoreceu a extração de zinco no sistema. Os coeficientes de regressão em termos das variáveis originárias (Tabela 6) também foram calculados e empregados na determinação do modelo matemático quadrático que descreveu o sistema estudado no presente trabalho (Equação 11).

$$y = -29,47 - 0,18x_1 - 0,20x_1^2 - 2,40x_2 + 0,43x_2^2 + 66,70x_3 - 10,93x_3^2 - 0,62x_4 + 0,11x_4^2 - 0,31x_1x_2 + 0,08x_1x_3 + 0,21x_1x_4 + 2,75x_2x_3 - 0,02x_2x_4 - 2,0x_3x_4 \quad (11)$$

Na Equação 11, a variável dependente (y) representa o valor predito para a extração de zinco e as variáveis independentes x_1 , x_2 , x_3 e x_4 representam os valores concentração de Fe^{+2} , % sólido, pH e % inóculo, respectivamente. Verificando-se os dados obtidos experimentalmente com os dados calculados pela Equação 9, utilizaram-se os valores observados versus valores preditos e calcularam-se os resíduos correspondentes a cada um dos ensaios, conforme apresentados na Tabela 7. Com os resultados apresentados na Tabela 7, pode-se observar que o maior valor de resíduo apreciado foi de 17,22 e a média quadrática do erro puro apresentou um valor de 58,24.

Além disso, o valor do coeficiente de determinação (45%) do modelo matemático quadrático não implicou em uma boa previsibilidade desse modelo, podendo ser observado pela decorrência da baixa correlação entre os valores observados e preditos (Figura 3). Diante da Figura 4, nota-se que os resíduos apresentaram um bom ajuste, tendo em vista a proximidade dos pontos à linha de distribuição ajustada e, portanto, pode-se inferir que eles se encontram distribuídos normalmente, o teste Shapiro Wilk corrobora com estes resultados indicando um $p(p = 0,9532)$. O teste de Kolmogorov-Smirnov (KS-Test) para homocedasticidade de variância também se mostrou plausível com um p ($p = 0,150$), ou seja, indicando não heterocedasticidade das variâncias.

Tabela 7: Valores observados e preditos para cada ensaio realizado no planejamento composto central CCF, e o respectivo resíduo

Ensaio	Valor observado (%)	Valor predito (%)	Resíduo
1	19,16	26,04	-6,89
2	35,23	28,39	6,84
3	29,82	31,75	-1,93
4	21,75	24,09	-2,34
5	46,47	39,38	7,09
6	41,89	40,79	1,11
7	54,71	50,59	4,12
8	41,70	41,99	-0,29
9	28,40	24,86	3,55
10	30,06	37,87	-7,81
11	25,97	30,77	-4,80
12	29,94	33,78	-3,84
13	30,73	32,08	-1,35
14	49,33	44,15	5,18
15	39,91	43,49	-3,58
16	48,76	45,56	3,20
17	23,83	31,54	-7,71
18	42,19	32,73	9,45
19	46,06	28,85	17,22
20	25,93	41,40	-15,48
21	23,21	30,93	-7,72
22	43,95	34,49	9,46
23	38,86	35,07	3,79
24	35,23	37,28	-2,05
25	23,48	33,39	-9,91
26	36,57	33,39	3,18
27	40,15	33,39	6,76
28	28,14	33,39	-5,25

