



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**POTENCIAL DO USO DE BIOSSURFACTANTES NO
TRATAMENTO DE ÁGUA CONTAMINADA COM METAIS
TÓXICOS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FASES**

LARYSSE CAIXETA FERREIRA

Uberlândia –MG

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**POTENCIAL DO USO DE BIOSSURFACTANTES NO TRATAMENTO DE
ÁGUA CONTAMINADA COM METAIS TÓXICOS PELO MÉTODO DE
EXTRAÇÃO DE FASES**

Larysse Caixeta Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho.

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383p
2017 Ferreira, Larysse Caixeta, 1990-
 Potencial do uso de biossurfactantes no tratamento de água
 contaminada com metais tóxicos pelo método de extração de fases /
 Larysse Caixeta Ferreira. - 2017.
 99 f. : il.

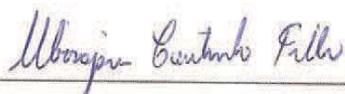
 Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1130>
 Inclui bibliografia.

 1. Engenharia química - Teses. 2. Metais pesados - Aspectos
 ambientais - Teses. 3. Águas residuais - Purificação - Teses. I. Coutinho
 Filho, Ubirajara. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
 Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 20/04/2017

BANCA EXAMINADORA:



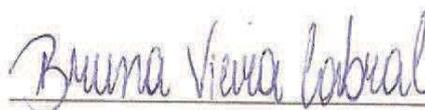
Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho.
Orientador (PPG-EQ/UFU)



Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso.
(PPG-EQ/UFU)



Profª. Drª. Miriam Maria de Resende.
(PPG-EQ/UFU)



Profª. Drª. Bruna Vieira Cabral.
(UFTM)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho, concedendo-me saúde e iluminação para que esse caminho fosse trilhado.

Aos meus pais, Maria Geralda e José, pela compreensão, apoio e suporte de sempre.

A minha irmã Layse, pela compreensão e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, pela orientação, oportunidade, paciência, ensinamentos e disponibilidade para que esse trabalho fosse desenvolvido.

As professoras doutoras Vicelma Luiz Cardoso, Miriam Maria de Resende e Bruna Vieira Cabral pelas diversas contribuições e disponibilidade no desenvolvimento do trabalho.

As minhas amigas Carol e Marina pela amizade, carinho e apoio de sempre.

Aos colegas da NucBio, pela ajuda e apoio durante a realização do trabalho.

A FEQUI pela disponibilidade de infraestrutura.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	2
2.1 – Geral.....	2
2.2 – Específicos	2
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 – Metais pesados	3
3.2 – Contaminação em ambientes aquáticos por metais pesados	4
3.2.1 – Ferro	4
3.2.2 – Manganês	6
3.2.3 – Zinco	8
3.3 – Surfactante	9
3.4 – Biossurfactantes	10
3.5 – Membrana líquida de emulsão	13
3.6 – Agentes complexantes	17
3.7 – Uso de modelos de redes neurais artificiais no estudo da remoção de metais.....	20
3.8 – Otimização do modelo pelo método de colônia artificial de abelhas (ABCoptim) ...	22
4– MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 – Microrganismos	24
4.2 – Meios de cultura	24
4.2.1 - Meio de manutenção das leveduras	24
4.2.2 - Meio de manutenção das cepas	24
4.2.3 - Meio de cultura para crescimento do microrganismo	25
4.2.4 - Meio utilizado no processo de fermentação	26
4.2.5 - Meio utilizado no processo de fermentação empregando glicerol como substrato	26
4.3– Avaliação da produção de biossurfactante	27
4.3.1 – Tensão superficial	27
4.3.2 – Índice de emulsificação	28
4.3.3 – Biomassa	28
4.3.4 – Concentração de surfactante	29

4.3.5 – Concentração de raminose	29
4.4– Produção da membrana líquida de emulsão	29
4.4.1 – Estudo de formação das emulsões iniciais	30
4.4.2 – Estudo de formação das emulsões utilizando a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4.5– Processo de remoção dos metais	32
4.5.1 – Solução metálica	32
4.5.2 – Remoção por meio da membrana.....	33
4.5.3 – Concentração final e remoção dos metais	33
4.6– Planejamento experimental e otimização.....	33
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 – Determinação da produção de biossurfactante pelas leveduras	36
5.2 – Remoção dos metais	38
5.2.1 – Remoção utilizando a levedura como microrganismo	39
5.2.2 – Remoção utilizando a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como microrganismo	40
5.3 – Avaliação da produção de biossurfactante a partir da fermentação com a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando glicerol como substrato	43
5.3.1 – Remoção dos metais zinco, ferro e manganês utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e glicerol como substrato no meio fermentativo	48
5.4 – Planejamento para remoção dos metais ferro e manganês utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e glicerol como substrato no meio fermentativo.....	55
6 – CONCLUSÃO.....	65
6.1 – Conclusão	65
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Representação esquemática de um tensoativo (adaptado de SCHRAMM, 2000).	9
Figura 3.2 - Estrutura da molécula de um ramnolipídio (Cameotra & Makkar, 1998).....	12
Figura 3.3 - Representação esquemática das estruturas simples e múltiplas (BOUYER <i>et al.</i> , 2012).	14
Figura 3.4 - Esquema da preparação da membrana líquida iônica de emulsão (LENDE <i>et al.</i> , 2014)	16
Figura 3.5 - Esquema do processo da membrana de emulsão de surfactante (LENDE, 2016).	17
Figura 3.6 - Estrutura molecular do EDTA (OVIEDO & RODRÍGUEZ, 2003).....	18
Figura 3.7 - Esquema do processo de permeação do íon metálico, sendo f: solução alimentação (solução metálica contendo os íons), s: solução de retirada e m: membrana líquida (WÓDZKI <i>et al.</i> , 1999).....	19
Figura 3.8 - - Estrutura molecular do D ₂ EHPA (Yang <i>et al.</i> , 2009).	19
Figura 3.9 – Esquema da arquitetura da rede neural constituída pelas variáveis de entrada (Tempo, D ₂ EHPA, H ₂ SO ₄ , EDTA e NaCl), as camadas ocultas e saída (Remoção) (Adaptado de Peng <i>et al.</i> , 2013)	21
Figura 4.1 - Tensiômetro utilizado nas análises de tensão superficial (Foto tirada pelo autor).	28
Figura 4.2 - Agitador mecânico utilizado na formação da emulsão (foto tirada pelo autor)..	30
Figura 4.3 - Esquema ilustrativo do agitador mecânico utilizado na formação da emulsão (ilustração feita pelo autor).....	31
Figura 4.4 - Formação da emulsão no agitador mecânico (foto tirada pelo autor).	31
Figura 4.5 – Fluxograma do processo de otimização utilizando redes neurais.	35
Figura 5.1 - Concentrações finais para o metal manganês em ppm utilizando a levedura <i>Cystofilo basidium</i> (L46) para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de	

EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas em 3,6 e 9 minutos.....	39
Figura 5.2 - Remoções em porcentagem para o metal manganês utilizando a levedura <i>Cystofilo basidium</i> (L46) para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3, 6 e 9 minutos.....	40
Figura 5.3 - Concentrações finais em ppm para o metal manganês utilizando a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas em 3, 6 ,9 e 12 minutos.....	41
Figura 5.4 - Remoções em porcentagem para o metal manganês utilizando a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2 % de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3, 6, 9 e 12 minutos.....	41
Figura 5.5 - Concentrações finais em ppm do controle para o metal manganês utilizando a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3, 6, 9 e 12 minutos.....	42
Figura 5.6 - Remoções em porcentagem do controle para o metal manganês utilizando a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2 % de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3, 6, 9 e 12 minutos.....	43
Figura 5.7 - Concentração de biomassa média formada ao longo do período de 24 a 120 horas	44
Figura 5.8 - Índice de emulsificação médio no período de 24 a 120 horas	45
Figura 5.9 - Tensão superficial ao longo do período de 24 a 120 horas	46
Figura 5.10 - Concentração de surfactante avaliado no período de 24 horas a 120 horas	47
Figura 5.11 - Concentração de raminose avaliado no período de 24 a 120 horas	48
Figura 5.12 - Gráfico da concentração final de Zinco em ppm utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.....	49

Figura 5.13 - Gráfico da remoção de Zinco em porcentagem (%) utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.....	50
Figura 5.14 - Gráfico da concentração final de Ferro em ppm utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 g/L de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.....	51
Figura 5.15 - Gráfico da remoção do Ferro em porcentagem (%) utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.....	51
Figura 5.16 - Gráfico da concentração final de Manganês em ppm utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos	52
Figura 5.17 - Gráfico da remoção do Manganês em porcentagem (%) utilizando o microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.....	53
Figura 5.18 - Gráfico da concentração final de manganês em ppm, obtida no controle de água com o metal para cada condição de EDTA, NaCl, NaOH e HCl, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.	54
Figura 5.19 - Gráfico da remoção de manganês em (%), obtida no controle de água com o metal para cada condição de EDTA, NaCl, NaOH e HCl, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos	54
Figura 5.20 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à remoção de manganês	57
Figura 5.21 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D ₂ EHPA e tempo)	59
Figura 5.22 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D ₂ EHPA e ácido)	59

Figura 5.23 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D ₂ EHPA e NaCl)	60
Figura 5.24 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D ₂ EHPA e EDTA).....	61
Figura 5.25 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (tempo e ácido sulfúrico)	61
Figura 5.26 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (EDTA e ácido sulfúrico).....	62
Figura 5.27 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (NaCl e ácido sulfúrico).....	63
Figura 5.28 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (NaCl e tempo).....	63
Figura 5.29 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (NaCl e EDTA)	64
Figura 5.30 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (EDTA e tempo).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Principais minerais de manganês, suas fórmulas e composições químicas	6
Tabela 3.2 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos	11
Tabela 3.3 – Função de cada abelha no método de abelhas	23
Tabela 4.1 – Composição do meio universal.....	24
Tabela 4.2 – Composição do meio de cultura em gelose	25
Tabela 4.3 – Composição do meio de cultura para crescimento do microrganismo	25
Tabela 4.4 – Composição do meio de crescimento da levedura.....	26
Tabela 4.5 – Composição do meio de fermentação.....	26
Tabela 4.6 – Composição para o meio fermentativo para produção de biossurfactante	27
Tabela 4.7 – Concentrações para obtenção das emulsões	30
Tabela 4.8 – Ensaio com a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> variando o EDTA, NaCl, NaOH, HCl e a concentração de surfactante	32
Tabela 4.9 – Fatores e os níveis do planejamento	33
Tabela 4.10 – Planejamento de experimentos	34
Tabela 5.1 – Concentração de biomassa.....	36
Tabela 5.2 – Tensão superficial.....	37
Tabela 5.3 – Resultado do índice de emulsificação.....	37
Tabela 5.4 – Resultado do índice de emulsificação.....	38
Tabela 5.5 – Resultado do planejamento para o ferro e manganês	55
Tabela 5.6 – Dados do número de neurônios e os respectivos erros absolutos médios	56
Tabela 5.7 – Valores ótimos encontrados através das redes neurais para os metais	57

RESUMO

O avanço dos processos industriais tem contribuído com o aumento da presença de metais pesados no ambiente, alertando a sociedades para as características de toxicidade, abundância, prevalência no ambiente e não biodegradabilidade desses elementos. O processo de remediação e o uso de tecnologias de metais pesados em ambientes aquáticos são de grande importância porque esses sistemas, na maioria dos casos, são os grandes receptores dos metais, por meio de efluentes industriais e acidentes ambientais. Neste contexto a remediação por membrana de emulsão de surfactante (MES) se destaca como forma eficiente no processo de remoção de metais, uma vez que já foi avaliada com sucesso para remoção de Pb (II) e outros metais. O presente trabalho estudou a remoção dos metais ferro, zinco e manganês pelo uso membrana líquida de emulsão de surfactante formada a partir de soluções de biossurfactantes não purificadas de *Cystofilo basidium* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram avaliadas diferentes condições de fermentações e diferentes composições de membranas constituídas por cloreto de sódio, EDTA, NaOH, HCl e ácido di-(2-etil-hexil)fosfórico. Referente as fermentações nas condições testadas, os resultados mais favoráveis foram os obtidos com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Referente as membranas verificou-se remoções satisfatórias nas condições básicas e ácidas, sendo que houve a remoção por retenção do metal na membrana e formação de um precipitado nas condições básicas, mas que somente por contenção do metal nas membranas condições ácidas. Diante do interesse de desenvolvimento da remoção pela contenção do metal na membrana, estudou-se a otimização da remoção de membranas com as variáveis EDTA, cloreto de sódio, H₂SO₄, o ácido di-(2-etil-hexil)fosfórico e o tempo para os metais manganês e ferro por planejamento composto central (PCC) de cinco níveis, em que se obteve uma remoção máxima de 30% para o ferro e 25% para o manganês. Através dos dados de remoção obtidos pelo PCC, avaliou-se o modelo descritivo da remoção pelo uso de redes neurais, utilizando o método de colônia de abelhas (ABCoptim), que possibilitou avaliar condições otimizadas com remoção máxima de 48% para o ferro e de 33% para o manganês. Referente as condições encontradas para esses valores de remoção, foi realizado experimentalmente os ensaios para a remoção desses metais, para a validação do modelo, em que foi obtido um valor de 36% de remoção para o manganês, com erro relativo de 10%, sendo essas remoções, valores superiores aos encontrados na literatura para esse metal.

Palavras-chave: metais pesados, biossurfactante, ferro, manganês, zinco e membranas líquidas.

ABSTRACT

The advancement of industrial processes has increased the presence of heavy metals in the environment, and the characteristics like toxicity, abundance, prevalence in the environment and non-biodegradability of these elements has provoked the attention of the global society. The technology used to reduce the heavy metals in aquatic environments are of great importance for purpose the removal of these compounds in the environment, because these systems, in most cases, are the receivers of the metals, through industrial effluents and environmental accidents. In this context, the removal of metals based on surfactant emulsion membrane (SEM) proved to be effective in the Pb (II) like as removal of other metals. The present work studied the removal of iron, zinc and manganese metals using SEM produced using *Cystofilo basidium* and *Pseudomonas aeruginosa* fermented mediums as source of not purified biosurfactant and different chemical composition of SEM as regarding addition of NaCl, NaOH, HCl and di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid. Removals were found to be satisfactory on basic and acid conditions, but in basic conditions part of metal removal was related to not soluble metal compounds. Following the fact the significant removal was related to precipitation in basic membranes it has been chosen to study acid form and a central composite design (CCD) with EDTA, sodium chloride, H₂SO₄, di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid and time as variables, and five levels was proposed for iron and manganese metals, which a maximum removal was 30% to iron and 25% to manganese. An artificial neural network (ANN) descriptive model of removal of metals was studied using artificial bee colony methodology optimization (ABCoptim) found the maximum removal to iron and manganese were, respectively, 48 and 33%. Regarding the conditions found for these removal values, the tests were carried out experimentally for the removal of these metals, for the validation of the model, a value of 36% of removal was obtained for manganese, with a relative error of 10%, being these removals, values higher than those found in the literature for this metal.

Keywords: heavy metals, biosurfactant, iron, manganese, zinc and liquid membranes.

1- INTRODUÇÃO

O avanço nos processos de industrialização em diversos países, nos anos sessenta, fez com que surgisse um levantamento das questões ambientais, geradas como consequência da liberação de mais poluentes no ambiente por parte das atividades industriais. Uma das diversas questões levantadas é a emissão de metais pesados e tóxicos no ambiente, com elevado potencial de poluição, como por exemplo, o lançamento de íons metálicos em ambientes aquáticos (AHMAD *et al.*, 2015, MONEM EL ZEFTAWY & MULLIGAN, 2011).

A presença de metais pesados no ambiente e as características de toxicidade, abundância e prevalência no ambiente desses compostos, despertou a atenção da sociedade global (ISLAM *et al.*, 2016). A contaminação de metais pesados a partir de efluentes industriais é importante, pois esses elementos, geralmente encontram-se em quantidades consideráveis, e se lançados em águas superficiais ou em solos, podem ocasionar efeitos graves e de difícil remediação sobre o meio ambiente e saúde pública (VENKATESWARAN *et al.*, 2007, CHEN *et al.*, 2016).

A contaminação por metais, ocorre principalmente por atividades como mineração, fundição e também por meio do processo de aterro em solos de resíduos industriais, locais onde metais como Pb, Cu, Zn, Cd, Ni, Cr, entre outros, são encontrados em países com grandes atividades industriais, destacando-se os Estados Unidos, países europeus, Taiwan, Índia e China (MAITY *et al.*, 2013). Esses metais, diferentemente dos resíduos orgânicos, não são biodegradáveis e possuem a capacidade de se acumularem nos tecidos de animais e plantas, gerando o surgimento de várias doenças e distúrbios nos organismos vivos, como consequência, justificando a remoção desses elementos do ambiente (ISLAM *et al.*, 2016).

O processo de remediação é um tratamento utilizado na redução de metais pesados em sistemas aquáticos com o objetivo de remover esses elementos desses ambientes, pois esses sistemas, na maioria dos casos, são os grandes receptores de metais (KANOUN-BOULÉ *et al.*, 2009). As tecnologias no processo de remediação envolvem fenômenos físico-químicos como adsorção, troca iônica, eletrodialise, osmose reversa, etc, sendo a maioria desenvolvida na captação de determinado elemento (MISHRA & TRIPATHI, 2008).

Entretanto os métodos convencionais citados apresentam algumas limitações em seu uso, tais como dispersão e coalescência nos processos de extração, além de dificuldades no uso

do solvente, como a toxicidade, volatilidade e grande perda de solvente (LENDE, 2016). Dessa forma, com o intuito de sobrepor as limitações dos métodos tradicionais na remoção de metais tóxicos, uma técnica de membrana de emulsão de surfactante (EMS) foi desenvolvida no processo de remoção de Pb (II) (LENDE, 2016).

Essa tecnologia (EMS), consiste em um processo de dispersão trifásica, em que uma fase é aquosa envolvida por uma fase contendo uma membrana líquida (fase orgânica), a qual é composta pelo agente de extração (agente quelante) e surfactante em diluentes orgânicos (LENDE, 2016).

Os surfactantes são moléculas constituídas por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, o que permite esses compostos se distribuírem nas interfaces entre as fases fluidas com distintos graus de polaridade, fazendo com que eles possuam propriedades de emulsificação, elevada capacidade espumante, detergência, entre outras (PASTORE & NITSCHKE, 2002). Entretanto, os surfactantes são compostos obtidos por derivados de petróleo, e na busca por um composto biodegradável, os biossurfactantes vieram como uma alternativa para essa questão. Esses tensoativos são compostos derivados de subprodutos do metabolismo de microrganismos como fungos, bactérias e leveduras e que apresentam características semelhantes às dos surfactantes (PASTORE & NITSCHKE, 2002).

Dentre os diversos microrganismos produtores de biossurfactantes, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* são produtoras de biossurfactante classificado como ramnolipídios e destacam-se pela elevada produção desse composto, utilização no processo de biodegradação de hidrocarbonetos e na remoção de metais pesados (SÁNCHEZ *et al.*, 2007, SARUBBO *et al.*, 2015).

No processo de remoção usando a membrana líquida de emulsão a partir de surfactante, a função deste é estabilizar as gotas da emulsão formada e a dispersão das fases é obtida pelo uso de um homogeneizador. Assim, os íons da solução metálica formam um complexo com o extratante para que possam ser transportados para a fase orgânica da membrana (LENDE, 2016).

Dessa forma, diante do exposto pretende-se estudar o uso da remoção EMS de forma a atender os objetivos apresentados no capítulo 2.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

Este trabalho possui como objetivo geral avaliar a produção e a utilização de membrana de biossurfactante na remoção de ferro, manganês e zinco em águas contaminadas.

2.2 – Específicos

- Desenvolver membranas destinadas a redução de contaminação de águas com metais tóxicos composto por surfactante, agente quelante, água e líquido apolar ou de baixa polaridade;
- Avaliar o uso da membrana descontaminante na remoção de metais como ferro, zinco e manganês, presente em águas contaminadas;
- Estudar o processo de remoção de metais das águas contaminadas utilizando o modelo de redes neurais artificiais;
- Otimizar a remoção dos metais pela membrana.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Metais pesados

O aumento do processo de industrialização e urbanização tem levado à poluição ambiental por metais pesados. Esses elementos são um dos contaminantes mais perigosos que podem ser encontrados no ambiente aquático (RAI, 2009).

Atividades antropogênicas como mineração, processos industriais e agrícolas, são responsáveis pelo aumento de metais no ambiente, sendo comum encontrar esses elementos nos ecossistemas aquáticos, tornando o controle da emissão desses compostos um desafio (TOMASIK & WARREN 1996, SCHWARZENBACH *et al.*, 2010, LANCTÔT *et al.*, 2016).

Um metal é considerado pesado, quando apresentar densidade igual ou superior a 5 g/cm³ ou possuir número atômico superior a 20, em sua forma elementar. Esses elementos, também conhecidos como metais traço, constituem um grupo de aproximadamente 40 compostos e possuem características como aparência brilhante, são bons condutores de eletricidade e, podem participar de reações químicas com enzimas (CAZIÑARES, 2000, LEE *et al.*, 1985, MENESES, 2008).

Os metais pesados podem ser classificados de três formas: essenciais como o cobre (Cu) e o zinco (Zn), provavelmente essenciais como o níquel (Ni) e potencialmente tóxicos como arsênio (As), cromo (Cr), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), entre outros (HEDBERG *et al.*, 2014, TUZEN, 2009).

A toxicidade de uma substância no organismo, depende de sua concentração, como no caso dos metais, em que, mesmo alguns sendo biogênicos, se ingeridos em concentrações elevadas apresentam comportamento nocivo no organismo. Os elementos ditos essenciais como o cobre, manganês, zinco são metais que os seres vivos precisam em baixas concentrações para que realizem as funções vitais do organismo, mas que em níveis elevados podem ser extremamente tóxicos (PEREIRA & EBECKEN, 2009)

Já os metais pesados como o mercúrio, chumbo e cádmio não apresentam função nos organismos, podendo provocar efeitos nocivos à saúde, sobretudo nos mamíferos (PEREIRA & EBECKEN, 2009). Esses elementos, devido à pouca biodegradabilidade em ambientes e ao fato de possuir a característica de bioacumulação, são nocivos as plantas, aos animais e seres humanos quando lançados como resíduos industriais, em águas, solos e no ar, provocando

intoxicações ao longo da cadeia alimentar (VARGAS-GARCÍA *et al.*, 2012, AKAR *et al.*, 2012, BULUT & TEZ, 2007, PEREIRA & EBECKEN, 2009). Devido aos efeitos tóxicos desses metais, nos últimos anos, como consequência da sua mobilização antropogênica no ambiente, sua remoção tem atraído considerável atenção (SEEBAUGH *et al.*, 2005, SCHMITT - JANSEN *et al.*, 2008).

3.2 – Contaminação em ambientes aquáticos por metais pesados

Nos ambientes aquáticos, as principais fontes de contaminação por metais pesados são as descargas que provêm de efluentes domésticos ou industriais, a lixiviação de pesticidas em áreas agrícolas, dentre outras fontes (FÖRSTNER & WITTMANN, 1981). Em sistemas costeiros, quantidades de metais traços e compostos orgânicos são descarregados diretamente a partir de atividades comerciais, industriais, escoamento de esgotos terrestres e municipais, águas residuárias agrícolas e domésticas (GAO *et al.*, 2014, HUANG *et al.*, 2013, PAN *et al.*, 2014).

O comprometimento da qualidade da água, a perda da biodiversidade aquática, o comprometimento da fauna e flora, e o desequilíbrio dos ciclos geoquímicos são as principais consequências da presença de efluentes nos ambientes aquáticos, a partir de fontes difusas, geralmente de difícil controle (BEM, 2009, COSTA *et al.*, 2008).

Os ecossistemas aquáticos são ambientes em elevado risco, pois são receptores de contaminantes como os metais tóxicos (KANOUN-BOULÉ *et al.*, 2009). A poluição por metais pesados em lagos, ocorre por meio da cadeia alimentar pelo processo de bioacumulação nos organismos aquáticos, que podem ser um risco para a saúde (BUCCOLIARI *et al.*, 2006, FAN *et al.*, 2002, COMBY *et al.*, 2014). Além disso, ecossistemas pesqueiros como lagoas, estuários e ambientes de manguezais, servem como alimento, rotas de migração e viveiros para diversos organismos, e a contaminação desses ambientes podem alterar o ecossistema e gerar consequências negativas para a produtividade de pesca (BALLS *et al.*, 1997, CHAPMAN & WANG, 2001).

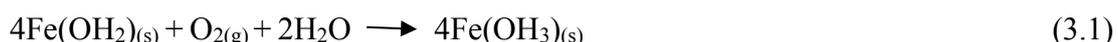
3.2.1 – Ferro

Ferro em seu estado puro, é um metal de aparência branco-prateado, maleável, extremamente reativo, facilmente oxidável, dificilmente comercializado nessa forma e em pó é uma substância cinzenta brilhante (KROSCWITZ, 1995, HSDB, 2000).

O ferro é encontrado no ambiente primeiramente à sua forma ferrosa e, então, à sua forma férrica, a qual é extremamente propenso a sofrer o processo de hidrólise e formar polímeros de hidróxido de ferro, insolúvel, conhecido como ferrugem (O' NEIL, 1991, HUEBERS, 1991).

A ocorrência natural de ferro é como minério, sendo os mais encontrados estão na forma de hematita (Fe_2O_3) ou minério de ferro vermelho (70 % em ferro), limonita [$\text{FeO}(\text{OH})\cdot n\text{H}_2\text{O}$] (42% em ferro), magnetita (Fe_3O_4) ou minério de ferro magnético (alto conteúdo em ferro) e siderita (FeCO_3) ou minério de ferro espáticos, podendo estar associados com silicatos formando complexos, geralmente causando contaminações (COX, 1997, ILO,1997)

Os estados de oxidação de compostos do ferro variam de II a VI, sendo que os mais encontrados são os estados II e III. No estado II, o ferro existente encontra-se como íon Fe^{+2} , de coloração verde-pálida, quase incolor, e que se oxida a íon Fe^{+3} facilmente ao entrar em contato com o ar. Ao se adicionar uma base a soluções de ferro (II), obtém-se um precipitado pardo de hidróxido de ferro (II), o $\text{Fe}(\text{OH})_2$ que, em contato com oxigênio do ar, se torna marrom devido à oxidação de ferro (III), como mostra a reação descrita na Equação (3.1) (SIENKO, 1977):



Em ambientes aquáticos, o ferro ocorre como ferro II ou ferro III ou como complexos orgânicos de ferro II e III. Quando o pH é próximo do neutro sob condições aeróbicas, a forma férrica dos sais inorgânicos é a que prevalece, ou seja, todo ferro ferroso é oxidado e convertido a férrico, mais estável (O'NEIL, 1991).

As principais fontes antropogênicas responsáveis pela liberação de ferro no ambiente, são as atividades industriais como mineração, fundição, soldagem, polimento de metais e o uso de compostos de ferro como agente antidetonante da gasolina. Nas águas marítimas, a contaminação ocorre principalmente pelo despejo de efluentes municipais e industriais nesse ambiente (ILO, 1997).

Os sais de ferro, principalmente os férricos, são extremamente tóxicos e irritantes à pele ao entrar em contato com as vias respiratórias por meio de inalação de poeira e névoas. A

toxicidade oral dos sais de ferro apresenta comportamento de moderado à baixa, porém existem sintomas de irritação severa ao ingerir esses sais, além de poderem causar impactos significativos em ambientes aquáticos e terrestre quando os mesmos se encontram como contaminante (ACGIH, 1986, NIOSH, 1996).

