

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Curso de Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular

Paola dos Santos Lopes

**CARACTERIZAÇÃO DO USO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO13 NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS
POTENCIALMENTE TÓXICOS EM MEIOS AQUOSOS**

Porto Alegre

2022

Paola dos Santos Lopes

**CARACTERIZAÇÃO DO USO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO13 NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS
POTENCIALMENTE TÓXICOS EM MEIOS AQUOSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de bacharelado em
Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia
Molecular do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marilene Henning
Vainstein
Coorientador: Me. Henrique Alves de Brito

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Paola dos Santos
CARACTERIZAÇÃO DO USO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO
POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO13 NA BIORREMEDIAÇÃO
DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM MEIOS AQUOSOS /
Paola dos Santos Lopes. -- 2022.
37 f.
Orientadora: Marilene Henning Vainstein.

Coorientador: Henrique Alves de Brito.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Biotecnologia. 2. Biorremediação. 3.
Biossurfactantes. 4. Metais potencialmente tóxicos. I.
Vainstein, Marilene Henning, orient. II. de Brito,
Henrique Alves, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora do trabalho de conclusão de curso e também de iniciação científica, Professora Marilene Henning Vainstein, pelo o apoio, confiança e disponibilidade que sempre teve comigo.

Ao meu coorientador e também companheiro de laboratório, Henrique Alves de Brito, por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho, por toda a confiança, incentivo e carinho que nunca faltaram.

Ao técnico Alan dos Santos da Silva, por todo o suporte e disponibilidade para me auxiliar neste projeto.

Aos meus colegas do curso de Biotecnologia, que fizeram essa jornada ter mais cor e vida, por dividirem comigo os momentos mais desafiadores e também os mais empolgantes.

À minha mãe, Genair Ferreira dos Santos, por desde muito cedo me ensinar que a educação é sempre o melhor caminho, mesmo que cheio de pedras, e por sempre me mostrar pelo exemplo que não importa o tamanho da nossa dificuldade e sim da nossa vontade.

À minha família, por mesmo não entendendo muito bem meus estudos sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus sogros, Ane Luci e Paulo Alex Scherer, por acreditarem em mim e mais de uma vez disponibilizarem e adaptarem a sua própria casa para que eu tivesse mais conforto para estudar.

Ao meu noivo, Gabriel Tronco Scherer, por nunca permitir, nem por um segundo, que eu desistisse do meu maior sonho, por acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu não acreditava e por ser meu maior apoiador, disposto a fazer de tudo para me auxiliar.

No começo pensei que estivesse lutando para salvar seringueiras, depois pensei que estava lutando para salvar a Floresta Amazônica. Agora, percebo que estou lutando pela humanidade.

Chico Mendes

RESUMO

Com o mundo cada vez mais tecnológico e eletrônico a demanda por metais para a produção de produtos é cada vez maior. No entanto, os processos realizados durante a mineração destes metais acabam gerando resíduos com alta concentração metálica que, quando descartados, causam um grande desequilíbrio ecológico. Seja em meios aquosos ou em solo, a poluição por metais potencialmente tóxicos é uma problemática para todo o ecossistema. A toxicidade é bioacumulada de forma direta ou indireta como por exemplo em cultivos que utilizam em sua irrigação água contaminada com metais. A alta concentração de metais em animais é responsável por diversas sequelas como convulsões, distúrbios endócrinos e até mesmo danos a medula óssea nos casos de acúmulo de Cobre e Ferro. Devido aos efeitos dessa poluição por metais e na sua alta incidência, muitos metais como Cobre e Ferro foram adicionados à lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Uma das alternativas possíveis para recuperar ambientes contaminados com tais metais potencialmente tóxicos é a utilização de biossurfactantes que são capazes de quelar as moléculas contaminantes permitindo sua extração do meio. Nesse contexto, esse trabalho propõe a utilização do biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 na biorremediação de ambientes aquosos contaminados com os metais Cobre e Ferro. Primeiramente, foram feitos testes com soluções de diferentes metais: Zinco, Cromo, Cádmiio, Cobalto, Chumbo, Ferro e Cobre com concentração de 15 mg/L e do biossurfactante em 10 mg/L à fim de se determinar quais metais seriam mais interessantes de serem explorados. Os mais promissores foram Ferro e Cobre e, portanto, seguiu-se para o planejamento de desenho fatorial onde foram utilizadas três variáveis estratégicas: temperatura (13, 17, 21, 25 e 29 °C), concentração de biossurfactante (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 CMC) e tempo (0, 24, 48, 72, 96 horas). A concentração inicial de Cobre e Ferro foi de 10 e 15 mg/L respectivamente. Após cada experimento as amostras foram analisadas por espectrômetro de absorção atômica por chama (FAAS) de modo a determinar a concentração de metais presente na amostra. Com base nos resultados foram produzidas respostas de superfície, gráficos de pareto e equações de remoção de metais. Verificou-se uma maior biorremediação das soluções que estavam em menores temperaturas, com menor tempo de ensaio e maior concentração de biossurfactante nas amostras de Cobre e maiores temperaturas, maior tempo de ensaio e maior concentração de biossurfactante nas amostras de Ferro. Assim, a capacidade do biossurfactante produzido por *B. amyloliquefaciens* em remediar meios aquosos contaminados com Cu e Fe foi demonstrada, sendo ainda necessários mais estudos para o entendimento desse processo.

Palavras-chave: Biotecnologia. Biorremediação. Biossurfactante. Metais potencialmente tóxicos.

ABSTRACT

With the world increasingly technological and electronic, the demand for metals to production of products is increasing. However, the processes carried out during the mining of these metals end up generating residues with high metallic concentration that, when discarded, cause a great ecological disorder. Whether in aqueous media or in soil, pollution by potentially toxic metals is a problem to the entire ecosystem. Toxicity is bioaccumulated directly or indirectly, for example in cultivars that use water contaminated with metals in their irrigation. The high concentration of metals in animals is responsible for several sequels such as seizures, endocrine disorders and even damage to the bone marrow in cases of copper and iron accumulation. Due to the effects of this metal pollution and its high incidence, many metals such as copper and iron have been added to the US Environmental Protection Agency's list of priority pollutants. One of the possible alternatives to recover environments contaminated with such potentially toxic metals is the use of biosurfactants that are able to chelate the contaminating molecules allowing their extraction from the medium. In this context, this work proposes the use of the biosurfactant produced by *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 in the bioremediation of aqueous environments contaminated with copper and iron metals. Firstly, tests were carried out with solutions of different metals: Zinc, Chromium, Cadmium, Cobalt, Lead, Iron and Copper with a concentration of 15 mg/L and of the biosurfactant in 10 mg/L in order to determine which metals would be more interesting to be explored. The most promising were Iron and Copper and, therefore, it was followed to the factorial design planning where three strategic variables were used: temperature (13, 17, 21, 25 and 29 °C), concentration of biosurfactant (0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 CMC) and time (0, 24, 48, 72, 96 hours). The initial concentration of Copper and Iron was 10 and 15 mg/L respectively. After each experiment, the samples were analyzed by flame atomic absorption spectrometer (F AAS) in order to determine the concentration of metals present in the sample. Based on the results surface responses, Pareto plots and metal removal equations were produced. There was a greater bioremediation of the solutions that were at lower temperatures, with shorter testing time and higher concentration of biosurfactant in the copper samples and higher temperatures, longer testing time and higher concentration of biosurfactant in the iron samples. Thus, the ability of the biosurfactant produced by *B. amyloliquefaciens* to remediate aqueous media contaminated with Cu and Fe was demonstrated, and further studies are needed to understand this process.

