



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

ALEXANDRE AUGUSTO PAREDES SELVA FILHO

**APLICAÇÃO DA *EICHHORNIA CRASSIPES* NO
TRATAMENTO DE AMBIENTES CONTAMINADOS
POR PETRODERIVADOS**

Recife, 1 de março 2021

ALEXANDRE AUGUSTO PAREDES SELVA FILHO

**APLICAÇÃO DA *EICHHORNIA CRASSIPES* NO
TRATAMENTO DE AMBIENTES CONTAMINADOS
POR PETRODERIVADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Co- orientadora: Dra. Rita de Cássia Freire Soares da Silva

Recife, 1 de março 2021

SELVA FILHO, A. A. P. **Aplicação da *Eichhornia crassipes* no tratamento de ambientes contaminados por petroderivados**, 2021. p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2021.

1. Macrófitas; 2. *Wetlands*; 3. Flotação; 4. Biossurfactante; 5. Efluente oleoso; 6. Metais pesados. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

APLICAÇÃO DA *EICHHORNIA CRASSIPES* NO TRATAMENTO DE AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRODERIVADOS

ALEXANDRE AUGUSTO PAREDES SELVA FILHO

Examinadores:

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos (Membro Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Dra. Fabíola Carolina Gomes de Almeida (Membro Externo)
Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação – IATI

Defendida em _01_/_03_/_2021_

Coordenador (a): Prof. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por todo apoio que me deram nesta caminhada rumo à realização do sonho, o qual foi a publicação dessa obra. À minha irmã por estar sempre ao meu lado me incentivando em todo esse processo. Esse trabalho é dedicado a essas pessoas, que sempre vibraram comigo, com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Jesus por realizarem toda essa obra e por serem fieis a mim.

À minha Orientadora Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, por ser uma amiga muito admirada, incentivadora e apoiadora em todo esse trabalho.

À Dra. Rita de Cássia Freire Soares da Silva, por estar constantemente ao meu lado me ajudando em todo esse processo e por ser uma grande amiga.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP, pelo meu aprendizado.

Ao Reitor da UNICAP, Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S. J. pela oportunidade em desenvolver este trabalho nesta universidade.

À 15ª turma do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP, pelo companheirismo e amizade.

À Dra. Fabíola Carolina Gomes de Almeida e ao colega Hugo Morais Meira pela colaboração com o desenvolvimento dos experimentos.

Ao técnico Lucas Ferreira da Costa, dos laboratórios da UNICAP, pela paciência e ajuda conferida ao longo do Mestrado.

Ao colega Dr. Elias José da Silva, do Departamento de Química Fundamental da UFPE, pelas análises de caracterização dos extratos vegetais.

Ao Ms. Pedro Pinto Ferreira Brasileiro, por ser um grande amigo e por ter me auxiliado diversas vezes na obtenção de conhecimento.

À Mestre Káren Gercyane Oliveira Bezerra, por auxiliar neste trabalho.

A todos os colegas do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, por compartilharem seus conhecimentos ao longo desta pesquisa.

Ao CNPq, CAPES, FACEPE e IATI pelo suporte financeiro aos laboratórios do Centro de Ciências e Tecnologia da UNICAP.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 MACRÓFITAS AQUÁTICAS	19
3.2 WETLANDS	26
3.2.1. Wetlands construídos	29
3.3 BIOSSURFACTANTES	33
3.3.1. Propriedades	39
3.3.2. Aplicações industriais dos biossurfactantes	40
3.3.3. Aplicações ambientais	42
3.4 FLOTAÇÃO	46
3.4.1. Aplicações da flotação	47
3.4.2. Flotação por ar dissolvido	49
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO II	62
Resumo	64
Introdução	65
Materiais e Métodos	67
Resultados e Discussão	72
Conclusões	81
Agradecimentos	82
Referências	82
CAPÍTULO III	85
Resumo	87
Introdução	88

Materiais e Métodos	89
Resultados e Discussão	94
Conclusões	105
Agradecimentos	105
Referências	105
CAPÍTULO IV	110
CONCLUSÕES GERAIS	111
APÊNDICE	112

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Ilustração das raízes de <i>Eichhornia crassipes</i>	21
Figura 2 – Ilustração das folhas de <i>Eichhornia crassipes</i>	22
Figura 3 – Macrófitas em <i>wetlands</i>	32
Figura 4 – Gráfico ilustrativo das regiões onde ocorre a formação de micelas (CMC).....	36
Figura 5 – Incorporação das bolhas de gás nas gotas de óleo e incorporação ao floco no processo de flotação	49
Figura 6 – Esquema simplificado do funcionamento da FAD	51

CAPÍTULO II

Figura 1 – Diagrama esquemático (vista lateral) do protótipo piloto da FAD (Vasconcelos et al., 2015). 1 – Duto de entrada de água oleosa. 2 – Câmara de mistura. 3 – Agitador mecânico. 4 – Motor elétrico. 5 – Câmara auxiliar. 6 – Misturador estático. 7 – Difusor. 8 – Primeira câmara de flotação. 9 – Coletor. 10 – Segunda câmara de flotação. 11 – Dutos de distribuição. 12 - Válvula de pressurização e controle. 13 e 14 – Câmaras subsequentes. 15 – Bomba centrífuga. 16 - Duto.....	68
Figura 2 – <i>Wetlands</i> construídos em policarbonato transparente, equipados com macrófitas flutuantes	69
Figura 3 – Esquema da estratégia de controle para integração dos protótipos FAD e <i>wetlands</i>	70
Figura 4 – Valores previstos versus observados do modelo proposto	75
Figura 5 – Diagrama de Pareto para a estimativa dos efeitos	76
Figura 6 – Resultados de a) superfície de resposta e b) gráfico de curvas de nível para eficiência de separação com base na razão entre as vazões de saídas de ar e água para a produção de microbolhas ($X_1 \cdot 10^3$) e a razão entre a vazão de alimentação do protótipo de <i>wetland</i> e vazão de água para a produção de microbolhas (X_2)	77
Figura 7 – Isométricas no SolidWorks do protótipo híbrido comercial FAD- <i>wetland</i>	81

CAPÍTULO III

Figura 1 – Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do extrato vegetal contendo surfactante de <i>E. crassipes</i>	94
Figura 2 – Estabilidade do extrato vegetal de <i>E. Crassipes</i> contendo surfactante determinada através da tensão superficial em: (A) diferentes valores de pH; (B) diferentes concentrações de NaCl; (C) diferentes temperaturas e (D) temperatura de 90°C em diferentes intervalos de tempo.....	96

Figura 3 – Índice de emulsificação do extrato vegetal de <i>E. Crassipes</i> contendo biossurfactante em diferentes substratos hidrofóbicos	97
Figura 4 – Curva de calibração do padrão de saponina junto com a equação da reta e coeficiente de determinação para o extrato de <i>E. crassipes</i>	98
Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do extrato vegetal isolado das raízes de <i>E. crassipes</i>	99
Figura 6 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do extrato vegetal isolado das raízes de <i>E. crassipes</i>	100
Figura 7 – Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	100
Figura 8 – Mortalidade de <i>Artemia salina</i> em percentual com relação às concentrações do extrato vegetal de <i>E. crassipes</i>	101
Figura 9 – Parâmetros de fitotoxicidade em percentual para sementes de <i>Brassica oleracea</i> com relação às concentrações avaliadas do extrato vegetal de <i>E. crassipes</i>	102
Figura 10 – Ilustração da gota de óleo de motor dispersa por ação dos extratos vegetais contendo surfactante nas razões de extrato vegetal:óleo de 1:2 (A), 1:8 (B) e 1:25 (C) (vol/vol)	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Valores reais e codificados de variáveis independentes no DCCR para a eficiência de separação água-óleo	71
Tabela 2 – Matriz experimental do DCCR com variáveis codificadas e valores de resposta para eficiência de separação óleo-água	73
Tabela 3 – Efeitos estimados para o tratamento de FAD + <i>wetland</i>	74
Tabela 4 – ANOVA para validação do modelo matemático	75