3.2.2 – Manganês

O manganês é encontrado na natureza associado a outros compostos, formando minerais, e elementos nas formas de óxidos, hidróxidos, silicatos e carbonatos (HAROLD & TAYLOR, 1994). A Tabela 3.1 mostra os principais minerais de manganês, suas fórmulas e composições químicas.

Tabela 3.1- Principais minerais de manganês, suas fórmulas e composições químicas.

Minerais	Fórmula química	Composição Química (%)				
		Mn	MnO	MnO ₂	CO ₂	H ₂ O
Braunita	2Mn ₂ O ₃ .MnSiO ₃	66,6	44,8	55,2	-	-
Criptomelana	KMn ₈ O ₁₆	59,8	-	-	-	-
Hausmannita	Mn ₃ O ₄	72	62,0	32	-	-
Jacobsita	MnFe ₂ O ₄	24	-	-	-	-
Manganita	Mn ₂ O ₃ .H ₂ O	62,5	40,4	49,4	-	10,2
Nsutita	MnO ₂ .Y	-	-	-	-	-
Psilomelana	mMnO.MnO ₂ .nH ₂ O	45-60	-	-	-	-
Pirolusita	MnO ₂ .β	62-63	-	-	-	-
Rodocrosita	MnCO ₃	47,8	61,7	-	38,3	-
Rodonita	(Mn, Ca, Fe, Zn)SiO ₃	47,8	-	-	-	-
Todorokita	(Na,Ca,KMn ²⁺)(Mn ⁴⁺ ,Mn ²⁺ ,Mg).3H ₂ O	-	-	-	-	-

Adaptado (SAMPAIO & PENNA, 2001, HARBEN, 1996)

O manganês encontra-se amplamente distribuído no solo, sedimento, águas e no continente, sendo o 12º elemento mais abundante na biosfera. A concentração deste metal na crosta oceânica é aproximadamente 60% mais elevada do que no continente (SIEGEL & SIEGEL, 2000).

O manganês encontra-se na natureza combinado com outros elementos, formando minerais, na sua maioria, óxidos. Embora esteja amplamente disperso nas rochas, não há conhecimento de sua ocorrência na forma metálica. São conhecidos mais de cem minerais de manganês; entretanto, pouco mais de uma dezena, constituem minerais de minério. De um modo geral, eles ocorrem na natureza nas formas de óxidos, hidróxidos, silicatos e carbonatos (HAROLD & TAYLOR, 1994).

Os estados de oxidação do manganês variam de -3 a +7, sendo onze estados de oxidação diferentes. As principais formas encontradas em ambientes aquáticos são como Mn (II) e Mn (IV), e as transformações entre as duas formas ocorrem por meio de reações de oxidação e redução (IPCS, 2004). Essas conversões do manganês são importantes para avaliar o comportamento desse metal em ambientes aquáticos, uma vez que, íons de Mn^{2+} são solúveis enquanto que os de Mn^{4+} estão presentes em óxidos insolúveis (PINSINO *et al.*, 2012). A presença de manganês (Mn^{2+}) em águas de abastecimento, faz com que a mesma resulte em uma coloração preta devido a obstrução das tubagens no processo de abastecimento (TEKERLEKOPOULOU & VAYENAS, 2007).

Cerca de 90% de todo manganês puro obtido é utilizado pelas indústrias siderúrgicas, como aditivo desoxidante ligado a outros metais, como alumínio e cobre para reduzir o processo de corrosão (BAETTY, 2004, GERBER *et al.*, 2002, WHO, 2001). Então, o manganês lançado no meio ambiente por fontes antropogênicas como as atividades industriais, inclui as descargas de efluentes, lodo, mineração e processamento de minerais como o níquel, bem como combustíveis fósseis (HRONEC, 2010).

O manganês é um elemento-traço essencial para as atividades metabólicas do organismo humano, destacando sua presença em enzimas no corpo humano (KEEN *et al.*, 2000). Esse elemento orienta o desenvolvimento normal e funções regulatórias do corpo humano, tais como: i) mineralização óssea; ii) formação do tecido conjuntivo; iii) metabolismo energético; iv) ativação enzimática; v) sistema imunológico e nervoso; vi) defesa celular; vii) aminoácidos, lipídeos, proteínas e metabolismo dos carboidratos; viii) formação de glicosaminoglicanos; ix) coagulação do sangue (ATSDR, 2008, SANTAMARIA, 2008).

A exposição ao manganês ocorre em diferentes níveis, por meio de uma ampla variedade de fontes industriais, tais com mineração, produção de ligas, processamento, operações de ferro-manganês, soldagem, produção agroquímica, e outras atividades. Os produtos de manganês podem ser descarregados no mar, aumentando a biodisponibilidade do metal, e conseqüentemente a sua absorção em organismos vivos, que ocorre

predominantemente pela água, podendo causar efeitos tóxicos aos organismos em concentrações elevadas (ROTH, 2006).

Em organismos marinhos, o excesso de manganês pode causar disfunção no processo de bombeamento de Ca^{2+} . Nos crustáceos, por exemplo, o manganês atua como um competidor inibidor dos canais iônicos regulados pelo cálcio presentes nas membranas nervosas e musculares, inibindo, assim a transmissão sináptica e neuromuscular (HAGIWARA & TAKAHASHI, 1967, HOMES *et al.*, 1999, BADEN & NEIL, 1998).

No organismo humano, a exposição a longo prazo ao manganês pode resultar em uma progressiva disfunção, resultando em uma síndrome denominada de manganismo (MERGLER & BALDWIN, 1997). Essa síndrome é uma doença neurológica progressiva e que geralmente se inicia com um quadro relativamente suave, evoluindo para sintomas como tremor, e em alguns casos, distúrbios psiquiátricos (WHO, 2001).

3.2.3 – Zinco

O zinco (Zn) é o vigésimo terceiro elemento mais abundante presente na crosta terrestre, com um número atômico igual a 30, sendo encontrado em diferentes ambientes como nos solos e em águas (CHANEY, 1993, BROADLEY *et al.*, 2007). Esse metal, é encontrado nos diversos ambientes como Zn orgânico, acoplado a ligantes orgânicos e inorgânico como íons Zn^{+2} , liberado por meio de processos naturais físico-químicos de rochas e pelas atividades antropogênicas (SANTOS, 2005, BROADLEY *et al.*, 2007).

Grande parte do zinco produzido é utilizado nos processos de galvanização de ferro e aço, além de objetos galvanizados (fios, pregos, folhas, etc) aplicados nas indústrias de automóveis, construção, equipamentos de escritório e utensílios de cozinha (RUBIO *et al.*, 2007). Outros setores que utilizam desse metal, estão as indústrias de fabricação de baterias, atividades odontológicas e médicas, responsáveis pela introdução do zinco no ambiente (RIBAS *et al.*, 2017).

Além da aplicação em atividades industriais, o zinco é um dos elementos essenciais mais abundantes no corpo humano desempenhando funções biológicas como: neuromodulador em sinapses; crescimento e integridade celular; citoprotetor: propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e como agente imunoregulador e regulação da pressão arterial (RUBIO *et al.*, 2007). Em espécies vegetais, o zinco também, desempenha funções importantes no

metabolismo, tais como nas atividades enzimáticas, mas que em concentrações elevadas, esse metal pode acarretar problemas no crescimento de plantas (RIBAS *et al.*, 2017, MARSCHNER, 1995).

Apesar de ser considerado um metal de baixa toxicidade, a presença de zinco, em organismos humanos pode ocasionar disfunções no sistema renal causando prejuízos à saúde humana (INECAR, 2000, NOLAN, 2003). Os sinais clínicos críticos se manifestam por meio de vômitos, diarreia, icterícia (membrana de muco amarela), insuficiência hepática, insuficiência renal e anemia (FOSMIRE, 1990).

3.3 – Surfactantes

Os surfactantes são compostos tensoativos anfipáticos constituídos de uma porção hidrofóbica e uma hidrofílica (PASTORE & NITSCHKE, 2002). Os tensoativos são elementos químicos que diminuem a tensão superficial de líquido e que são estruturados por uma porção lipofílica (ou hidrofóbica) como mostra a Figura 3.1.

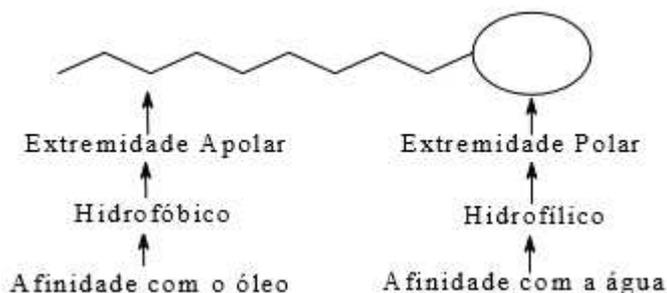


Figura 3.1 - Representação esquemática de um tensoativo (adaptado de SCHRAMM, 2000).

Os tensoativos, em soluções aquosas, podem associar de forma espontânea a partir de uma determinada concentração denominada de concentração micelar crítica (CMC) (MARTINÉZ *et al.*, 2000). Em soluções aquosas, geralmente, as moléculas do tensoativo se agrupam constituindo uma esfera com caudas hidrofóbicas voltadas para o seu interior e os grupos hidrofílicos para fora (MANIASSO, 2001).

A grande parcela dos surfactantes disponíveis comercialmente é obtida a partir de derivados de petróleo. Devido às propriedades dos surfactantes, como capacidade de formar um

filme molecular ordenado nas interfaces e reduzir a tensão interfacial e superficial, estes compostos são aplicados em processos industriais que envolvem: detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases. Por isso, são utilizados em diversos setores industriais como limpeza, petróleo, beleza e higiene (PASTORE & NITSCHKE, 2002).

A busca para atender às legislações de controle do meio ambiente associado à preocupação ambiental entre os consumidores, levaram ao desenvolvimento de surfactantes naturais. A necessidade por produtos que não agredem de forma tão severa o meio ambiente como os compostos não biodegradáveis, fez com que buscassem a obtenção de surfactantes a partir, por exemplo, de compostos de origem microbiana (PASTORE & NITSCHKE, 2002).

3.4 – Biosurfactantes

Os biosurfactantes são compostos resultantes das atividades metabólicas de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, que exibem propriedades surfactantes (PASTORE & NITSCHKE, 2002). Esses agentes tensoativos microbianos são moléculas anfífilas constituídas de porções hidrofóbicas e hidrofílicas que tendem a interagir com a superfícies de compostos com polaridades diferentes, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais (SHAVANDI *et al.*, 2011).

Ao comparar os biosurfactantes e os surfactantes sintetizados industrialmente, os agentes tensoativos de origem microbiana apresentam diversas vantagens, tais como: baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, elevada capacidade espumante, maior seletividade, atividade específica a temperaturas extremas, pH e salinidade (KHOPADE *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013). Devido à característica de redução de tensão superficial dos biosurfactantes, esses compostos aumentam a solubilidade e a área de contato dos elementos insolúveis, a sua mobilidade, biodisponibilidade e biodegradação (APARNA *et al.*, 2011).

A estrutura dos biosurfactantes, são compostas por uma porção lipofílica que geralmente é formada por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (BOGNOLO, 1999, CAMEOTRA & MAKAR, 1998). Esses tensoativos podem ser classificados em cinco classes diferentes, sendo elas, glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI & DESAI, 1993) como mostra a Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
-ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i>
-trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
-peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
-visosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
-surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
-subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
-gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
-polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídios	
-ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
-fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
-emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-liposan	<i>Candida lipolytica</i>
-caboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
-vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-células	Várias bactérias

Adaptado de (DESAI & BANAT, 1997).

Diversos gêneros de bactérias têm sido responsáveis pela sintetização de biossurfactantes, tais como *Acinobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* e *Enterobacter* (SATPUTE, 2010). Entre as diversas classes de biossurfactantes,

os lipopeptídios destacam-se pelas suas propriedades superficiais e atividades biológicas, como recuperação de óleo cru, remoção eficiente de hidrocarbonetos derivados de petróleo e metais pesados nos solos (AYED *et al.*, 2014).

Outras classes de biossurfactantes, como os ramnolipídios, também são aplicados na degradação de hidrocarbonetos, produzidos pela bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Os biossurfactantes classificados como ramnolipídios são de natureza glicolipídica, compostos por uma cabeça hidrofílica, a qual é formada por uma ou duas moléculas de ramnose, e uma cauda hidrofóbica como mostra a Figura 3.2 (MONTEIRO *et al.*, 2007).

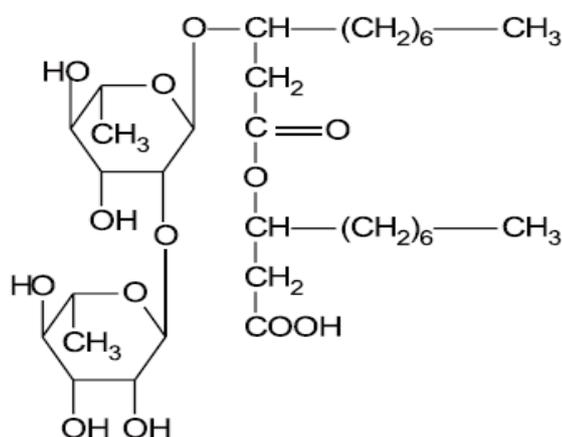


Figura 3.2 - Estrutura da molécula de um ramnolipídio.
Fonte: CAMEOTRA & MAKKAR, 1998.

Além das bactérias, microrganismos como as leveduras também produzem emulsificantes extracelulares em seu processo de crescimento em contato com substratos apolares em água como n-alcanos ou óleos, facilitando o consumo e produzindo biossurfactantes em concentrações elevadas, tais como as leveduras da espécie *Candida*. Essa espécie tem sido muito utilizada para a produção de biossurfactantes ao serem cultivadas em hidrocarbonetos (FONTES *et al.*, 2008, SARUBBO *et al.*, 2001).

Esses compostos tensoativos de origem microbiana, possuem aplicações em indústrias petrolíferas, por exemplo, processos de biorremediação, indústria de alimentos, entre outras aplicações (PASTORE & NITSCHKE, 2002). Nas indústrias de alimentos, os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas, nas empresas petrolíferas são aplicados no processo de recuperação melhorada do petróleo e também na limpeza de reservatórios de óleo (PASTORE & NITSCHKE, 2002).

No processo de biorremediação, a capacidade dos biossurfactantes de formar emulsões e dispersar hidrocarbonetos em água eleva a degradação de compostos como óleo no ambiente (PASTORE & NITSCHKE, 2002). Além de ser utilizado na biorremediação de contaminações com óleo e seus derivados, os biossurfactantes, nos últimos anos, tem sido aplicados no processo de biorremediação de ambientes contaminados por metais pesados, destacando-se a classe dos ramnolipídios pela sua grande citação na literatura no processo de remoção desses metais no solo (SARUBBO *et al.*, 2015).

3.5 – Membrana líquida de emulsão

Emulsões consistem em uma mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, constituídas por uma fase dispersa em forma de gotas esféricas e pequenas (diâmetro de 0,1 μm a 100 μm) e uma fase contínua. Essas emulsões são termodinamicamente instáveis, pois apresentam elevada e positiva energia livre (tensão superficial) entre as duas fases (HILL, 1996; WALSTRA & VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011; LAM & NICKERSON, 2013).

As emulsões são compostas por dois principais grupos: emulsões simples e emulsões múltiplas e são definidas de acordo com a distribuição relativa das diferentes fases que compõem o sistema. O sistema composto por gotas de óleo, dispersa em uma fase aquosa, são chamados de emulsões simples óleo/água (O/A) e menos frequentemente, os sistemas formados por gotas de água dispersas em uma fase óleo são chamadas emulsões simples água/óleo (A/O). Já as emulsões múltiplas possuem estruturas mais complexas, sendo as mais comuns: água/óleo/água (A/O/A) e óleo/água/óleo (O/A/O) (PEREIRA & GARCIA-ROJAS, 2015). A Figura 3.3 mostra de forma esquemática as estruturas das emulsões simples e múltiplas mais comuns, em que 1: emulsão simples O/A, 2: emulsão simples A/O, 3: emulsão múltipla A/O/A e 4: emulsão múltipla O/A/O, sendo O: fase óleo, A₁: fase aquosa interna e A₂: fase aquosa externa, (BOUYER *et al.*, 2012).

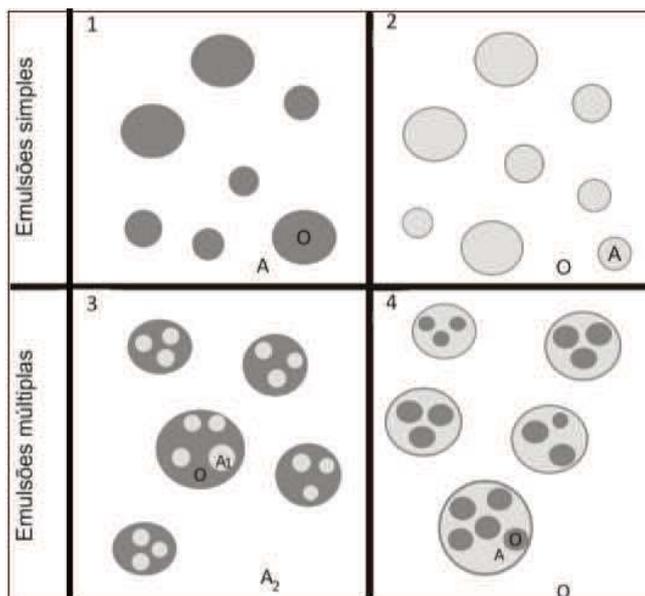


Figura 3.3 - Representação esquemática das estruturas simples e múltiplas
 Fonte: Adaptado de: BOUYER *et al.*, 2012.

A membrana líquida de emulsão (ELM), é formada por uma fase aquosa dispersa numa fase oleosa, resultante de uma mistura homogênea com aparência branca (leitosa) e processada a partir de um homogeneizador ou agitadores de elevada velocidade (KULKARNI *et al.*, 2009 GOYAL *et al.*, 2011). A emulsão preparada é adicionada numa fase aquosa contendo um soluto a ser removido nas pequenas gotículas formadas no interior da emulsão. A fase apolar da emulsão atua como uma barreira entre a fase da membrana e a fase aquosa contendo o composto a ser removido (GOYAL *et al.*, 2011).

A membrana líquida de emulsão (ELM) foi implementada pela primeira vez por Li (1968) e é conhecida como um dos métodos de separação mais promissora no processo de extração de contaminantes metálicos e hidrocarbonetos (MOKHTARI & POURABDOLLAH, 2012). Além disso, o fator custo, torna o uso desse processo de extração promissor, como foi estudado por Frankenfeld *et al* (1981), o qual relatou que o ELM poderia ter um custo de até 40% mais baixo do que outros métodos de extração e remoção.

A seletividade do ELM, geralmente, depende de fatores como a composição da fase da membrana, do gradiente de concentração e da diferença de pH que são as principais forças motrizes para que ocorra o transporte do soluto para a outra fase (GOYAL *et al.*, 2011).

Ao considerar o tratamento utilizando a membrana líquida de emulsão em grande escala, a estabilidade da emulsão é o principal fator de avaliação. Essa estabilidade da emulsão está associada ao processo de lixiviação do soluto em questão durante o contato da alimentação

e a emulsão, sendo que em alguns casos os solutos não são solúveis na fase orgânica (LENDE *et al.*, 2014). Para superar esses impasses, é necessário o uso de determinados agentes para a estabilização da membrana a partir da emulsão e solubilização dos solutos, formando complexos e ainda proporcionar a difusão para a fase orgânica (LENDE *et al.*, 2014).

O ELM apresenta características que o torna promissor e vantajoso, tais como: o consumo relativamente baixo de energia, se comparada à processos de separação convencionais como evaporação térmica, extração e processos de membrana sob pressão. Além disso, o fato de possuir apenas uma fase de operação, elevada disponibilidade de superfície para solutos, o que proporciona rápida extração e remoção, elevada eficiência e seletividade, torna o processo atrativo (FRANKENFELD & LI, 1987, SKELLAND & MENG, 1999).

No processo de tratamento de chumbo, diversos métodos foram propostos, tais como precipitação química, adsorção e extração com solvente. O tratamento por membrana líquida de emulsão (ELM), apresenta como uma junção entre o processo de extração e a remoção do soluto. Esse processo simultâneo, surgiu a partir de aplicações com bons resultados na separação de hidrocarbonetos, aminoácido, compostos biológicos e remoção de metais pesados de águas contaminadas (LENDE *et al.*, 2014).

Lende *et al.*, 2014 estudou a remoção de chumbo (II) a partir de uma membrana líquida de emulsão, a qual foi preparada emulsificando uma fase orgânica, composta por surfactante, D₂EHPA como extrator, hexano como diluente, e adicionando um líquido iônico [OMIM][PF₆] (*octylmethylimidazole hexafluorophosphine*) seguido de agitação. A emulsão preparada foi adicionada na fase de alimentação de Pb(II), em que foi realizada o processo de remoção do metal, de acordo com a Figura 3.4.

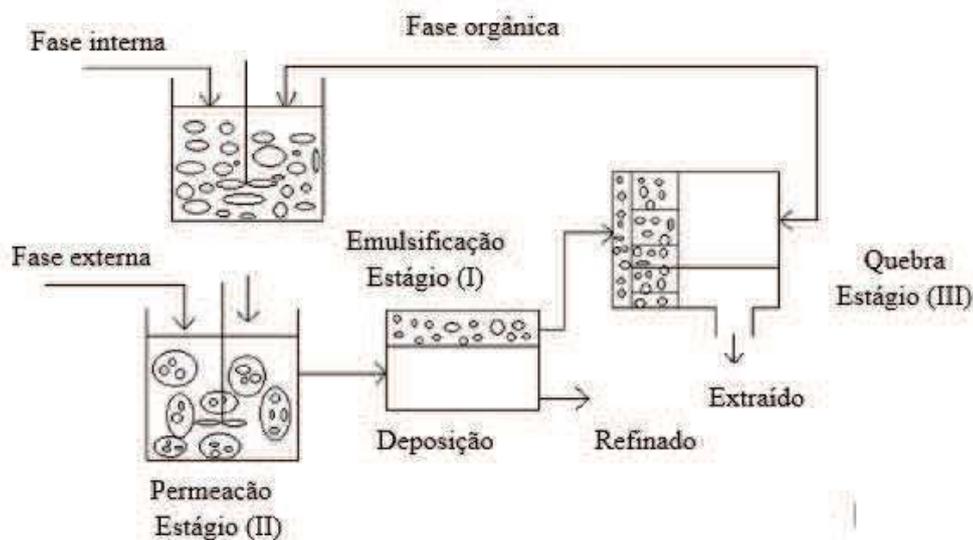


Figura 3.4 - Esquema da preparação da membrana líquida iônica de emulsão.
 Fonte: Adaptado de Lende *et al.*, 2014.

Na pesquisa de Lende *et al.*,(2014), foi comparado a eficiência de remoção e enriquecimento de íons Pb (II) do uso da membrana líquida iônica de emulsão com a membrana líquida de emulsão sem o IL (líquido iônico). Estes autores avaliaram também os parâmetros com os quais houve máxima remoção, tais como a velocidade do homogeneizador, pH da fase de alimentação, tempo de contato e concentração de surfactante.

Outro estudo realizado na remoção de metais utilizando ELM, foi o de Goyal *et al.*, (2011), em que se utilizou a membrana líquida de emulsão na remoção de cromo usando $[BMIM]^+[NTf_2]^-$ como estabilizador e TOMAC como extrator. Neste trabalho, foi utilizado também, além do estabilizado e extrator, surfactante Span 80, querosene com solvente e NaOH como reagente interno. Dessa forma, foram investigados o efeito da concentração de líquido iônico ($[BMIM]^+[NTf_2]^-$ e TOMAC) e a estabilidade da membrana líquida.

Lende (2016), em sua pesquisa, utilizou o processo de membrana de emulsão de surfactante (EMS) no tratamento de chumbo do efluente de placa de circuito impresso (PCB), o qual apresenta operação simples, baixo custo, elevada seletividade e altos fluxos. Nesse mesmo estudo, a EMS foi desenvolvida utilizando n-hexano como diluente orgânico, surfactante Span 80, o D₂EHPA como extrator e ácido sulfúrico como agente de remoção aquoso. Esse processo de obtenção de membrana de emulsão de surfactante esta esquematizado na Figura 3.5.

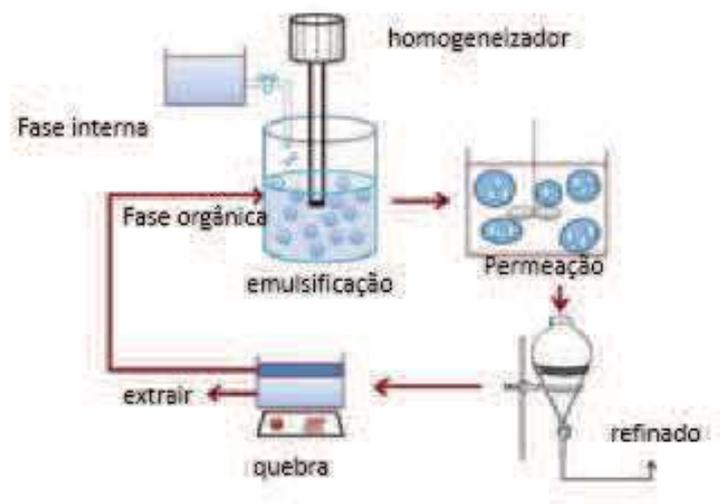


Figura 3.5 - Esquema do processo da membrana de emulsão de surfactante.

Fonte: Adaptado de Lende, 2016.

O processo EMS consiste em um sistema de três fases, em que uma fase aquosa está revestida por uma fase de membrana (fase orgânica), a qual contém o agente de extração e tensoativos em diluentes orgânicos. Dessa forma, os íons metálicos presentes na solução aquosa (fase de alimentação) formam um complexo com o agente de extração na interface do glóbulo de emulsão e da fase de alimentação (KULKARNI & MAHAJANI, 2002). Esse método tem sido empregado no tratamento de ambientes aquáticos, como os córregos, contaminados com íons de metais pesados, por exemplo, o cobalto, zinco, cádmio, níquel, mercúrio, chumbo e crômio (AHAMADA *et al.*, 2011, KUMBASAR & SACHIN, 2008).

3.6 - Agentes complexantes

A presença de íons metálicos tóxicos em ambientes aquáticos é uma questão complexa, o que fez diversos pesquisadores depositarem atenção no tratamento desses ambientes, nos últimos anos (GUPTA & SHARMA, 2003). Dessa forma, objetivando a separação e a pré-concentração de traços de íons metálicos, os agentes complexantes surgem como uma alternativa no desempenho dessas funções, apresentando vantagens como: simples substituição, podendo ser utilizado para distintos propósitos, seletividade para um íon específico e facilidade de recuperação, o que eleva a flexibilidade das condições de trabalho (DESAI & PARK, 2005; KAWAMURA *et al.*, 1993; VITALI *et al.*, 2006).

Entre os agentes quelantes existentes, tem-se o etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por exemplo, que possui alta afinidade com íons metálicos, formando complexos de metal-EDTA (OVIDO & RODRÍGUEZ, 2003). Esse composto foi patenteado por F. Munz em 1935, na Alemanha, sendo um agente complexante de elevado poder e uma molécula estável, cuja a fórmula está representada na Figura 3.6. Além disso, o EDTA oferece uma versatilidade em seu uso nos detergentes, tratamento de água, limpeza de metais, indústrias têxteis, entre outras aplicações (OVIDO & RODRÍGUEZ, 2003).