Keywords: Biotechnology. Bioremediation. Biosurfactant. Potentially toxic metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de remoção de metais.....	17
Figura 2 – Análise da otimização da remoção de Cobre.....	19
Figura 3 – Influência da temperatura e concentração de BSFs na remoção de Cobre.	19
Figura 4 – Influência do tempo e concentração de BSFs na remoção de Cobre.....	20
Figura 5 – Influência da temperatura e tempo na remoção de Cobre.....	20
Figura 6 – Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados para ensaios com Cobre.....	21
Figura 7 – Análise da otimização da remoção de Ferro.....	22
Figura 8 – Influência da temperatura e concentração de BSFs na remoção de Ferro..	23
Figura 9 – Influência do tempo e concentração de BSFs na remoção de Ferro.....	23
Figura 10 – Influência da temperatura e tempo na remoção de Ferro.....	24
Figura 11 – Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados para ensaios com Ferro.....	24
Figura 12 – Taxa de diminuição da condutividade para Cobre.....	25
Figura 13 – Taxa de diminuição da condutividade para Ferro.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações iniciais e finais dos metais.....	17
Tabela 2 – Análise de Variância Cobre - Modelo Quadrático.....	18
Tabela 3 – Análise de Variância Ferro - Modelo Quadrático.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSF – Biossurfactante

CMC – Concentração Micelar Crítica

FAAS – Flame Atomic Absorption Spectrometry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Indústria mineradora	10
1.2	Poluição de águas por metais	10
1.3	Remediação de águas contaminadas por metais	11
1.4	Biossurfactantes	12
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVOS.....	14
3.1	Objetivo geral.....	14
3.2	Objetivos específicos.....	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	Preparo das amostras	15
4.2	Produção do biossurfactante	15
4.3	Seleção dos metais potencialmente tóxicos	15
4.4	Planejamento fatorial experimental	16
4.5	Avaliação da remoção dos metais	16
4.6	Ensaio de condutividade	16
5	RESULTADOS.....	17
5.1	Testes para seleção de metais potencialmente tóxicos	17
5.2	Otimização para remoção de cobre	18
5.3	Análise de pareto para cobre	20
5.4	Otimização para remoção de ferro.....	21
5.5	Análise de pareto para ferro	24
5.6	Ensaio de condutividade	25
6	DISCUSSÃO	27
7	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Indústria mineradora

A extração de metais é, indubitavelmente, uma das atividades mais atreladas ao desenvolvimento humano. A descoberta de cada um dos compostos que podem ser extraídos por mineração e suas diferentes aplicações foram e são fundamentais para novas perspectivas industriais. Não haveria como existir energia elétrica sem o uso de metais como o Cobre como condutor, não seria possível a evolução tecnológica sem o Silício para a produção de chips, assim como não seria possível o início da industrialização sem o uso do carvão (Dai et al., 2016; Dai & Finkelman, 2018).

No entanto, apesar de essencial, toda a atividade mineradora causa sérios danos ao ambiente, contribuindo significativamente na poluição do ar, águas e solo (Rêgo et al., 2022). Além da contaminação atrelada à extração, tem-se também a contaminação por acidentes, como no caso do rompimento das barragens da mineradora Vale afetando os municípios de Brumadinho e Mariana causando um desequilíbrio incalculável do ecossistema (Castro, 2021).

Todos esses danos ao ambiente causam, principalmente, um acúmulo de metais potencialmente tóxicos, que por se tratarem de compostos inorgânicos, dificilmente serão assimilados por aquele ambiente, gerando um dano grave àquele ecossistema (Lucas da Silva Rêgo et al., 2022). A alta concentração de metais nesses ambientes acaba resultando em uma bioacumulação que afeta todos os seres vivos envolvidos, havendo diversos danos toxicológicos para cada espécie afetada (Amin et al., 2013).

1.2 Poluição de águas por metais

Uma das principais formas de contaminação de águas resultante da atividade mineradora é por meio da Drenagem Ácida de Mina (DAM) que consiste na oxidação de rochas liberadas pela mineração através do contato com água e oxigênio resultando em uma água com pH baixo e alta concentração de metais potencialmente tóxicos (Dutta et al., 2020). Essa água proveniente da DAM muitas vezes acaba sendo

escoada para rios e lagos, gerando uma contaminação de metais potencialmente tóxicos.

Em menor proporção, porém com igual impacto, tem-se também a contaminação de águas por metais provenientes da lixiviação de aterros sanitários, lixões, automóveis e também da indústria de fertilizantes e pesticidas (Briffa et al., 2020). Essas são fontes secundárias de contaminação, entretanto fundamentais para a magnificação dessa problemática.

Os órgãos reguladores como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) são responsáveis por estabelecerem limites para as concentrações de metais nos diversos tipos de águas (CONAMA, 2005). Entretanto, devido à essas variadas fontes de contaminação é um desafio manter as concentrações dos metais potencialmente tóxicos dentro dos limites estipulados, sendo crucial encontrar maneiras de remediar e recuperar esses ambientes.

1.3 Remediação de águas contaminadas por metais

Algumas das principais maneiras de tratamento de águas contaminadas por metais potencialmente tóxicos são precipitação, recuperação evaporativa e eletrolítica, extração por solvente, cimentação, osmose reversa, eletrodiálise, troca iônica e adsorção (Gautam et al., 2016). Todavia, tais técnicas são muito agressivas ao ambiente, sendo responsáveis por outros desequilíbrios ecológicos e, portanto, não sendo boas alternativas. Além disso, a eficiência do processo de remediação por meio destas técnicas é baixa e seu custo é alto, tornando-as desvantajosas para esse propósito.

Assim, há uma urgência por tratar esses meios de maneira segura, sem ocasionar contaminações secundárias no processo de remediação, visando também alternativas que possuam um bom custo-benefício. Dentre as possibilidades existentes para isso tem-se a utilização de agentes biológicos, como plantas e microrganismos, capazes de retirar esses e outros tipos de contaminantes do ambiente (Aronsson & Perttu, 2001; Gautam et al., 2016) com baixa toxicidade, por se tratarem de compostos biodegradáveis.

1.4 Biossurfactantes

Biossurfactantes são moléculas biológicas com natureza anfifílica produzidas por diversos organismos. Podem diminuir a tensão superficial do meio em que são adicionados levando a aplicações como na indústria cosmética, farmacêutica, petrolífera, alimentícia, entre outras (Akbari et al., 2018). São compostos de baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, multifuncionalidade, capacidade de uso ambiental e baixo custo quando utilizando resíduos industriais na sua produção (Akbari et al., 2018).

Devido a todas essas características, os biossurfactantes exibem potencial de biorremediar diversos contaminantes como resíduos de petróleo, metais potencialmente tóxicos e outros (da Rocha Junior et al., 2019; Singh & Cameotra, 2013), destacando que a área dos metais potencialmente tóxicos é uma das mais promissoras, considerando os poucos avanços obtidos na recuperação de ambientes contaminados pelos mesmos.

Há quatro maneiras pelas quais os biossurfactantes conseguem eliminar metais potencialmente tóxicos, sendo elas: mobilização, solubilização, emulsificação e complexação. A primeira está associada com a capacidade do biossurfactante de disponibilizar o metal aos microrganismos presentes naquele ambiente, permitindo que ele seja assimilado. Na solubilização, há o aumento da solubilidade do metal possibilitando sua dissolução pelo meio, tornando-o menos concentrado, entretanto não viabilizando sua retirada do meio. Outra forma é através da emulsificação onde é possível estabilizar em mistura diferentes fases, levando a estabilização do metal em uma determinada fase para sua posterior remoção (Mishra et al., 2021). Se tratando da complexação, há indícios de que os metais interagem com os grupos amino e carboxílico terminais dos aminoácidos presentes nos biossurfactantes (Janek et al., 2019).

No último caso citado anteriormente, se percebe uma remoção mais eficiente dos metais e com maiores possibilidades, uma vez que os biossurfactantes possuem grande variedade de estruturas químicas e, conseqüentemente, grande variedade de seletividade a metais, permitindo uma maior eficiência na remoção dos mesmos e também mais possibilidades de aplicação (Mulligan, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

A poluição por metais potencialmente tóxicos é hoje um dos maiores desafios da atualidade, em um mundo cada vez mais eletrônico, onde a necessidade de extração de metais por mineração e seu uso aumentam a cada dia, é notável o impacto nos rios, lagos e solos contaminados (Sodrzeieski et al., 2019; Ugbede et al., 2020). Com base na lista de poluentes prioritários da Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, os metais mais emergentes são Arsênio, Cádmio, Cromo, Cobre, Chumbo, Mercurio, Níquel, Selenio, Prata, Ferro e Zinco (United States Environmental Protection Agency, 2014). Esses e outros metais acarretam um grande dano ao ecossistema em alta concentração, sendo responsáveis pela toxicidade direta a vida presente naquele ambiente, como na intoxicação de peixes (Green & Planchart, 2018), ou indireta, como por meio da bioacumulação durante a cadeia alimentar (Sani et al., 2022).

A legislação responsável por limitar a concentração de metais potencialmente tóxicos em águas do Brasil é a Resolução 357 do CONAMA (CONAMA, 2005), no entanto costumeiramente a concentração de metais é maior do que o permitido, principalmente em rios e lagos próximos a atividades de mineração (Menezes et al., 2011). Com isso, torna-se fundamental a utilização de técnicas e processos capazes de retirar esses contaminantes dos ambientes aquosos, tais como o uso de biossurfactantes (Mishra et al., 2021). Sendo esses compostos uma excelente alternativa para solucionar essa problemática, uma vez que são biodegradáveis, baixo impacto ambiental, com boa eficácia e de relativo baixo custo de produção (Jahan et al., 2020).