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Percentual de óleo de motor removido da areia através do método cinético pelo extrato vegetal de <i>E. crassipes</i> na metade da CMC, CMC e 2 vezes a CMC.....	103
Tabela 2 – Percentual de óleo de motor removido da areia através das colunas empacotadas pelo extrato vegetal de <i>E. crassipes</i> na metade da CMC, CMC e 2 vezes a CMC	104
Tabela 3 – Condutividade da solução de metais pesados, os quais foram removidos do efluente sintético pelo extrato vegetal de <i>E. crassipes</i> na metade da CMC e na CMC	105

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1 – Aplicação dos biossurfactantes para usos industriais.....	41
Quadro 2 – Algumas aplicações ambientais da flotação.....	48

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
ppm	Parte por milhão
g	Grama
mg/L	Miligrama por litro
plantas/m ²	Plantas por metro quadrado
m	Metro
mN/m	Mili Newton por metro
m ³ /dia	Metro cúbico por dia
µm	Micrometro
kgf/cm ²	Quilograma-força por centímetro quadrado

RESUMO

Os derramamentos de petroderivados e metais pesados são considerados tóxicos para os ecossistemas, por apresentarem grandes quantidades de xenobióticos. Dentre as possíveis soluções para o tratamento desses poluentes, estão os *wetlands* contruídos, através dos quais é possível realizar processos de fitorremediação, e o uso de biossurfactantes, que são agentes tensoativos biodegradáveis. Nesse contexto, as macrófitas da espécie *Eichhornia crassipes*, plantas que impactam o meio ambiente por se proliferarem rapidamente, foram investigadas no tratamento desses poluentes na formação de *wetlands* e como fonte de surfactantes. Inicialmente, a eficiência de um sistema híbrido por um flotor de ar dissolvido e *wetlands* foi avaliado no tratamento de água oleosa industrial. Em seguida, os resíduos de raízes provenientes dos *wetlands* foram reaproveitados na extração de surfactantes. A presença de surfactante no extrato vegetal concentrado foi estudada, assim como foram realizados testes de toxicidade utilizando como bioindicadores o microcrustáceo *Artemia salina* e as sementes de *Brassica oleracea*, atividade de emulsificação (óleo motor, diesel, n-hexadecano, querosene, óleo de milho e de soja), estabilidade frente a pH, temperatura e salinidade e a composição química do extrato vegetal. Além disso, o extrato vegetal foi aplicado na remoção de petroderivado (óleo motor) em areia através de ensaios cinéticos e estáticos, na dispersão do óleo motor na água do mar e na remoção de metais pesados em efluente sintético (Pb, Cu e Zn). A eficiência obtida nos protótipos foi de 97% de remoção de óleo. A tensão superficial obtida foi de 27,57 mN/m e a taxa de emulsificação de óleo motor alcançou 65%, indicando grande afinidade do surfactante vegetal pelo óleo. Os testes de estabilidade do extrato vegetal demonstraram pouca variação em sua tensão superficial para todas as condições testadas. A Concentração Micelar Crítica (CMC) vegetal foi de 1,4 g/L com uma tensão superficial nesse ponto de 25,84 mN/m. O extrato de *E. crassipes* provou ser praticamente atóxico para os bioindicadores testados. A concentração do surfactante vegetal (saponina) obtida foi de 1,29 g/L no extrato vegetal e a caracterização química desse extrato purificado indicou que o mesmo se enquadra na categoria de ácido graxo insaturado. O extrato vegetal foi capaz de dispersar 100% do óleo de motor em água do mar. O percentual de óleo motor removido em areia atingiu cerca de 67% e o percentual de metais pesados removidos aproximou-se de 55%. Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstram claramente a viabilidade de aplicação da *E. crassipes* como agente biotecnológico para os processos de remediação ambiental.

Palavras-chave: *Eichhornia crassipes*; flotação; *wetlands*; água oleosa; surfactantes.

ABSTRACT

Spills of petroleum products and heavy metals are considered toxic to ecosystems by they contain large amounts of xenobiotics. Among the possible solutions, for the treatment of these pollutants, are the use of constructed wetlands, where it is possible to carry out phytoremediation processes, and the use of biosurfactants, which are biodegradable tensoactive agents. In this context, macrophytes of the species *Eichhornia crassipes*, plants that impact the environment by proliferating rapidly, were investigated in the treatment of these pollutants in the formation of wetlands and as a source of surfactants. Initially, the efficiency of a hybrid system by dissolved air flotation and wetlands was evaluated in the treatment of industrial oily water. Then, root residues from wetlands were reused in the extraction of surfactants. The presence of surfactant in the concentrated plant extract was studied, as well as toxicity tests using as bioindicators the microcrustacean *Artemia salina* and the seeds of *Brassica oleracea*, emulsification activity (motor oil, diesel, n-hexadecane, kerosene, corn oil and soybean oil), stability against pH, temperature and salinity and the chemical composition of the plant extract were carried out. In addition, the vegetal extract was applied to remove petroleum derivative (motor oil) in sand through kinetic and static tests, in the dispersion of the motor oil in sea water and in the removal of heavy metals in synthetic effluent (Pb, Cu and Zn). The efficiency obtained in the prototypes was 97% of oil removal. The obtained surface tension was 27.57 mN/m and the motor oil's emulsification indexes reached 65%, indicating a great affinity of the plant surfactant to the oil. The stability tests of the vegetal extract showed little variation in its surface tension for all conditions tested. The plant Critical Micellar Concentration was 1.4 g/L with a surface tension at that point of 25.84 mN/m. *E. crassipes* extract proved to be practically non-toxic to the tested bioindicators. The concentration of the plant surfarfactant (saponin) obtained was 1.29 g/L in the plant extract and the chemical characterization of this purified extract indicated that it falls into the category of unsaturated fatty acid. The plant extract was able to disperse 100% of the motor oil in sea water. The percentage of motor oil removed in sand reached around 67% and the percentage of heavy metals removed approached 55%. The results obtained in this research clearly demonstrate the feasibility of applying *E. crassipes* as a biotechnological agent for environmental remediation processes.

Key words: *Eichhornia crassipes*; flotation; wetlands; oily water; surfactants.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Os derivados de petróleo gerados durante o transporte de carga ou na forma de derrames industriais de resíduos de óleo e derivados de petróleo constituem grandes fontes de poluição ambiental. O petróleo é um hidrocarboneto hidrofóbico com efeitos negativos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares de organismos vivos, oferecendo considerável risco de contaminação em ecossistemas marinhos e terrestres (SHI et al., 2019).

Outros poluentes de considerável impacto ambiental incluem os metais pesados. A produção de aço e ferro afeta negativamente o meio ambiente ao utilizar alto volume de água em fornos para combustão. Os metais pesados liberados através dos efluentes siderúrgicos são tóxicos para animais e plantas, exigindo, assim, um tratamento complexo (RAMÍREZ et al., 2018; DAS et al., 2018).

Nesse contexto da poluição e degradação ambiental, estão as macrófitas da espécie vegetal *Eichhornia crassipes* (aguapé), originárias de ambientes tropicais. Essa espécie, embora apresente potencial de fitorremediação de óleos e metais pesados, é comumente chamada de planta daninha ou invasora, impactando negativamente o meio ambiente. As macrófitas proliferam-se durante vários meses, causando a perda da qualidade do corpo hídrico, ocasionando redução na quantidade de peixes e macroinvertebrados, além de impactar negativamente a economia e parâmetros sociais (ALLAM et al., 2020).

A eliminação de efluentes só é permitida após a remoção de contaminantes e sólidos suspensos para níveis aceitáveis pela legislação, exigindo sistemas para o tratamento e separação desses resíduos (CHAPRÃO et al., 2018). Diante do exposto, várias tecnologias surgem no tratamento desses poluentes orgânicos e inorgânicos, como serão descritas a seguir, visando sempre à qualidade de vida e o bem estar social.

Uma das principais técnicas que tem se destacado com sucesso no tratamento de efluentes oleosos é o processo de flotação por ar dissolvido (FAD). Sua utilização teve início no século passado e possui aplicação clássica no beneficiamento de minérios. Essa técnica que consiste na separação de água e óleo/sólidos através da adesão de bolhas ar que conduzem as partículas à superfície, onde são removidas, permitindo uma reutilização mais eficiente e econômica das fases envolvidas no processo (ROCHA E SILVA et al., 2018a).