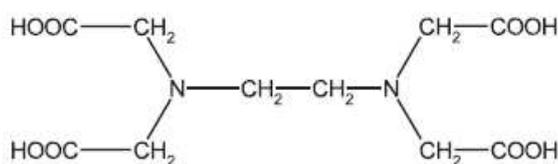


Figura 3.6 - Estrutura molecular do EDTA
Fonte: Oviedo & Rodríguez, 2003.

Existe uma apreensão quanto aos efeitos da presença de EDTA no ambiente. Alguns estudos demonstraram que a complexação com EDTA pode mobilizar contaminantes, de forma que, o composto pode evitar o processo de precipitação de metais em solução, ou o contrário, pode provocar a dissolução de metais pesados adsorvidos em sedimentos (OVIDO & RODRÍGUEZ, 2003).

Apesar de não haver pesquisas suficientes que descrevam o comportamento do EDTA em ambientes aquáticos, nota-se que este composto é um complexo, um fenômeno que envolve diversas variáveis e elevada dinâmica, tornado difícil a quantificação da velocidade dos processos envolvidos. Assim, alguns autores concluíram que os cálculos teóricos envolvendo equilíbrio químico não são suficientes e úteis para especificar o comportamento do EDTA em efluentes (KARI & GIGER, 1995, NOWACK, 2002).

No processo de remoção que envolve membrana líquida, o Di-(2-etil-hexil)fosfórico (D₂EHPA) tem a função de facilitar a permeação através da fase orgânica de íons como cátions de Zn²⁺, no transporte de Cu²⁺, Ni⁺, entre outros, ou seja, esse composto forma complexos com o íons metálicos, promovendo a remoção ou separação (WÓDZKI *et al.*, 1999). A Figura 3.7 mostra um esquema do processo de permeação do íon, em que esse íon forma um complexo com um transportador CH pela reação interfacial de troca iônica (WÓDZKI *et al.*, 1999).

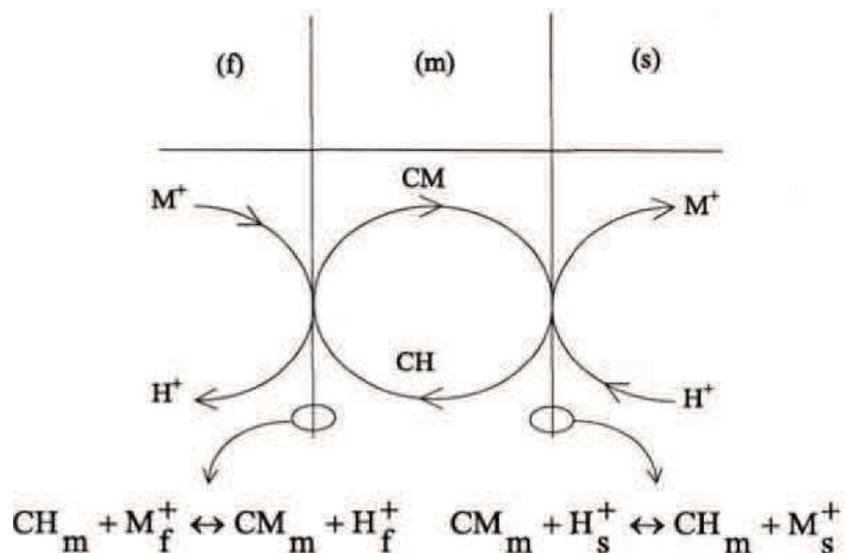
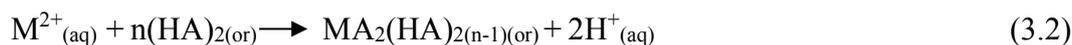


Figura 3.7 - Esquema do processo de permeação do íon metálico, sendo f: solução alimentação (solução metálica contendo os íons), s: solução de retirada e m: membrana líquida.

Fonte: WÓDZKI *et al.*, (1999).

O agente complexante D₂EHPA, a reação entre os íons metálicos com esse composto, dissolvido em diluentes orgânicos, é descrita na literatura internacional de acordo com a Equação (3.2), sendo (HA)₂ representa a forma das moléculas de D₂EHPA e M²⁺ representa qualquer metal bivalente (SOUSA JÚNIOR *et al.*, 2012).



Além do D₂EHPA, cujo estrutura molecular está presente na Figura 3.8, existem outros compostos extratantes, tais como Gyanex 302 (ácido bis(2,4,4-trimetil pentil) monotiofosfínico) e o Cyanex 272 (ácido bis (2,4,4-trimetil pentil fofínico), todos os dois da Cytec (EUA), que apresentam o mecanismo de reação próximo ao de troca catiônica (SOUSA JÚNIOR *et al.*, 2012).

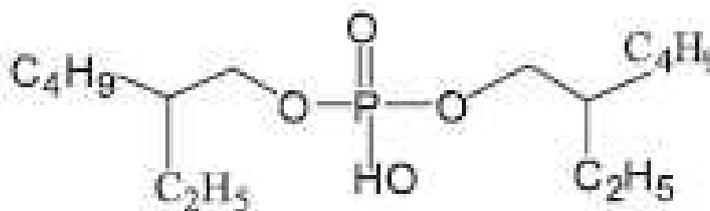


Figura 3.8 - Estrutura molecular do D₂EHPA.

Fonte: Yang *et al.*, 2009.

Um estudo realizado por Cheng (2000), para verificar o comportamento e o mecanismo de separação do manganês de cobalto e níquel, utilizando o D₂EHPA em querosene, concluiu que esse processo era influenciado pelas variáveis temperatura e pH. Nesse trabalho, o autor constatou que no pH com valor 3, houve uma separação mais eficiente de manganês do cobalto e níquel à temperatura de 23°C, porém com o pH de 3,5, obteve-se apenas a separação de manganês do cobalto.

Outro estudo realizado utilizando o D₂EHPA, foi feito por Pagnanellia (2004), em que esse composto foi usado como extrator com n-heptano como diluente, em que se analisou o efeito da concentração de extratores no intervalo de 0,05 M e 2,5 M, na separação do manganês, empregando uma proporção em volume de 1:1 das fases orgânica e aquosa. O processo de extração com solvente desempenha uma função fundamental nos processos de purificação e separação, e o D₂EHPA, é o composto com menor custo e mais amplamente utilizado para extrair manganês em uma solução de lixiviação (ZHANG & CHENG, 2007).

3.7 – Uso de modelos de redes neurais artificiais no estudo de remoção de metais

As redes neurais artificiais (RNA) são usadas em diversas pesquisas, aplicações técnicas e científicas, pela habilidade que possuem de aprendizado na descrição de fenômenos complexos com características não lineares. Esse método de programação utilizado em processos de otimização não linear, apresenta vantagens como: capacidade intrínseca de operação em paralelo; facilidade de implementação em hardware e o alcance de elevadas taxas de computação por intermédio de elementos simples de processamento (LOLLI *et al.*, 2017, SILVA *et al.*, 2004).

Nos modelos de RNA, a interconexão de elementos denominados neurônios representam a RNA que mimetiza o funcionamento e habilidades computacionais de sistemas neurais, que por meio de funções, são capazes de efetuar cálculos complexos a partir de três camadas constituídas de neurônios totalmente interconectados. Essas três camadas, inclui uma entrada, uma ou mais camadas ocultas e uma saída, sendo que um neurônio em cada camada se encontra conectado aos neurônios vizinhos como mostra a Figura 3.9 (BEHROOZ & BOOZARJOMEHRY, 2017).

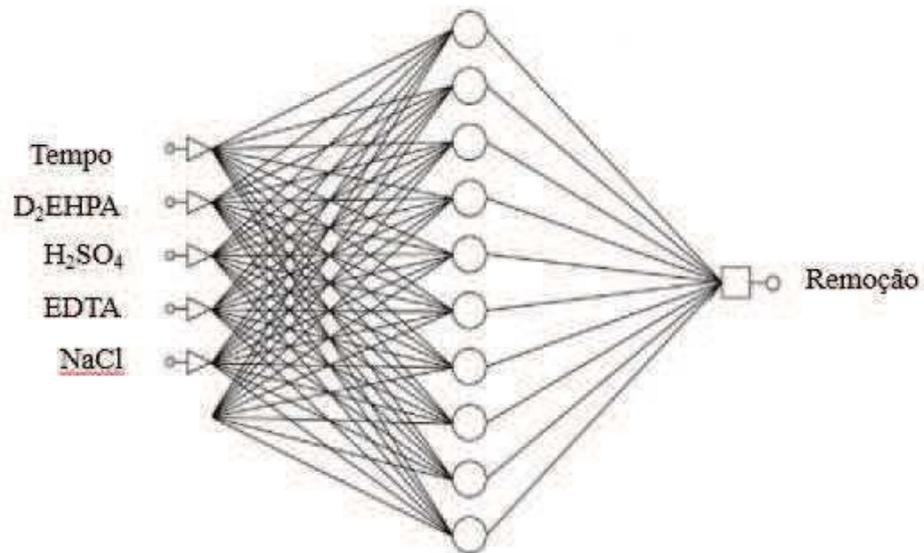


Figura 3.9 - Esquema da arquitetura da rede neural constituída pelas variáveis de entrada (Tempo, D₂EHPA, H₂SO₄, EDTA e NaCl), as camadas ocultas e a saída (Remoção).
 Fonte: Adaptado de Peng *et al.*, 2013.

Para o j-ésimo neurônio, a soma ponderada de todas as entradas (x_i) somada ao termo da trajetória do neurônio (b_j) é passada pela função transferência (φ) para resultar na saída do j-ésimo neurônio (y_i) de acordo com a fórmula descrita na Equação (3.3):

$$y_i = \varphi\left(\sum_{i=1}^n w_{ji}x_i + b_j\right) \quad (3.3)$$

Sendo w_{ij} o peso sináptico correspondente a i-ésima sinapse do j-ésimo neurônio, x_i o i-ésimo sinal de entrada para o j-ésimo neurônio e n o número de sinais de entrada para o j-ésimo neurônio. Entre as funções de transferência utilizadas, destaca-se a função sigmoide, descrita na fórmula da Equação (3.4), em que $\varphi(\text{net})$ é a função da soma ponderada obtida na primeira etapa do cálculo da saída de um neurônio, ou seja, y_i da fórmula descrita pela Equação (3.3) (BEHROOZ & BOOZARJOMEHRY, 2017).

$$\varphi(\text{net}) = \frac{1}{1+e^{-\text{net}}} \quad (3.4)$$

Em que:

$$\varphi(\text{net}) = \text{net}$$

3.8 – Otimização do modelo pelo método de colônia artificial de abelhas (ABCoptim)

Entre os métodos de otimização que não utilizam derivadas se destacam os métodos de enxames, que são amplamente estudados como uma das áreas de inteligência artificial inspirado na inteligência coletiva de enxames. Nesses métodos de enxames, a auto-organização e divisão de tarefas são características presentes, por exemplo, em colônias de formigas e abelhas (KARABOGA *et al.*, 2014).

De acordo com Millonas 1994, para que o método de otimização seja caracterizado como um método baseado no comportamento de enxames, deve satisfazer os princípios abaixo:

- i) Princípio da proximidade: o qual o enxame deve ser capaz de fazer cálculos simples de espaço e tempo;
- ii) Princípio da qualidade: deve apresentar a capacidade de responder à fatores de qualidade no ambiente;
- iii) Princípio de resposta diversa: o enxame não deve comprometer, excessivamente, suas atividades por canais;
- iv) Princípio da estabilidade: não deve apresentar mudança no comportamento em cada flutuação ocorrida;
- v) Princípio da adaptabilidade: deve apresentar a capacidade de mudança de comportamento quando necessário.

O modelo baseado no comportamento do enxame de abelhas (ABC) mantém um conjunto de fontes alimentares, em que as posições representam soluções candidatas para a solução do problema. Dessa forma, um conjunto de abelhas, que são agentes computacionais operam em fontes de alimento para encontrar novas soluções candidatas. A quantidade de néctar contida em uma fonte de alimento corresponde à qualidade da solução associada ao problema. Inicialmente, as fontes alimentares estão aleatoriamente amostradas a partir do espaço de pesquisa e atribuídas a uma abelha operária (BRANDES, 2001).

Em particular, a otimização inspirada no comportamento de abelhas para se obter ótimos globais, utiliza-se de parâmetros que otimizam o objeto pela simulação do comportamento de abelhas operadoras (*employed*), exploradoras (*scout*) e observadoras (*onlooker*), cujas as funções estão descritas na Tabela 3.3 (LOZANO *et al.*, 2017).

Tabela 3.3 - Função de cada abelha no método de abelhas.

Abelhas	Descrição
Operárias	Exploram a vizinhança na busca de melhores fontes de alimento, a partir de uma operária vizinha que gera uma nova solução de candidato por meio da anterior. Dessa forma, é realizada a avaliação da solução e, se esta for melhor que a atual, a abelha abandona sua posição atual para se deslocar para a nova fonte de alimento, caso contrário descarta a nova solução. Após realizado esse processo, as abelhas operárias retornam à colmeia e compartilham as informações da fonte de alimento, posição e quantidades de néctar com as abelhas observadoras.
Observadoras	Esperam pelas informações adquiridas pelas operárias, em que cada uma escolhe probabilisticamente uma fonte de alimento proporcional às quantidades de néctar, de acordo com a descoberta realizada pelas operárias. Caso a nova fonte de alimento seja mais atraente, a informação da fonte é atualizada, caso contrário a nova fonte é descartada.
Exploradoras	Se a fonte de alimento é explorada para um determinado número de interações sem qualquer melhoria, a fonte de alimento é abandonada e a abelha operária associada torna-se uma exploradora. Em seguida, a exploradora procura uma nova fonte de alimento de uma forma mais exploratória, geralmente, por amostragem aleatória de uma nova solução candidata a partir do espaço de busca. Então, a abelha exploradora torna-se uma operária, associada com a fonte de alimento.

(Fonte: Adaptado de LOZANO *et al.*, 2017)

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Microrganismos

Foram utilizadas seis leveduras (*Cystofilo basidium* (L46), *Cystofilo basidium* (L96), *Guehomyces* (L86), *Guehomyces* (L88), *Leucosporidium* (L120) e *Leucosporidium* (L117), identificadas por métodos convencionais de biologia molecular no Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da UNICAMP (CPQ BA) para os testes preliminares.

A cultura utilizada de *Pseudomonas aeruginosa* foi a ATCC 10145 fornecida pela Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tosello, em Campinas-SP.

4.2 – Meios de cultura

4.2.1 – Meio de manutenção das leveduras

As leveduras foram mantidas no ultrafreezer à temperatura de -72 ± 1 °C em meio contendo 50% de glicerina e 50% de meio universal com os compostos da Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Composição do meio universal.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	3,0
Peptona	5,0

As fermentações foram realizadas em reatores cônicos de 250 mL, contendo 100 mL de meio universal e posterior adição de 0,3 g células /mL, sob agitação à 120 rpm na temperatura de 25 ± 3 °C em inoculador rotativo (*shaker*).

4.2.2 – Meio de cultura para a manutenção das cepas

A manutenção da cepa foi mantida no meio gelose nutriente em tubos de ensaios inclinados contendo em seu interior gelose nutriente, na qual a composição é dada pela Tabela 4.2. No período de quinze dias, as culturas eram repicadas para um novo tubo contendo gelose nutriente. Os tubos contendo as culturas da bactéria eram mantidos por um período de 48 horas em um recipiente isolado termicamente à temperatura de aproximadamente $25 \pm 3^\circ\text{C}$, em seguida colocados para refrigeração à temperatura de $7^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, objetivando reduzir o metabolismo do microrganismo para o uso futuro.

Tabela 4.2- Composição do meio de cultura em gelose.

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	20,0
Extrato de carne	3,0
Peptona de carne bacteriológica	5,0
Ágar bacteriológico	20,0

Esterilização a $121^\circ\text{C}/20\text{min}$ a 1 atm.

A análise de pureza dos cultivos durante a manutenção da cultura foi realizada pelo método de Gram, de acordo com PENHA *et al.* (1989).

4.2.3 – Meio de cultura para o crescimento do microrganismo

O meio fermentativo para o crescimento da cultura bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 utilizado foi o descrito na Tabela 4.3, realizado em reatores cônicos de 250 mL durante o período de 48 horas.

Tabela 4.3- Composição do meio de cultura para o crescimento do microrganismo.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	11,0
NH_4NO_3	5,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Na_2HPO_4	7,0
KH_2PO_4	3,0

O meio fermentativo empregado para o crescimento e fermentação das leveduras foi o universal descrito na Tabela 4.4, também realizados em reatores cônicos de 250 mL no período de 48 horas para o crescimento, mantidos à temperatura de aproximadamente 25 ± 3 °C.

Tabela 4.4 - Composição do meio de crescimento da levedura

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	3,0
Peptona	5,0

4.2.4– Meio utilizado no processo de fermentação

No processo fermentativo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na produção de biossurfactante em estudos iniciais da obtenção da emulsão (Tabela 4.7) foi utilizado o meio fermentativo apresentado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Composição do meio de fermentação

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	8,0
Extrato de levedura	15,0
KH_2PO_4	2,0
Na_2HPO_4	7,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
NH_4NO_3	5,0

4.2.5– Meio utilizado no processo de fermentação empregando glicerol como substrato

Para o processo fermentativo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na produção de biossurfactante foi utilizado o meio proposto por Sarubbo *et al.* (2010) conforme mostra a Tabela 4.6. Nesse processo, foram utilizados reatores cônicos de 250 mL colocados em um *Shaker* CERTOMAT MO a 130 rpm durante um período de 72 horas de fermentação.

Tabela 4.6 - Composição para o meio fermentativo para produção de biossurfactante.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	30,0
$NaNO_3$	6,0
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,05

4.3 – Avaliação da produção de biossurfactante

A produção de biossurfactante para as leveduras foram avaliadas nos intervalos de tempos de 24, 48 e 72 horas. Já a produção de biossurfactante foi avaliada no período de 24 horas a 120 horas para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Para isso, o meio fermentativo foi centrifugado na centrífuga Bekman Coulter J-25 na velocidade de 7741 G-force durante 20 minutos, para a remoção das células. Do sobrenadante obtido, foi realizado as análises de tensão superficial, índice de emulsificação, biomassa, concentração de surfactante e concentração de raminose, sendo este último teste avaliado apenas com o microrganismo bacteriano.

4.3.1 – Tensão superficial

Para a identificação indireta da produção de biossurfactante, foi realizada a leitura da tensão superficial do meio fermentativo.

Dessa forma, amostras (25 mL) do meio de fermentação foram centrifugadas a 7741 G-force e 25°C utilizando uma centrífuga da marca Bekman Coulter J-25 durante 20 minutos para a remoção das células e obtenção de um sobrenadante. Aproximadamente 15 mL do sobrenadante obtido, foram colocadas em placas Petri à temperatura ambiente e realizadas as análises com o auxílio de um tensiômetro (Figura 4.1), previamente calibrado com álcool etílico. A realização da leitura em triplicata no tensiômetro, foi feita utilizando-se um anel de

platina-iridium de 2 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura, sendo este, imerso na superfície das amostras colocadas nas placas de Petri.

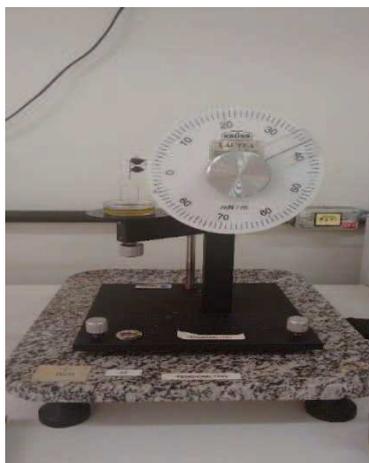


Figura 4.1-Tensiômetro utilizado nas análises de tensão superficial
(Foto tirada pelo autor).

4.3.2 – Índice de emulsificação

Para fazer uma avaliação da formação de biossurfactante, foi realizado o teste de índice de emulsificação conforme o método descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987). Esse índice foi obtido a partir da mistura e agitação no vórtex (marca Phoenix, modelo AP56) por 2 minutos de 3 mL do meio apolar querosene e óleo de motor, com o 2 mL de sobrenadante do meio fermentativo centrifugado durante 20 minutos a 7741 G-force na centrífuga da marca Bekman Coulter J-25, em um tubo de ensaio. Assim, após 24 horas de repouso desse tubo de ensaio, o índice de emulsificação foi obtido em triplicata pela Equação (4.1):

$$E_{24} = \frac{E}{E_1} \times 100 \quad (4.1)$$

Sendo: E - altura da camada emulsificada (cm), e E₁ - altura total da mistura (cm).

4.3.3 – Biomassa

Na verificação de produção de biossurfactante, foi feita a análise de biomassa. Essa análise, foi avaliada pelo método gravimétrico, em que o meio fermentado foi centrifugado a 7741 G-force por 20 minutos na centrífuga Bekman Coulter J-25, retirando as células formadas

como corpo de fundo, colocada na estufa à $90 \pm 5^\circ\text{C}$, por 24 horas, seguida da pesagem até o peso constante.

4.3.4 – Concentração de surfactante

A concentração de surfactante foi obtida por massa seca da fração extraída pelo uso de acetato de etila segundo a metodologia de extração que consiste em misturar 2 mL de acetato de etila e 2 mL do meio fermentado centrifugado na centrífuga Bekman Coulter J-25 durante 20 minutos a 7741 G-force, seguido de agitação em vórtex (marca Phoenix, modelo AP56) por 2 minutos. A quantificação da massa do surfactante presente foi realizada com em 1 mL do solvente em uma placa Petri após a evaporação em estufa de circulação forçada a 30°C até peso constante.

4.3.5 – Concentração de raminose

A quantificação da concentração de raminose no meio fermentativo foi realizada em duas etapas. A primeira consistiu em adicionar 2 mL do sobrenadante do meio fermentativo após centrifugação durante 20 minutos a 7741 G-force na centrífuga Bekman Coulter J-25, com 2 mL de acetato de etila P.A, seguida de agitação no vórtex (marca Phoenix, modelo AP56) por 2 minutos e retirada de 1 mL da fase superior dessa solução. A outra etapa, foi realizada segundo o método descrito por RAHMAN *et al.* (2002). Em um tubo rosqueado, foram adicionados 4,5 mL de ácido sulfúrico 70% ao 1 mL retirado na primeira etapa, agitado no vórtex (marca Phoenix, modelo AP56) por 2 minutos e 10 minutos de aquecimento a 100°C . Após esse processo, a solução foi resfriada e adicionado a ela 0,1 mL de ácido tioglicólico 3%, seguida de repouso, na ausência de luz, durante 3 horas. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância das soluções em comprimento de onda de 420 nm, em espectrofotômetro da marca Genesys-modelo 10UV. Previamente, fez-se uma curva de calibração com concentrações de amostra padrão de raminose conforme o apêndice A.

4.4– Produção da membrana líquida de emulsão

A membrana líquida de emulsão de biossurfactante foi obtida a partir da formação de uma emulsão para a remoção de metais.

4.4.1 – Estudo de formação das emulsões iniciais

O meio de fermentação utilizando o microrganismo *Cystofilo basidium* e a *Pseudomonas aeruginosa*, foi centrifugado em uma centrífuga Bekman Coulter J-25 a 7741 G-force por 20 minutos. Em seguida, com o sobrenadante do meio centrifugado, foi adicionado NaCl, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em diferentes concentrações para cada ensaio, variando o pH nos valores de 1 e 10 com soluções de 1 M de NaOH e 1 M de H₂SO₄, ou seja, obtendo diferentes emulsões de acordo com a Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Concentrações para obtenção das emulsões.

Componentes	Emulsões								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
NaCl (%)	0	2	0	2	2	0	2	0	2
EDTA (mM)	5	10	5	10	5	10	5	10	10
pH	1	1	10	10	1	1	10	10	Neutro

Para a obtenção da emulsão, em cada ensaio, adicionou-se em um recipiente 25mL de n-hexano ao meio centrifugado contendo diferentes concentrações de NaCl e EDTA. Essa solução foi agitada durante 15 min, em um agitador mecânico IKA RW 20 como mostra a Figura 4.2 na velocidade de 1700 a 1800 rpm, cuja as dimensões estão referidas na Figura 4.3.



Figura 4.2 - Agitador mecânico utilizado na formação da emulsão (foto tirada pelo autor).

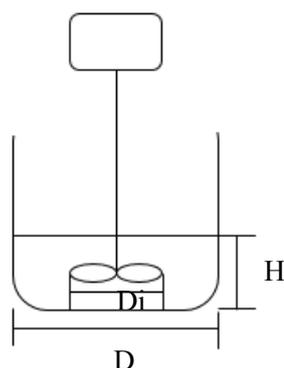


Figura 4.3 - Esquema ilustrativo do agitador mecânico utilizado na formação da emulsão (ilustração feita pelo autor) em que D: 6,5 cm; H:2,3; Di: 4,2 cm, sendo $H/D=0,3538$ e $D/D_i=1,5476$.

4.4.2 – Estudo de formação das emulsões utilizando a *Pseudomonas aeruginosa*

O meio de fermentação utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, foi centrifugado em uma centrífuga Bekman Coulter J-25 a 7741 G-force durante 20 minutos. Em seguida, adicionou-se ao sobrenadante do meio centrifugado, NaCl, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), variando as concentrações de NaOH, HCl, e surfactante na concentração de 0,0745 g/L (50%) e 0,149 g/L (100%). A concentração a 50% foi obtida diluindo o meio de fermentação 1:2, ou seja, obtendo 16 ensaios de acordo com a Tabela 4.8. Assim como no item 4.4.1, para a obtenção da emulsão, em cada ensaio, foi adicionado em um recipiente, 25mL de meio centrifugado em diferentes concentrações de aditivos, com 25 mL de n-hexano. Essa solução foi agitada durante 15 min, em um agitador mecânico IKA RW 20 digital como mostra a Figura 4.4 na velocidade de 1700 a 1800 rpm para a formação da emulsão.



Figura 4.4 - Formação da emulsão no agitador mecânico (foto tirada pelo autor).

Tabela 4.8 - Ensaio com a *Pseudomonas aeruginosa* variando o EDTA, NaCl, NaOH, HCl e concentração de surfactante.

Varição de EDTA e NaCl	Ensaio	NaOH	HCl	Concentração de Surfactante (g/L)
10 mM EDTA + 2% NaCl	1	1%	-	0,0745
	2	1%	-	0,1490
	3	-	0,7%	0,0745
	4	-	0,7%	0,1490
10 mM EDTA + 0 NaCl	5	1%	-	0,0745
	6	1%	-	0,1490
	7	-	0,7%	0,0745
	8	-	0,7%	0,1490
0 mM EDTA + 2% NaCl	9	1%	-	0,0745
	10	1%	-	0,1490
	11	-	0,7%	0,0745
	12	-	0,7%	0,1490
0 mM EDTA + 0 NaCl	13	1%	-	0,0745
	14	1%	-	0,1490
	15	-	0,7%	0,0745
	16	-	0,7%	0,1490

4.5 – Processo de remoção dos metais

4.5.1 – Solução metálica

Foram preparadas soluções de 100 ppm dos metais: manganês, zinco e ferro. Para isso, utilizou-se o sal de $MnSO_4 \cdot H_2O$ para a solução de manganês, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ para o zinco, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ para o ferro. Em seguida, verificou-se a concentração das soluções metálicas, utilizando o equipamento de absorção atômica em chamas da marca SHIMADZU (modelo AA-7000).