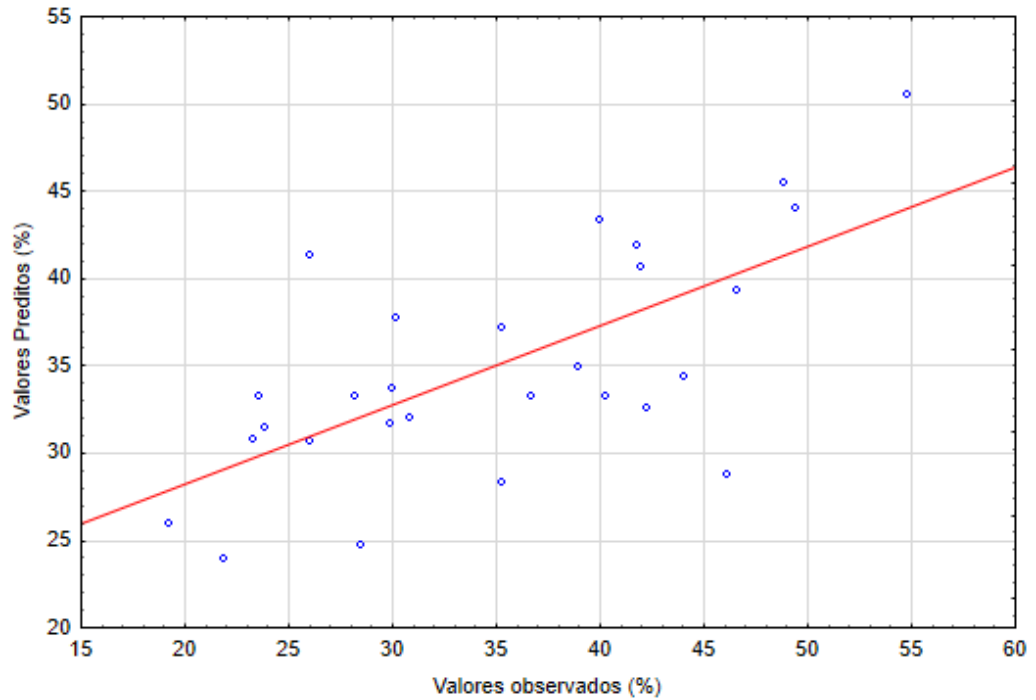


Figura 3: Relação entre os valores de extração de prata preditos e observados do planejamento composto central esférico. Quadrado médio do erro puro = 58,24.

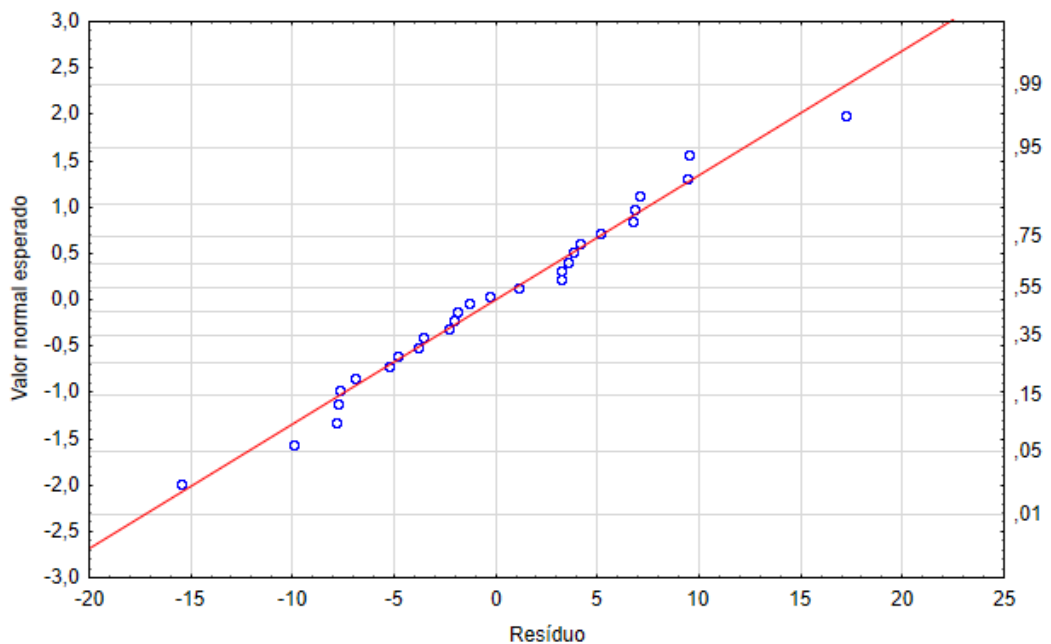


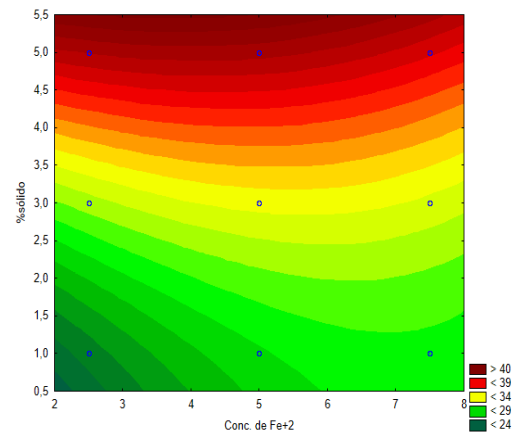
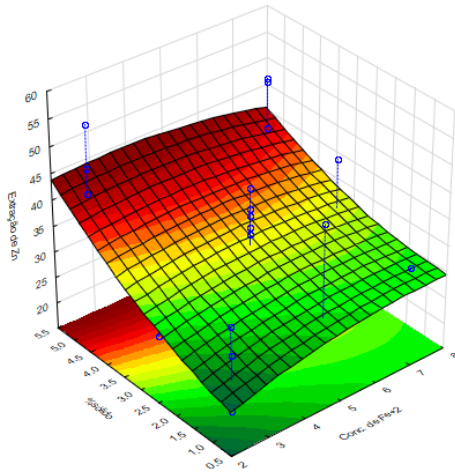
Figura 4: Gráfico de probabilidade normal para os resíduos. Quadrado médio do erro puro = 58,24.