As zonas húmidas ou os *wetlands* construídos com escoamento superficial são estruturas inspiradas em ambientes naturais como lagos e pântanos, que consistem em um

canal, dispositivos de entrada e saída e plantas aquáticas, conhecidas como macrófitas, que ajudam na remoção de poluentes oleosos e metais pesados. As operações fáceis e a grande adaptabilidade dos *wetlands* construídos favorecem a mecânica de remoção dos poluentes. As zonas úmidas também podem ser aplicadas nas indústrias siderúrgicas após um pré-tratamento físico. Esse tratamento biológico normalmente conta com o processo de bioacumulação, removendo os metais. Além disso, o mecanismo pode ser de zonas úmidas em água superficial livre, zonas de fluxo horizontal subsuperficial, de fluxo vertical ou de operação híbrida (DAS et al., 2018).

No contexto da poluição provocada por óleos de petróleo, é importante citar o acidente ocorrido com o petroleiro da EXXON VALDEZ, que deu início às pesquisas na área de surfactantes microbianos (ROCHA E SILVA et al., 2019).

Os surfactantes são compostos anfipáticos contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam na interface entre fases fluidas com diferentes polaridades e pontes de hidrogênio. Essa propriedade possibilita uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (SARKAR et al., 2020). Entretanto, a preocupação ambiental, combinada com a legislação ambiental levou ao desenvolvimento de surfactantes naturais, ou biosurfactantes, produzidos por micro-organismos ou vegetais, como alternativa aos produtos existentes (PŁAZA; ACHAL, 2020).

Os biosurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixas toxicidades, estabilidade em ampla faixa de pH, em diferentes temperaturas e em diferentes ambientes salinos (ROCHA E SILVA et al., 2019). As saponinas, glicosídeos resultantes do metabolismo vegetal, por exemplo, surgem como uma classe promissora de biosurfactantes distribuídos no reino vegetal. Alguns estudos mostram que as saponinas removem efetivamente metais pesados ou óleos de solos.

Nesse sentido, considerando a necessidade de tratamento dos poluentes orgânicos e inorgânicos, a problemática ambiental gerada pelo acúmulo das macrófitas, bem como o potencial biotecnológico dessa planta, esse trabalho propôs a aplicação da *Eichhornia crassipes* como coadjuvante do processo de descontaminação ambiental associado ao pré-tratamento por flotação e o reaproveitamento das raízes geradas na extração de agentes surfactantes com potencial de remoção de óleos e metais pesados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o uso da *Eichhornia crassipes* no tratamento de efluente oleoso através de um sistema híbrido composto por métodos físico e biológico e na obtenção de biossurfactante para aplicação na remoção de petroderivados e metais pesados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar a flotação por ar dissolvido associada às *wetlands* artificiais de *Eichhornia crassipes* no tratamento de efluente oleoso sintético através de um sistema híbrido composto por dois protótipos em escala piloto;
- Utilizar um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e a metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para otimização das condições operacionais associadas à eficiência de separação do óleo pelos protótipos;
- Reaproveitar as raízes das macrófitas utilizadas nos *wetlands* na extração de substâncias surfactantes;
- Determinar a tensão superficial e a Concentração Micelar Crítica (CMC) do extrato vegetal concentrado;
- Determinar a capacidade de emulsificação de hidrocarbonetos pelo extrato vegetal;
- Caracterizar as substâncias surfactantes quanto à estabilidade frente a condições específicas de temperatura, pH e presença de sal;
- Caracterizar quimicamente o extrato vegetal concentrado;
- Determinar a toxicidade do extrato vegetal;
- Aplicar o extrato vegetal na dispersão de manchas de derivados de petróleo em água;
- Realizar a remoção de derivado de petróleo adsorvido em areia através de ensaios estático e dinâmico com o extrato vegetal;
- Determinar o potencial de remoção de metais pesados em solução aquosa pelo extrato vegetal.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MACRÓFITAS AQUÁTICAS

As plantas invasivas são espécies exóticas que foram introduzidas para fins de agricultura, paisagísticos e que se reproduzem rapidamente tomando o lugar das plantas nativas, pois são mais resistentes na competição por área. Isso provoca um dano ambiental, pois as invasoras transformam um ambiente equilibrado em um ecossistema homogêneo, provocando distúrbios ecológicos nesses sistemas ambientais, principalmente no que se refere aos ciclos biogeoquímicos (PRABAKARAN et al., 2019).

Paralelamente, o desenvolvimento de regiões leva a um aumento dos lançamentos de poluentes ambientais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas, PCBs (bifenilas policloradas), metais pesados e DDT (dicloro-difenil-tricloroetano). Isso compromete o controle da segurança alimentar, pois os vegetais utilizados na agricultura vão absorver esses contaminantes presentes principalmente nos solos. Uma das soluções encontradas pela China para esse problema foi o uso da fitorremediação (PRABAKARAN et al., 2019).

A técnica da fitorremediação consiste no fenômeno em que determinadas plantas resistentes à contaminação removem poluentes ambientais. Esse mecanismo pode ocorrer por fitoextração, fitoacumulação, fitodegradação, fitovolatilização e rizodegradação (PRABAKARAN et al., 2019), dentre estas:

- A fitoextração retira o contaminante do solo ou outro ambiente, transportando-o para as partes superiores da planta. Já a fitovolatilização remove do solo poluentes orgânicos voláteis que por meio da transpiração vegetal é emitido para a atmosfera.
- A fitoacumulação retira o contaminante do solo e o incorpora nas células vegetais. Por outro lado, na fitodegradação o vegetal absorve o contaminante e o digere através de suas enzimas. Já na rizodegradação, os micro-organismos da rizosfera decompõem o poluente e o vegetal absorve.
- A fitorremediação é muito utilizada na China para o controle da contaminação. A espécie de macrófita *Eichhornia crassipes*, comumente chamada de aguapé, em conjunto com *Pistia stratiotes* (alface de água), é bastante utilizada nesse país na remoção de poluentes nos rios.

Vários estudos demonstraram que o aguapé é eficiente na remoção de metais pesados. Por exemplo, essa espécie já removeu aproximadamente 55% de Cu em efluente. Além disso, a macrófita apresenta uma alta capacidade de remover fósforo e nitrogênio amoniacal de efluentes. Como essa planta é invasiva e se reproduz rapidamente, para a gestão ambiental, uma solução seria o uso dos excessos da planta como biocombustível na geração de energia como já foi relatado em pesquisa (PRABAKARAN et al., 2019).

O aumento nos preços para produção de petróleo para fins energéticos tem levado a busca de países em desenvolvimento por tecnologia mais barata como é o caso da produção de biocombustível, principalmente o biodiesel, que por sua vez tem uma rápida ignição. Normalmente, para esse fim, tem-se como fonte o girassol, sempre partindo do açúcar presente na planta, o qual é fermentado, gerando como produto etanol ou metanol. A vantagem de se utilizar o aguapé, nesse processo, é o não uso dele como alimento e a baixa presença de lignina, o que reduz os custos com o processo de fermentação (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

O aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma planta aquática nativa do Brasil e que foi introduzida na Índia para propósito ornamental, é uma macrófita flutuante e sua rápida reprodução forma grandes extensões de camadas de massa vegetal em cursos de rios e em lagos de forma perene ou anual (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

Alguns estudos afirmam que o aguapé foi introduzido na Europa através de Portugal no ano de 1930, sendo utilizados em canais irrigados; mas alguns documentos informam a chegada dessa planta na Península Ibérica 25 anos atrás. Em contra partida, o documento mais antigo foi datado na primeira metade do século XIX, chegando aguapés provenientes de Trindade no Reino Unido (BRUNDU et al., 2013).

No continente britânico, essa planta foi primeiro introduzida no Jardim Botânico de Sheffield. Depois, a macrófita foi utilizada no jardim botânico de Paris, Viena e Amsterdam. Após isso, essa espécie já estava presente em jardins privados. Em seguida, a *Eichhornia crassipes* foi identificada como planta invasiva na Austrália. Estudos informam que o comportamento invasivo teve início nos Estados Unidos (BRUNDU et al., 2013).