O uso de biossurfactantes de origem microbiológica é propício no tratamento de águas contaminadas por metais potencialmente tóxicos devido a sua capacidade de quelar diversos tipos de metais, sendo possível fazer a modulação de qual biossurfactante é mais adequado a cada tipo de ambiente contaminado (Janek et al., 2019). Assim, nesse trabalho foi realizada a otimização e caracterização do uso de um biossurfactante na recuperação de ambientes aquosos contaminados com Cobre e Ferro, objetivando sua recuperação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Utilizar biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 na biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por metais potencialmente tóxicos.

3.2 Objetivos específicos

- a. Selecionar metais potencialmente tóxicos relevantes de serem biorremediados pelos biossurfactantes produzidos por *B. amyloliquefaciens* MO13.
- b. Analisar a influência da temperatura, tempo e concentração de biossurfactantes no processo de biorremediação;
- c. Avaliar, por meio de ensaios de interação biossurfactante-metal, o potencial de biorremediação de Cu e Fe mediante aplicação de biossurfactantes;
- d. Compreender o mecanismo de interação entre biossurfactante e o metal;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo das amostras

As soluções foram preparadas sinteticamente em frascos Erlenmeyers com 30 mL de água ultrapurificada e quantidade de reagente suficiente para atingir uma concentração de 15 mg/L de cada metal, partindo dos sais Sulfato de Zinco 99% Heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), Sulfato de Cromo III 99% Básico ($Cr_4(SO_4)_5(OH)_2$), Sulfato de Cádmio 99% Hidratado ($CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$), Sulfato de Cobalto II 99% Heptahidratado ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$), Nitrato de chumbo 99% ($Pb(NO_3)_2$), Cloreto Férrico 99% Hexahidratado ($FeCl_2$) e Sulfato de Cobre 98% Pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), sendo todas as amostras produzidas em triplicata.

4.2 Produção do Biossurfactante

A metodologia de produção seguiu trabalhos anteriores do nosso grupo, que identificou e caracterizou o mesmo no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (Brito, H. A., 2019). Um pré inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 foi crescido em YPD a 200 rpm, 30°C e 24 h. Após esse tempo, foi inoculado em biorreatores de 500 mL em meio MSM com controle de temperatura de 34°C, pH 7,2, agitação de 252 rpm e aeração de 0,3 lpm de ar. Após 72 horas o meio foi centrifugado a 9000 rpm por 20 minutos para retirada das células. HCl 5 M foi adicionado ao sobrenadante livres de células até este atingir pH 2 e deixado a 4°C por 24 horas. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas (9000 rpm, 20 minutos, 9°C) e o precipitado formado foi lavado com água ácida (pH 2) duas vezes. Foi adicionado NaOH para elevar o pH até 7 na solução final. Em seguida, as amostras foram liofilizadas por 12 horas a fim de obter os BSFs utilizados no trabalho.

4.3 Seleção dos metais potencialmente tóxicos

Foram feitas soluções de sais metais com BSF liofilizado com volume final de 30mL. Inicialmente foram utilizados os metais Zinco, Cromo, Cádmio, Cobalto, Chumbo, Ferro e Cobre nas concentrações de 15 mg/L e BSF liofilizado na concentração de 10 mg/L. As soluções foram agitadas a 200 rpm por 48h a 21 °C. Após transcorrido esse tempo as soluções foram centrifugadas a 5000 g por 10

minutos e posteriormente foram encaminhadas para determinação da concentração de metais restantes por F AAS.

4.4 Planejamento fatorial experimental

A metodologia dos ensaios seguiu o planejamento fatorial (Teófilo & Ferreira, 2006), que consiste na otimização dos experimentos a serem realizados, com o objetivo de encontrar a melhor condição de aplicação do biossurfactante para biorremediação de metais potencialmente tóxicos. Por meio do planejamento fatorial de composto central – modelo quadrático cúbico 2^3 (representando três variáveis), foram utilizadas as temperaturas de 13, 17, 21, 25 e 29 °C, as concentrações de biossurfactante de 0, 5, 10, 15 e 20 mg/L e os tempos de contato de 0, 24, 48 e 72 e 96 horas totalizando 15 experimentos em triplicata. A partir desses experimentos, foram geradas equações de otimização, por meio do software Origin Pro, e gráficos de resposta de superfície, através do Minitab Statistical Software. A análise estatística de variância foi realizada por meio de ANOVA e teste F, com $p < 0,05$.

4.5 Avaliação da remoção dos metais

Após realizados os ensaios experimentais todas as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos, separando assim o biossurfactante ligado ao metal do restante da solução, e encaminhadas para a determinação da concentração de metais por espectrometria de absorção atômica por chama (AAAnalyst 200, PerkinElmer, AA-BG) com atomização das amostras em chama de acetileno 2,5 L/min e ar comprimido 10 L/min. Para cada amostra, as lâmpadas de excitação dos metais tinham diferentes comprimentos de onda e curvas de calibração. A porcentagem de remoção final dos metais foi obtida considerando a concentração inicial da amostra como 100% e verificando o quanto foi removido pela concentração final obtida.

4.6 Ensaio de condutividade

Com base em estudos anteriores (Singh & Cameotra, 2013), foram realizadas medições de condutividade das soluções apenas com metais e das soluções com metais e BSFs.

5 RESULTADOS

5.1 Testes para seleção de metais potencialmente tóxicos

Na figura 1 está a comparação dos valores encontrados entre as amostras controle e amostras tratadas com os BSFs para os 7 metais analisados (Zinco, Cromo, Cádmio, Cobalto, Chumbo, Ferro e Cobre), tendo sido determinada a concentração de metais nas amostras por F AAS. Os valores correspondentes a concentração de metais nas amostras estão destacados na tabela 1, juntamente da taxa de remoção observada.

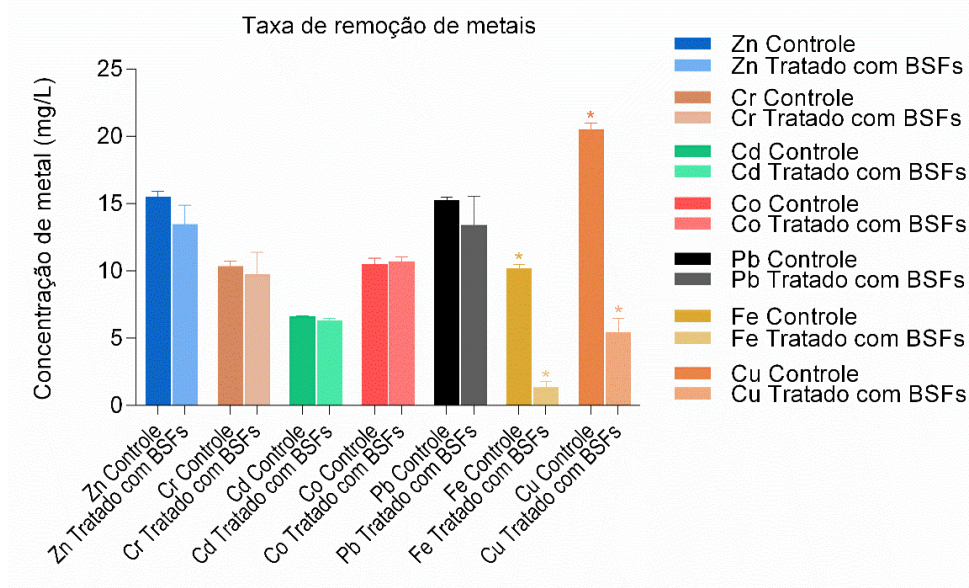


Figura 1. Taxa de remoção de metais. Não houve diferença significativa entre a amostra controle e a amostra tratada com BSF para Zinco, Cromo, Cádmio, Cobalto e Chumbo. Os metais Ferro e Cobre apresentaram boa taxa de remoção comparando-os com suas respectivas amostras controles nos ensaios realizados a 21 °C, por 48 horas com concentração de BSFs de 10 mg/L. O símbolo (*) representa diferença estatística ($p < 0,05$) entre controle e tratado por ANOVA seguida por teste Tukey.

Tabela 1. Concentrações iniciais e finais dos metais.