As superfícies de resposta e de contorno foram construídas e indicaram o valor esperado para a extração de zinco com análise de duas das variáveis independentes (Figuras 5 a-f). Destaca-se que as demais variáveis não apresentadas em cada uma das superfícies tiveram seus

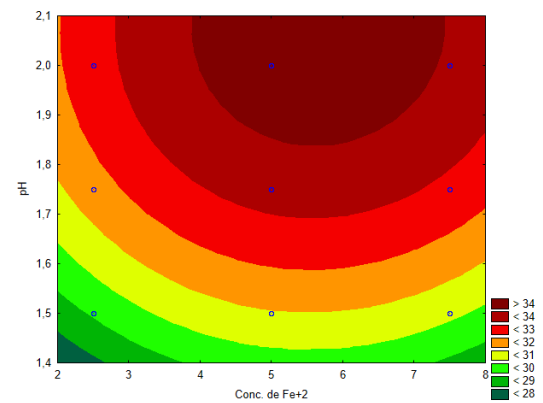
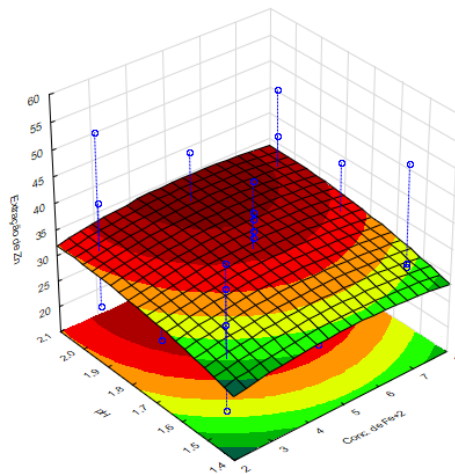
valores fixados nos respectivos pontos centrais (*), isto é, Concentração de Fe^{+2} ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$), % de sólido (3%), pH (1,75) e % de inóculo (15%).

a)

(Continua)

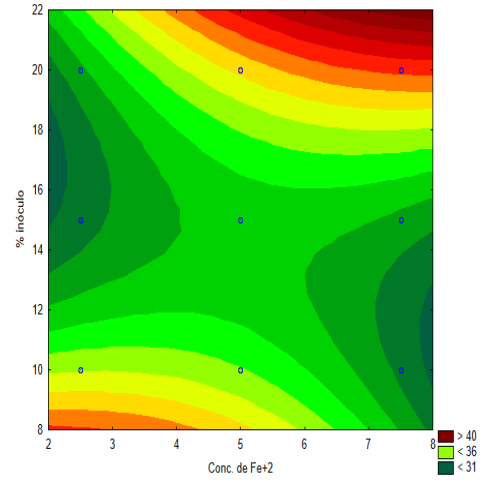
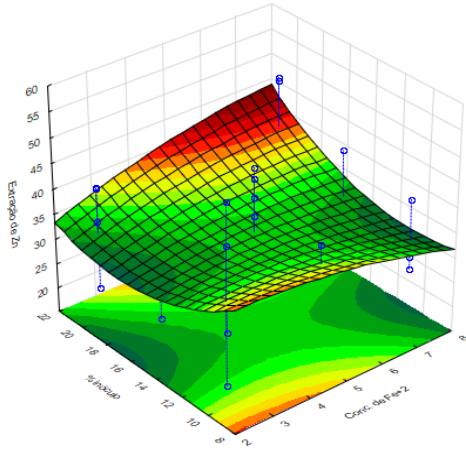


b)