As macrófitas das espécies *Eichhornia crassipes* e *Salvinia molesta* são originárias de ambientes tropicais. Essas plantas ocupam respectivamente as posições 1 e 2 dessa classe de seres vivos que mais impactam negativamente o meio ambiente. O crescimento do aguapé é rápido, podendo tornar-se um problema ambiental em algumas situações, por isso é comumente chamada de planta daninha ou invasora (WANYONYI; ONYARI; SHIUNDU, 2014; RUFCHAEI et al., 2020). Por outro lado, a *Eichhornia crassipes* é utilizada no tratamento de

efluentes principalmente ricos em metais pesados em países desenvolvidos (DURAIVADIVEL; GOWTHAM; HARIPRASAD, 2020).

As raízes do aguapé é parte do organismo que mais acumula metais pesados (Figura 1). Um estudo realizado demonstrou que esse componente dessa espécie de planta acumulou 10 vezes a concentração inicial de cádmio. Isso é explicado por mecanismos fisiológicos que impedem que metais pesados sejam transportados para as partes aéreas do aguapé. Apesar disso, com o passar do tempo alguns metais pesados atingem os caules e folhas. O acúmulo de metais pesados torna o aguapé uma excelente ferramenta para a fitorremediação (SWAIN; ADHIKARI; MOHANTY, 2014; RIGUETO et al., 2020).

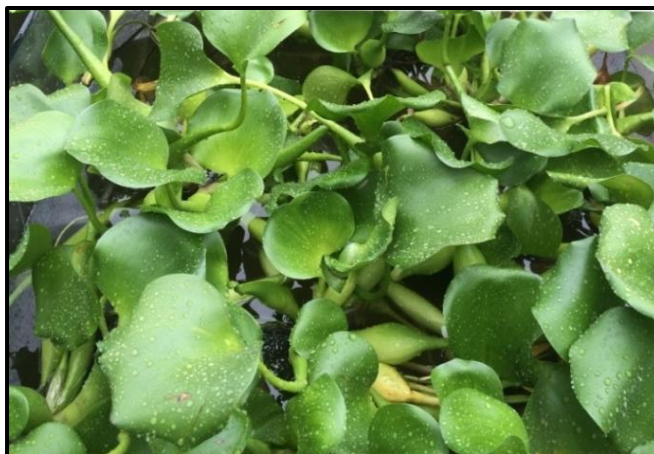
Figura 1 – Ilustração das raízes de *Eichhornia crassipes*



Fonte: Silva (2017).

As folhas do aguapé apresentam características antioxidante, antibacteriana e citotóxica (Figura 2). Essas folhas apresentam em sua composição saponinas, um tipo de biossurfactante (KUMAR et al., 2014; ELAGIB, 2020).

A *Eichhornia crassipes* (aguapé) removeu 82% de fósforos totais e 46,1% de nitrogênios totais, o controle apenas removeu 50,3% de fósforos totais e 22,8% de nitrogênios totais de efluente rico em metais pesados. Pesquisadores comprovaram que os efluentes tratados pelo aguapé podem ser utilizados na aquicultura sem problemas (KOUTIKA; RAINEY, 2015). Já em uma água utilizada para o cultivo de peixe, a qual continha *Eichhornia crassipes* (aguapé), obteve-se 0,79 mg/L de nitrato e 0,06 mg/L de fosfato, enquanto que o controle apresentou, respectivamente, 1,01 mg/L e 0,13 mg/L para esses compostos (YUNIARTI; NANDA; PUSPITA, 2020). A biomassa da planta aquática pode ser utilizada na produção de adubo para agricultura (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

Figura 2 – Ilustração das folhas de *Eichhornia crassipes*

Fonte: Silva (2017).

A *Eichhornia crassipes* atinge seu maior potencial de proliferação durante vários meses. A grande proliferação dessa espécie contribui para perda da qualidade do corpo hídrico com redução na quantidade de peixes e macroinvertebrados, além de impactar negativamente a economia e parâmetros sociais (CASTRO; AGBLEVOR, 2020).

A espécie *Eichhornia crassipes* pode se reproduzir de forma sexuada através de sementes ou assexuadamente. A reprodução assexuada influencia mais na expansão dessa espécie do que a reprodução por sementes. A expansão do aguapé compromete a pesca e a navegabilidade de um rio, além de reduzir a biodiversidade, contribuindo para o desaparecimento de peixes (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020). Essa planta tolera temperaturas de 1°C a 40°C, sendo entre 25°C e 27,5°C a temperatura ótima para o crescimento da espécie (KOUTIKA; RAINEY, 2015). A macrófita tem ótimo crescimento no pH de 8,51 e a salinidade de 0 g de NaCl/L (TING et al., 2020).

Os organismos dos aguapés, em um rio eutrofizado, possuíram $3,7\% \pm 0,1\%$ de nitrogênio, a razão C/N foi 10,5. A massa corpórea dessa espécie é rica em minerais. Essa riqueza em nutrientes promove a economia. Em uma análise, um indivíduo da espécie *Eichhornia crassipes* conteve $3,1 \pm 0,3\%$ de P, $21,9 \pm 1,1\%$ de K, $7,2 \pm 0,5\%$ de Ca, $0,2 \pm 0,02\%$ de Fe, $142,5 \pm 22,0$ mg/kg de Zn, $41,0 \pm 2,6$ mg/kg de Cu e $0,20 \pm 0,01\%$ de Mn. O crescimento do aguapé decorre do processo de eutrofização de rios e lagos (CASTRO; AGBLEVOR, 2020).

O aguapé pode ser utilizado no tratamento de efluentes provenientes de mineradoras, removendo grande quantidade de cianeto. Assim 2 g de material de planta precisaram de mais do que 50 horas para remover por completo o cianeto. Além disso, um experimento laboratorial revelou a grande capacidade da *Eichhornia crassipes* na remoção de metais pesados ao

reduzir a quantidade de nutrientes e mercúrio. Pesquisas também demonstraram a viabilidade de operação e manutenção de sistemas de tratamento de efluentes urbanos e da agricultura, utilizando essa macrófita (BRUNDU et al., 2013).

A planta também pode servir de substrato na compostagem e na vermicompostagem, produzindo compostos que podem ser aplicados em solos pobres em nutrientes. O composto apresenta elevado valor nutricional (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020). A *Eichhornia crassipes* contém proteínas, o que sugere sua aplicação na produção de alimentos. Isso foi comprovado em um estudo, o qual revelou 10,8% de proteína crua presente no organismo do aguapé. Essa espécie não acumula poluentes em seu tecido, mas degrada resíduos provenientes do tratamento de efluentes agrícolas (KOUTIKA; RAINEY, 2015).

A *Eichhornia crassipes* altera as características físico-químicas das águas, pois reduz os níveis de luz, o pH e aumenta a turbidez. Além disso, a planta pode reduzir por completo o oxigênio dissolvido das águas, provocando a morte de peixes. A macrófita também restringe o uso da água nos arredores, principalmente na irrigação e no uso para fins potáveis, além de limitar atividades recreativas em águas (ROMÁN et al., 2020).

Diante desse cenário, foi criado o European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) voltado para o controle da biodiversidade. A organização determinou que os países que contêm a planta *Eichhornia crassipes*, a qual está na lista das espécies monitoradas, devem fazer o controle dessa macrófita. O Bern Convention Standing Committee fez recomendações para o controle do aguapé (BRUNDU et al., 2013).

A literatura sugeriu que o controle dessa macrófita deve ser feito através de algumas aplicações. Uma dessas aplicações é o tratamento de efluentes, outras atividades são a remediação de metais pesados, produção do combustível biogás, o uso dessa planta em indústrias, na produção de ração para animais (BRUNDU et al., 2013; BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

O processo de digestão anaeróbia tem início com a hidrólise, que é a reação do composto orgânico com a molécula de água; depois vem a fase acidogênica cuja reação forma ácido acético; e, por fim, a fase metanogênica, a qual produz gás metano, que por sua vez é utilizado na produção de energia elétrica. No caso da utilização da *Eichhornia crassipes* nesse processo, a macrófita é retirada do curso d'água e triturada, tendo a parte líquida destinada para um biodigestor e a parte sólida é submetida ao processo de vermicompostagem (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

O biodigestor e a vermicompostagem, ambos com resíduos de aguapé, convertem gás metano em energia elétrica. Outra forma de se aplicar a *Eichhornia crassipes* é na produção de ácido levulínico na hidrólise em ambiente ácido. Portanto esses destinos são nobres para o aguapé, pois essa espécie é considerada a pior macrófita invasiva (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

O custo maior na produção de energia elétrica ocorre na retirada mecânica do aguapé do curso d'água, logo, atualmente, é necessário investigar formas de baixo custo para essa coleta (BOTE; NAIK; JAGADEESHGOUDA, 2020).