4.5.2 – Remoção por meio da membrana

Após a formação da emulsão, pesou-se 5 g da mesma. Essa massa de emulsão foi adicionada à 30 mL de solução metálica contida em um frasco de penicilina. O frasco foi submetido à agitação em um *shaker* CEROTMAT MO na velocidade de 130 rpm. Em seguida retirou-se amostras de 1 mL de volume da fase inferior da solução formada.

4.5.3 – Concentração final e remoção dos metais

As concentrações finais dos metais foram obtidas através da leitura no equipamento de absorção atômica, com a realização prévia de uma curva de calibração para diferentes concentrações conhecidas. A remoção de cada metal foi calculada utilizando a Equação (4.2):

$$\text{Remoção (\%)} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (4.2)$$

Sendo:

C_i a concentração inicial de 100 ppm e C_f a concentração final obtida após o processo de remoção.

4.6– **Planejamento experimental e otimização**

Para o estudo da remoção dos metais Ferro e Manganês foi proposto um planejamento composto central (PCC), com cinco níveis e fatores como mostra a Tabela 4.9, realizando vinte e nove corridas como mostra a Tabela 4.10, utilizando querosene na fase orgânica (diluyente) e concentração de biossurfactante a 0,149 g/L, ou seja, não foi realizada a diluição do meio de fermentação centrifugado.

Tabela 4.9 - Fatores e os níveis do planejamento.

Fatores	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
D ₂ EHPA (M)	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20
Tempo (min)	2	4	6	8	10
H ₂ SO ₄ (M)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
NaCl (g/L)	0	8	16	24	32
EDTA (mM)	0	4	8	12	16

Tabela 4.10 - Planejamento de experimentos

Corridas	D ₂ EHPA (M)	Tempo (min)	H ₂ SO ₄ (M)	NaCl (g/L)	EDTA (mM)
13	-1 (0,08)	-1 (4)	-1 (0,4)	-1 (8)	+1 (12)
4	+1 (0,16)	-1 (4)	-1 (0,4)	-1 (8)	-1 (4)
17	-1 (0,08)	+1 (8)	-1 (0,4)	-1 (8)	-1 (4)
29	+1 (0,16)	+1 (8)	-1 (0,4)	-1 (8)	+1 (12)
8	-1 (0,08)	-1 (4)	+1 (0,8)	-1 (8)	-1 (4)
22	+1 (0,16)	-1 (4)	+1 (0,8)	-1 (8)	+1 (12)
1	-1 (0,08)	+1 (8)	+1 (0,8)	-1 (8)	+1 (12)
11	+1 (0,16)	+1 (8)	+1 (0,8)	-1 (8)	-1 (4)
6	-1 (0,08)	-1 (4)	-1 (0,4)	+1 (24)	-1 (4)
27	+1 (0,16)	-1 (4)	-1 (0,4)	+1 (24)	+1 (12)
7	-1 (0,08)	+1 (8)	-1 (0,4)	+1 (24)	+1 (12)
23	+1 (0,16)	+1 (8)	-1 (0,4)	+1 (24)	-1 (4)
3	-1 (0,08)	-1 (4)	+1 (0,8)	+1 (24)	+1 (12)
5	+1 (0,16)	-1 (4)	+1 (0,8)	+1 (24)	-1 (4)
26	-1 (0,08)	+1 (8)	+1 (0,8)	+1 (24)	-1 (4)
14	+1 (0,16)	+1 (8)	+1 (0,8)	+1 (24)	+1 (12)
24	-2 (0,04)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)
16	+2 (0,20)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)
10	0 (0,12)	-2 (2)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)
9	0 (0,12)	+2 (10)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)
2	0 (0,12)	0 (6)	-2 (0,2)	0 (16)	0 (8)
12	0 (0,12)	0 (6)	+2 (1,0)	0 (16)	0 (8)
15	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	-2 (0)	0 (8)
19	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	+2 (32)	0 (8)
18	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	-2 (4)
20	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	+2 (16)
28	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)
21	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)
25	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)

Na determinação do modelo descritivo da remoção, foi utilizado a metodologia de redes neurais em linguagem R com o pacote AMORE, sendo que a rede neural proposta foi de três camadas ajustada segundo o método do gradiente descendente e função de transferência tangente hiperbólica (tansig) para camada oculta e linear (purelin) para resposta de saída, em que o número de neurônios da camada oculta é apresentado em resultados. Já na otimização foi utilizado o método heurístico de colônia artificial de abelhas em linguagem R no pacote ABCoptim. O fluxograma da Figura 4.5 mostra como foi realizada a otimização do processo de remoção dos metais ferro e manganês do planejamento proposto.

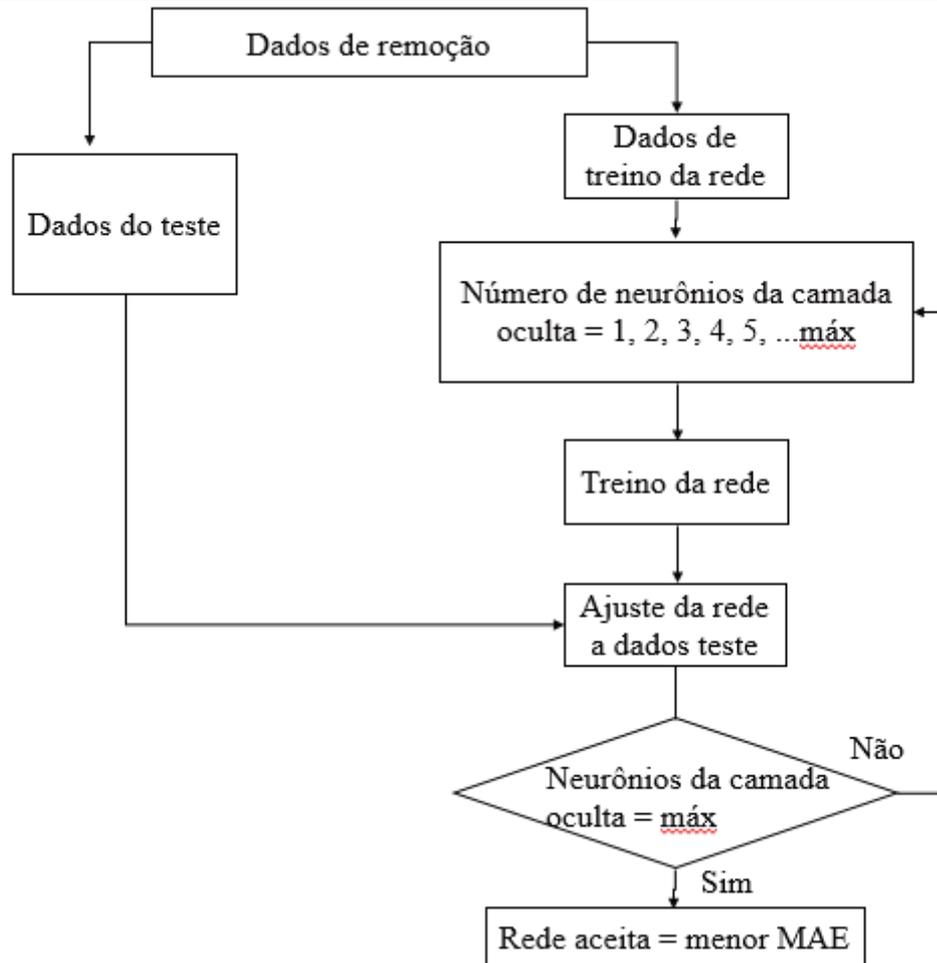


Figura 4.5 - Fluxograma do processo de otimização utilizando redes neurais.

Em que o erro absoluto médio é calculado pela fórmula descrita na Equação (4.3), sendo EXP o valor experimental, CALC o valor calculado pela rede neural, N o número de ensaios e MAE (*medium absolute error*):

$$\overline{MAE} = \frac{\sum|EXP-CALC.|}{N} \quad (4.3)$$

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Determinação da produção de biossurfactante pelas leveduras

Foram realizados os testes de produção de biomassa (massa seca), tensão superficial, índice de emulsificação e produção de surfactante, no estudo das leveduras *Cystofilo basidium*, *Guehomyces* e *Leucosporidium*. As Tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 apresentam os valores médios obtidos em triplicata com os respectivos desvios-padrão (D.P) para cada levedura ao longo do tempo inicial, 24, 48 e 72 horas para os testes de produção de biomassa, tensão superficial, índice de emulsificação e produção de surfactante, respectivamente.

Tabela 5.1 - Concentração de biomassa.

Leveduras	Concentração de biomassa (g/L)							
	Inicial	D.P	24 horas	D.P	48 horas	D.P	72 horas	D.P
<i>Cystofilo basidium (L46)</i>	0,6360	0,6390	0,200	0,1216	0,5867	0,0233	1,4300	0,2192
<i>Cystofilo basidium (L96)</i>	1,1240	0,1697	0,8000	0,7300	0,7400	0,1300	1,8900	0,9000
<i>Guehomyces (L86)</i>	0,4128	0,0814	1,1567	0,4891	1,6867	0,5092	1,4667	0,4401
<i>Guehomyces (L88)</i>	0,6564	0,0786	0,5300	0,0900	1,1167	0,1464	0,6500	0,4124
<i>Leucosporidium (L120)</i>	0,7840	0,1748	2,9000	0,2300	4,7800	0,8300	5,1033	0,6435
<i>Leucosporidium (L117)</i>	1,0509	0,0304	2,1700	0,9781	4,1100	0,5093	4,9233	1,5281

Ao analisar os valores de produção de biomassa da Tabela 5.1, nota-se que o crescimento celular foi diferente para cada levedura. Enquanto a *Cystofilo basidium* e a *Leucosporidium* obtiveram um crescimento celular maior após 72 horas com pequena variação entre o período de 48 e 72 horas, a *Guehomyces* teve o crescimento celular menor no tempo de 48 horas, com uma pequena redução na produção de biomassa em 72 horas. Além disso, a levedura *Leucosporidium* destacou-se em relação ao crescimento celular, atingindo 5,1033 g/L e 2,90 g/L em 72, e 24 horas.

Tabela 5.2 - Tensão superficial.

Leveduras	Tensão superficial (mN/m)							
	Inicial	D.P	24 horas	D.P	48 horas	D.P	72 horas	D.P
<i>Cystofilo basidium</i> (L46)	54,6560	1,0009	49,1246	2,0183	53,3261	3,4958	55,5884	1,4810
<i>Cystofilo basidium</i> (L96)	57,5400	1,0009	50,0942	1,4810	53,3261	4,2262	49,7710	1,4810
<i>Guehomyces</i> (L86)	63,1518	0,7345	49,1246	2,0183	52,3565	0,9696	58,1739	0
<i>Guehomyces</i> (L88)	57,2213	1,2722	40,8833	1,3938	53,7730	1,4495	52,3565	3,0275
<i>Leucosporidium</i> (L120)	56,7404	0	45,0848	4,9200	49,1246	3,4050	51,7101	1,4810
<i>Leucosporidium</i> (L117)	54,8170	0	49,7710	8,0732	47,1855	3,9184	50,2558	2,4877

Tensão superficial do meio: 62 mN/m.

A tensão superficial foi avaliada no Tensiômetro *Kruss* para as diferentes leveduras sendo 40 mN/m o menor valor encontrado de tensão para a *Guehomyces*. A redução da tensão superficial foi acentuada para as leveduras após o período de 24 horas e aumentou levemente após 72 horas, comparando-se com valores em relação à água, cuja a tensão é 72 mN/m e em relação ao meio de fermentação que é aproximadamente 62 mN/m.

Tabela 5.3. Resultado do índice de emulsificação.

Leveduras	Índice de emulsificação (%)											
	24 horas				48 horas				72 horas			
	Quer.	D.P	Óleo	D.P	Quer.	D.P	Óleo	D.P	Quer.	D.P	Óleo	D.P
<i>Cystofilo basidium</i> (L46)	43,18	9,65	86,33	7,81	41,67	1,44	88,35	1,96	43,09	0,85	78,27	1,17
<i>Cystofilo basidium</i> (L96)	58,12	16,48	88,97	11,57	57,50	18,03	91,23	8,04	50,00	6,41	77,63	4,20
<i>Guehomyces</i> (L86)	44,10	4,38	69,56	2,54	47,65	5,22	72,40	8,12	43,61	3,43	78,77	8,12
<i>Guehomyces</i> (L88)	37,02	10,14	87,04	9,30	37,61	9,71	92,93	2,99	38,75	8,64	89,42	2,76
<i>Leucosporidium</i> (L120)	43,43	2,81	84,76	1,65	52,14	3,92	79,05	6,51	44,12	1,41	78,98	8,50
<i>Leucosporidium</i> (L117)	60,73	29,68	82,85	0	53,53	10,63	86,95	0,19	47,50	6,81	82,28	5,50

Quer.: querosene e óleo: óleo de motor

O índice de emulsificação foi avaliado para os meios apolares querosene e óleo de motor para as diferentes leveduras. Ao analisar a Tabela 5.3 verificou-se que os resultados do índice de emulsificação foram mais elevados com o meio apolar óleo de motor comparados aos com querosene em todos os tempos avaliados verificados no período de 48 horas para praticamente todas as leveduras estudadas, reduzindo os valores no após 72 horas. Verificou-se também que as leveduras *Cystofilo basidium* (L96) e a *Guehomyces* (L88) apresentaram valores mais elevados de índice de emulsificação, iguais a aproximadamente 91% e 92 %, respectivamente.

Ao observar a Tabela 5.4 nota-se que para a maioria das leveduras, a concentração de surfactante teve um comportamento levemente decrescente no tempo de 48 horas, porém com valores próximos aos obtidos no período de 24 horas e um aumento no tempo de 72 horas. A levedura *Guehomyces* (L86) e a *Cystofilo basidium* (L46) apresentaram um crescimento ao longo do período avaliado, mostrando resultados mais equilibrados de produção de surfactante com a produção de 0,9 g/L e 1,0 g/L, respectivamente, no período de 48 horas, com pequena variação no tempo de 72 horas.

Tabela 5.4 - Resultado da concentração de surfactante formado.

Leveduras	Concentração de surfactante (g/L)							
	Inicial	D.P	24 horas	D.P	48 horas	D.P	72 horas	D.P
<i>Cystofilo basidium</i> (L46)	0,5600	0,2970	0,5000	0,2645	1,0000	0,6000	1,7000	1,2028
<i>Cystofilo basidium</i> (L96)	0,3533	0,5427	2,9000	0,2160	1,3000	0,6000	1,3000	0,4000
<i>Guehomyces</i> (L86)	0,1300	0,0702	0,5700	0,6658	0,9000	0,1732	1,0000	7,1842
<i>Guehomyces</i> (L88)	0,1067	0,0901	1,2500	0,9192	0,5000	0,3055	1,4000	0,7234
<i>Leucosporidium</i> (L120)	0,1333	0,1101	1,1000	0,5507	0,9000	0,6245	1,3000	0,4000
<i>Leucosporidium</i> (L117)	0,0533	0,4529	1,0000	0,7095	0,7000	0,2082	1,0000	2,6153

5.2 – Remoção dos metais

5.2.1 – Remoção utilizando a levedura como microrganismo

Nesse processo, realizou-se o estudo de remoção do metal manganês utilizando o microrganismo *Cystofilo basidium (L46)* devido à avaliação dos resultados na produção de biosurfactante. Ao verificar uma produção de surfactante com resultados mais equilibrados ao longo do tempo e valores de índice de emulsificação mais elevados em 48 horas, selecionou-se a levedura *Cystofilo basidium (L46)* o primeiro microrganismo na remoção de metais. Dessa forma, fixou-se o período de fermentação de 48 horas para a realização do procedimento de remoção, no qual foram estudadas nove condições de preparação e eficiência de emulsões apresentado na Tabela 4.7, variando-se o pH, a concentração de NaCl (para que ocorra a troca iônica no procedimento de remoção) e o agente quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) utilizado na captação de metais.

O primeiro metal no estudo da remoção foi o zinco, em que se obteve resultados insatisfatórios, ou seja, nenhuma remoção foi observada. O segundo metal pesado estudado foi o manganês com concentração inicial de 100 ppm em que as amostras foram retiradas nos tempos de 3, 6 e 9 minutos. O resultados das concentrações finais deste metal podem ser vistas no gráfico da Figura 5.1 para cada situação de emulsão estudada, em que seus valores de pHs se encontram na Tabela 1 do apêndice B e suas respectivas remoções estão representadas no gráfico da Figura 5.2.

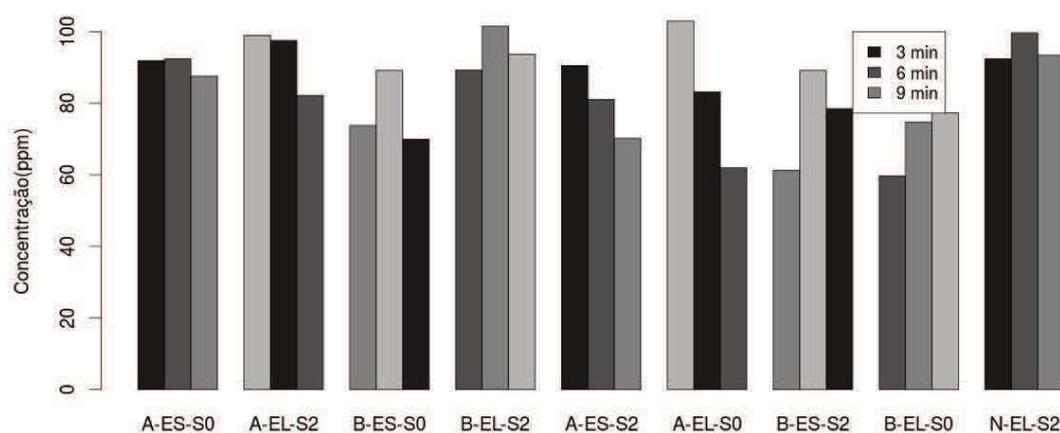


Figura 5.1 - Concentrações finais para o metal manganês em ppm utilizando a levedura *Cystofilo basidium (L46)* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5 mM de EDTA, EL: concentração de 10 mM de EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas em 3,6 e 9 minutos.

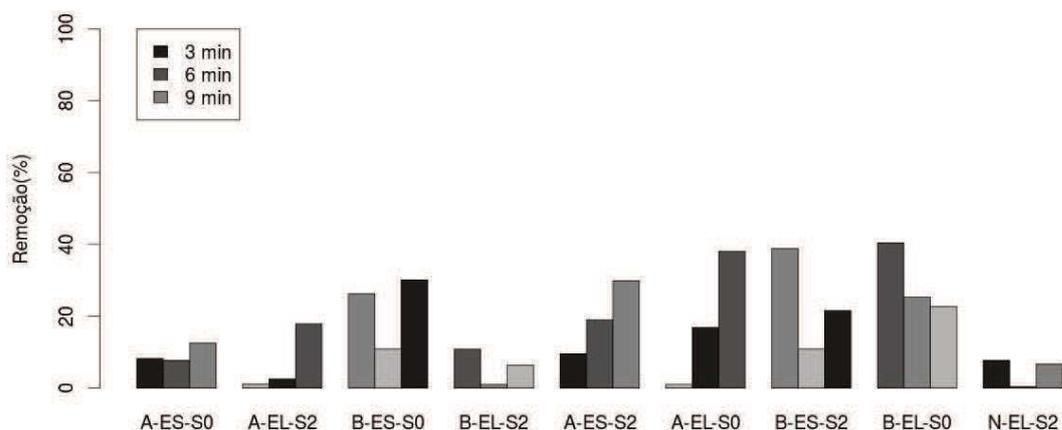


Figura 5.2 - Remoções em porcentagem para o metal manganês utilizando a levedura *Cystofilo basidium (L46)* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5 mM de EDTA, EL: concentração de 10 mM de EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3,6 e 9 minutos.

Dessa forma, ao avaliar as situações em que somente o pH é diferente, por exemplo, na remoção da primeira situação do gráfico da Figura 5.2 (A-ES-S0) e da terceira condição (B-ES-S0), é visível que apesar de ter ocorrido remoções em condições ácidas, no pH básico, a remoção foi mais eficiente do manganês para os tempos distintos em questão. Ao analisar as condições de pH e de concentrações de EDTA a 5 mM, com diferentes concentrações de NaCl ((B-ES-S0) e (B-ES-S2) situação no gráfico da Figura 5.2), tem-se que a remoção no tempo de 9 minutos foi aproximadamente a mesma, com diferença nos tempos de 6 e 3 minutos, e que a ausência de NaCl favoreceu a remoção no menor tempo de retirada da amostra.

Ao avaliar a concentração de EDTA, com as mesmas concentrações de cloreto de sódio e condições de pH, como ocorre na terceira (B-ES-S0) e oitava situação (B-EL-S0) do gráfico da Figura 5.2, é possível observar que na situação com 10 mM de EDTA ((B-EL-S0), a remoção do manganês foi mais satisfatória do que a condição com menor concentração de EDTA, para os tempos de 3,6 e 9 minutos. Além disso, no gráfico da Figura 5.2, observa-se que a maior remoção foi aproximadamente 40%, que ocorreu nas condições de pH básico, 10 mM de EDTA, e ausência de cloreto de sódio.

5.2.2– Remoção utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* como microrganismo

O processo de remoção dos metais foi conduzido também utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* com o meio fermentativo apresentado na Tabela 4.5. Neste estudo, foram avaliadas nove condições de emulsões de acordo com a Tabela 4.7, variando as concentrações de cloreto de sódio, EDTA e pH apresentados na Tabela 2 do apêndice B. As amostras, nesse teste, foram retiradas nos tempos de 3, 6, 9 e 12 minutos para um possível estudo do comportamento da remoção. O gráfico da Figura 5.3 mostra as concentrações finais de manganês em ppm obtidas para as distintas emulsões da Tabela 4.7 e no gráfico da Figura 5.4 encontram os valores das remoções em porcentagem.

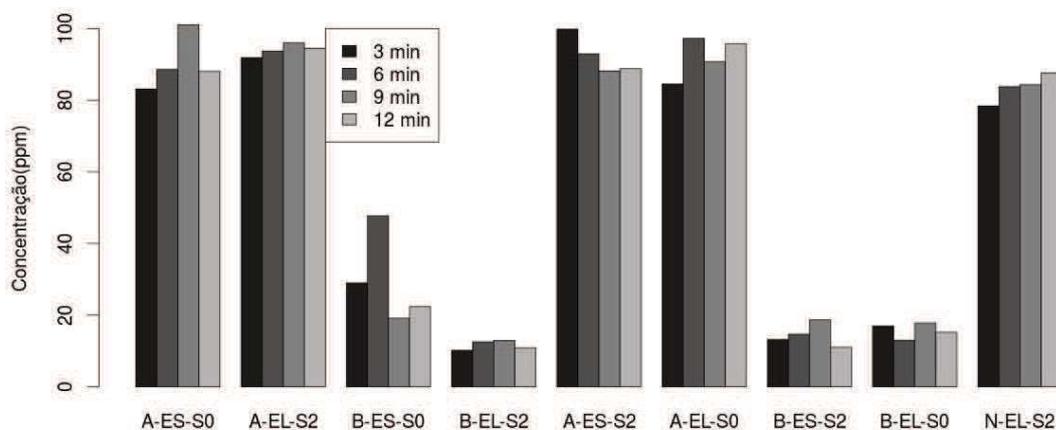


Figura 5.3 - Concentrações finais em ppm para o metal manganês utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas em 3,6,9 e 12 minutos.

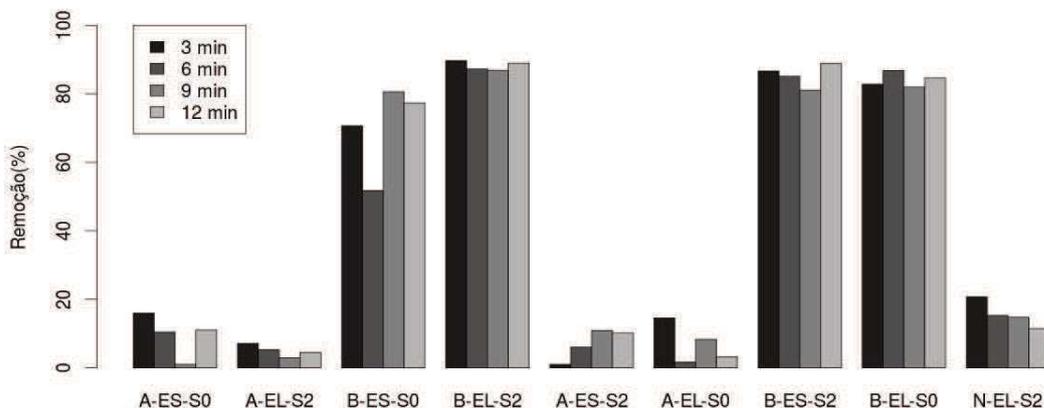


Figura 5.4 - Remoções em porcentagem para o metal manganês utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0% de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 20% de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3,6,9 e 12 minutos.

A partir dos gráficos de concentração final (gráfico da Figura 5.3) e gráfico de remoção (gráfico da Figura 5.4) ficou evidente que em algumas situações de emulsão a remoção para uma concentração inicial de 100 ppm foi mais elevada do que em outras. Ao analisar as condições em que o pH é ácido e as em que o pH é básico, notou-se que no básico as remoções foram maiores para o manganês. Porém, mesmo nas situações em que o pH é ácido, houve remoção de pequenas quantidades do metal, assim como na condição sem o ajuste do pH, principalmente no tempo de 3 minutos, indicando que a remoção pela membrana tem um tempo de residência inferior ao tempo 6 minutos nessas condições.

Quanto a eficiência do NaCl na troca iônica e do EDTA na captação do metal, observou-se que a remoção foi mais eficiente em concentrações maiores do agente complexante, ou seja, 10 mM. Já quanto ao cloreto de sódio, a ausência ou presença deste composto não provocou alterações na remoção do manganês.

Para verificar a eficiência do processo de remoção da membrana de emulsão foi realizado um controle com o meio fermentativo utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O meio fermentativo, após ser centrifugado, acrescentado de NaCl, EDTA e ajustado o pH de acordo com a Tabela 4.7 (os valores de pH encontram-se na Tabela 3 do apêndice B), foi adicionado à solução metálica, porém sem o procedimento de obtenção da membrana líquida de emulsão. O gráfico da Figura 5.5 encontra os resultados das concentrações finais para o controle com o metal manganês e o gráfico da Figura 5.6 estão as porcentagens de remoção do metal no controle.

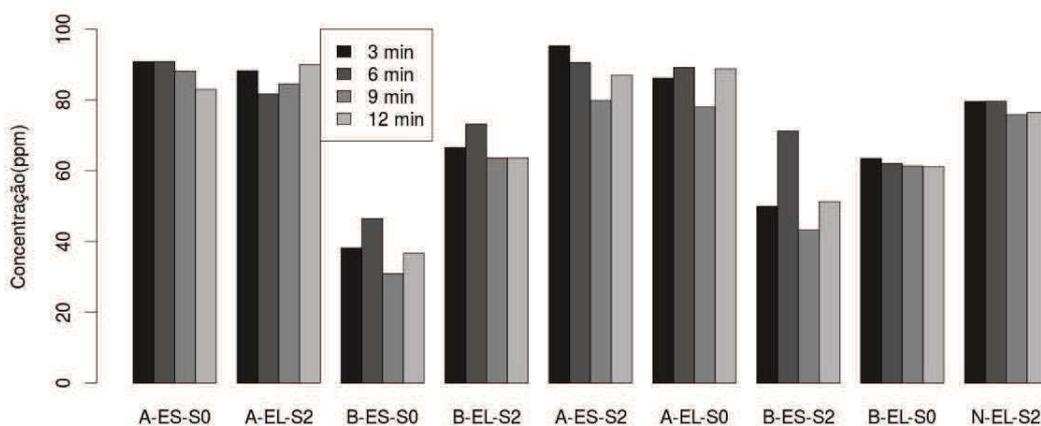


Figura 5.5 - Concentrações finais em ppm do controle para o metal manganês utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10 mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2% de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3,6,9 e 12 minutos.