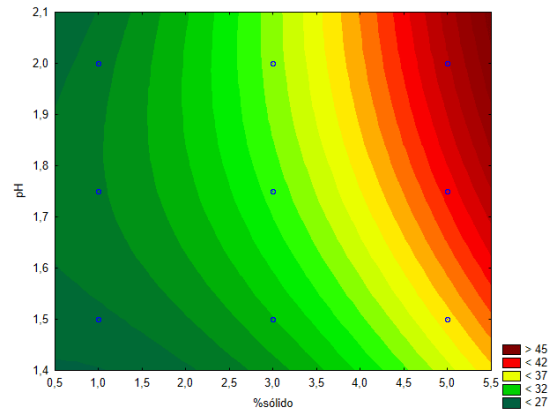
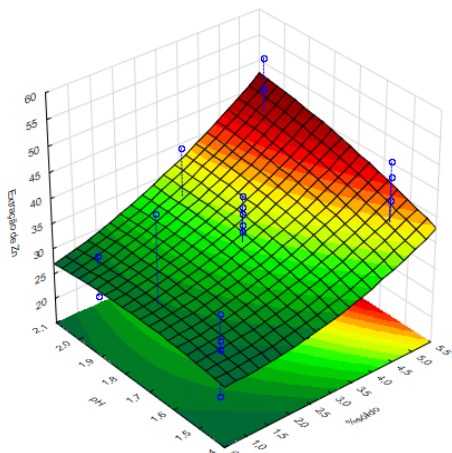


(Continuação)

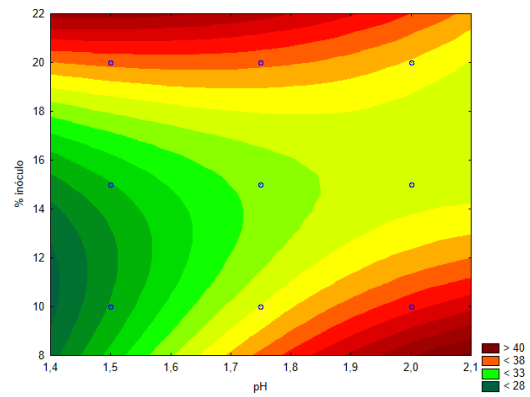
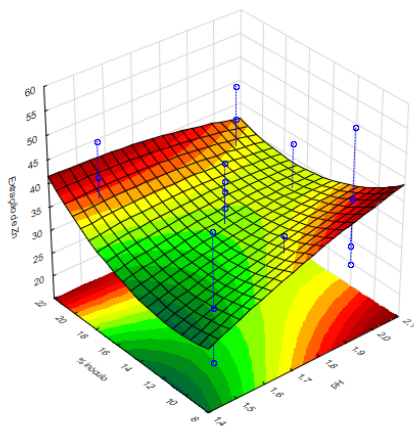
c)



d)



e)



f)

(Conclusão)

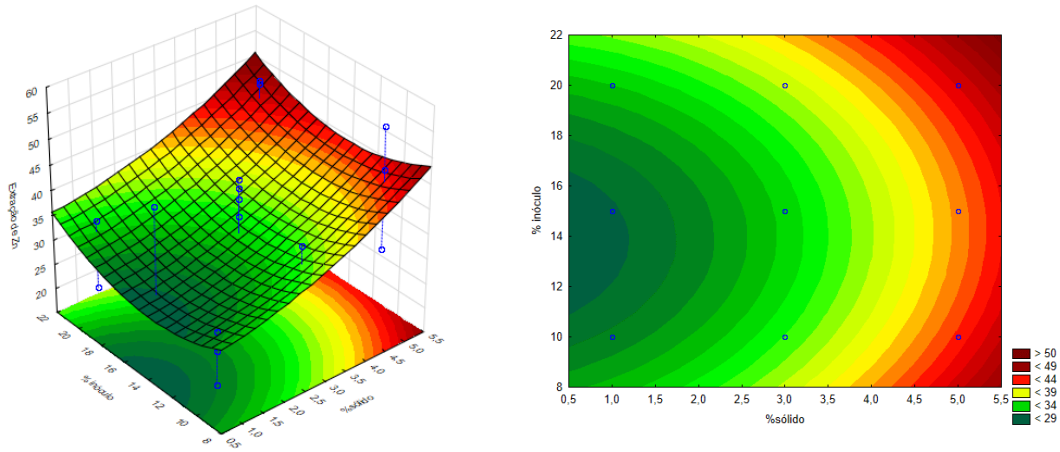


Figura 5: a) b) c) d) e) e f) superfícies de resposta e superfícies de contorno obtidas para a variável extração de zinco (%). a) Interação % sólido e concentração de Fe^{+2} b) interação pH e Concentração de Fe^{+2} c) interação % de inóculo e Concentração de Fe^{+2} d) Interação % sólido e pH e) interação % inóculo e pH e f) Interação % inóculo e % sólido.