Várias indústrias, como as de corante geram efluentes industriais com elevada quantidade de nitrogênio contido no íon amônio. O problema ocorre quando os efluentes industriais são lançados em corpos hídricos, pois nitrogênio e fósforo são nutrientes, o que provoca a proliferação de algas (eutrofização) (TING et al., 2018)

As bactérias nitrificantes convertem o íon amônio (NH_4^+) em nitrito (NO_2^-) em meio aerado, que por sua vez é convertido em nitrato (NO_3^-) por outras bactérias como as da espécie *Nitrobacter* sp. em qualquer meio. Esse processo é denominado de nitrificação. Já na desnitrificação, outras bactérias e algumas arqueobactérias transformam o nitrato em gás nitrogênio, que por sua vez é emitido para a atmosfera em meio anaeróbio (TING et al., 2018).

Os mecanismos convencionais de remoção de nitrogênio do amônio ocorrem por precipitação após adição de MgCl_2 , adsorção com o uso de um material adsorvente e conversão de íons amônio em gás. Cada mecanismo desses deve apresentar condições ideais de pH e temperatura (TING et al., 2018).

A fitorremediação pode existir de várias formas. Uma delas é a fitoextração, a qual existe quando a planta absorve o poluente e o incorpora em suas células. Outra forma é a fitodegradação, a qual ocorre quando os poluentes orgânicos são convertidos em moléculas inorgânicas mais estáveis e menos prejudiciais ao meio ambiente. Já na fitovolatilização, os poluentes são transformados em gases pela planta e liberados para a atmosfera (PAZ-ALBERTO; SIGUA, 2013).

Um estudo foi realizado com o uso do aguapé (*Eichhornia crassipes*) na fitorremediação do nitrogênio proveniente do íon amônio, por conta da alta capacidade de proliferação e estabilidade em diferentes meios dessa planta. A fitorremediação foi realizada em efluente industrial, fazendo-se o controle da proliferação do aguapé (TING et al., 2018).

Outros estudos haviam sido feitos, revelando uma eficiente remoção de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Totais, Sólidos

Suspensos Totais, Sólidos Dissolvidos Totais e turbidez com o uso do aguapé. O problema existe, pois o mecanismo de remoção é lento com duração de 10 dias a 3 anos. A redução foi de 92,5% de turbidez, 83,7% de DQO, 91,8% de Sólidos Suspensos Totais, 62,3% de Sólidos Dissolvidos Totais, 80% de Sólidos Totais, 67,5% de nitratos, 71,6% de nitrogênio amoniacal, 90,2% de fosfatos, 97,5% de Cd, 95,1% de Ni, 99,9% de Hg e 83,4% de Pb presentes em efluentes industriais (FAZAL; ZHANG; MEHMOOD, 2015).

Alguns estudos foram feitos a respeito do uso do aguapé na fitorremediação de poluentes em rios poluídos, lagos eutrofizados e efluentes domésticos, estudos em escala laboratorial. Esse tipo de remediação requer extensas áreas e as plantas devem ser postas de forma adequada para evitar liberação de metais pesados. A fitorremediação é o mecanismo sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente. Um trabalho revelou uma remoção de 5,2 mg/L para 3,5 mg/L do nitrogênio do íon amônio, ou seja, uma remoção de aproximadamente 48,6% em um rio poluído durante 1 ano (TING et al., 2018).

Os mecanismos de precipitação com $MgCl_2$ e adsorção com uso de material adsorvente são físico-químicos. Já a nitrificação em meio aerado; a desnitrificação em meio anaeróbio; ou ambos os processos em um mesmo reator; a nitrificação parcial, a qual forma apenas nitrito, junto com a desnitrificação, transformando o nitrogênio na forma de gás; ou um processo de desnitrificação, envolvendo carbono inorgânico e bactérias autotróficas são mecanismos biológicos de remediação de nitrogênio. Todos os mecanismos apresentam condições específicas de pH e temperatura (TING et al., 2018).

A fitorremediação do aguapé foi comparada com a de outras macrófitas e os resultados demonstraram maior eficiência do aguapé na remoção de nutrientes de efluentes com aproximadamente 40,34% de remoção em comparação a aproximadamente 17,59% de outras espécies. As zonas húmidas é um método de tratamento de efluentes, em que há um fluxo dessa água em meio contendo espécies vegetais. Esse tipo de operação pode ser apenas de fluxo superficial, apenas de fluxo submerso, ou uma combinação desses, sendo a combinação mais eficiente na remoção de nutrientes. O aguapé é mais eficiente, utilizando-se o fluxo de água superficial (SHAH et al., 2014).

O uso eficiente do aguapé na fitorremediação depende do pH, salinidade, sazonalidade e da carga de poluentes. Essa planta não é tolerante a alta salinidade, um elevado nível do íon amônio é tóxico para essa macrófita, o pH baixo limita a proliferação e a remoção de poluentes pelo aguapé. Essa planta tem uma melhor adaptação em clima tropical e subtropical, sua maior densidade ocorre no período de primavera (186 plantas/m²) e menor densidade no verão (73 plantas/m²) de acordo com um estudo realizado (TING et al., 2018).

3.2 WETLANDS

As áreas úmidas ou *wetlands* costeiras são ecótonos, ou seja, ecossistemas de transição entre o oceano e o ambiente terrestre. Essas áreas são ricas em biodiversidade, servem de habitat para animais marinhos e de ambiente de transição para a rota migratória de aves (XIE; AN; DAVIS, 2019). Esses ecossistemas são considerados efêmeros, frágeis e susceptíveis ao hidroperíodo (CUTHBERT et al. 2019).

Na região norte do Canadá, existe uma *wetland* natural que serve de habitat para uma elevada riqueza de macro-invertebrados. Essa *wetland* que é boreal se localiza no delta Peace-Athabasca presente no Parque Nacional Wood Buffalo ecológico, um patrimônio mundial da Organização das Nações Unidas para a educação, a ciência e a cultura. O habitat foi submetido a um estudo taxonômico para avaliar a perda de biodiversidade, através da validação do modelo do metabolismo do ácido desoxirribonucleico (DNA) comparando-o com o modelo da Rede Canadense de Biomonitoramento Aquático (CABIN) (BUSH et al., 2020).

O estudo taxonômico contou com registros das famílias e gêneros dos macro-invertebrados identificados visualmente e macro-invertebrados previstos pelos modelos. O metabolismo do DNA contou com um modelo para as famílias e outro para os gêneros. Esse estudo gera informações sobre a biodiversidade da *wetland* importantes para a tomada de decisão dos governantes com relação à conservação desse habitat, pois os assentamentos urbanos estão avançando em direção aos ambientes naturais. Os modelos estimaram a taxa de redução de cada família e gênero de macro-invertebrado (BUSH et al., 2020).

Na África do Sul, a quantidade de *wetlands* em hidroperíodo é reduzida, devido ao elevado número de microcrustáceos fêmeas grávidas da espécie *Lovenula raynerae*, potencializando o impacto negativo. A explicação para isso é que a *Lovenula raynerae* se alimenta das larvas de mosquitos da espécie *Culex pipiens*, que por sua vez tem um papel de dispersor de sementes das *wetlands*, além de o microcrustáceo ter uma elevada velocidade de consumo quando comparada com os outros grupos da mesma espécie (CUTHBERT et al., 2019).

Outra causa natural para o decaimento de *wetlands* no mundo, de acordo com Xie, An e Davis (2019), são a produção de fezes de camarões estimulante da atividade decompositora microbiana e a alimentação por parte dos crustáceos, reduzindo por exemplo, o número de plantas da espécie *Typha angustifolia*.