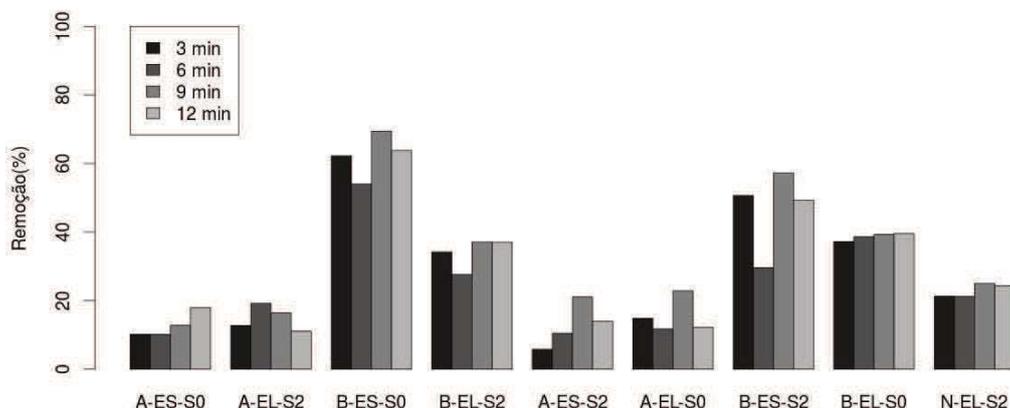


Figura 5.6 - Remoções em porcentagem do controle para o metal manganês utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido, B: pH básico, N: pH neutro (sem ajuste), ES: concentração 5mM de EDTA, EL: concentração de 10mM de EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl) e S2: concentração de 2 % de NaCl, com amostras retiradas nos tempos de 3,6,9 e 12 minutos.

Ao realizar o controle com o meio fermentativo utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, verificou-se que ao misturar a solução metálica do manganês de concentração inicial de 100 ppm com o meio fermentativo, sem o procedimento de formação da membrana líquida de emulsão, houve remoção do metal estudado. Apesar de ter ocorrido remoção, cujo o valor máximo foi de 62%, o processo envolvendo a formação da membrana líquida de emulsão, apresentou-se mais eficiente, alcançando a remoção máxima de 89%.

Ao analisar as condições de pH, concentração de EDTA e NaCl do controle realizado (gráfico da Figura 5.6), notou-se maiores remoções nas condições de pH básico, como havia ocorrido nos processos de remoção envolvendo a membrana líquida de emulsão. Além disso, pela análise do gráfico da Figura 5.6, verificou-se que para o manganês a remoção foi mais eficiente na ausência de cloreto de sódio e em concentrações menores de EDTA (5 mM).

5.3 – Avaliação da produção de biossurfactante a partir da fermentação com a *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerol como substrato

Nessa etapa do trabalho, foi realizado, primeiramente, um estudo da produção de biossurfactante utilizando o meio de fermentação descrito na Tabela 4.6. Nesse meio de fermentação foi utilizado o glicerol como fonte de carbono, o qual tem-se tornado promissor e uma alternativa de baixo custo na produção de biossurfactante, devido ao aumento de sua

produção, juntamente com o biodiesel, uma vez que o glicerol é um subproduto da produção do biodiesel (SARUBBO *et al.*, 2010). Dessa forma, foram realizados os testes de produção de biomassa, concentração de surfactante, índice de emulsificação, tensão superficial e concentração de raminose para avaliar a produção de biosurfactante ao longo de 24 a 120 horas. O gráfico da Figura 5.7 mostra os resultados obtidos para a produção de biomassa.

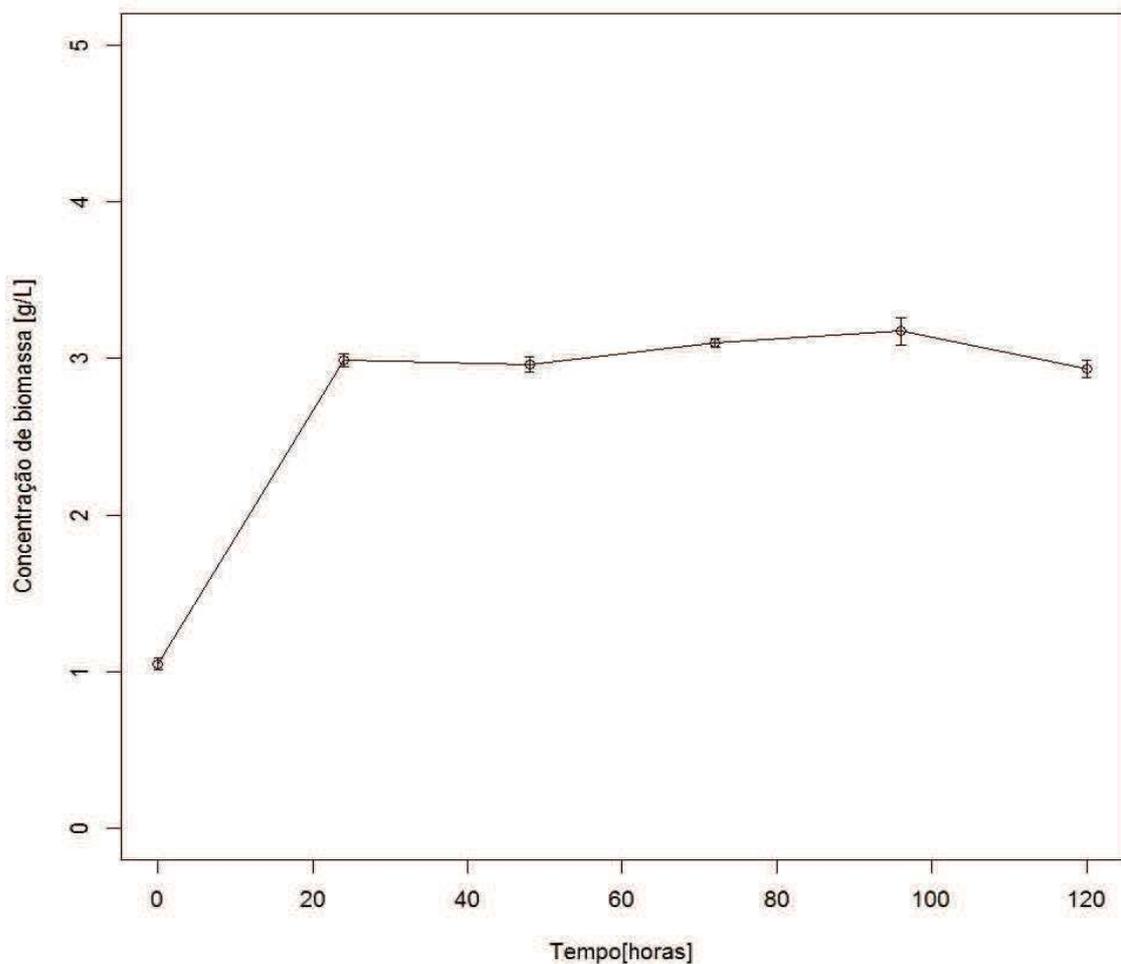


Figura 5.7 - Concentração de biomassa média formada ao longo do período de 24 a 120 horas

Ao observar o gráfico da Figura 5.7, foi possível verificar que o crescimento celular foi maior no período de 96 horas, mas com pequena diferença do tempo de 72 horas, e que no período de 120 horas teve um pequeno decaimento na concentração de biomassa. No estudo realizado por Sarubbo *et al.*, (2010), a maior concentração de biomassa foi obtida do período de 96 horas, utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, assim como no obtido no presente trabalho.

O gráfico da Figura 5.8, estão os resultados obtidos para o índice de emulsificação, utilizando o querosene como meio apolar.

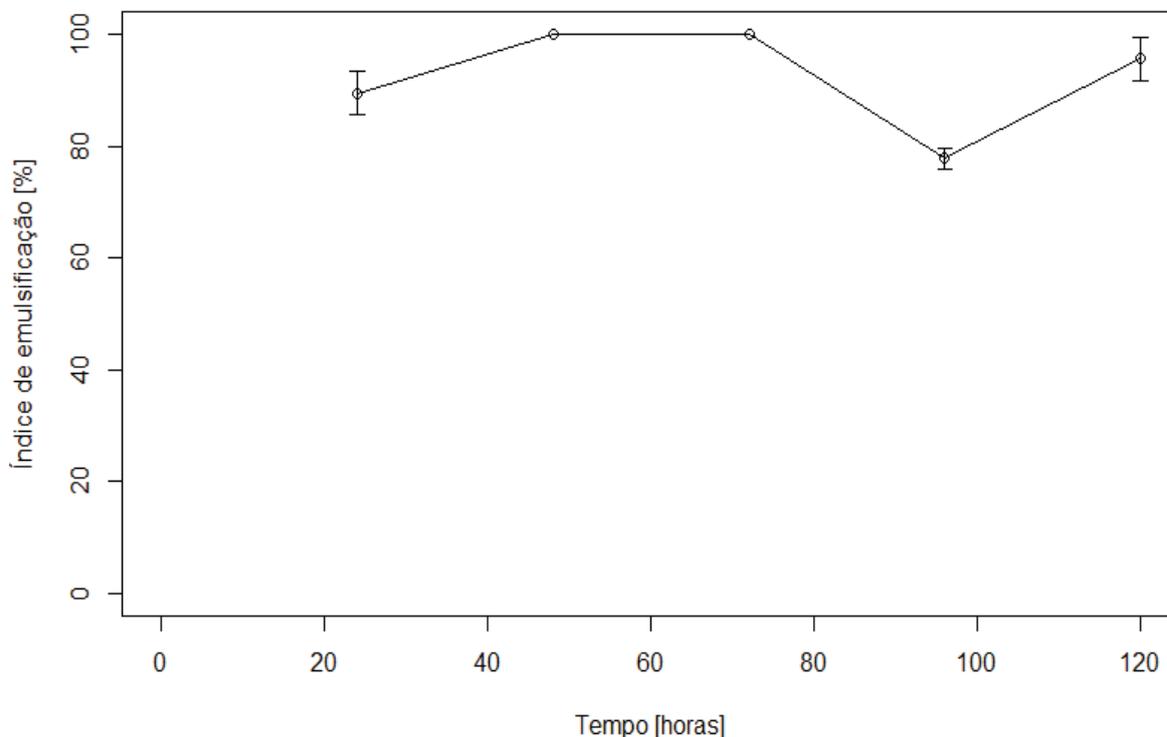


Figura 5.8 - Índice de emulsificação médio no período de 24 a 120 horas.

O índice de emulsificação, avaliado em triplicata com o meio apolar querosene, foi de 100% nos tempos de 48 e 72 horas, reduzindo a um valor de 77% no período de 96 horas e aumentando para 95% em 120 horas. No trabalho realizado por Sarubbo *et al* (2010), o meio apolar utilizado foi o composto n-hexadecano, e os melhores resultados com esse composto foram obtidos nos períodos de 96 horas e 120 horas, com aproximadamente 80% de índice de emulsificação.

Outro teste realizado no estudo da produção de biossurfactante foi a avaliação da tensão superficial, pois esse composto apresenta a característica de reduzir a tensão superficial e interfacial do meio. Dessa forma, esse teste foi realizado com o auxílio do tensiômetro para a leitura das amostras conforme apresentado na Figura 4.1, previamente calibrado com álcool etílico. Os resultados desse teste ao longo do período de 24 horas a 120 horas estão apresentados no gráfico da Figura 5.9.

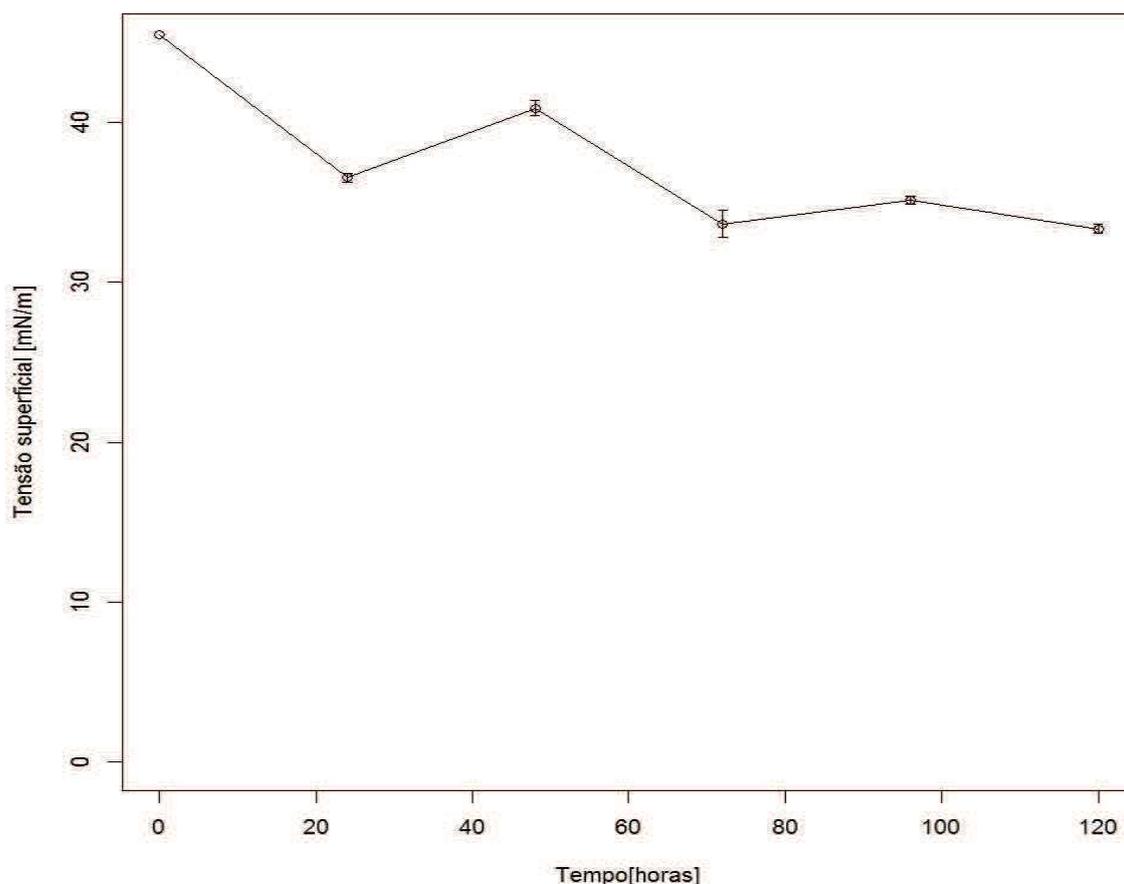


Figura 5.9 - Tensão superficial ao longo do período de 24 a 120 horas.

Ao comparar a tensão do meio de fermentação (aproximadamente 51,35 mN/m) com a tensão superficial avaliada ao longo do período de 120 horas, verificou-se a redução da mesma. No período de 24 horas a tensão reduziu para um valor de aproximadamente 36 mN/m, atingindo um aumento em 48 horas de 12%. Após 72 horas houve uma redução similar à alcançada após 120 horas (33 mN/m), e em 96 horas valor da tensão superficial foi de 35 mN/m.

No estudo realizado por Sarubbo *et al.*, (2010), na produção de biossurfactante utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 durante 120 horas, avaliou-se o efeito da concentração de nitrato de sódio ($NaNO_3$) na redução da tensão superficial, o qual resultou em $27,40 \pm 0,35$ mN/m após 96 e 120 horas. Valor este, próximo ao obtido no presente trabalho em que utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, em que após 120 horas, obteve uma tensão superficial de 33mN/m. Observou-se, também, que após 72 horas, para o presente trabalho e o realizado por Sarubbo *et al.*, (2010) valores próximos de 33mN/m para a redução superficial.

Para a caracterização do biossurfactante, foi realizado o teste de concentração de surfactante, conduzido também no período de 24 a 120 horas. Os resultados para esse teste estão no gráfico da Figura 5.10.

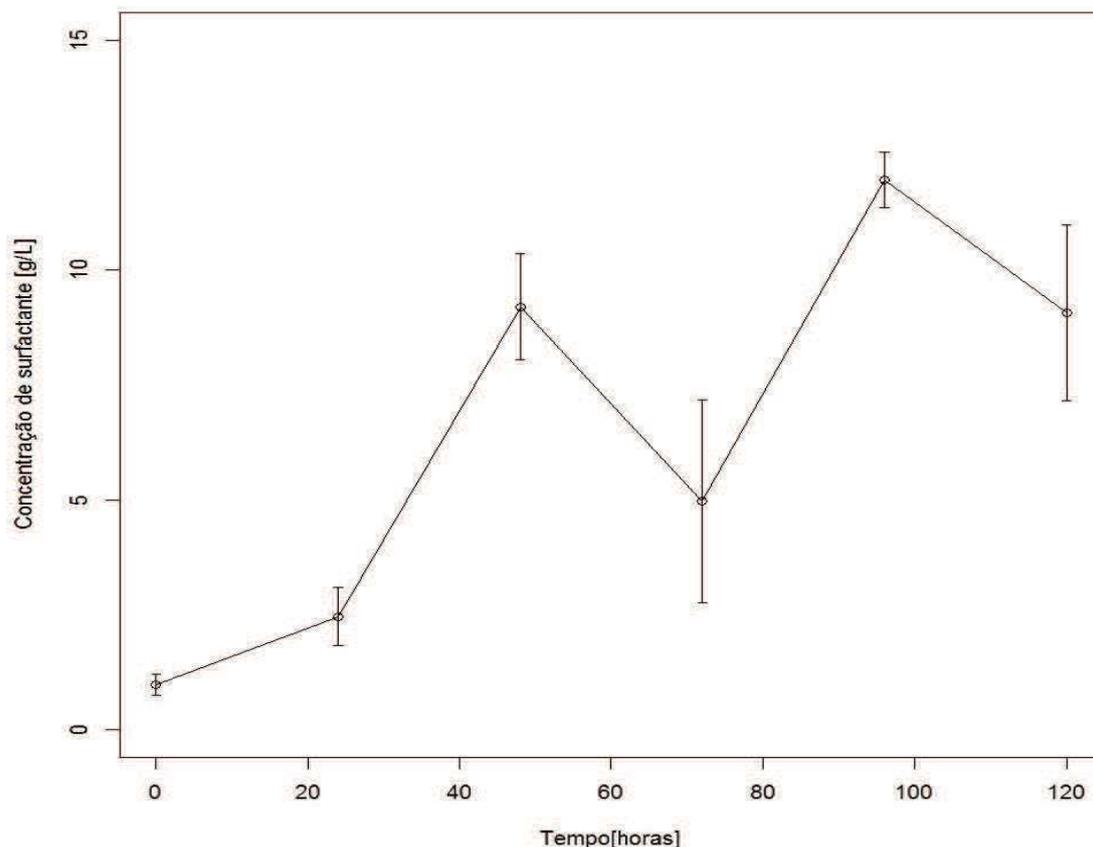


Figura 5.10 - Concentração de surfactante avaliado no período de 24 horas a 120 horas.

Neste teste de quantificação de surfactante formado, observou-se uma oscilação nos resultados, apresentando desvios-padrão mais elevados em relação a média. No período de 24 horas, obteve-se uma concentração de surfactante de 2,5 g/L, aumentando aproximadamente 79%, atingindo um valor próximo a 12 g/L no período de 96 horas. Nos tempos de 72 e 120 horas, a concentração de surfactante formada apresentou valores menores e próximos, no valor de 7 g/L.

Um teste para quantificação de biossurfactante, também realizado, foi o de concentração de raminose. Esse teste possibilita quantificar a raminose produzida, que é um tipo de biossurfactante produzido pelas *Pseudomonas aeruginosa*, segundo o método proposto por Rahaman *et al.*, (2002), a partir da obtenção prévia da curva de calibração apresentada no

apêndice A. Esse teste, avaliou a produção de raminose, também no período de 24 a 120 horas, como mostra o gráfico da Figura 5.11.

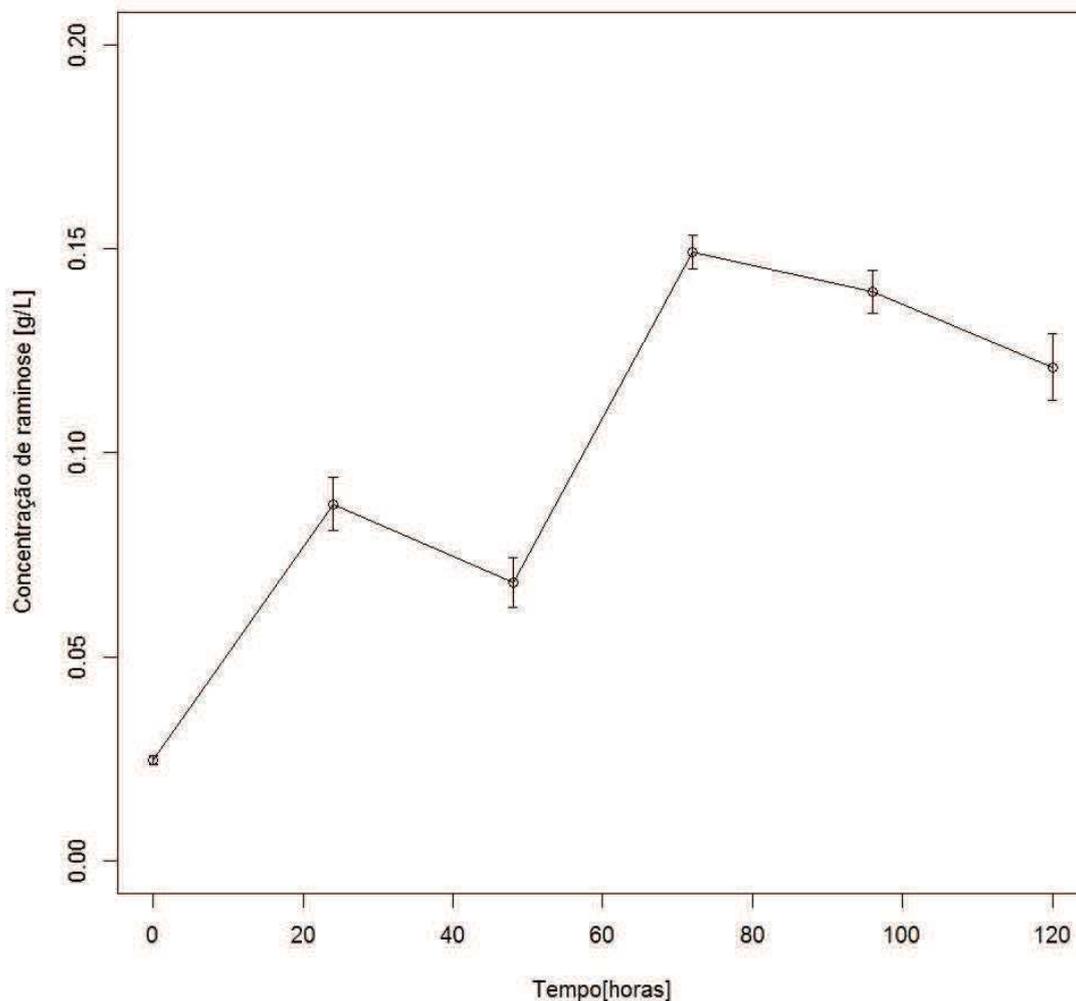


Figura 5.11 - Concentração de raminose avaliado no período de 24 a 120 horas.

O gráfico da Figura 5.11 sugere que no período de 24 horas a produção de raminose foi de aproximadamente 0,088 g/L, estabilizando após 48 horas, apesar de uma pequena redução. A produção máxima alcançada foi no período de 72 horas igual a 0,149 g/L, com uma redução após no período de 96 horas.

5.3.1 – Remoção dos metais Zinco, Ferro e Manganês utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* e glicerol como substrato no meio fermentativo

A partir dos resultados obtidos no item anterior para a caracterização e produção de biossurfactante, foi possível concluir que o tempo de fermentação mais favorável na produção do tensoativo foi de 72 horas. Esse período condicionado como propício para a produção de biossurfactante, foi obtido pela análise dos testes do item anterior (produção de biomassa, índice de emulsificação, tensão superficial, concentração de surfactante e concentração de raminose), em que se observou um índice de emulsificação com querosene de 100%, 33 mN/m de tensão superficial (o menor valor de tensão superficial encontrado), concentração de surfactante de aproximadamente 7 g/L, sendo ainda o período com a maior concentração de raminose (0,149 g/L) obtida.

Dessa forma, nesta etapa, foram realizados os testes de remoção com os metais zinco, ferro e manganês, com o tempo de fermentação de 72 horas, utilizando microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* e o meio fermentativo descrito na Tabela 4.6 proposto por Sarubbo *et al.*, (2010).

Os ensaios foram conduzidos de acordo com a Tabela 4.8, em que houve a variação da concentração de cloreto de sódio (NaCl), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), concentração de surfactante e EDTA, cujos os valores de pH dos ensaios realizados encontram-se na Tabela 4 do apêndice B. Os resultados das concentrações finais e remoção, com amostras retiradas nos tempos de 5 e 10 minutos, são apresentados no gráfico das Figuras 5.12 e 5.13, respectivamente, para uma concentração inicial de 100 ppm.