A partir dos resultados apresentados na Figura 5, pode-se observar que para as curvas a), d) e f), os valores de extração de zinco são ditados pela variável % de sólido, uma vez que estas superfícies manifestaram variações na extração para as variáveis: (i) concentração de Fe^{+2} (ii) pH e (iii) % de inóculo próximas a linearidade. De forma oposta, notou-se que nas curvas b), c) e e), a variável resposta é ditada pela interação das duas variáveis independentes, sendo estas, Concentração de Fe^{+2} versus pH, Concentração de Fe^{+2} versus % de inóculo, % inóculo versus pH, respectivamente. Diante da superfície apresentada em d), observou-se que para uma percentagem de extração de zinco superior a 40%, os valores de % de sólido podem variar de 4% a 5,5%, desde que o pH esteja no intervalo entre 1,6 e 2,1.

Por fim, os experimentos de biolixiviação da esfalerita, mostraram que as baixas extrações de zinco estiveram associadas aos baixos potenciais de oxirredução, indicando que a oxidação dos sulfetos não estava ocorrendo pela via férrica (Fe^{+3}). Segundo Martins (2023), a dissolução da esfalerita é iniciada pelo ataque dos íons prótons (H^+) presente na solução, sendo posteriormente controlada pelo processo de biooxidação, a partir da oxidação do íon Fe^{2+} a íons Fe^{+3} . Neste sentido, o íon férrico biologicamente gerado se torna o principal agente oxidante na reação de solubilização da esfalerita conforme apresentado na equação 2, o que não se evidenciou em maior parte dos ensaios.

6- CONCLUSÕES

No presente estudo, o planejamento CCD do tipo CCF para metodologia de análise de superfície resposta (MSR) foi utilizado para estudar a interação entre fatores em um processo de biolixiviação de um concentrado de alto teor de esfalerita utilizando *A. ferrooxidans* com os seguintes resultados:

– Para uma elevada taxa de extração de zinco, o aumento da % sólido, na faixa de 4–5,5%, não sofreu o efeito de deslocamento da concentração de Fe^{+2} para valores mais baixos, enquanto o oposto foi verificado quando se analisou com a variável pH. Isso demonstrou a importância do controle do pH durante o processo para valores próximos a 2.

– A % sólido e o pH tiveram um efeito mais significativo na concentração de Zn após os 55 dias de biolixiviação em comparação com % inóculo e a concentração inicial de ferro ferroso. Previu-se que quando a % sólido e o pH são fixados em 5% e 2, respectivamente, as extrações de $\text{Zn} \geq 50\%$ podem ser atingidas se o Fe(II) inicial for fixado na condição inferior em $2,5 \text{ g.L}^{-1}$.

– Não houve interação de segunda ordem estatisticamente significativa entre os quatro fatores estudados.

– A otimização dos fatores para os processos de biolixiviação de esfalerita pode ser realizada usando DOEs fatoriais, como CCD, mas a técnica de repicagem das bactérias e a sua adaptação é imprescindível na repetibilidade dos ensaios (o que não se constatou neste trabalho).

REFERÊNCIAS

ANTONY, J. Fundamentals of Design of Experiments. **Design of Experiments for Engineers and Scientists**, [s. l.], p. 6–16, 2003. Disponível em: Acesso em: 15 jan. 2023.

ASWEGEN, P. C. V.; NIEKERK, J. V.; OLIVIER, W. The BIOX™ Process for the Treatment of Refractory Gold Concentrates. *Em*: RAWLINGS, Douglas E.; JOHNSON, D. Barrie (org.). **Biomining**. 1. ed. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 18–50.

BRIERLEY, C. L. Mining Biotechnology: Research to Commercial Development and Beyond. *Em*: RAWLINGS, Douglas E. (org.). **Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes**. 1. ed. [S. l.]: Springer-Verlag, 1997. p. 3–17.

CALADO, V.; MONTGOMERY, C D. Planejamento de experimentos usando Statistica 1. **E-papers Serviços Editoriais**, [s. l.], 2003.