Por outro lado, a pressão antrópica também compromete a estabilidade das *wetlands*, por exemplo, em ambientes costeiros as plantas *Grus japonensis* tiveram sua quantidade

reduzida, bem como o habitat natural da mesma. Uma pesquisa observou que é necessário combinar os efeitos da salinidade e das inundações no ciclo biogeoquímico do carbono na baixa quantidade de *wetlands* (XIE; AN; DAVIS, 2019).

Quando as *wetlands* costeiras estão submetidas ao estresse devido às ações antrópicas, isso compromete a atividade fotossintética de absorção de carbono, reduzindo as razões de C:N, C:S e P:S, e aumentando a razão de C:P e N:P em solo argiloso. Os pesquisadores concluíram que a mesma comunidade de plantas de *Sueda salsa* apresenta o mesmo mecanismo, mas em diferente habitat (XIE; AN; DAVIS, 2019).

Um estudo realizado na China analisou o decréscimo e o aumento de *wetlands* no período de 2000 a 2015 através de imagens do satélite Landsat e por meio do uso do software Arcgis. Em geral, essa quantidade aumentou em 0,4% em lagos, pântanos e rios, em especial na região montanhosa do Sudoeste da China, na parte do Tibet. O aumento se deve pelas mudanças climáticas, principalmente pelo derretimento das geleiras, o que aumenta o nível dos lagos e consequentemente a quantidade de *wetlands*. Fatores como mudanças no regime de precipitação, na temperatura e na evapotranspiração foram também as causas para essa elevação. Outra causa para o aumento das *wetlands* é a construção de reservatórios artificiais, que por sua vez também eleva o nível de água (XU et al., 2019).

Por outro lado, no mesmo estudo realizado por Xu et al. (2019), percebeu-se que mesmo sendo inferior ao aumento de *wetlands*, o decréscimo ocorreu, principalmente, nas áreas de pântanos, devido ao avanço da agricultura e das áreas urbanas na China. Isso reflete a importância de se existir um plano diretor para que haja delimitação e controle de áreas de importância ecológica como pântanos. Na China, a perda de *wetlands* foi convertida também a extensões de capim. Dessa forma, é necessário adotar-se políticas conservacionistas das *wetlands*, por conta da sua importância ecológica como no ciclo biogeoquímico do carbono, do nitrogênio, e para a manutenção da biodiversidade nativa incentivada pelas conferências das Nações Unidas.

Apesar das mudanças climáticas promovidas pela produção de gás metano, as barreiras de *wetlands* são importantes para restaurar o equilíbrio ecológico do ambiente e impulsionar a economia local (MATTHEWS, 2019).

O Novo Código Florestal Brasileiro favoreceu a expansão agrícola em Áreas de Preservação Permanente, possibilitando o aumento da salinidade nas águas da Amazônia pelo cultivo de camarão e produção de sal, além de permitir o reflorestamento com 50% de espécies exóticas. Diante desse contexto, as *wetlands* tem um papel importante no tratamento dos

curtos d'água, reduzindo a salinidade e mantendo o equilíbrio ecológico nas margens dos rios (GRASEL et al., 2019).

Outro aproveitamento das *wetlands* é a utilização destas para fins energéticos de fonte renovável, substituindo os combustíveis fósseis, que por sua vez são os maiores responsáveis pelas mudanças climáticas. Além disso, as *wetlands* podem beneficiar a atividade pesqueira, trazendo novamente os peixes para os reservatórios de água doce. A pesca é uma maneira de fornecer proteína para uma população (HERMOSO; CLAVERO; GREEN, 2019).

Um estudo realizado na Cidade de Melbourne na Austrália observou a presença de sapos em *wetlands* urbanas. As espécies estudadas foram estas: *Litoria ewingii*, *Crinia signifera*, *Limnodynastes tasmaniensis*, *Limnodynastes dumerilii* e *Limnodynastes peronii*. Verificou-se através de modelos matemáticos que a presença de metais pesados tinha um grande efeito negativo na quantidade das espécies de anfíbios avaliadas. Cobre, chumbo, níquel, arsênio, cádmio, cromo, mercúrio e zinco foram os metais avaliados. Já a extensão das *wetlands* em um raio de 500 m bem como a proporção de vegetação aquática emergente e ciliar teve um grande impacto positivo na presença dos anfíbios (SIEVERS et al., 2019).

Sievers et al. (2019) observaram que as formações geológicas, o tamanho das *wetlands*, a urbanização, condutividade elétrica, área de *wetlands*, a presença de estradas e pesticidas não provocam grande impacto nos anfíbios. Foram observados os efeitos de inseticidas comumente utilizados em áreas urbanas; herbicidas aplicados em ambiente rural; e fungicidas. Os principais pesticidas avaliados foram o diuron, bifentrina e trifloxistrobina. A espécie *Litoria ewingii* demonstrou ser melhor adaptada à ambiente geológico constituído de rochas sedimentares, diferentemente da *Crinia signifera*, que por sua vez é mais adaptada à área geológica de basalto.

O motivo de sapos estarem presentes em ambientes urbanos contaminados por metais pesados e pesticidas é que as *wetlands*, na qual convivem, oferecem alimentos, servem de habitat e lugar para reprodução, atraindo esses animais mais do que as outras áreas urbanas da cidade. Além disso, as *wetlands* podem adsorver pesticidas e também removê-los por hidrólise alcalina. Outra causa para a presença desses anfíbios é que alguns girinos não têm contato com o sedimento dos açudes em que estão as *wetlands*, não tendo acesso à maior concentração de contaminantes. Além disso, cada pesticida e metal pesado apresenta uma faixa de concentração para cada anfíbio entre a apresentação de resposta por parte do animal e o ser letal para o mesmo. Nessa faixa é revelado o potencial de adaptação do animal. Desta forma, *wetlands* em ambientes naturais, de fato, possuem maior número e riqueza de anfíbios (SIEVERS et al., 2019).

Apesar dos benefícios das *wetlands*, é necessário se ter o controle de cada poluente para que não ultrapasse os critérios e parâmetros de qualidade; além de não só colocar, por exemplo, plantas emergentes e ciliares, mas também outras espécies de *wetlands* como as submergentes, para que haja maior resistência da vegetação ao ambiente poluído. Caso contrário, naturalmente é reduzida a área de *wetlands* (SIEVERS et al., 2019).

No caso dos parâmetros de qualidade da água, a remoção de poluentes pelas *wetlands* pode ser representada por Nitrogênio Total, Fósforo Total, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) e intensidade de cor. O estudo de Sun et al. (2019), demonstrou a eficiência de remoção de poluentes biodegradáveis representados pela Demanda Bioquímica de Oxigênio pelas *wetlands* de *Phragmites australis* e *Typha angustifolia* em um parque nacional protegido na China. Nesse mesmo trabalho, as macrófitas não removeram de forma eficaz o fósforo total e a cor da água variou, dependendo da espécie de *wetlands* utilizada.

Por outro lado, os parâmetros podem variar com relação às estações do ano. Na China, a eficiência de remoção do Nitrogênio Total (NT) e da DBO₅ variou de 45,31% a 69,08% e de 22,83% a 60,44%, respectivamente, com relação às estações do ano avaliadas; primavera, verão e outono. Apesar disso, várias fazendas foram convertidas em *wetlands* para purificar a água de superfície, melhorando a qualidade e removendo poluentes, principalmente os utilizados na irrigação na agricultura. Isso promove a educação ambiental e uma visão ecológica do meio ambiente, além de gerar uma qualidade visual e paisagística do ambiente (SUN et al., 2019).

No tratamento de um curso d'água poluído, é necessário levar em consideração a função de purificação da água e da restauração do equilíbrio ecológico. O atendimento desses fatores ocorre pela seleção de um conjunto específico de tipos de *wetlands*, iniciando pelo cultivo de macrófitas submergentes, seguidas das flutuantes e emergentes (SUN et al., 2019).