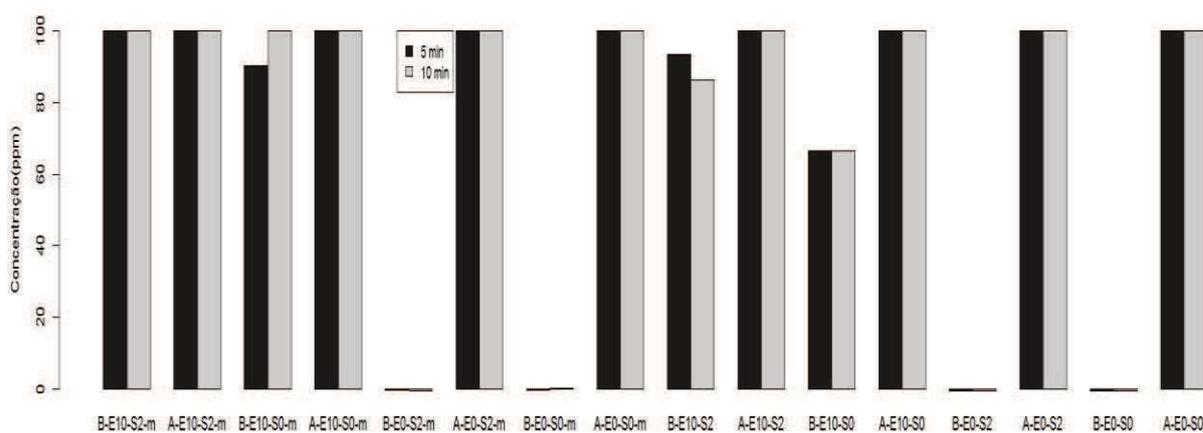


Figura 5.12 - Gráfico da concentração final de Zinco em ppm utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

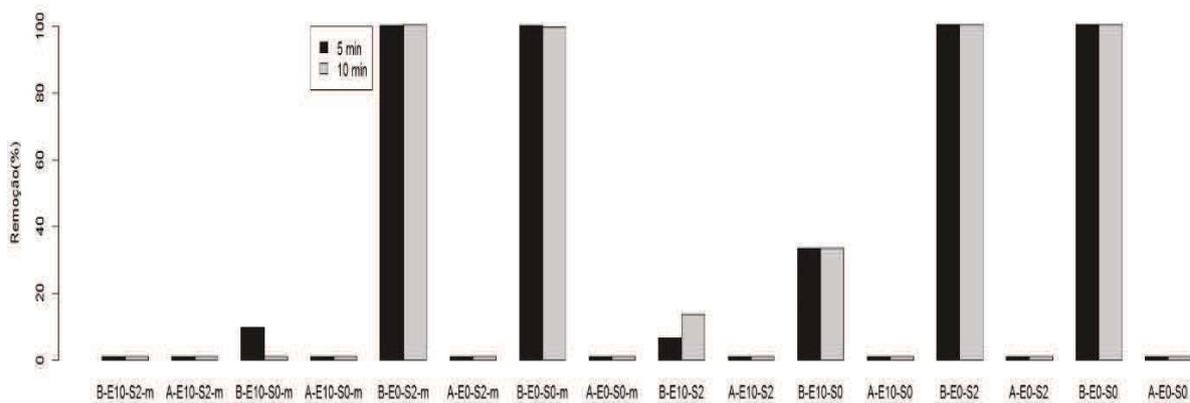


Figura 5.13 - Gráfico da remoção de Zinco em porcentagem (%) utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

A remoção do zinco, assim como a do manganês nos estudos anteriores, apresentou-se mais acentuada nas condições de pH básico, aproximadamente 100% desse metal, não apresentando remoções nas condições ácidas estudadas. Além disso, para esse metal, a presença do cloreto de sódio (NaCl) a 2% não afetou a eficiência da remoção e a ausência de EDTA promoveu melhorias nas remoções de zinco. Outro aspecto avaliado nesse processo, foi a concentração de meio fermentativo contendo biossurfactante, que por meio das Figuras 5.12 e 5.13, notou-se que tanto na concentração de 0,0745 g/L quanto na de 0,149 g/L de meio de fermentação, as remoções foram aproximadamente iguais a 100%.

O ferro foi o segundo metal estudado e assim como o zinco, foram realizados ensaios conforme a Tabela 4.8 (variando NaCl, EDTA, NaOH, HCl e a concentração de surfactante do meio fermentativo) em que os valores de pH desses ensaios realizados encontram-se na Tabela 5 do apêndice B conforme a nomenclatura dos gráficos apresentados nas Figuras 5.14 e 5.15. Os resultados das concentrações finais em ppm e das remoções em % estão dispostos nas Figuras 5.14 e 5.15, respectivamente, com as amostras retiradas nos tempos de 5 e 10 minutos para uma concentração inicial de 100 ppm de ferro.

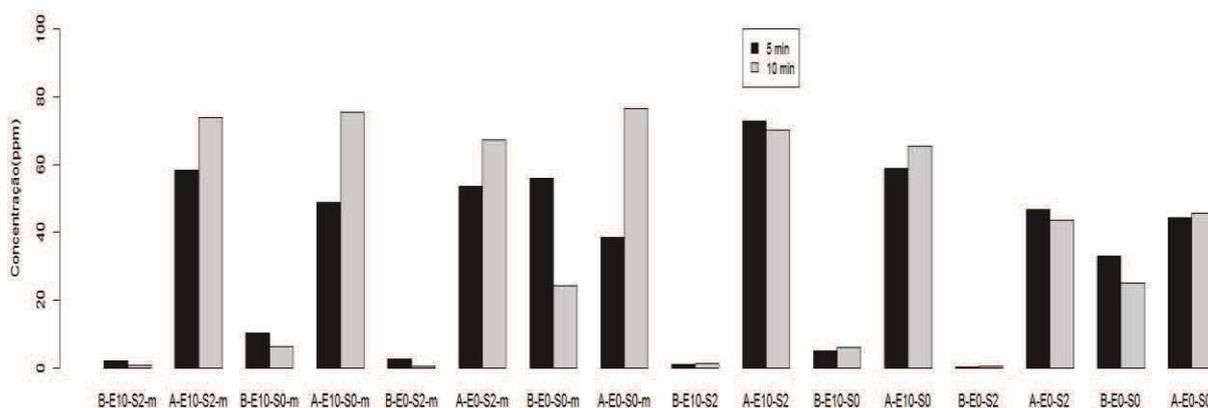


Figura 5.14 - Gráfico da concentração final de Ferro em ppm utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

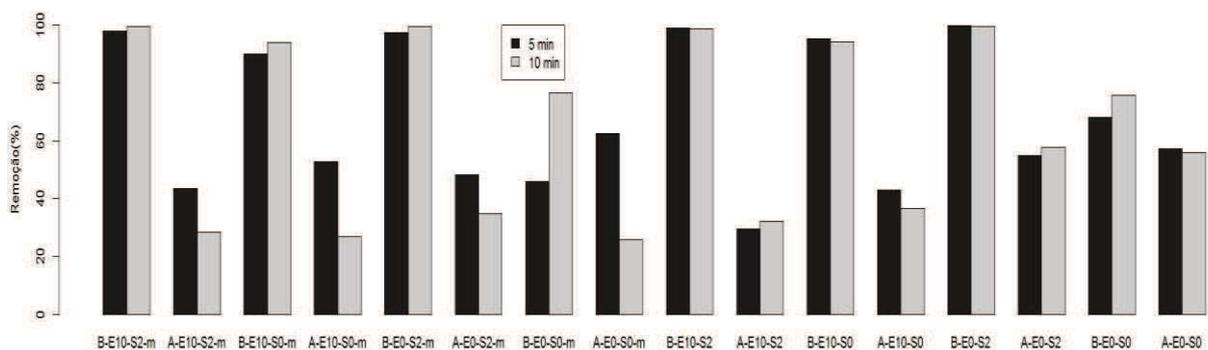


Figura 5.15 - Gráfico da remoção do Ferro em porcentagem (%) utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

Diferentemente do zinco, o ferro com uma concentração inicial de 100 ppm apresentou remoções tanto em condições ácidas quanto em básicas. Entretanto, com 1% de hidróxido de sódio a remoção do metal foi mais efetiva, atingindo um valor de aproximadamente 99% de remoção nessas condições. Já para as condições ácidas, a remoção do ferro, obteve um valor próximo a 60%.

Ao analisar as situações em que as condições são idênticas, diferindo apenas na quantidade de EDTA, observou-se que na presença desse agente quelante, as remoções foram mais eficientes do que com sua ausência para os ensaios realizados em condições básicas. Porém, ao fazer uma análise similar para as condições ácidas, verificou-se que o EDTA não

proporcionou melhores resultados de remoção para o ferro. Além do EDTA, variou-se a concentração de cloreto de sódio (NaCl), e para esse composto a remoção foi mais eficaz a 2%.

Para as diferentes concentrações de meio fermentativo, verificou-se que as remoções para condições contendo 0,0745 g/L (diluído a 1:2) de meio com biossurfactante e concentração de 0,149 g/L (100%) de meio com esse composto foram muito próximas. Fato que pode ser explicado pelas concentrações (50% e 100%) corresponderem a um valor acima da concentração crítica micelar, formando micelas, as quais são estruturas eficazes na formação de complexos e mobilização com metais pesados, como o ferro e zinco (Sarubbo *et al.*, 2016).

Outro metal estudado nesse processo de remoção, foi o manganês, com ensaios realizados conforme a Tabela 4.8 (variando NaCl, EDTA, NaOH, HCl e a concentração de surfactante do meio fermentativo), cujos os valores de pH correspondente aos ensaios realizado se encontram na Tabela 6 do apêndice B. Os gráficos das concentrações finais de manganês em ppm e o do processo de remoção em % se encontram nas Figuras 5.16 e 5.17, respectivamente, com concentração inicial de 100 ppm e amostras retiradas nos tempos de 5 e 10 minutos.

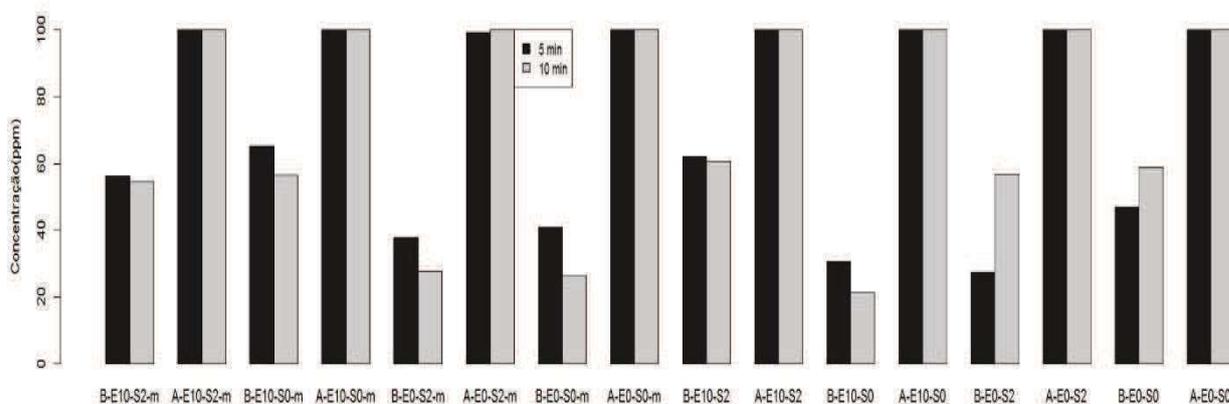


Figura 5.16 - Gráfico da concentração final de Manganês em ppm utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

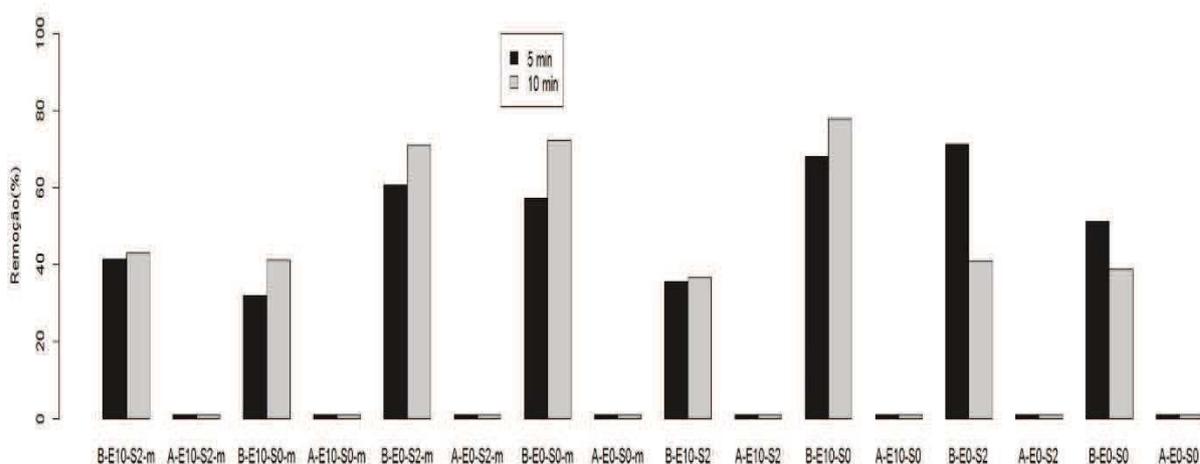


Figura 5.17 - Gráfico da remoção do Manganês em porcentagem (%) utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* para cada condição de emulsão, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl e m: 0,0745 g/L de surfactante, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

Assim como o ferro e o zinco, a remoção do manganês com concentração inicial de 100 ppm foi mais eficaz nas condições em pH básico, não havendo remoção deste metal nas condições ácidas. Ao analisar as concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e EDTA, verificou-se que para pH e EDTA em mesmas condições, as situações na ausência de NaCl, o processo de remoção foi mais eficaz, e que, para o EDTA, houve situações semelhantes em que este composto foi favorável, e que, em outras desfavoreceu à remoção.

Em relação à concentração do meio fermentativo, como apresentado para o metal zinco, as remoções foram efetivas tanto com 50% e a 100% nos ensaios contendo 1% de hidróxido de sódio.

Para fazer uma análise do processo de remoção ocorrido para os metais estudados, foi realizado um controle com água para o metal manganês sem processo de formação da membrana líquida e solução de biossurfactante. Dessa forma, foi feito um controle com o ajuste de pH de acordo com a Tabela 4.8, adição de NaCl e EDTA, em que os valores de pH se encontram na Tabela 7 do apêndice B. Os gráficos da Figura 5.18 encontram as concentrações finais em ppm e a Figura 5.19 as remoções em % de manganês no controle com água para uma concentração inicial de 100 ppm em que as foram amostras retiradas nos tempos de 5 e 10 minutos.

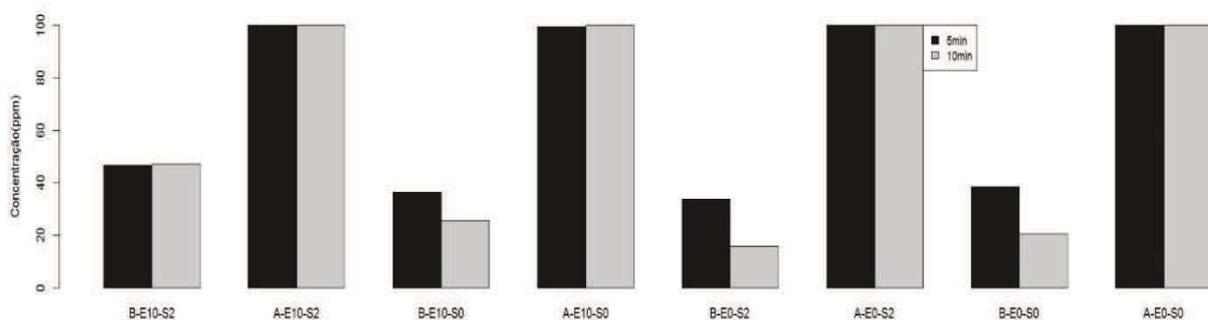


Figura 5.18 – Gráfico da concentração final de manganês em ppm, obtida no controle de água com o metal para cada condição de EDTA, NaCl, NaOH e HCl, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

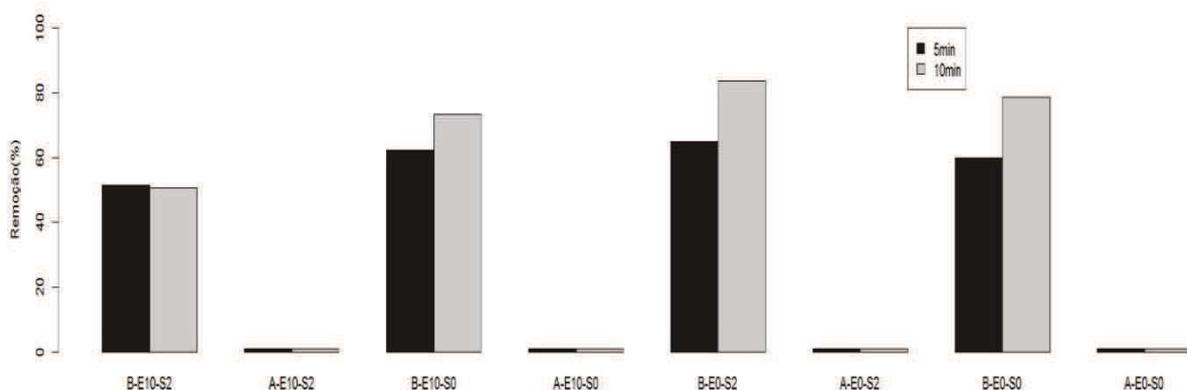


Figura 5.19 – Gráfico da remoção de manganês em (%), obtida no controle de água com o metal para cada condição de EDTA, NaCl, NaOH e HCl, sendo A: pH ácido (0,7% de HCL), B: pH básico (1% de NaOH), E10: concentração de 10mM de EDTA, E0: sem EDTA, S0: concentração 0 % de cloreto de sódio (NaCl), S2: 2% de NaCl, com amostras retiradas em 5 e 10 minutos.

Nesse controle, realizado com água foi verificado a formação de um precipitado (corpo de fundo), insolúvel no meio, em pH básico (valores entre 7 e 8, conforme a Tabela 7 do apêndice B). Esse precipitado obtido, provavelmente, hidróxido de manganês, apresenta K_{ps} de $1,6 \times 10^{-13}$ (HARRIS, 2001), um valor muito baixo, comprovando sua insolubilidade no meio, assim como o hidróxido de ferro, cujo o K_{ps} é $7,0 \times 10^{-16}$ (HARRIS, 2001), comprovando sua insolubilidade. Dessa forma, não podendo ser afirmado que todo hidróxido formado ficou retido na membrana, nesse estudo, e como houve remoção também nas condições ácidas (gráfico da Figura 5.15), para o metal ferro, voltou-se o interesse do trabalho para ensaios realizados com adição de ácido sulfúrico, ou seja, em condições ácidas. Então foi proposto um planejamento para o estudo da remoção para o manganês e o ferro como apresentado no item 5.4.

5.4 – Planejamento para remoção dos metais Ferro e Manganês utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* e glicerol como substrato no meio fermentativo

O planejamento foi realizado de acordo com a Tabela 4.10. O estudo do mesmo, avaliou-se influência das concentrações de cloreto de sódio (NaCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄), EDTA (etilenodiamino tetra-acético), D₂EHPA (Di-(2-etil-hexil)fosfórico) e tempo na remoção do ferro e manganês. Os resultados dos ensaios realizados, encontram na Tabela 5.5 e os respectivos valores de pH para os na Tabela 8 do apêndice B.

Tabela 5.5- Resultados do planejamento para o Ferro e Manganês.

Ensaio	D ₂ EHPA (M)	Tempo (min)	H ₂ SO ₄ (M)	NaCl (g/L)	EDTA (mM)	Remoção Fe (%)	Remoção Mn (%)
13	-1 (0,08)	-1 (4)	-1 (0,4)	-1 (8)	+1 (12)	16,3897	6,6640
4	+1 (0,16)	-1 (4)	-1 (0,4)	-1 (8)	-1 (4)	23,3398	19,9549
17	-1 (0,08)	+1 (8)	-1 (0,4)	-1 (8)	-1 (4)	30,2510	13,8836
29	+1 (0,16)	+1 (8)	-1 (0,4)	-1 (8)	+1 (12)	24,9212	7,2735
8	-1 (0,08)	-1 (4)	+1 (0,8)	-1 (8)	-1 (4)	22,8813	25,5076
22	+1 (0,16)	-1 (4)	+1 (0,8)	-1 (8)	+1 (12)	19,9234	13,1831
1	-1 (0,08)	+1 (8)	+1 (0,8)	-1 (8)	+1 (12)	14,2225	0
11	+1 (0,16)	+1 (8)	+1 (0,8)	-1 (8)	-1 (4)	17,4734	10,5701
6	-1 (0,08)	-1 (4)	-1 (0,4)	+1 (24)	-1 (4)	12,3679	5,9265
27	+1 (0,16)	-1 (4)	-1 (0,4)	+1 (24)	+1 (12)	15,1597	0
7	-1 (0,08)	+1 (8)	-1 (0,4)	+1 (24)	+1 (12)	19,7476	0
23	+1 (0,16)	+1 (8)	-1 (0,4)	+1 (24)	-1 (4)	20,9776	0
3	-1 (0,08)	-1 (4)	+1 (0,8)	+1 (24)	+1 (12)	21,1925	3,7950
5	+1 (0,16)	-1 (4)	+1 (0,8)	+1 (24)	-1 (4)	12,3972	9,4757
26	-1 (0,08)	+1 (8)	+1 (0,8)	+1 (24)	-1 (4)	0	5,4113
14	+1 (0,16)	+1 (8)	+1 (0,8)	+1 (24)	+1 (12)	5,5444	4,8725
24	-2 (0,04)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	0	8,2028
16	+2 (0,20)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	4,6034	15,7962
10	0 (0,12)	-2 (2)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	0	4,1587
9	0 (0,12)	+2 (10)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	0	9,8293
2	0 (0,12)	0 (6)	-2 (0,2)	0 (16)	0 (8)	0	0
12	0 (0,12)	0 (6)	+2 (1,0)	0 (16)	0 (8)	0	22,0325
15	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	-2 (0)	0 (8)	0	8,9571
19	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	+2 (32)	0 (8)	0	0
18	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	-2 (4)	0	3,5660
20	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	+2 (16)	0	10,9809
28	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	0	9,6912
21	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	0	3,7108
25	0 (0,12)	0 (6)	0 (0,6)	0 (16)	0 (8)	0	0,5927

Ao avaliar a Tabela 5.5 em que se encontram os valores de remoção obtidos experimentalmente para cada ensaio realizado com a variação dos parâmetros de acordo com a Tabela 4.10, observa-se que os resultados de remoção foram variados, obtendo valores satisfatórios de remoção e situações com ausência remoção. A partir do planejamento composto central proposto foi obtido para o ferro uma remoção de aproximadamente 30 %, enquanto que para o manganês a remoção máxima foi igual a 25%.

Dessa forma, para a otimização dos resultados obtidos no planejamento proposto, foi realizado o estudo da rede neural para melhor representar os dados experimentais a partir do cálculo dos erros absolutos médios e do seu ajuste dos dados. A Tabela 5.6 apresentam os valores associados ao número de neurônios da rede e os respectivos erros absolutos médios encontrados pelo cálculo da Equação 4.3. Dessa forma, pôde-se observar que para o número de neurônios da camada oculta igual a 10, obteve-se a rede que melhor representa os dados experimentais, pois nesta situação tem-se o menor valor do erro absoluto médio (5,7369).

Tabela 5.6 - Dados do número de neurônios e os respectivos erros absolutos médios.

Número de neurônios	Erro absoluto médio (EAM)
3	7,1435
4	7,4316
5	6,5309
6	6,0141
7	6,6669
8	7,0376
9	6,6961
10	5,7369
11	7,4708
12	7,4988

Na Figura 5.20 estão os resultados da rede neural na descrição da remoção do manganês em termos de valores preditos pelos valores observados para a totalidade dos pontos, nas condições em que no número de neurônios utilizado foi 10. Pode-se observar que a rede neural foi capaz de representar adequadamente os experimentos com a correspondência entre os valores previstos e calculados pelo modelo o que indica a boa qualidade do ajuste, sendo que

para o modelo proposto tem-se $R^2=0,96$ e equação descritiva $y= 0.97224x + 0.7295$, em que y representa os valores preditos e x os valores observados.

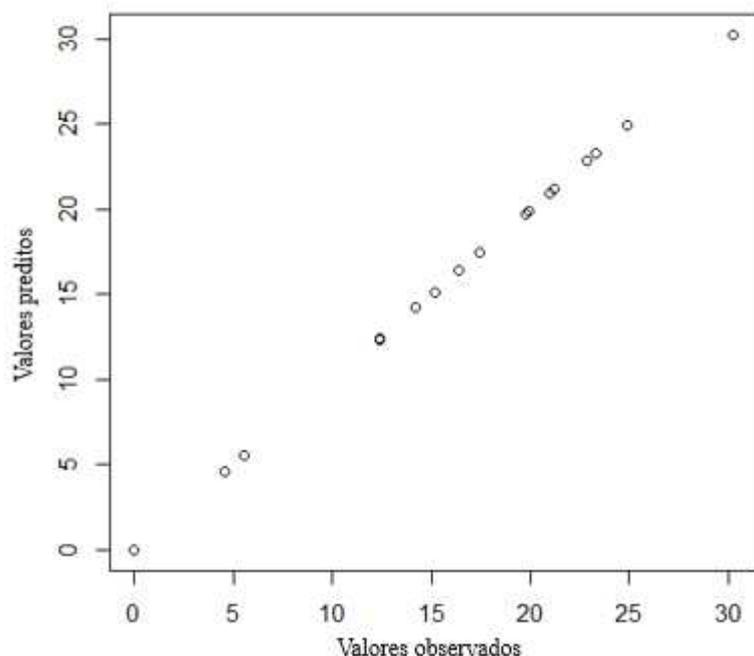


Figura 5.20 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à remoção de manganês.

Uma vez que o modelo da rede foi adequado para descrever os resultados, o mesmo pode ser utilizado na fase de otimização dos dados. Essa otimização pelo método de colônia de abelhas (ABCoptim), forneceu valores ótimos para cada variável estudada, que estão dispostos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Valores ótimos encontrados pelas redes neurais para os metais.

Metal	D₂EHPA (M)	Tempo (min)	Ácido sulfúrico (M)	NaCl (g/L)	EDTA (mM)	Remoção (%)
Manganês	0,1125	2,1752	0,4864	0,0000	3,6120	33,0576
Ferro	0,1580	2,0000	0,2000	11,2443	0,0000	48,5746

Dessa forma, foi realizado o processo de remoção para cada metal nas condições ótimas encontradas, objetivando a validação da otimização realizada. Para o manganês, foi

encontrado uma remoção de 36% experimentalmente, resultando em um erro relativo de aproximadamente 10%. Com isso, considerando os erros experimentais, verificou-se que a otimização do manganês foi válida, pois o resultado experimental aproximou-se do valor ótimo da otimização.

No trabalho realizado por Pérez-Garibay *et al.*,(2012), em que se comparou a eficiência do D₂EHPA com o Cyanex 272 na extração de manganês de uma solução do processo de lixiviação obtida por uma redutora de pirolusita de baixo grau utilizando SO₂. Nesse processo, foi estudado a cinética da extração usando o D₂EHPA como extratante, diluindo este na fase orgânica (querosene). No estudo, o maior valor de extração do manganês foi de aproximadamente 15%, em um tempo de 200 segundos (aproximadamente 3 min).

Então, ao analisar os resultados obtidos no estudo do autor mencionado, com os dados do presente trabalho, verifica-se uma maior remoção, aproximadamente 58%, com um tempo menor nesse estudo com a formação da membrana líquida.

Para ilustrar a visualização dos efeitos das variáveis analisadas no planejamento, foram construídas superfícies de respostas para a otimização do metal manganês (Figuras 5.21 a 5.30). Na Figura 5.21, fixou o EDTA, sal e ácido (H₂SO₄), variando a concentração de D₂EHPA e tempo. Com a análise dessa figura, observa-se que há vários pontos ótimos para a remoção, sendo que as concentrações de D₂EHPA se encontram nas faixas entre aproximadamente 0,08 e 0,15 M, a qual está na faixa encontrada na otimização. Para o tempo, nota-se que a faixa ótima encontra-se em mais de um ponto, pois a superfície mostra a presença de mais um domo.

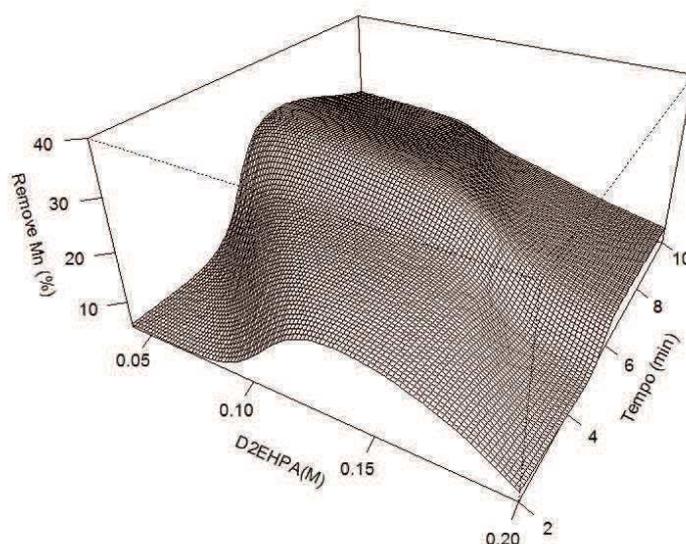


Figura 5.21 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D₂EHPA e tempo).