	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)	Taxa de remoção (%)
Zinco	15,5 ± 0,4	13,47 ± 1,41	13,09
Cromo	10,34 ± 0,37	9,75 ± 1,62	5,72
Cádmio	6,60 ± 0,05	6,32 ± 0,13	4,23
Cobalto	10,52 ± 0,43	10,66 ± 0,36	0
Chumbo	15,24 ± 0,25	13,40 ± 2,12	12,02
Ferro	10,2 ± 0,26	1,34 ± 0,45	86,85
Cobre	20,5 ± 0,49	5,44 ± 1,03	73,45

5.2 Otimização para remoção de Cobre

Com base no planejamento fatorial de composto central – modelo quadrático cúbico, foi gerada uma equação [1], onde temperatura é representada por T, concentração de BSF por C e tempo por t. Tal equação é utilizada como modelo teórico para o processo de otimização de remoção do Cobre, sendo responsável pelos valores esperados descritos nas demais figuras e tabelas.

$$\text{Remoção de Cu} = 6.56 - (0.056 \cdot T) - (0.52 \cdot C) - (0.092 \cdot t) + (0.008 \cdot T^2) + (0.027 \cdot C^2) + (0.00007 \cdot t^2) - (0.025 \cdot T \cdot C) - (0.0005 \cdot T \cdot t) + (0.0108 \cdot C \cdot t)$$

[1]

Na tabela 2 é possível verificar a significância das variáveis escolhidas com base em cálculos estatísticos, demonstrando a relevância das variáveis utilizadas. O p calculado ficou abaixo de 0.05 e a regressão de Fcalc. ficou bem acima do teste p , porém abaixo do F. Ajuste. Isso significa que o planejamento fatorial é estatisticamente relevante. Considerando a porcentagem máxima de variação explicável de 99,29 %, a variação explicada encontrada de 72,49 % demonstra ser aproximada o suficiente para corroborar com a importância de tais variáveis.

Tabela 2. Análise de Variância Cobre - Modelo Quadrático.

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	147.97709	6	24.662848	5.2711174	0.0070965
Resíduos	56.146384	12	4.6788653		
F. Ajuste	53.342336	8	6.667792	18.534113	0.006545
Erro Puro	1.4390313	4	0.3597578		
Total	204.12347	18			
% variação explicada				72.493911	
% máx. de variação explicável				99.295019	

FV – Fatores de Variância

SQ – Soma Quadrática

nGL – número de Graus de Liberdade

MQ – Média Quadrática

Fcalc. – F calculado

A comparação dos valores observados nos experimentos com os valores esperados com base na equação [1] está destacada na figura 2, sendo possível verificar o coeficiente linear de 0,8287. Este valor é um indicativo de que o processo de otimização da remoção do Cobre foi efetivo e que os resultados possuem significância (Moore et al., 2013).

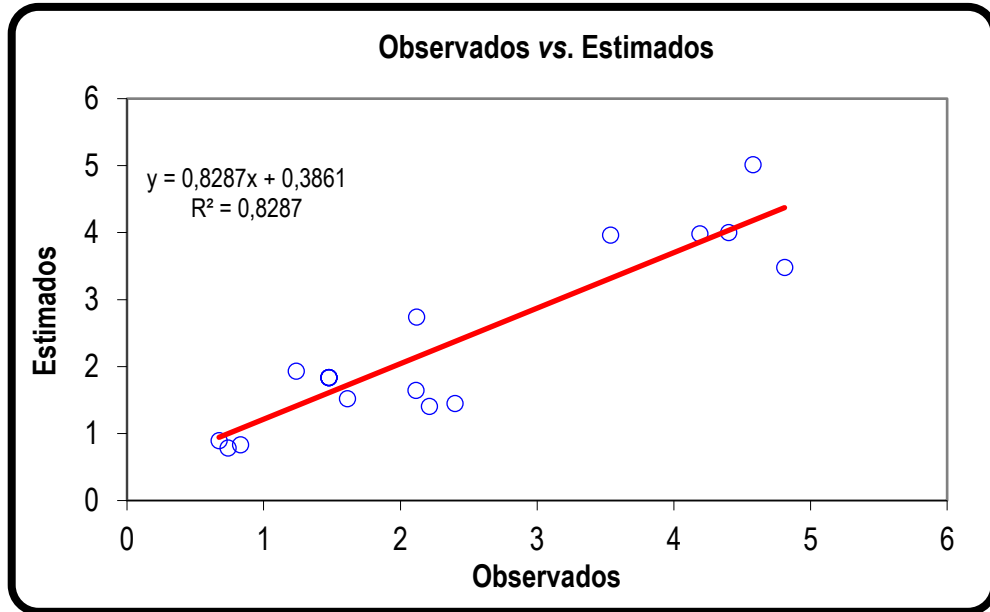


Figura 2. Análise da otimização da remoção de Cobre. Valores estimados e observados em uma equação linear com coeficiente linear de 0,8287.

Quando contrastamos a influência das variáveis na resposta da concentração final de Cobre após o tratamento com o BSF obtemos gráficos de resposta de superfície, como na figura 3, em que é possível verificar a interação da temperatura e da concentração do BSF e como essa interação impacta a remoção do Cobre. Do mesmo modo, na figura 4 observamos a interação do tempo e da concentração de BSF e na figura 5 a interação da temperatura e do tempo.

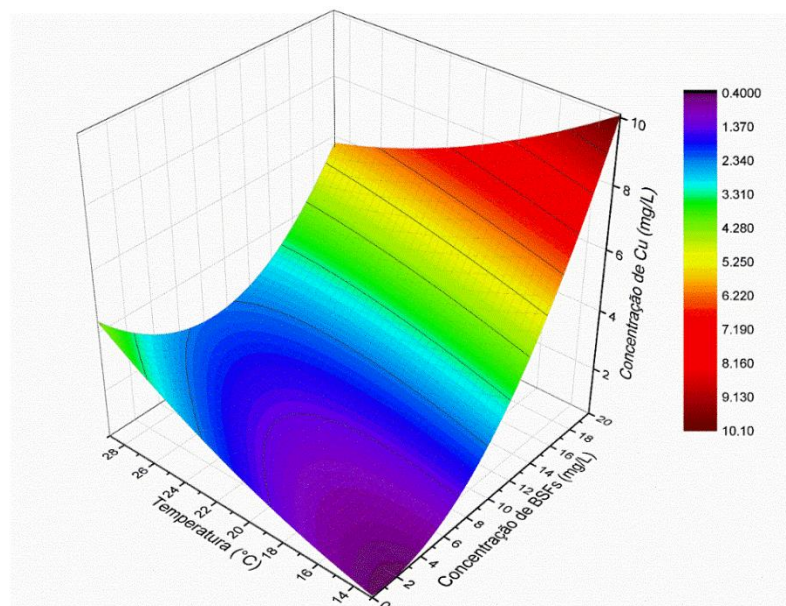


Figura 3. Influência da temperatura e concentração de BSFs na remoção de Cobre. Tendência de maior remoção em temperaturas mais baixas, como 14 °C, e concentrações de BSFs maiores, como 20 mg/L.

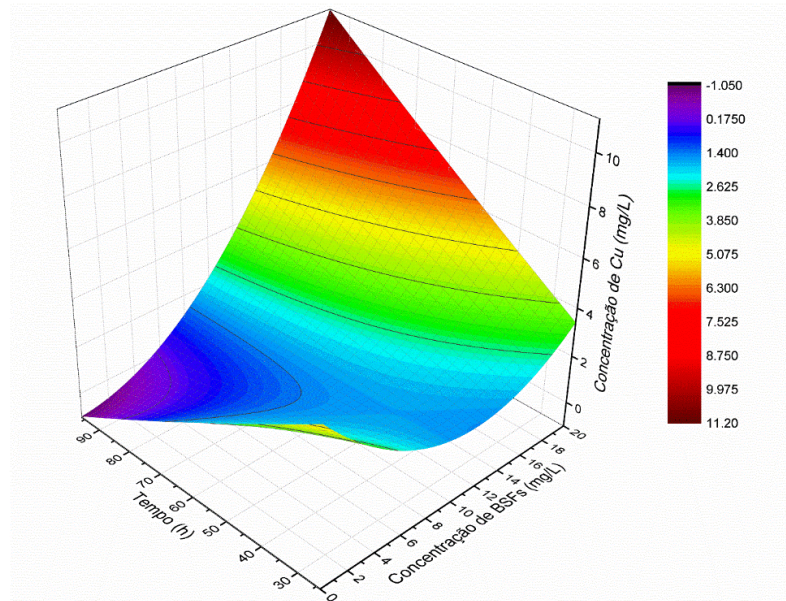


Figura 4. Influência do tempo e concentração de BSFs na remoção de Cobre. Tendência de maior remoção em ensaios de maior tempo, como 90 horas, e concentrações de BSFs maiores, como 20 mg/L.