3.2.1. Wetlands construídos

São denominadas de *wetlands* (em português, áreas alagadas) as regiões inundadas ou saturadas por água advinda de fontes superficiais e/ou subterrâneas. Estas inundações favorecem o surgimento de vegetações adaptadas às características do local. De acordo com (CUNHA; CALIJURI, 2013; GLAGLIO et al., 2017), diversas funções ecológicas são atribuídas aos *wetlands*, entre elas:

- a) ciclagem de nutrientes: as áreas alagadas atuam como fontes ou sumidouros de nutrientes por meio de processos como mineralização e decomposição de formas de carbono, enxofre, nitrogênio e fósforo;
- b) produção primária: ocorre a síntese de matéria orgânica por meio da fotossíntese ou quimiossíntese;
- c) manutenção de biodiversidade: *wetlands* constituem refúgio, hábitat e local de reprodução de espécies da flora e da fauna;
- d) regulação climática: as áreas alagadas são componentes importantes do ciclo hidrológico e contribuem para o fluxo de água entre os diferentes compartimentos da hidrosfera e atmosfera, o que influencia diretamente o clima;
- e) controle do fluxo hidrológico: as áreas alagadas regulam a recarga e descarga de aquíferos, além de contribuir para a retenção de sedimentos, o armazenamento de água e o controle de enchentes nas bacias hidrográficas.

Os *wetlands* construídos são equipamentos utilizados no tratamento de efluentes domésticos, agrícolas e industriais, que reproduzem operação semelhante ocorrida nas áreas alagadas naturais, com ajustes que permitem sua otimização. Estas alterações tornam possível realizar a recuperação de águas residuárias através de reações como oxirredução, precipitação, dissolução, complexação e assimilação biológica que irão reduzir a carga poluidora do efluente e contribuir para a melhoria da qualidade da água (PERBANGKHEM; POLPRASERT, 2010; ZHIMIAO et al., 2016; SARAIVA; MATOS; MATOS, 2019).

Portanto, *wetlands* construídos são ecossistemas artificiais com diferentes níveis de tecnologia que procuram atingir as mesmas funções ecossistêmicas básicas de *wetlands* naturais (GRULL, 2013). A utilização de *wetlands* construídos teve início no século 20 em países da Europa e nos Estados Unidos, se apresentando como uma alternativa aos tradicionais sistemas de tratamento. Na Alemanha, no início da década de 50, vários estudos sobre as propriedades dos *wetlands* construídos foram realizados no Instituto Max Plank. Estas pesquisas incluíram diversos testes com diferentes tipos de águas residuais, incluindo efluentes contaminados com fenóis e provenientes de processos agrícolas.

Wetlands são constituídos por um leito geralmente impermeabilizado (impedindo uma possível infiltração no solo) preenchido por água. De acordo com Fogler (2009) sua operação se assemelha a de um reator do tipo pistão (PFR - *Plug Flow Reactor*) tendo em vista que o efluente entra em uma das extremidades do *wetland* construído, realizando o percurso com escoamento laminar (velocidade baixa) sem mistura das fases, até a saída localizada na outra

extremidade do tanque de forma que todas as partículas percorram o mesmo trajeto do início ao fim.

Os *wetlands* de macrófitas aéreas (Figura 3) proporcionam, através de processos físicos, químicos e biológicos a remoção de diversos poluentes. As macrófitas aquáticas utilizadas nos sistemas *wetlands* construídos podem ser de dois tipos: emergentes e flutuantes. A escolha deve seguir alguns critérios: fácil propagação e rápido crescimento, alta capacidade de absorção de poluente, tolerância a ambientes eutrofizados, fácil colheita e valor econômico (FELIPE et al., 2014).

A operação de *wetlands* em Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário (ETE), as quais são comumente denominadas de *wetlands* construídos, atua principalmente na remoção da carga orgânica por via biológica com auxílio de micro-organismos. Esse parâmetro pode ser avaliado através da Demanda Química de Oxigênio (DQO) como foi realizado na China, investigando através do controle de qualidade do efluente que saia da estação para um rio no Norte desse país (WU et al., 2018).

Neste estudo realizado na China, também foram coletadas amostras de gases presentes na atmosfera para avaliar a emissão de dióxido de carbono (CO₂) e gás metano (CH₄) pelas *wetlands*, que por sua vez estavam operando em um conjunto de unidades com espécies diferentes de macrófitas, incluindo o aguapé. Percebeu-se que elevadas quantidades dos gases em estudo eram emitidas, principalmente no verão, assim como significativa redução na DQO observou-se no efluente tratado pela ETE com maior remoção de compostos orgânicos nesta mesma estação do ano (WU et al., 2018).

Ainda no mesmo estudo, as *wetlands* utilizadas foram do tipo *wetlands* de superfície livre, na qual as macrófitas ficam flutuando; mas também existem *wetlands* submersas, as quais as plantas ficam fixas em um substrato. Na segunda predomina a remoção anaeróbia dos compostos orgânicos. É importante salientar que para um desenvolvimento sustentável é necessário que se tenha um gerenciamento de emissão dos gases de efeito estufa como CO₂ e CH₄. A carga orgânica é reduzida de forma mais eficiente em um ETE quando o tratamento biológico utiliza um conjunto diferente de *wetlands* (WU et al., 2018).

Uma estação de tratamento de efluentes pode ser aplicada no tratamento de lixiviado em aterro sanitário, no tratamento de esgoto doméstico, no tratamento de efluentes de atividades agrícolas e industriais. Inicialmente ocorre o tratamento físico ou primário através da filtração, decantação ou outra operação física. Depois vem o tratamento secundário onde ocorre a remoção da carga orgânica por meio de seres vivos (WU et al., 2018).

Figura 3 - Macrófitas em *wetlands*

Fonte: Silva (2017).

Os *wetlands* construídos contam com a presença de macrófitas de forma artificial na remoção física e biológica de poluentes orgânicos e metais pesados. Os micro-organismos presentes na rizosfera são os responsáveis pela conversão da carga orgânica em compostos inorgânicos. Em contra partida, as macrófitas fazem a fotossíntese, fornecendo oxigênio e fração orgânica para os micro-organismos efetuarem a decomposição. Posteriormente, as plantas absorvem os compostos inorgânicos. Os metais pesados, por exemplo, vão se acumulando no tecido vegetal (WANG et al., 2018).

O oxigênio também é fornecido de forma natural para os micro-organismos por meio da temperatura e da taxa de humidade, solubilizando o oxigênio atmosférico. O controle do tratamento de efluentes por *wetlands* artificiais é realizado medindo-se a quantidade de oxigênio dissolvido. Isso é feito através do método titulométrico, potenciométrico e também pela modelagem matemática. A titulometria não é eficaz em altas concentrações de oxigênio, apesar de ser um método não caro. O potenciométrico, apesar da sua elevada acurácia, apresenta um elevado custo. Já a modelagem matemática, através de cálculos descreve bem o *input* de oxigênio no sistema de tratamento além de ser um método de base teórica (WANG et al., 2018).

As *wetlands* podem ser de 3 tipos: livres de fluxo horizontal; submergentes de fluxo horizontal; e submergentes de fluxo vertical. As submergentes de fluxo horizontal são mais eficientes na remoção da carga poluidora; e o sistema híbrido é a forma que opera com mais eficácia. Por outro lado, as macrófitas utilizadas nesses sistemas artificiais podem ser do tipo flutuante, emergentes ou submersas. Durante o tratamento com as macrófitas, micro-

organismos são responsáveis pela nitrificação e desnitrificação, sendo uma fonte de nitrogênio para essas plantas, na rizosfera (WANG et al., 2018).

O tratamento de efluentes através de *wetlands* também promove a desinfecção de patógenos como as bactérias da espécie *Escherichia coli*, sem a necessidade de cloração, a qual é responsável pela presença de trihalometanos na água tratada (WU et al., 2016).

O Benzotriazol é um composto químico, o qual evita a corrosão de torres de resfriamento e flui nesse equipamento através de uma mistura. Um experimento avaliou a remoção dessa substância por meio de *wetlands* construídos. Foram realizadas 2 replicatas para cada tratamento, as quais ocorreram através da vazão de fluxo vertical e submerso; fluxo horizontal e submerso; e fluxo superficial. Os *wetlands* trataram o efluente sintético através de protótipos (WAGNER et al., 2020).