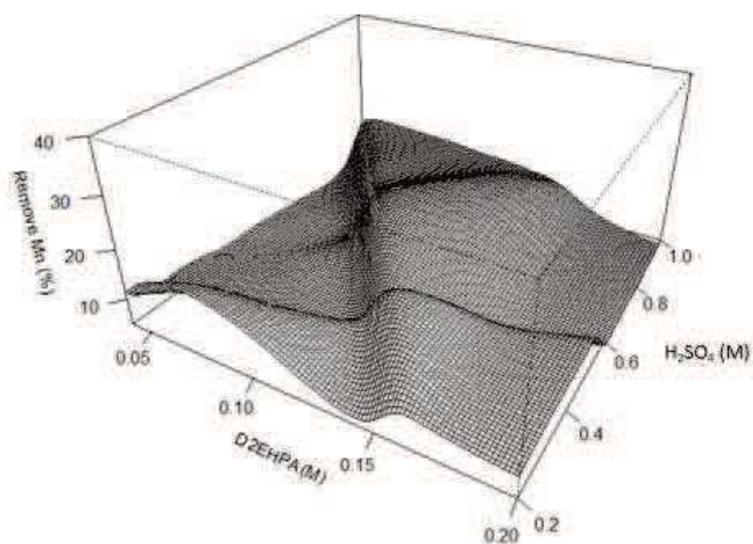


Figura 5.22 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D₂EHPA e ácido).

No processo de construção da superfície de resposta da Figura 5.22, fixou o EDTA em 3,6120 mM, sal (NaCl) em 0 g/L e o tempo em 2 min, variando a concentração de D₂EHPA e o ácido sulfúrico. Analisando a Figura 5.22, observa-se que há vários pontos ótimos para a remoção, sendo que as concentrações de D₂EHPA se encontram nas faixas entre 0,05 e 0,15 M e entre 0,15 e 0,20 M, sendo os que a primeira faixa de valores (0,05 e 0,15 M) engloba o valor encontrado no processo de otimização (0,1125 M). Para o ácido sulfúrico, nota-se que a faixa ótima para a remoção está em diversos pontos, com vários domos na superfície de resposta, em que o valor previsto na otimização (0,4864 M) encontra-se em um desses pontos ótimos.

Além disso, observa-se que para a concentração de aproximadamente 0,11 M de D₂EHPA (valor encontrado na otimização) e 0,48 M (valor encontrado na otimização) de ácido sulfúrico na superfície de resposta da Figura 5.22, tem-se um ponto em que a remoção de manganês é máxima.

A Figura 5.23, encontra-se a superfície de resposta construída a partir da fixação das variáveis tempo em 2 min, EDTA em 3,6120 mM e o ácido sulfúrico em 0,4864 M, variando as variáveis cloreto de sódio (NaCl), D₂EHPA e ácido sulfúrico (H₂SO₄).

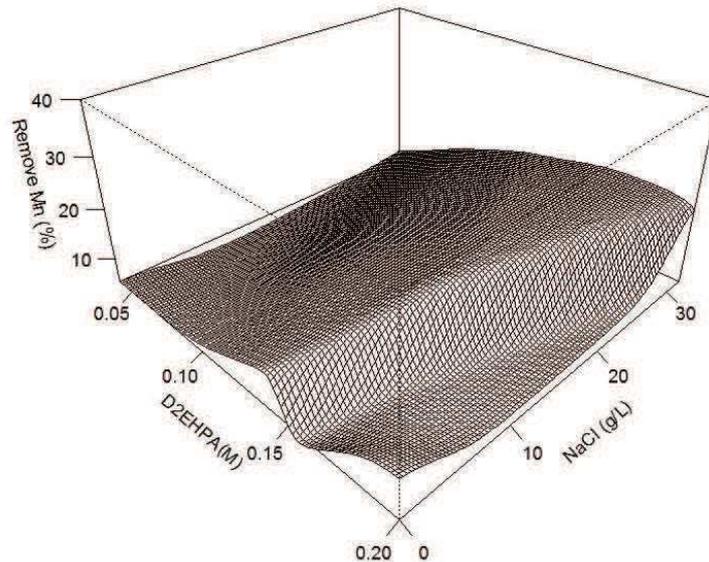


Figura 5.23 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D₂EHPA e NaCl).

Ao analisar a Figura 5.23, observa-se que, assim como as superfícies anteriores, há mais de um ponto ótimo para a remoção, sendo que as concentrações de D₂EHPA se encontram na faixa entre 0,10 e 0,15M, valores que estão na faixa encontrada na otimização (0,1125 M). Para o cloreto de sódio (NaCl), verifica-se que no ponto próximo a concentração de 0 g/L houve maior valor de remoção também.

Dessa forma, observa-se na superfície de resposta da Figura 5.23, que para a concentração de aproximadamente 0 g/L de NaCl (valor encontrado na otimização) e 0,11 de D₂EHPA, ocorre um ponto, dentre os presentes na superfície, que a remoção do manganês é máxima.

Na Figura 5.24, é apresentada a superfície de resposta em que as variáveis tempo, NaCl e ácido sulfúrico foram fixadas nos valores de 2 min, 0 g/L e 0,4864 M (valores encontrados na otimização), respectivamente, variando a concentração de EDTA e D₂EHPA.

Na Figura 5.25 está apresentada a superfície de resposta correspondente a fixação das variáveis NaCl, EDTA e D₂EHPA em 0 g/L, 3,6120 mM e 0,1125 M (valores obtidos na otimização), respectivamente, e variação do tempo e da concentração de ácido sulfúrico, para análise dos efeitos dessas variáveis na remoção do manganês.

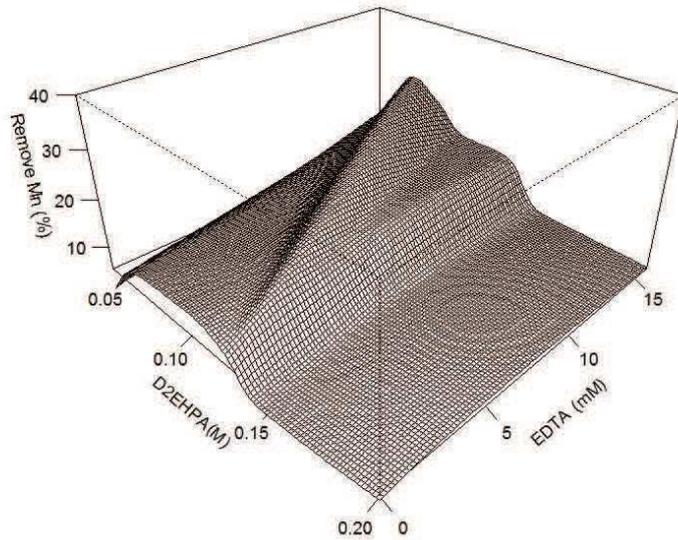


Figura 5.24 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (D₂EHPA e EDTA).

A partir da Figura 5.24, observa-se que ocorre mais de um ponto ótimo para a remoção do manganês. Para o composto D₂EHPA, a faixa em que a remoção é maior está entre 0,05 M e aproximadamente 0,15 M, que inclui o valor de concentração encontrada na otimização (0,1152 M). Além disso, nota-se que para um tempo de 2 min e aproximadamente 0,48 M de ácido, tem-se um ponto em que a remoção de manganês é máxima.

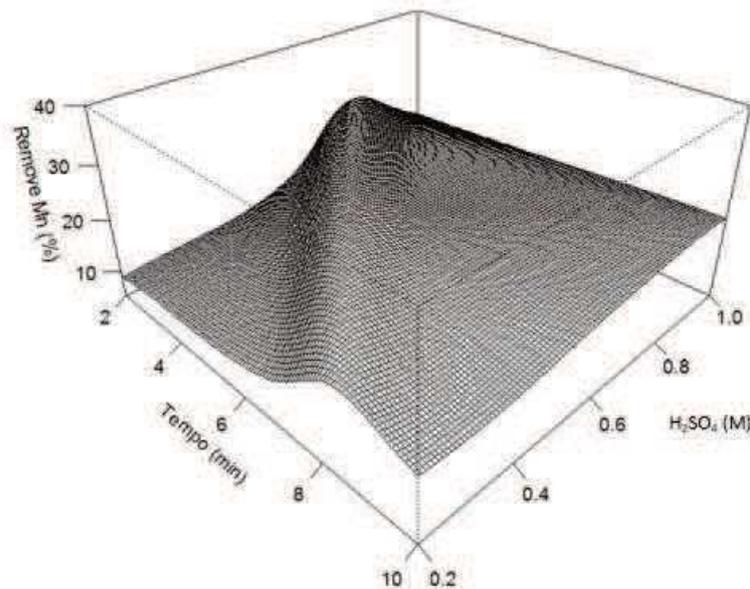


Figura 5.25 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (Tempo e ácido sulfúrico).

Ao analisar a superfície de resposta da Figura 5.25, verifica-se um ponto ótimo, em que a remoção é de aproximadamente 30%. Nesse ponto, a variável tempo é próximo ao valor inicial de 2 minutos e a concentração de ácido sulfúrico é de aproximadamente 0,48 M, valor que se aproxima do encontrado na otimização.

Na Figura 5.26 está apresentada a superfície de resposta, em que as variáveis tempo, D₂EHPA e NaCl foram fixadas em 2 min, 0,1125 M e 0 g/L, respectivamente, e que as concentrações dos compostos EDTA e ácido sulfúrico foram variadas. Na Figura 5.27, encontra a superfície de resposta em que fixou as concentrações de EDTA, D₂EHPA e o tempo em 3,6120 mM, 0,1125 M e 2 min (valores encontrados no processo de otimização), respectivamente, variando a concentração de ácido sulfúrico e NaCl.

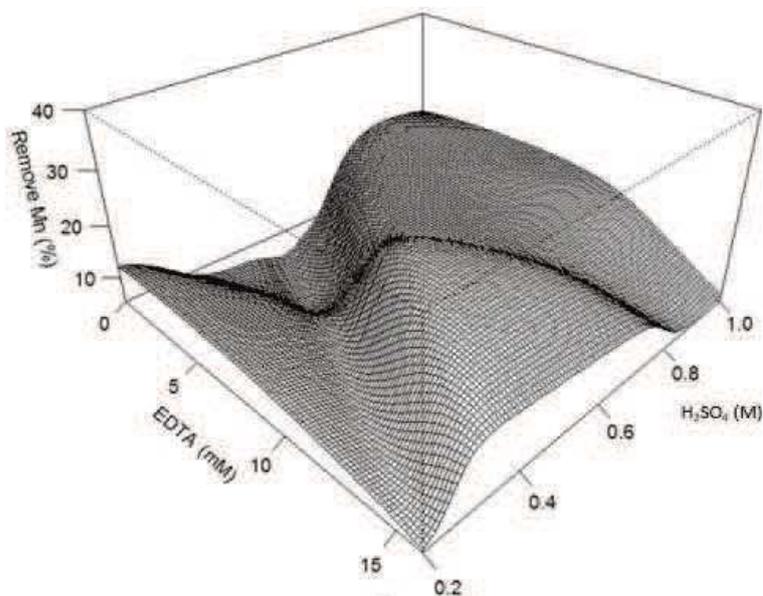


Figura 5.26 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (EDTA e ácido sulfúrico).

Ao observar a superfície de resposta da Figura 5.26, é possível notar dois pontos em que a remoção do manganês foi próxima a 30%. Em um dos pontos ótimos de remoção verifica-se que a concentração de EDTA se aproximou de 3,6 mM, e que para o ácido, a concentração também se aproximou do valor encontrado na otimização, igual a 0,48 M. Dessa forma, para os valores de concentração iguais a 3,6 mM e 0,48 M de EDTA e ácido, respectivamente, nota-se na superfície de resposta, um ponto em que a remoção do manganês atinge um valor de máxima remoção.

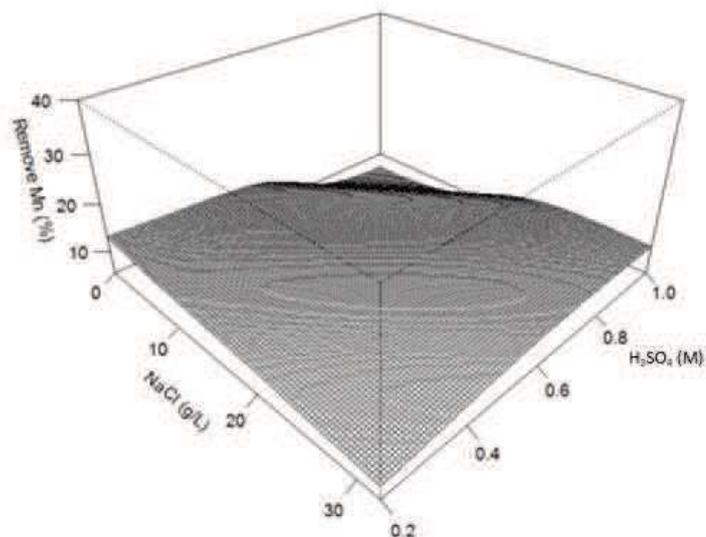


Figura 5.27 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (NaCl e ácido sulfúrico).

Na superfície de resposta apresentada na Figura 5.27, nota-se que para as concentrações de 0 g/L de NaCl e 0,5 M de ácido sulfúrico, ocorre um ponto e que a remoção de manganês atinge um valor máximo.

Na Figura 5.28 está disposta a superfície de resposta em que foram fixadas as variáveis EDTA, ácido sulfúrico e D₂EHPA, em 3,6120 mM, 0,4864 M e 0,1125, respectivamente, variando a concentração de NaCl e tempo. Nessa superfície foi possível verificar que a remoção de manganês foi na concentração de 0 g/L de NaCl no tempo de 2 minutos.

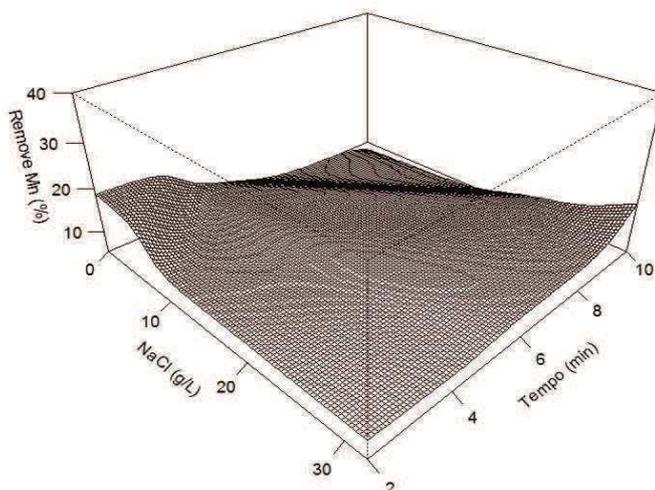


Figura 5.28 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (NaCl e tempo).

As Figuras 5.29 e 5.30 estão apresentadas as superfícies de resposta em que as variáveis EDTA e NaCl, e, EDTA e tempo foram estudadas, respectivamente.

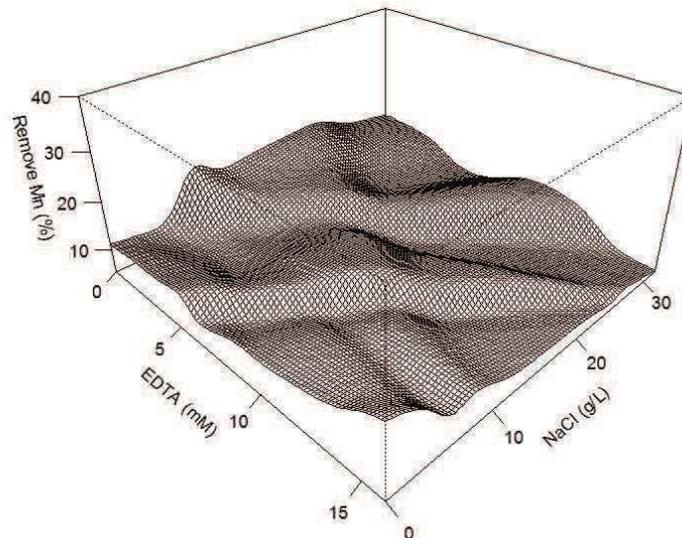


Figura 5.29 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (NaCl e EDTA).

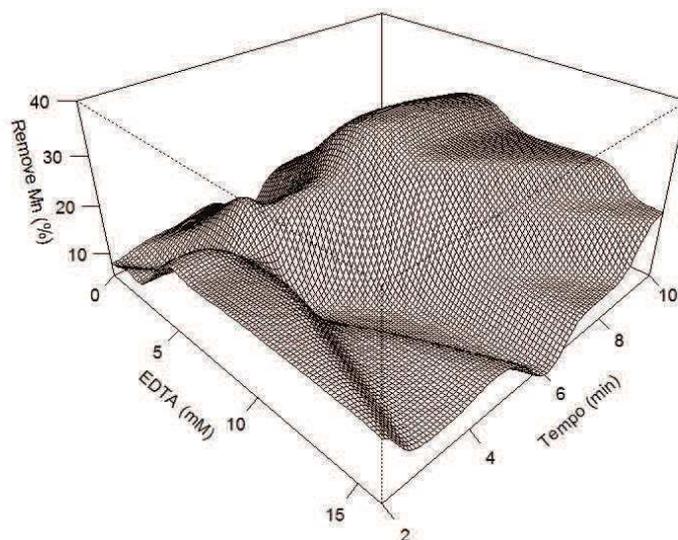


Figura 5.30 - Superfície de resposta para a remoção do manganês em relação às variáveis estudadas (EDTA e tempo).

Na Figura 5.29, observa-se que ocorre vários pontos ótimos para a remoção do manganês, em que um desses pontos corresponde aos valores encontrados na otimização, com 0 g/L de NaCl e aproximadamente 4 mM de EDTA. Na Figura 5.30, verifica-se de forma similar, a ocorrência de mais de um ponto ótimo para a remoção, sendo um deles correspondente aos valores encontrados na otimização, em 2 min e 3,6 mM de EDTA.

6 – CONCLUSÃO

6.1 – Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar as seguintes conclusões:

- O uso de membranas com biossurfactantes no tratamento de águas contaminadas mostrou ser uma metodologia promissora;
- Além da ação de estabilização da emulsão, o biossurfactante contribui para a remoção de metais;
- A membrana líquida de emulsão mostrou ser processo de remoção de metais em pH ácido capaz de remover quantidades superiores a 30% nas condições testadas;
- O uso de querosene como diluente orgânico resultou em emulsões mais estáveis que o n-hexano;
- O processo de remoção da membrana é um estudo complexo, contendo várias condições ótimas a serem estudadas;
- O resultado do planejamento proposto para o manganês, a partir de sua otimização, apresentou um valor próximo ao obtido experimentalmente, validando, dessa forma, o modelo de redes neurais obtido.

6.2 – Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar o processo de remoção em série com a utilização de novas membranas para se obter maiores remoções;
- Avaliar a remoção dos íons de ferro e manganês na forma combinada;

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACGIH] AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENIS. 1999 TVLs BEIs: limites de exposição (TVLs) para substâncias químicas e agentes físicos e índice biológicos de exposição (BEIs). Tradução: Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Campinas, 1999.

AHMAD, A. L., KUSUMASTUTIA, A., DEREK, C.J.C., OOI, B.S. Emulsion liquid membrane for heavy metal removal: an overview on emulsion stabilization and destabilization. *Journal Chemical Engineering*, v. 171, p.870–882, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.05.102>

AHMAD, A. L., SHAH BUDDIN, M. M. H., Ooi, B. S. Extraction of Cd (II) ions by emulsion liquid membrane (ELM) using Aliquat 336 as carrier. *American Journal of Chemistry*, v. 5, p. 1-6, 2015.

AKAR, S. T., ARSLAN, S., ALP, T., ARSLAN, D., AKAR, T. Biosorption potential of the waste biomaterial obtained from cucumis melo for the removal of Pb²⁺ ions from aqueous media: equilibrium, kinetic, thermodynamic and mechanism analysis. *Chem. Eng. J.* v.185–6, p. 82–90, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.032>

APARNA, A., SRINIKETHAN, G., HEGDE, S. Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* Sps. On Biodegradation of Crude Oil. In 2011, 2nd International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE, 2011.

ATSDR. Draft toxicological profile for manganese. Agency for toxic substances and disease registry. Division of toxicology and environmental medicine/applied toxicology branch, Atlanta, Georgia, 2008. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151-p.pdf>>

AYED, H. B., HMIDET, N., BÉCHET, M., CHOLLET, M., CHATAIGNÉ, G., LECLÈRE, V., JACQUES, P., NASRI, M. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis*. *Process Biochemical*, v.49, p.1699-1707, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.001>

BALLS, P. W., S. HULL, B. S. MILLER, J. M. PIRIE AND W. PROCTOR. Trace metal in Scottish estuarine and coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*. v. 34 p. 42-50, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(96\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00056-2)

BADEN, S.P., & NEIL, D.M. Accumulation of Manganese in the Haemolymph, Nerve and Muscle Tissue of *Nephrops norvegicus* (L.) and Its Effect on Neuromuscular Performance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.119A, p. 351-359, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(97\)00437-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(97)00437-6)

BAETTY, R. The elements: Manganese. New York: Marshal Cavendish Corp. p.32, 2004.

BEHROOZ, A. H.; BOOZARJOMEHRY, R. B. Prediction of limiting activity coefficients for binary vapor-liquid equilibrium using neural networks. *Fluid Phase Equilibria*, v.433, p. 174-183, 2017.<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.10.033>

BEM, C. C. Determinação do estado de eutrofização de um lago raso: estudo de caso do lago barigui. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agentes for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*, v. 152, p. 41- 42, 1999.[https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00684-0)

BOUYER, E., MEKHOLOUFI, G., ROSILIO, V., GROSSIORD, JL., AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?. *International Journal of Pharmaceutics*, v.436, n.1-2, p.359-378, 2012.<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052>

BRANDES, U. A faster algorithm for betweenness centrality, v. 25, p. 163-177, 2001.

BROADLEY, M. R., WHITE, P. J., HAMMOND, J. P., ZELKO, I., LUX, A. Zinc in plants. *New Phytologist*, v. 173, p. 677-702, 2007.<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>

BUCCOLIERI, A., BUCCOLIERI, G., CARDELLICCHIO, N., DELL'ATTI, A., DI LEO, A., MACI, A. Heavy metals in marine sediments of Taranto Gulf (Ionian Sea, southern Italy). *Journal Marine Chemistry*, v.99, p. 227–235, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.09.009>

BULUT, Y., TEZ, Z. Removal of heavy metals from aqueous solution by sawdust adsorption. *J. Environ. Sci.* v. 19, p. 160–166, 2007.[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60026-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60026-6)

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p. 520-529, 1998.<https://doi.org/10.1007/s002530051329>

CAZIÑARES, R.O. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latino-americana de Microbiología*, v.42, p.131-143, 2000.

CHANEY, R. L. Zinc phytotoxicity. In, Robson AD. *Zinc in soils and plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, v. 55, p. 135-150, 1993.https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2_10

CHAPMAN, P. M. AND WANG, F. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 2, p. 3-22, 2001.<https://doi.org/10.1002/etc.5620200102>

CHENG, C. Y. Purification of Synthetic Laterite Leach Solution by Solvent Extraction Using D2EHPA. *Hydrometallurgy*, v. 56, p. 369-386, 2000.[https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00095-5)

CHEN, M., QIN, X., ZENG, G., LI, J. Impacts of human activity modes and climate on heavy metal “spread” in groundwater are biased. *Chemosphere*. v.152, p. 439–445, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.137>

COMBY, E., LE LAY, Y-F., PIÉGAY, H. How chemical pollution becomes a social problem. Risk communication and assessment through regional newspapers during the management of PCB pollution of the Rhône River (France). *Science Total Environmental*. p.100-115, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.137>

COOPER, D. G., AND GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from a Two Bacillus Species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 224-229, 1987.

COSTA, C. R., OLIVI, P., BOTTA, C. M. R., ESPÍNDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*. v. 31, p.1820-1830, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>

COX, P. A. *The elements on Earth*. Oxford: Oxford University Press, p.105-280, 1997.

DESAI, J. D., AND DESAI, A. J. Em *Biosurfactants: production, properties, applications*; Kosaric, N., ed.; Marcel Decker: New York, cap. 3,1993.

DESAI, J. D., AND BANAT, I. M. Microbial production of surfactante and their comercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-64, 1997.

DESAI, K.G. H., AND PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *J. Microencapsul*, v.22, p.377-395, 2005. <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>

FAN, C., ZHU, Y., JI, Z., ZHANG, L., YANG, L. Characteristics of the pollution of heavy metals in the sediments of Yilihe River, Taihu Basin. *Journal Lake Science*, v. 14, p.235–241, 2002. <https://doi.org/10.18307/2002.0307>

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z . Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*, v. 31 ,p. 2091-2099, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800033>

FOSMIRE, GJ . Zinc Toxicity. *The American Journal of Clinical Nutritional*, v.51, p. 225 -227, 1990. <https://doi.org/10.1093/ajcn/51.2.225>

FÖRSTNER, U.E. & WITTMANN, G.T.W. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Berlin. SpringerVerlag, Berlin, p.486, 1981. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-69385-4>

FRANKENFELD, J. W., CHAN, R. P., LI, N. N. Extraction of copper by liquid membranes. *Separation Science and Technology*, v.16, p.385-402, 1981. <https://doi.org/10.1080/01496398108068528>

FRANKENFELD, J. W., AND Li, N.N. Recent advances in liquid membrane technology, in: R.W.Rousseau (Ed.), *Handbook of Separation Process Technology*, Wiley, New York, 1987.

GAO, X., ZHOU, F., CHEN, C. T. Pollution status of the Bohai Sea: na over view of the environmental quality assessment related trace metals. *Environment International*. v.62, p.12-30, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.09.019>

GERBER, G.B., L'EONARD, A., HANTSON, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v. 42, p. 25-34, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00178-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00178-0)

GOYAL, R. K., JAYAKUMAR, N. S., HASHIM, M. A. Chromium removal by emulsion liquid membrane using [BMIM]⁺[NTf₂]⁻ as stabilizer and TOMAC as extractant, v.278, p. 50-56, 2011.

GUPTA, V. K., AND SHARMA, S. Removal of Zinc from Aqueous Solutions Using Bagasse Fly Ash – a Low Cost Adsorbent. *Industrial Engineering Chemistry Residual*.,v. 42,p. 6619-6624, 2003. <https://doi.org/10.1021/ie0303146>

HAGIWARA, S., AND TAKAHASHI, K. Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *The Journal of General Physiology*, v. 50, p. 583–601, 1967. <https://doi.org/10.1085/jgp.50.3.583>

HARBEN, P. W., AND KUZVART, M. *Industrial Minerals. A Global Geology*, p.462, pp. 247-257, 1996.

HAROLD A., AND TAYLOR JR. Manganese minerals. In: *Industrial Minerals and Rocks*, 6 th Edition, D. D. Carr (Senior Editor), Society of Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc. Littleton, Colorado, p.1196, pp. 655-660, 1994.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 5. Ed. Rio de Janeiro, LTC-Livros técnicos e científicos Editora S.A, 861p, 2001.