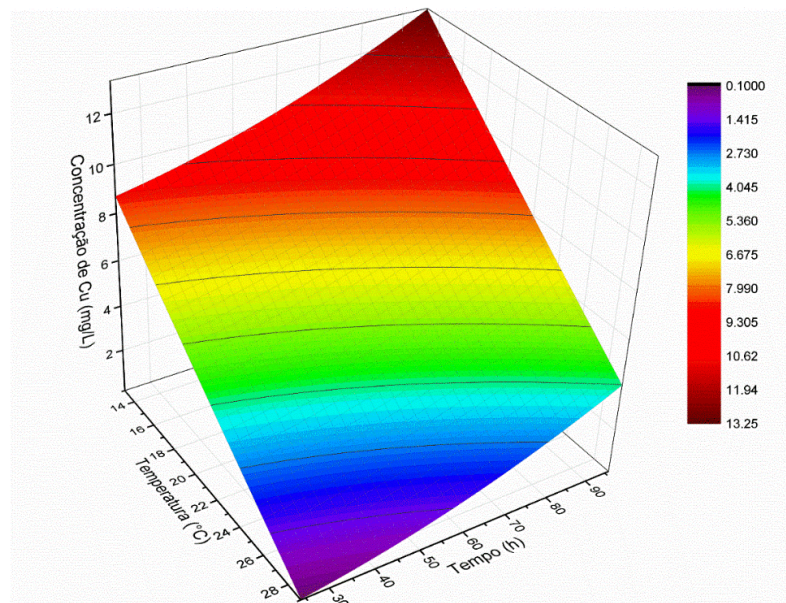


Figura 5. Influência da temperatura e tempo na remoção de Cobre. Tendência de maior remoção em temperaturas mais baixas, como 14 °C, e em ensaios de maior tempo, como 90 horas.

5.3 Análise de Pareto para Cobre

Por meio do Gráfico de Pareto evidencia-se as variáveis mais cruciais na escolha da melhor condição de remoção do Cobre (figura 6), sendo principalmente a interação BSF e tempo as estatisticamente relevantes.

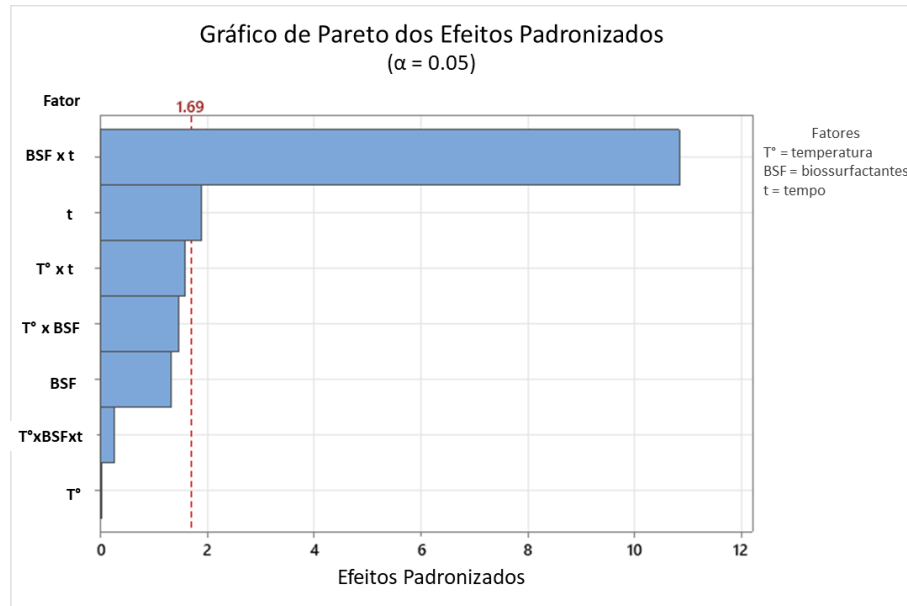


Figura 6. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados para ensaios com Cobre. Determinação de quais interações e/ou variáveis foram mais significativas para a remoção de Cobre com base nos Efeitos Padronizados, sendo a interação do BSF com o tempo a mais significativa. A diferença estatística ($p < 0,05$) entre as variáveis foi feita por two-way ANOVA.

5.4 Otimização para remoção de Ferro

Do mesmo modo utilizado para o Cobre, a otimização para remoção de Ferro é baseada no modelo estatístico cúbico que fornece uma equação [2], onde temperatura é representada por T, concentração de BSF por C e tempo por t. Tal equação é utilizada como modelo teórico para o processo de otimização do Ferro, sendo responsável pelos valores esperados descritos nas demais figuras e tabelas.

$$\text{Remoção de Fe} = -14.4 + (1.24 \cdot T) + (0.21 \cdot C) + (0.145 \cdot t) - (0.023 \cdot T^2) - (0.004 \cdot C^2) - (0.00006 \cdot t^2) + (0.009 \cdot T \cdot C) - (0.005 \cdot T \cdot t) - (0.0035 \cdot C \cdot t)$$

[2]

Tabela 3. Análise de Variância Ferro - Modelo Quadrático.

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	21.8923	9	2.43247	5.38266	0.009804239
Resíduos	4.06718	9	0.45191		
F. Ajuste	4.06718	5	0.81344	17.1956	0.0080472
Erro Puro	0	4	0		
Total	25.9594	18			
% variação explicada				84.33	

% máx. de variação explicável 100.00

FV – Fatores de Variância
 SQ – Soma Quadrática
 nGL – número de Graus de Liberdade
 MQ – Média Quadrática
 Fcalc. – F calculado

Novamente vemos que o p calculado ficou abaixo de 0.05 e a regressão de Fcalc. ficou bem acima do teste p , porém abaixo do F. Ajuste. Isso significa que o planejamento fatorial também é estatisticamente relevante.

É possível observar na figura 7 a relação entre os valores observados e esperados, resultando em uma equação da reta com coeficiente linear de 0,8433. Destacando que o processo de otimização foi efetivo e possui resultados significativos.

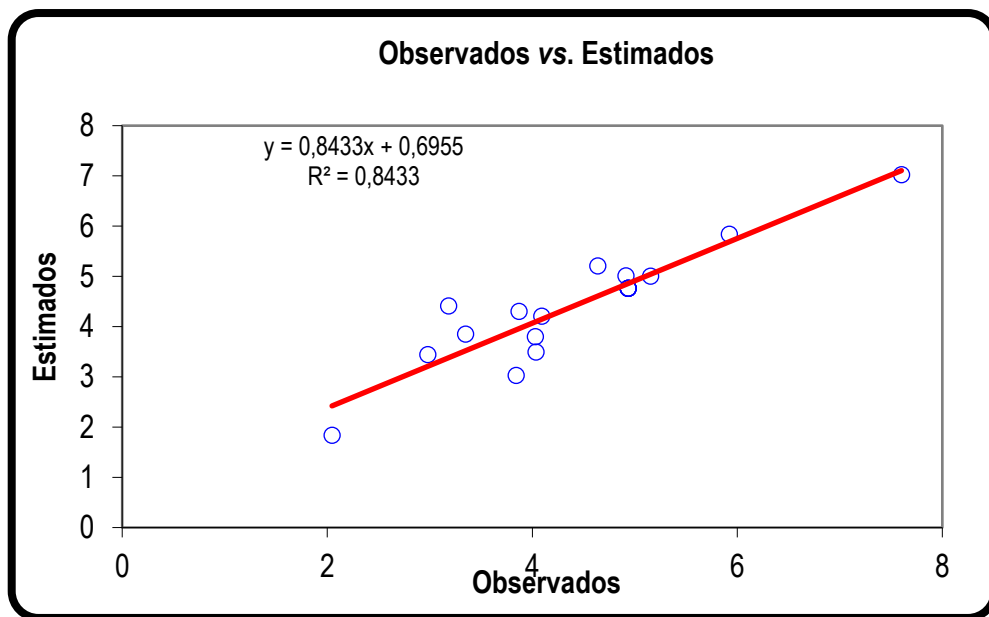


Figura 7. Análise da otimização da remoção de Ferro. Valores estimados e observados em uma equação linear com coeficiente linear de 0,8433.

A influência das variáveis na concentração final de Ferro nas amostras após o tratamento com o BSF é evidenciada nas figuras 8, 9 e 10. Nessas figuras observamos, respectivamente, a interação da temperatura e concentração do BSF, do tempo e concentração de BSF e da temperatura com o tempo e como essas interações impactam o processo de remoção do Ferro.