CONIĆ, V. T. *et al.* Copper, zinc, and iron bioleaching from polymetallic sulphide concentrate. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 3688–3695, 2014. Disponível em: Acesso em: 13 set. 2022.

DAMAN, D. *et al.* Biooxidação de esfalerita brasileira por *Acidithiobacillus* sp. **ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E METALURGIA EXTRATIVA**, [s. l.], v. 19, p. 76–82, 2002.

DE SOUZA, A. D.; PINA, P. S.; LEÃO, V. A.. Bioleaching and chemical leaching as an integrated process in the zinc industry. **Minerals Engineering**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 591–599, 2007. Disponível em: Acesso em: 29 jun. 2022.

FREE, M. L. **Hydrometallurgy: Fundamentals and Applications**. 1. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Tms, 2013.

GARCIA JR., O.; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. *Em*: LIMA, Urgel de Almeida *et al.* (org.). **Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2001. v. 3, p. 485–512.

GHORBANI, Y. *et al.* Large particle effects in chemical/biochemical heap leach processes – A review. **Minerals Engineering**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1172–1184, 2011. Disponível em: Acesso em: 9 ago. 2022.

GIAVENO, M. A.; URBIETA, M. S.; DONATI, E.. Mechanisms of bioleaching: basic understanding and possible industrial implications. *Em*: SOBRAL, Luiz Gonzaga santos; OLIVEIRA, Débora Monteiro; SOUZA, Carlos Eduardo Gomes (org.). **Biohydrometallurgical processes: a practical approach**. Rio de Janeiro: CETEM (MCT), 2010. p. 27–38.

HAGHSHENAS, D. F. *et al.* Kinetics of sphalerite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, [s. l.], v. 99, n. 3–4, p. 202–208, 2009. Disponível em: Acesso em: 8 jan. 2023.

HU, J. *et al.* A scaled-up continuous process for biooxidation as pre-treatment of refractory pyrite-arsenopyrite gold-bearing concentrates. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 128, p. 228–234, 2017. Disponível em: Acesso em: 28 abr. 2021.

KAKSONEN, A. H. *et al.* Recent progress in biohydrometallurgy and microbial characterisation. **Hydrometallurgy**, [s. l.], v. 180, p. 7–25, 2018. Disponível em: Acesso em: 3 ago. 2022.

MARTINS, F. L. **Biolixiviação da bornita, esfalerita e calcopirita em soluções de NaCl por *Sulfolobus acidocaldarius***. 2023. 68–69 f. - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 10. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2020.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos**. 4. ed. [S. l.]: Bookman Editora, 2010.

NIST/SEMATECH. **E-Handbook of Statistical Methods**. [S. l.]: NIST/SEMATECH, 2012. *E-book*. Disponível em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, date. Acesso em: 16 jan. 2023.

OLIVEIRA, L. E. L. **Identificação e isolamento de bactérias envolvidas na formação de drenagem ácida mineira na região de Jacobina (Bahia) e o seu uso na biolixiviação de cobre.** 2014. - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

OLLAKKA, H.; RUUSKA, J.; TASKILA, S. The application of principal component analysis for bioheapleaching process - Case study: Talvivaara mine. **Minerals Engineering**, [s. l.], v. 95, p. 48–58, 2016. Disponível em: Acesso em: 12 nov. 2022.

PINA, P. S. *et al.* The effect of ferrous and ferric iron on sphalerite bioleaching with *Acidithiobacillus* sp. **Minerals Engineering**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 549–551, 2005a. Disponível em: Acesso em: 11 jan. 2023.

PINA, P. S. *et al.* The effect of ferrous and ferric iron on sphalerite bioleaching with *Acidithiobacillus* sp. **Minerals Engineering**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 549–551, 2005b. Disponível em: Acesso em: 20 nov. 2022.

RAWLINGS, D. E. Mesophilic, Autotrophic Bioleaching Bacteria: Description, Physiology and Role Introduction to Microorganisms. *Em*: RAWLINGS, Douglas E. (org.). **Biomining: theory, microbes, and industrial processes**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 229–245.

RIVADENEIRA, J. Challenges in practicing the bioleaching process. *Em*: SOBRAL, Luis Gonzaga Santos; OLIVEIRA, Débora Monteiro; SOUZA, Carlos Eduardo Gomes (org.). **Biohydrometallurgical Processes**. Rio de Janeiro: CETEM (MCT), 2011. p. 17–38.