HEDBERG, Y.S., LIDÉN, C., ODNEVALL WALLINDER, I. Correlation between bulk and surface chemistry of Cr-tanned leather and the release of Cr (III) and Cr (VI). *Journal Hazardous Materials*. v.280, p. 654–661, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.061>

HILL, S.E. Emulsion. In: HALL, G.M. *Methods of testing protein functionality*. London: Blackie Academic & Professional. Cap.6, p.153-185, 1996.

HOLMES, J.M., GRÄNS, A.S., NEIL, D.M., BADEN, S.P. Effects of the metal ions Mn²⁺ and Co²⁺ on muscle contraction in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 169, p. 402-410, 1999. <https://doi.org/10.1007/s003600050236>

HRONEC, O., VILČEK, J., TOMAŠ, J., ADAMIIN, P., HUTTMANOVA, E. Environmental components quality problem areas in Slovakia. Mendelova univerzita, Brno. p.227, 2010.

[HSDB] HAZARDOUS SUBSTANCE DATA BANK. Iron. In: TOMES CPS™ SYSTEM. Toxicology, occupational medicine and environmental series. Englewood: Micromedex; CD-ROM, 2000.

HUANG, L., PU, X., PAN, JF., WANG, B. Heavy metal pollution status in surface sediments of Swan Lake lagoon and Rangcheng Bay in the northern Yellow Sea. Journal Chemosphere. v. 93, p. 1957-1964, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.080>

HUEBERS, H. A. Metals and their compounds in the environment-occurrence, analysis and biological relevance. Weinheim: VCH., Capll. 14, p. 745-955, 1991.

[ILO] INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION. Encyclopaedia of occupational health and safety Metals: chemical properties and toxicity. 4th. Ed. Geneva. v.3, p.63.1-63.68, 1997.

INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL CONSERVATION AND RESEARCH (INECAR) (2000). Position Paper Against Mining in Rapu-Rapu, Published by INECAR, Ateneo de Naga University, Philippines (www.adnu.edu.ph/Institutes/Inecar/pospaper1.asp)

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS. Manganese and Its Compounds: Environmental Aspects. Concise International Chemical Assessment Document 63. World Health Organization, Geneva, 2004.

ISLAM, MD. S., AHMED, MD. K., RAKNUZZAMAN, M., HABIBULLAH-AL-MAMUN, MD., KUNDUN, K. G. Heavy metals in the industrial sludge and their ecological risk: A case study for a developing country. Journal of Geochemical Exploration. v. 172, p.41-49, 2016.

KANOUN-BOULÉ, M., J. A. F. VICENTE, C. NABAIS, M. N. V. PRASAD AND H. FREITAS. Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. Journal Aquatic Toxicology., v.91, p.1-9, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.009>

KARABOGA, D., GORKEMLI, B., OZTURK, C., KARABOGA, N. A comprehensive survey: artificial bee colony (ABC) algorithm and applications. Artificial Intelligence, v. 42, p. 21- 57. <https://doi.org/10.1007/s10462-012-9328-0>

KARI, F., AND GIGER, W. Modeling the photochemical degradation of ethylenediaminetetraacetate in the River Glatt. Environmental Science and Technology, v.29., p. 2814-2827, 1995. <https://doi.org/10.1021/es00011a018>

KAWAMURA, Y., MITSUHASHI, M., TANIBE, H., YOSHIDA, H. Adsorption of metals ions on polyaminated highly porous chitosan chelating resin. Ind. Eng. Chem. Res, v. 32, 386-391, 1993. <https://doi.org/10.1021/ie00014a015>

KEEN, C. L., ENSUNSA, J. L., AND CLEGG, M. S. Metal Ions in biological Systems. Manganese and Its role in Biological Processes. Ed. A. Sigel and H. Sigel, Dekker, New York, v.37, p. 89–121, 2000.

KHOPADE, A., REN, B., LIU, X.Y., MAHADK, K., ZHANG, L., KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. Journal Colloid Interface Science. v.367, n.1p. 311-318, 2012.<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.009>

KROSCSWITZ, J. I. (Ed). Kirk- Othmer encyclopedia of Chemical technology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, v. 14, 1995.

KULKARNI, P.S., MUKHOPADHYAY, S., GHOSH, S. K. Liquid membrane process for the selective recovery of uranium from industrial leach solutions. Industrial & Engineering Chemistry Research, v.48, p. 3118–3125, 2009.<https://doi.org/10.1021/ie800819q>

KULKARNI, P. S., AND MAHAJANI, V. V. Application of liquid emulsion membrane (LEM) process for enrichment of molybdenum from aqueous solutions. Journal of Membrane Science, v.201, p.123–135, 2002.[https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00720-7](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00720-7)

KUMBASAR, R. A., AND SACHIN, I. Separation and concentration of cobalt from ammoniacal solutions containing cobalt and nickel by emulsion liquid membranes using 5,7-dibromo-8 hydroxyquinoline (DBHQ). Journal of membrane Science, v. 325, p. 712-718, 2008 <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.08.044>

LAM, R.S.H AND NICKERSON, M.T. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. Journal Foods Chemistry, v.141, n.2, p.975-984, 2013.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>

LANCTÔT, C., WILSON, S. P., FABBRO, L., LEUSCH, F. D. L., AND MELVIN, S. D. Comparative sensitivity of aquatic invertebrate and vertebrate species to wastewater from an operational coal mine in central Queensland, Australia. Journal Ecotoxicology and Environmental Safety, v.129, p.1-9, 2016.<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.003>

LEE, Y. H., HULTBERG, H., ANDERSSON, I. Catalytic effect of various metal ions on the methylation of mercury in the presence of humic substances. Water, Air, and Soil Pollution. v. 25, p. 391-400, 1985.<https://doi.org/10.1007/BF00283791>

LENDE, B. A., DINKER, K. M., BHOSALE, K. V., KAMBLE, P. S., MESHARAMC, D. P., KULKARNI, S. P. Emulsion ionic liquid membranes (EILMs) for removal of Pb(II) from aqueous solutions. The Royal Society of Chemistry, v.4, p. 52316–52323, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4RA06485B>

LENDE, A. Improvement in removal of Pb(II) using surfactante emulsion membrane from PCB wastewater by addition of NaCl. Journal of Water Process Engineering, v. 11, p.55-59, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.03.002>

LOLLI, F., GAMBERINI, R., REGATTIERI, A., BALUGANI, E., GATOS, T., GUCCI, S. Single-hidden layer neural networks for forecasting intermittente demand. Int. J. Production Economics, v.183, p.116-128, 2017.<https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2016.10.021>

LOZANO, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, C., RODRÍGUEZ, F. J., TRUJILLO, H. M. Optimizing network attacks by artificial bee colony. *Information Sciences*.v. 377, p. 30-50, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2016.10.014>

MAITY, J.P., HUANG, Y.M., HSU, C-M., WU, C-I., CHEN, C-C., LI, C-Y., JEAN, J-S., CHANG, Y-F., CHEN, C-Y. Removal of Cu, Pb and Zn by foam fractionation and a soil washing process from contaminated industrial soils using soapberry-derived saponin: a comparative effectiveness assessment. *Journal Chemosphere*, v. 92, p.1286-1293, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.060>

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v.24, p. 87-93, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100015>

MARTINÉZ, R. C., GONZALO, E. R., CORDERO, B. M., PAVÓN, J. L., PINTO, C. G., LESPADA, E. F. *Journal of Chromatograph*, v. 902, p. 251- 265, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00837-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00837-2)

MARSCHNER, P. Mineral nutrition of higher plants. San Diego: Academic Press. Second edition, 1995.

MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *The Royal Society of Chemistry*, v.7, p.2297-2316, 2011. <https://doi.org/10.1039/C0SM00549E>

MENESES, T. S. Fauna, pesca e contaminação por metais pesados em pescado no litoral de Sergipe. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 115 p, 2008.

MERGLER D, BALDWIN M. Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. *Environmental research*, v. 78, p.92–100, 1997. <https://doi.org/10.1006/enrs.1997.3710>

MILLONAS, M M. Swarms, phase transitions and collective intelligence. In: Langton C (ed) *Artificial life III*. Addison-Wesley, Reading, MA , pp 417–445, 1994.

MISHRA, V.K., TRIPATHI, B.D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology* .v. 99, p.7091–7097, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.002>

MOKHTARI, B AND POURABDOLLAH, K. Inclusion separation of alkali metals in emulsion liquid membranes by nanobaskets of calix[4]crown-3. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*., v. 29, p. 783 - 793, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000400010>

MONEM EL ZEFTAWY, M. A., AND MULLIGAN, C. N. Use of rhamnolipid to remove heavy metals from wastewater by micellar-enhanced ultrafiltration (MEUF). *Separation and Purification Technology*. v. 77, p.120-127, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.11.030>

MONTEIRO, S. A., SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., MOREIRA, J. A., MEIRA, J. A., ARAÚJO, J. M., MITCHELL, D. A., RAMOS, L.P., Krieger, N. Molecular and structural characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem. Phys. Lipids.*, v. 147, p. 1-13, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.02.001>

[NIOSH] NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL AND SAFETY. Documentation for immediately dangerous to life or health concentration (IDLHs). Aug. 1996.

NOLAN, K. Copper Toxicity Syndrome. *J. Orthomol. Psychiatry*, v.12, p. 270 – 282, 2003.

NOWACK, B. Environmental Chemistry of Aminopolycarboxylate Chelating Agents. *Environmental Science & Technology*, v. 36, p. 4009-4016. <https://doi.org/10.1021/es025683s>

O' NEIL, P. Major Elements in the earth's crust-Iron. *Environmental chemistry*. 2nd.ed. New York: Chapman e Hall, 1994. cap. 9, p.151-168.

OVIEDO, C., RODRIGUEZ, J. EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. *Química Nova*. v. 26, p. 901-905, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600020>

PAN, J., PAN, J-F., WANG, M. Trace elements distribution and ecological risk assessment of seawater and sediments from Dingzi Bay Shandong. Penincula, North China, *Mar. Pollut. Bull.* v.89, p.427-434, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.022>

PASTORE, M. G., AND NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova.*, v.25, p. 772-776, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

PENG, J., FANMEI, M., YUNCAN, A. Time-dependent fermentation control strategies for enhancing synthesis of marine bacteriocin 1701 using artificial neural network and genetic algorithm. *Bioresource Technology*, v.138, p. 345-352.

PENHA, E. das M., AND ROSEMBERG, J. A. Técnicas básicas de Microbiologia: Guia Prático. Universidade do Estado do Rio de Janeiro: Instituto de química – Laboratório de Biotecnologia. RJ, p.120, 1989.

PEREIRA, G.C., AND EBECKEN, N. F. F. Knowledge discovering for coastal waters classification. *Expert Systems with Applications*. v.36, p.8604 – 8609, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2008.10.009>

PEREIRA, J. F., GUDIÑA, E. J., COSTA, R., VITORINO, R., TEIXEIRA, J. A., COUTINHO, J. A., RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications, *Fuel*, v.111, p. 259-268, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>

PEREIRA, L.J. B., AND GARCIA-ROJAS, E.E. Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive componentes. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 45, p.155-162, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140315>

PÉREZ-GARIBAY, R., MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, J., URIBER-SALAS, A., MARTÍNEZ-LUÉVANOS, A. Comprative study betwiiien D₂EHPA and Cyanex 272 as extractants of Mn (II) from a Leached líquor produced by a reductive leaching of a pyrolusite ore with SO₂. Journal Engineering, v.4, p. 526-531, 2012.

PINSINO, A., MATRANGA, V., ROCCHERI, MC. Manganese: A New Emerging Contaminant in the Environment, Environmental Contamination, Dr. Jatin Srivastava (Ed.), ISBN: 978-953-51-0120-8, 2012 In:Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/manganesea-new-emerging-contaminant-in-the-environment>.

RAHMAN, K. S. M., BANAT, I. M., THAHIRA, J., THAYUMANAVAN, T., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended whit poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresource Tecnology, n.81, p. 25-32, 2002.

RAI, P. K. Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v.39,p. 697–753, 2009. <https://doi.org/10.1080/10643380801910058>

RIBAS, T.C. F., TÓTH, V. I., RANGEL, A. O. SS. A solid phase extraction flow injection spectrophotometria method for the zinc determination in plants. Microchemical Journal, v. 130, p. 366 – 370, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.10.016>

ROTH, J.A. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. Biological Research, v. 39, p. 45–57, 2006. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000100006>

RUBIO, C., GONZÁLEZ-WELLER, D., MARTÍN- IZQUIERDO, R. E., REVERT, C., RODRIGUEZ. I., HARDISSON, A. El zinc: oligoelemento esencial. Nutrición Hostpitalaria, v. 22, p. 101-107, 2007.

SÁNCHEZ, M., ARANDA, F. J., ESPUNY, M. J., MARQUÉS, A., TERUEL, J. A., MANRESA, A., ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. Journal of Colloid interface Science, v. 307, p.246-253, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.11.041>

SAMPAIO, J. A., AND PENNA, M. T. M. Manganês – CVRD/Mina do Azul. In: Usinas de Beneficiamento de Minérios do Brasil. Sampaio, J. A.; Luz, A. B. da e Lins, F. F.(Editores). Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, p. 49-60, 2001.

SANTAMARIA, A.B. Manganese exposure, essentiality and toxicity. Indian Journal of Medical Research, v. 128, p.484–500, 2008.

SANTOS, GCGD (2005). Comportamento de B, Zn, Mn, e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico. Tese de

Doutorado. Curso de Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

SARUBBO, L. A., LUNA, J. M., RUFINO, R. D., FARIAS, C. B. B., SILVA, S. N. R. L. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 174-183, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>

SARUBBO, L. A., LUNA, J. M., RUFINO, R. D. Biosurfactant form *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 102, p. 558-566, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010>

SARUBBO, L. A., MARCAL, M. C., NEVES, M. L. C. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 95, p.59-67, 2001. <https://doi.org/10.1385/ABAB:95:1:59>

SARUBBO, L. A., ROCHA JÚNIOR, R. B., LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SANTOS, V. A., BANAT, I. M. Some aspects of heavy metal contamination remediation and role of biosurfactants. *Chem. Ecol.*, v.31, p.707-723, 2015. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>

SATPUTE, S. K., BANAT, I. M., DHAKEPHALKAR, P. K., BANPURKAR, A. G., CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Journal of Biotechnology*, v. 28, p.436-450, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>

SCHMITT-JANSEN, M., VEIT, U., DUDEL, G., AND ALTENBURGER, R. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*. v. 9, p. 337-345, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2007.08.008>

SCHRAMM, L. L. *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. Cambridge University Press, Reino Unido, 2000.

SCHWARZENBACH, R. P., T. EGLI, T. B. HOFSTETTER, U. VON GUNTEN AND B. WEHRLI. Global water pollution and human health. *Annual Review of Environment and Resources*. v. 35, p. 109-136, 2000. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342>

SEEBAUGH, D.R., GOTO D., WALLACE, W.G. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Marine Environmental Research*. v. 59, p.473–491, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.07.003>

SHAVANDI, M., MOHEBALI, G., HADDADI, A., SHAKARAMI, H., NUHI, A.. Emulsification potencial of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus sp.* strain TA6. *Colloids and Surfaces B*, v.82, p.477-482, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.005>

SIEGEL, A., AND SIEGEL, H.: Metal Ions in Biological Systems: Manganese and its role in biological processes. Vol. 37, CRC Press, 2000, 816 p.

SIENKO, M. J., AND PLANE, R. A. Elementos de transição II. (Eds). Química. 5 ed. São Paulo: Nacional, 1977. cap.21, p.436-454.

SILVA, I. N., AMARAL, W. C., ARRUDA, L. V. R. Uma abordagem usando redes neurais artificiais para resolução de problemas de otimização restrita. Pesquisa operacional, v. 24, p. 285-302, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-74382004000200005>

SKELLAND, A. H. P., MENG, X. Non-Newtonian conversion solves problems of stability, permeability, and swelling in emulsion liquid membranes. Journal of Membrane Science, v.158. p. 1–15, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00332-9)

SOUSA JÚNIOR, C. DS., XIMENES, D. S., NASCIMENTO, M., DO NASCIMENTO, K. R. P. R., DA CUNHA, O. G. C. Modelagem termodinâmica por extração por solvente de metais divalentes em meio sulfato usando D₂EHPA. Química Nova, v. 35, p. 301-307, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000200013>

TEKERLEKOPOULOU, A. G., VAYENAS, D. V. Ammonia, iron and manganese removal from potable water using trickling filters. Desalination. v. 210. 225–235, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.05.047>

TOMASIK, P. AND D. M. WARREN . The use of Daphnia in studies of metal pollution of aquatic systems. *Environmental Reviews*. v.4, p.25-64, 1996. <https://doi.org/10.1139/a96-003>

TUZEN, M. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea Turkey. Food Chem. Toxicol. v. 47, p.1785–1790, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.029>

VARGAS-GARCÍA, M. C., LÓPEZ, M. J., SUÁREZ-ESTRELLA, F., MORENO, J. Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals: in vitro selection. Journal Science and the Total Environment. v.431, p. 62–67, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.026>

VENKATESWARAN, P., VELLAICHAMY, S., PALANIVELU, K. Speciation of heavy metals in electroplating industry sludge and wastewater residue using inductively coupled plasma. Int. J. Environ. Sci. Technol, v.4, p. 497–504, 2007. <https://doi.org/10.1007/BF03325986>

VITALI, L., JUSTI, C. K., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. Impregnation of Chelating Agent 3,3-bis-N,N bis-(carboxymethyl)aminomethyl-o-cresolsulfonephthalein in Biopolymer Chitosan. Adsorption Equilibrium of Cu(II) in Aqueous Medium. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.16, p. 116-122, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282006000200011>

WALSTRA, P., AND VAN VLIET, T. Sistemas dispersos: considerações básicas. In: DAMODARAN, S. et al. Química de alimentos de fennema. Porto Alegre: Artmed. Cap.13, p.611-660, 2010.

WHO: Air Quality Guidelines for Europe. 2nd Ed., Copenhagen: World Health Organisation. Regional Office for Europe. 288 p, 2001.

WÓDZKI, R., SZCZEPANSKI, P., PAWLOWSKI, M. Recovery of Metals from Electroplating Waste Solutions and Sluge. Comparison of Donnan Dialysis and Pertraction Technique. Polish Journal of Environmental Studies, v. 8, p.111-124, 1999.

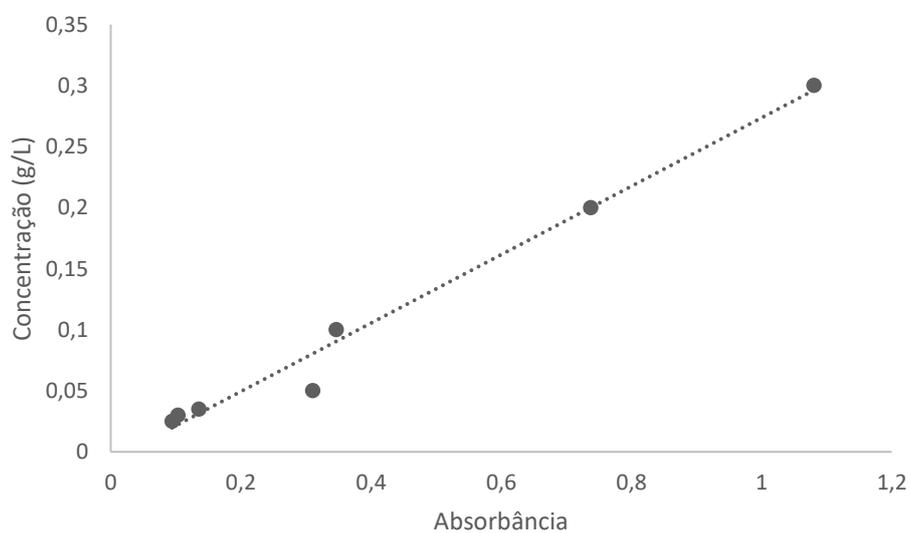
YANG, L; CHEN, X. Q; JIAO, P. F. Extraction resolution of racemic madelic acid through a bulk liquid membrane containing binary chiral carrier, v.20, n.8, p.1678-4790, 2009.

ZHANG, W AND CHENG, C. Y. Manganese Metallurgy Re- view. Part I: Leaching of Ores/Secondary Materials and Recovery of Electrolytic/Chemical Manganese Dioxide. Hydrometallurgy, v. 89, p. 137-159, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.08.010>

APÊNDICE A

Curva de calibração para o cálculo da concentração de raminose a partir das concentrações da tabela abaixo correspondente a equação $y=0,2802x - 0,0066$ e R^2 de 0,9832.

Y (concentração g/L)	X (absorbância.)
0,025	0,094
0,03	0,103
0,035	0,135
0,05	0,31
0,1	0,346
0,2	0,737
0,3	1,08



APÊNDICE B

Tabela 1 - Dados de pH na remoção de manganês da Figura 5.2

Componentes	Emulsões								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
NaCl (%)	0	2	0	2	2	0	2	0	2
EDTA (mM)	5	10	5	10	5	10	5	10	10
pH	1,06	1,20	10,97	9,61	1,26	1,08	10,17	10,75	6

Tabela 2 - Dados de pH na remoção de manganês da Figura 5.4.

Componentes	Emulsões								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
NaCl (%)	0	2	0	2	2	0	2	0	2
EDTA (mM)	5	10	5	10	5	10	5	10	10
pH	1,15	1,16	9,99	10,27	1,19	1,18	10,59	10,16	6,34

Tabela 3 - Dados de pH na remoção de manganês no controle da Figura 5.6

Componentes	Emulsões								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
NaCl (%)	0	2	0	2	2	0	2	0	2
EDTA (mM)	5	10	5	10	5	10	5	10	10
pH	1,21	1,15	10,06	10,13	1,22	1,20	10,19	10,03	6,80

Tabela 4 - Dados de pH na remoção do zinco da Figura 5.13

Variação de EDTA e NaCl	Ensaio	NaOH	HCl	Surfactante (g/L)	pH
10 mM EDTA + 2% NaCl	B-E10S2-m	1%	-	0,0745	12,25
	B-E10-S2	1%	-	0,1490	11,75
	A-E10-S2-m	-	0,7%	0,0745	3,70
	A-E10-S2	-	0,7%	0,1490	3,10
10 mM EDTA + 0 NaCl	B-E10-S0-m	1%	-	0,0745	12,20
	B-E10-S0	1%	-	0,1490	12,10
	A-E10-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,42
	A-E10-S0	-	0,7%	0,1490	3,20
0 mM EDTA + 2% NaCl	B-E0-S2-m	1%	-	0,0745	12,12
	B-E0-S2	1%	-	0,1490	12,28
	A-E10-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,36
	A-E0-S2	-	0,7%	0,1490	4,50
0 mM EDTA + 0 NaCl	B-E0-S0-m	1%	-	0,0745	12,22
	B-E0-S0	1%	-	0,1490	12,13
	A-E0-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,23
	A-E0-S0	-	0,7%	0,1490	5,18

Tabela 5 - Dados de pH na remoção do Ferro da Figura 5.15.

Variação de EDTA e NaCl	Ensaio	NaOH	HCl	Surfactante (g/L)	pH
10 mM EDTA + 2% NaCl	B-E10S2-m	1%	-	0,0745	11,86
	B-E10-S2	1%	-	0,1490	11,98
	A-E10-S2-m	-	0,7%	0,0745	3,20
	A-E10-S2	-	0,7%	0,1490	3,44
10 mM EDTA + 0 NaCl	B-E10-S0-m	1%	-	0,0745	12,10
	B-E10-S0	1%	-	0,1490	12,00
	A-E10-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,37
	A-E10-S0	-	0,7%	0,1490	3,42
0 mM EDTA + 2% NaCl	B-E0-S2-m	1%	-	0,0745	12,37
	B-E0-S2	1%	-	0,1490	12,38
	A-E10-S0-m	-	0,7%	0,0745	4,92
	A-E0-S2	-	0,7%	0,1490	4,94
0 mM EDTA + 0 NaCl	B-E0-S0-m	1%	-	0,0745	12,27
	B-E0-S0	1%	-	0,1490	12,24
	A-E0-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,84
	A-E0-S0	-	0,7%	0,1490	4,49

Tabela 6 - Dados de pHs na remoção do manganês da Figura 5.17

Variação de EDTA e NaCl	Ensaio	NaOH	HCl	Surfactante (g/L)	pH
10 mM EDTA + 2% NaCl	B-E10S2-m	1%	-	0,0745	7,17
	B-E10-S2	1%	-	0,1490	7,18
	A-E10-S2-m	-	0,7%	0,0745	2,98
	A-E10-S2	-	0,7%	0,1490	2,79
10 mM EDTA + 0 NaCl	B-E10-S0-m	1%	-	0,0745	7,01
	B-E10-S0	1%	-	0,1490	8,39
	A-E10-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,46
	A-E10-S0	-	0,7%	0,1490	3,12
0 mM EDTA + 2% NaCl	B-E0-S2-m	1%	-	0,0745	7,49
	B-E0-S2	1%	-	0,1490	7,92
	A-E10-S0-m	-	0,7%	0,0745	4,42
	A-E0-S2	-	0,7%	0,1490	3,51
0 mM EDTA + 0 NaCl	B-E0-S0-m	1%	-	0,0745	7,56
	B-E0-S0	1%	-	0,1490	7,22
	A-E0-S0-m	-	0,7%	0,0745	3,69
	A-E0-S0	-	0,7%	0,1490	4,04

Tabela 7 - Dados de pH do controle de manganês com água da Figura 5.19

Variação de EDTA e NaCl	Ensaio	NaOH	HCl	pH
10 mM EDTA + 2% NaCl	B-E10-S2	1%	-	7,45
	A-E10-S2	-	0,7%	2,22
10 mM EDTA + 0 NaCl	B-E10-S0	1%	-	6,95
	A-E10-S0	-	0,7%	2,26
0 mM EDTA + 2% NaCl	B-E0-S2	1%	-	6,70
	A-E0-S2	-	0,7%	2,26
0 mM EDTA + 0 NaCl	B-E0-S0	1%	-	7,98
	A-E0-S0	1%	-	2,25

Tabela 8 - Dados de pH no planejamento proposto.

Corridas	D₂EHPA (M)	Tempo (min)	H₂SO₄ (M)	NaCl (g/L)	EDTA (mM)	pH
13	-1	-1	-1	-1	+1	1,25
4	+1	-1	-1	-1	-1	1,08
17	-1	+1	-1	-1	-1	1,01
29	+1	+1	-1	-1	+1	1,10
8	-1	-1	+1	-1	-1	0,90
22	+1	-1	+1	-1	+1	0,76
1	-1	+1	+1	-1	+1	1,13
11	+1	+1	+1	-1	-1	1,11
6	-1	-1	-1	+1	-1	1,16
27	+1	-1	-1	+1	+1	1,08
7	-1	+1	-1	+1	+1	1,06
23	+1	+1	-1	+1	-1	1,07
3	-1	-1	+1	+1	+1	1,00
5	+1	-1	+1	+1	-1	1,02
26	-1	+1	+1	+1	-1	0,93
14	+1	+1	+1	+1	+1	1,02
24	-2	0	0	0	0	1,00
16	+2	0	0	0	0	0,97
10	0	-2	0	0	0	0,98
9	0	+2	0	0	0	0,98
2	0	0	-2	0	0	1,38
12	0	0	+2	0	0	0,99
15	0	0	0	-2	0	1,03
19	0	0	0	+2	0	0,94
18	0	0	0	0	-2	1,07
20	0	0	0	0	+2	0,91
28	0	0	0	0	0	1,11
21	0	0	0	0	0	1,01
25	0	0	0	0	0	0,93