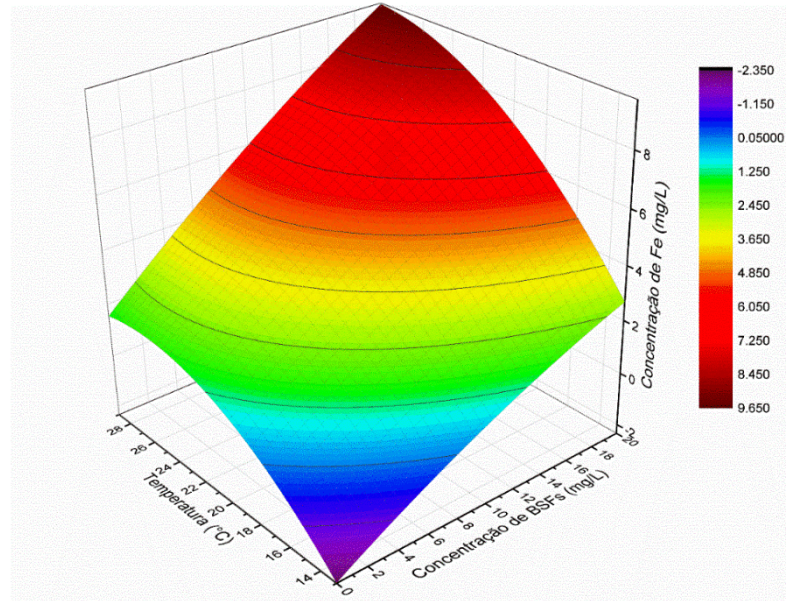


Figura 8. Influência da temperatura e concentração de BSFs na remoção de Ferro. Tendência de maior remoção em temperaturas mais altas, como 28 °C, e concentrações de BSFs maiores, como 20 mg/L.

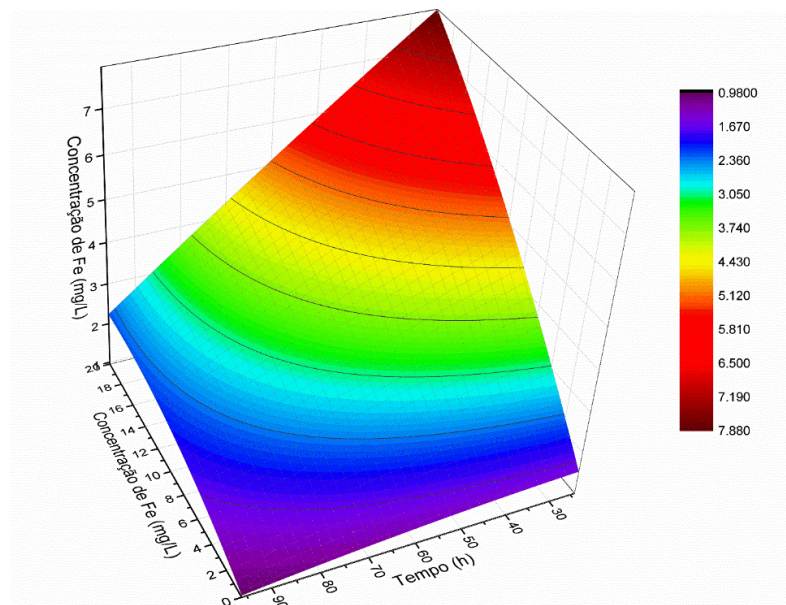


Figura 9. Influência do tempo e concentração de BSFs na remoção de Ferro. Tendência de maior remoção em ensaios de menor tempo, como 30 horas, e concentrações de BSFs maiores, como 20 mg/L.

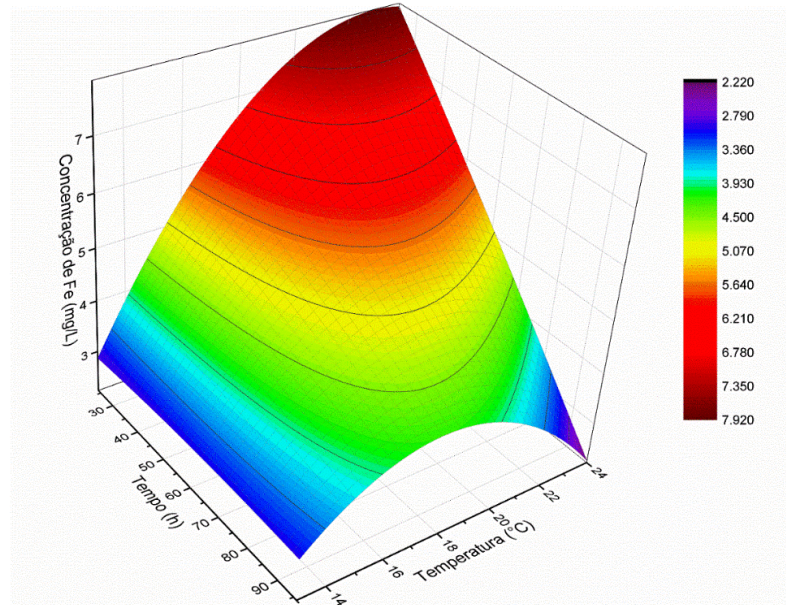


Figura 10. Influência da temperatura e tempo na remoção de Ferro. Tendência de maior remoção em temperaturas mais altas, como 24 °C, e em ensaios de menor tempo, como 30 horas

5.5 Análise de Pareto para Ferro

As variáveis mais importantes na remoção de Ferro estão demonstradas no Gráfico de Pareto na figura 11, destacando-se o BSF, o tempo e as interações entre tempo com o BSF e com a temperatura.

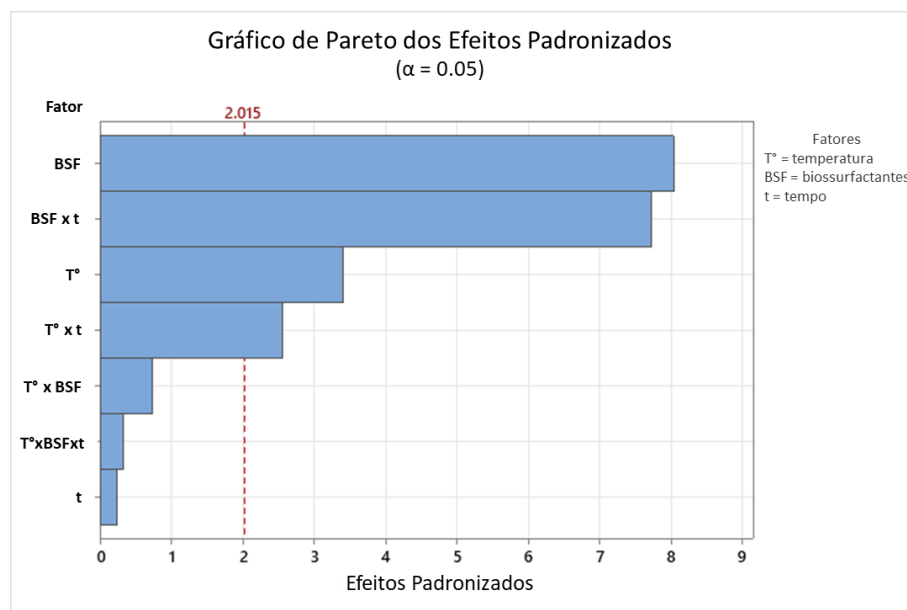


Figura 11. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados para ensaios com Ferro. Determinação de quais interações e/ou variáveis foram mais significativas para a remoção de Ferro com base nos Efeitos Padronizados, sendo as variáveis BSF e temperatura e as

interações do BSF com o tempo e do tempo com a temperatura as mais significativas. A diferença estatística ($p < 0,05$) entre as variáveis foi feita por two-way ANOVA.

5.6 Ensaio de condutividade

A fim de verificar possíveis alterações na condutividade das soluções com metais quando adicionados os BSFs, foram realizados testes de condutividade para os metais Cu (figura 13) e Fe (figura 14). Verifica-se uma diminuição significativa na condutividade nas soluções tratadas com BSFs em comparação com as soluções controle, tanto para o Cu quanto para o Fe.

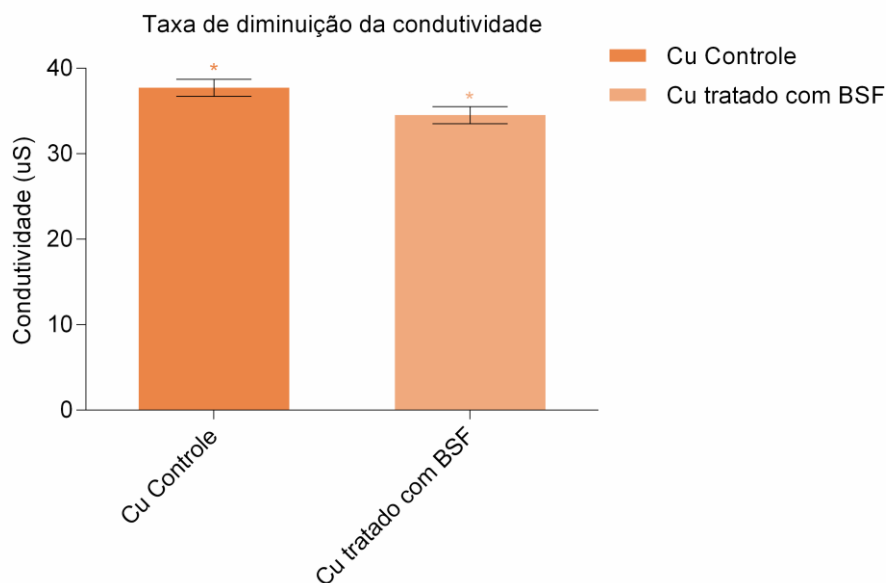


Figura 12. Taxa de diminuição da condutividade para Cobre. Determinação dos valores de condutividade para as soluções de Cu controle e as tratadas com BSF, notando-se uma diferença estatística entre estes. O símbolo (*) representa diferença estatística significativa entre controle e tratado. A análise estatística foi feita através de teste t com $p < 0,05$.

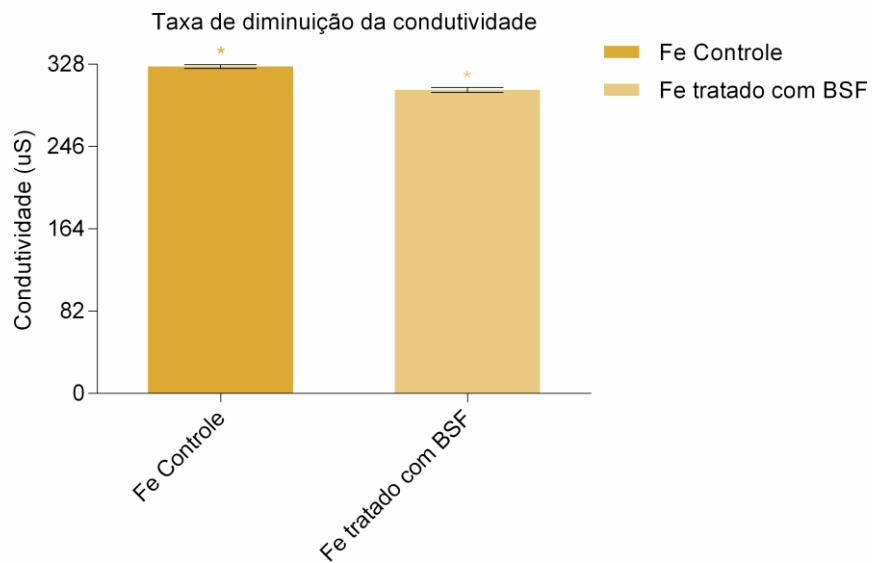


Figura 13. Taxa de diminuição da condutividade para Ferro. Determinação dos valores de condutividade para as soluções de Fe controle e as tratadas com BSF, destacando-se uma diferença significativa entre estes. O símbolo (*) representa diferença estatística significativa entre controle e tratado. A análise estatística foi feita através de teste t com $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A remediação de metais potencialmente tóxicos mostra-se um problema urgente de ser tratado, uma vez que há poucos avanços nessa área, assim pesquisas como esta são cruciais para o desenvolvimento de novos tratamentos capazes de recuperar áreas afetadas, seja pela indústria mineradora ou por quaisquer outros eventuais agentes contaminadores. Com base nos resultados aqui apresentados e também presentes na literatura, podemos destacar a importância dos biossurfactantes no tratamento de meios poluídos com metais potencialmente tóxicos, servindo como quelantes destes contaminantes.

Devido às características próprias de cada classificação de biossurfactantes há uma divergência sobre quais contaminantes se ligarão mais facilmente às moléculas e, portanto, quais devem ser utilizados. Biossurfactantes de lipopeptídeos, como o produzido por *B. amyloliquefaciens* MO13, fazem parte do grupo dos BSFs de baixo peso molecular e são muito eficientes na biorremediação, uma vez que possuem alta capacidade de diminuir a tensão superficial do meio e de quelar íons (Mishra et al., 2021). Considerando que metais são compostos inorgânicos, sendo assim não biodegradáveis, entende-se que para alterar sua toxicidade em determinado ambiente é necessário mobiliza-lo de alguma forma, como por ligação a alguma molécula capaz de recuperá-lo ou de biodisponibilizá-lo (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

Dessa forma, os metais positivamente carregados ligam-se facilmente às moléculas negativamente carregadas de BSF. Essa ligação possivelmente ocorre entre aos aminoácidos presentes nos lipopeptídeos, como os do anel proteico da surfactina, e os metais, havendo indícios de que o Cobre se liga diretamente aos nitrogênios da amina enquanto outros metais divalentes ligam-se aos oxigênios remanescentes (Janek et al., 2019). Não se sabe, por outro lado, onde os metais trivalentes, como o Ferro, ligam-se, entretanto, é possível que exista uma ligação em mais de um ponto das moléculas do BSF, assim como é possível que o Ferro esteja sendo reduzido a Ferro divalente devido a algum ponto do processo de biorremediação. O complexo entre metal-lipopeptídeo possivelmente deve-se a ligações de Van der Waals, sendo que ligações de hidrogênio ajudam a estabilizar esse complexo (Janek et al., 2019).

Como é possível observar na figura 1, cada BSF interage mais com alguns metais e menos com outros, isso se deve às características específicas das moléculas que

compõem o BSF. No caso do BSF utilizado esperava-se que houvesse uma interação maior com os metais Zinco e Chumbo (de França et al., 2015; Singh & Cameotra, 2013), no entanto pouco houve remoção destes metais quando usado o tratamento com BSF (tabela 1). Possivelmente esse processo esteja ocorrendo devido a uma provável presença de Sódio no BSF produzido por *B. amyloliquefaciens*, remanescente do seu processo de produção, uma vez que o Sódio acaba ligando-se no BSF justamente nos pontos de interação mais disponíveis ao Zinco e Chumbo, não permitindo que a ligação ocorra (Hong et al., n.d.). Sabendo desse possível interferente foi realizada uma diálise do BSF em questão para tentar diminuir o efeito do Sódio na ligação dos metais com o BSF, no entanto não se mostrou efetiva (dados não mostrados), sendo talvez necessário modificar o processo de remoção do Sódio. Quanto à baixa efetividade na remoção do Cromo, Cádmiio e Cobalto (tabela 1), entende-se que possivelmente esses metais ligam-se em sítios do BSF que já estão ocupados e, portanto, não ocorre a interação.

O processo de otimização para remoção do Cobre demonstrou-se satisfatório, uma vez que as variáveis foram significativas (tabela 2) e a comparação entre valores observados e esperados também (figura 2) que contém um R^2 satisfatório e maior que 0,75, aceitável em processos de otimização (Moore et al., 2013). Dessa forma, observamos pelos gráficos de superfície de resposta do Cobre uma clara tendência de remediação em temperaturas mais baixas, concentração de BSFs maiores e ensaios de maior duração (figuras 3, 4 e 5). Entretanto, ao analisar a influência de cada variável e interação no resultado final de remoção do Cobre percebemos um predomínio da interação BSF e tempo (figura 6), destacando que talvez a temperatura não seja relevante para a remoção do Cobre. O aumento na agitação das moléculas proporcionado pelo aumento da temperatura pode não influenciar tanto na interação do Cobre, não sendo assim uma variável tão influente na remoção do mesmo.

Quando analisamos o processo de otimização de remoção do Ferro verificamos que também foi satisfatório, devido a significância das variáveis, destacada na tabela 3, e também da comparação de valores observados e esperados (figura 7) que contém um R^2 satisfatório e maior que 0,75, aceitável em processos de otimização (Moore et al., 2013). Os gráficos de superfície de resposta do Ferro (figuras 8, 9 e 10) evidenciam uma tendência de remediação em temperaturas mais altas, concentração de BSFs maiores e ensaios de menor duração. Por meio do gráfico de Pareto (figura 11) verificamos que as variáveis mais influentes na remoção do Ferro foram a

concentração dos BSFs e temperatura, assim como as interações entre o BSF e tempo e entre temperatura e tempo. Assim, destaca-se a influência de diversos pontos, possivelmente devido ao Ferro estar presente na forma trivalente e, portanto, ligar-se de maneira mais complexa ao BSF, sendo fundamental uma alta agitação das moléculas do sistema para que esse processo ocorra e eventualmente não permitindo uma ligação tão estável, uma vez que com períodos maiores de tempo a interação possivelmente se quebra.

Com base em diversos estudos (Mishra et al., 2021; Sarubbo et al., 2022), há a possibilidade dos BSFs utilizados estarem formando micelas no processo de biorremediação e essa estrutura auxiliar na remoção dos metais. A biorremediação por biossurfactantes muitas vezes da-se por meio do sequestro dos contaminantes pelas micelas, uma vez que BSFs são moléculas anfifílicas com alta capacidade de formar micelas (Mulligan, 2005)

Quando verificamos a influência da adição de BSFs na condutividade das soluções (figuras 12 e 13) deduzimos que há entre os metais e os BSFs algum tipo de ligação, uma vez que sem os BSFs a condutividade da solução é maior, ou seja, há mais íons livres conduzindo energia, enquanto quando em presença dos BSF há menos íons livres resultando em uma menor condutividade (Luna et al., 2016). Tal ensaio corrobora com a hipótese de que esteja havendo ligação entre as moléculas dos BSFs e os metais analisados.

De modo geral, seja por meio de ligações de Van der Waals ou formação de micelas, há evidências de que biossurfactantes lipopeptídicos, como o utilizado nesse trabalho, atuam ativamente na remoção de Cu e Fe dos meios aquosos, sendo necessário ainda compreender melhor por qual mecanismo essa remoção está ocorrendo.

7 CONCLUSÃO

A extração de metais pela mineração é extremamente necessária para vida como conhecemos e para novos avanços tecnológicos, assim é impossível simplesmente extinguí-la para evitar os danos consequentes desse processo. Por conseguinte, torna-se fundamental existirem alternativas que tratem dos efeitos ao ecossistema causados pela mineração. Dentro disso, a utilização de biossurfactantes para biorremediação de metais potencialmente tóxicos mostra-se uma boa opção de tratamento, uma vez que não afeta o ambiente com outros tipos de contaminantes.

Nesse trabalho, foram realizados ensaios de biorremediação de metais potencialmente tóxicos através do uso do biossurfactante produzidos por *B. amyloliquefaciens* MO13. Tais ensaios tiveram o objetivo de verificar a efetividade do uso de BSFs para esse tipo de tratamento e ainda otimizar esse processo, buscando as melhores condições de biorremediação.

Os experimentos com Zinco, Cromo, Cádmio, Cobalto, Chumbo, Ferro e Cobre demonstraram maiores taxas de remoção para Cobre e Ferro. Estes seguiram para ensaios de otimização por uma remoção mais efetiva, onde notou-se principalmente uma influência do aumento da concentração de BSFs. O aumento da temperatura teve influência positiva para o Ferro e negativa para o Cobre. Já o maior tempo teve o resultado oposto, positivo para o Cobre e negativo para o Ferro. Por meio dos ensaios com Cobre e Ferro, foram obtidas taxas de remoção de 73,45 e 86,85%, respectivamente, demonstrando a relevância e aplicabilidade deste trabalho.

A partir disso, foram levantadas hipóteses de como os biossurfactantes podem estar atuando para a remoção destes metais, dentre elas há a possibilidade de ocorrerem ligações de Van der Waals entre os metais e os BSFs ou então estar ocorrendo o sequestro dos metais pelas micelas formadas pelos BSFs.

Apesar de observada uma boa otimização, são necessários mais estudos para verificar a condição ótima de remoção destes metais, partindo dos estudos aqui presentes e aumentando a variação dos parâmetros analisados. Além disso, pesquisas *in sílico* mostram-se fundamentais para entender melhor o processo de interação dos metais com as moléculas dos BSFs e assim aumentar a efetividade do processo de remoção. Por fim, é importante haver estudos que visem a aplicação dessa ferramenta em meios contaminados reais, possibilitando sua utilização prática.

REFERÊNCIAS

- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1). <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>
- Amin, N. U., Hussain, A., Alamzeb, S., & Begum, S. (2013). Accumulation of heavy metals in edible parts of vegetables irrigated with waste water and their daily intake to adults and children, District Mardan, Pakistan. *Food Chemistry*, 136(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.058>
- Aronsson, P., & Perttu, K. (2001). Willow vegetation filters for wastewater treatment and soil remediation combined with biomass production. *Forestry Chronicle*, 77(2). <https://doi.org/10.5558/tfc77293-2>
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. In *Heliyon* (Vol. 6, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- Castro, P. de T. A. (2021). Desastres de Mariana e Brumadinho. *Caderno de Geografia*, 31(1). <https://doi.org/10.5752/p.2318-2962.2021v31nesp1p196>
- CONAMA. (2005). Resolução CONAMA 357/2005. *Diário Oficial de União*, 053.
- da Rocha Junior, R. B., Meira, H. M., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2019). Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. *Biodegradation*, 30(4). <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9833-1>
- Dai, S., & Finkelman, R. B. (2018). Coal as a promising source of critical elements: Progress and future prospects. In *International Journal of Coal Geology* (Vol. 186). <https://doi.org/10.1016/j.coal.2017.06.005>
- Dai, S., Graham, I. T., & Ward, C. R. (2016). A review of anomalous rare earth elements and yttrium in coal. In *International Journal of Coal Geology* (Vol. 159). <https://doi.org/10.1016/j.coal.2016.04.005>
- de França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M., de Sant'ana, H. B., & Gonçalves, L. R. B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- Dissertação de Mestrado do Henrique.* (n.d.).

- Dutta, M., Islam, N., Rabha, S., Narzary, B., Bordoloi, M., Saikia, D., Silva, L. F. O., & Saikia, B. K. (2020). Acid mine drainage in an Indian high-sulfur coal mining area: Cytotoxicity assay and remediation study. *Journal of Hazardous Materials*, 389. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121851>
- Gautam, P. K., Gautam, R. K., Banerjee, S., Chattopadhyaya, M. C., & Pandey, J. D. (2016). Heavy metals in the environment: Fate, transport, toxicity and remediation technologies. In *Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques*.
- Green, A. J., & Planchart, A. (2018). The neurological toxicity of heavy metals: A fish perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.008>
- Hong, K.-J., Tokunaga, S., & Kajiuchi, T. (n.d.). *Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils*. www.elsevier.com/locate/chemosphere
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 275). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Janek, T., Rodrigues, L. R., Gudiña, E. J., & Czyżnikowska, Ż. (2019). Metal-biosurfactant complexes characterization: Binding, self-assembly and interaction with bovine serum albumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122864>
- Lucas da Silva Rêgo, L., Augusto de Almeida, L., & Gasparotto, J. (2022). Toxicological effects of mining hazard elements. *Energy Geoscience*. <https://doi.org/10.1016/j.engeos.2022.03.003>
- Luna, J. M., Rufino, R. D., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Safety and Environmental Protection*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010>
- Menezes, C. T. B., Barros, E. C., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2011). Replacing synthetic with microbial surfactants as collectors in the treatment of aqueous effluent produced by acid mine drainage, using the dissolved air flotation technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(4). <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9060-7>

- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, Y., Bhatt, P., & Chen, S. (2021). Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 418). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253>
- Moore, D. S., Notz, W. I., & Flinger, M. A. (2013). The Basic Practice of Statistics (6th ed.) and Correlation. In *Freeman and Company*.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Mulligan, C. N. (2021). Sustainable Remediation of Contaminated Soil Using Biosurfactants. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.635196>
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
- Sani, A., Idris, K. M., Abdullahi, B. A., & Darma, A. I. (2022). Bioaccumulation and health risks of some heavy metals in *Oreochromis niloticus*, sediment and water of Challawa river, Kano, Northwestern Nigeria. *Environmental Advances*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100172>
- Sarubbo, L. A., Silva, M. da G. C., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 181). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>
- Singh, A. K., & Cameotra, S. S. (2013). Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1752-4>
- Sodrzeieski, P. A., de Andrade, L. C., Tiecher, T., & Camargo, F. A. de O. (2019). Physico-chemical variability and heavy metal pollution of surface sediment in a non-channeled section of Dilúvio Stream (Southern Brazil) and the influence of channeled section in sediment pollution. *Revista Ambiente e Agua*, 14(1). <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2285>

- Teófilo, R. F., & Ferreira, M. M. C. (2006). Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29(2). <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000200026>
- Ugbede, F. O., Aduo, B. C., Ogbonna, O. N., & Ekoh, O. C. (2020). Natural radionuclides, heavy metals and health risk assessment in surface water of Nkalagu river dam with statistical analysis. *Scientific African*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00439>
- United States Environmental Protection Agency. (2014). Bypassing Credit Control.pdf. *Priority Pollutant List*.