A adsorção, a biodegradação e a fotodegradação foram os mecanismos de remoção de Benzotriazole avaliados. A fotodegradação ocorreu através de uma lâmpada com o comprimento de onda na faixa do visível. A biodegradação contou com a inoculação de micro-organismos. A concentração do poluente em estudo inicialmente foi de 1 mg/L e durante o processo as concentrações nos efluentes foram quantificadas em tempos específicos (WAGNER et al., 2020).

O mecanismo que obteve a maior remoção de Benzotriazole foi a adsorção através do sedimento e da planta utilizada no processo. A biodegradação foi feita por meio de micro-organismos aeróbios. O *wetland* construído com fluxo vertical e submerso foi a técnica que mais removeu o Benzotriazole. A fotodegradação e o *wetland* construído com fluxo superficial não obtiveram significativa remoção do Benzotriazole (WAGNER et al., 2020).

A remoção do poluente através dos *wetlands* construídos é eficaz se antes houver uma dessalinização prévia do efluente sintético. O uso de carvão ativado melhora a adsorção do Benzotriazole nesse processo (WAGNER et al., 2020).

3.3 BIOSSURFACTANTES

Atualmente, a corrida pelo desenvolvimento e a melhora do estilo de vida tem impactado negativamente os ecossistemas aquáticos e terrestres pelo lançamento de poluentes ambientais. Os exemplos mais comuns de contaminantes são estes: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados, herbicidas, inseticidas, fungicidas, clorofórmio. No caso da atmosfera, são lançados gases estufas como dióxido de carbono, gases que provocam

a chuva ácida como óxido de enxofre, além de serem emitidos sólidos particulados (JIMOH; LIN, 2019).

Esses contaminantes são tóxicos para os seres humanos, pois através, por exemplo, da chuva esses compostos são absorvidos por vegetais ou por peixes, ocorrendo o fenômeno da bioacumulação, o que potencializa a presença dessas substâncias na alimentação das pessoas. Para mitigar essa poluição, teve início o uso de surfactantes sintéticos para remover esses contaminantes. O problema é que essas substâncias são tóxicas para o meio ambiente e dificilmente degradados por micro-organismos (JIMOH; LIN, 2019).

Aliado ao interesse científico, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinada a novas legislações de controle ambiental têm levado ao desenvolvimento de surfactantes naturais obtidos por via microbiológica e vegetal como alternativa aos produtos existentes (ROCHA E SILVA et al., 2019). Além disso, os compostos naturais, diferentemente dos sintéticos, são acessíveis para os micro-organismos, o que promove a biodegradabilidade ou remoção dos poluentes ambientais (JIMOH; LIN, 2019).

Os biossurfactantes, além de apresentarem certa especificidade, são compostos anfipáticos, ou seja, são constituídos, na sua estrutura, por parte polar (hidrofílica) e parte apolar (hidrofóbica). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (MAO et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

As principais classes de biossurfactantes descobertas são estas: lipopeptídeos, nucleolipídeos e glicolipídios. O alto custo do processo de fermentação desses compostos em escala industrial e comercial levou-se a investigar a aplicação de produção dos biossurfactantes sintéticos pertencentes a essas classes. No entanto, lipopeptídeos e nucleolipídeos sintéticos continuam a apresentar elevados custos. A solução para isso é investigar tipos diferentes de biossurfactantes (LIU et al., 2019).

Os lipopeptídeos devido as suas características anfipáticas podem ser utilizados na fabricação de fármacos, cosméticos, na remoção de óleos contaminantes. Esse grupo de compostos possui ação antimicrobiana e são produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*. A parte hidrofóbica dessas substâncias é composta por cadeia hidrocarbonada e a parte hidrofílica por aminoácidos. Além disso, essa classe de biossurfactantes facilita a entrada de metais tóxicos para o interior da célula da bactéria, pois a composição da membrana celular é similar ao biossurfactante (LIU et al., 2019).

As formas naturais de lipopeptídeos apresentam micelas com uma configuração circular. Além disso, esses compostos naturais têm a parte polar hidrofílica carregada negativamente atraindo íons metálicos. Já os lipopeptídeos sintéticos apresentam uma configuração linear com uma extremidade apolar composta por hidrocarboneto e a outra parte por aminoácidos, enxofre, fósforo e oxigênio. As micelas desses biossurfactantes sintéticos possuem uma forma helicoidal (LIU et al., 2019).

Os nucleolipídeos podem ser nucleobase, nucleosídeos e nucleotídeos. Os nucleolipídeos naturais são produzidos por bactérias e fungos, comportam apenas os nucleosídeos e apresentam ácidos nucleicos. Os nucleotídeos possuem um componente de fósforo ligando a cadeia de hidrocarboneto à parte polar. Os nucleolipídeos apresentam baixa solubilidade em água e quando acrescenta-se hidrocarboneto à extremidade polar apresentam atividade superficial constante em ampla faixa de pH e temperatura, além de tornar o ácido desoxirribonucleico (DNA) estável em solução aquosa (LIU et al., 2019).

A alteração no nucleolipídeo do DNA de uma bactéria leva à modificação na produção de enzimas e metabólitos da mesma. Isso é a engenharia genética, a qual pode levar a otimização e redução dos custos na produção industrial de biossurfactantes comerciais (LIU et al., 2019).

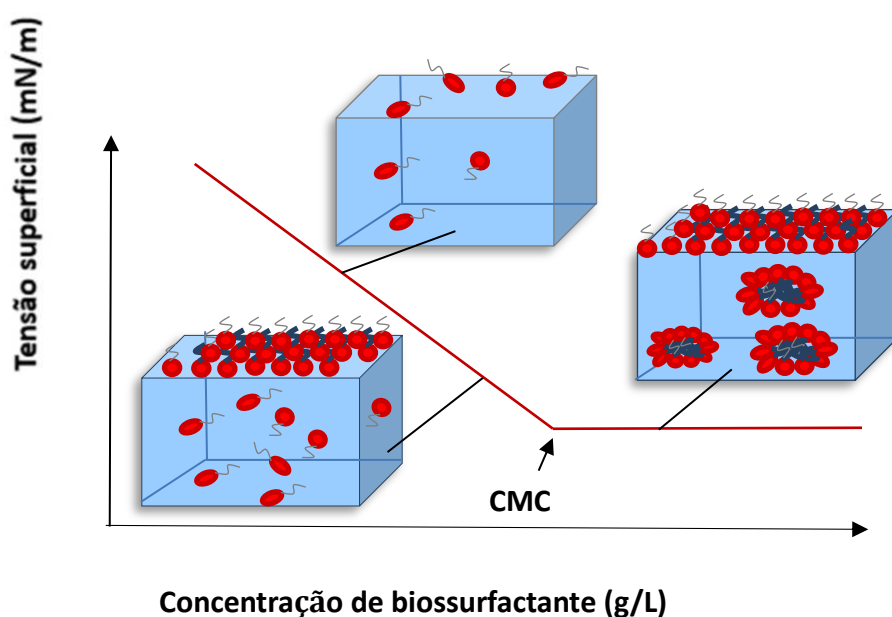
O glicolipídeo é um composto constituído de um lipídeo ligado a um açúcar que pode ser manose, celulose e outros, podendo conter glicogênio ou não. Os mais comuns dessa classe são os ramnolipídeos, os quais possuem ramanose ligada a um lipídeo. Os glicolipídeos são produzidos por bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos filamentosos através da fermentação em meio de cultura, que por sua vez pode conter resíduos de baixo custo, viabilizando a produção de biossurfactante em escala industrial. Os resíduos podem ser soro de leite ou óleos vegetais (LIU et al., 2019).

A eficiência de um surfactante é determinada por sua habilidade em reduzir a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. Surfactantes aumentam a solubilidade aquosa de moléculas hidrofílicas, reduzindo a tensão superficial/interfacial de interfaces óleo-água (ROCHA E SILVA et al., 2019).

A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são estruturas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna. A concentração de micelas é conhecida como a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde ao ponto em que o agente tensoativo registra o menor valor de tensão superficial estável, ou seja, corresponde à mínima concentração de surfactante

necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 4). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (CAMPOS et al., 2013).

Figura 4 - Gráfico ilustrativo das regiões onde ocorre a formação de micelas (CMC)



Fonte: Santos et al. (2016).

Os biossurfactantes são derivados de organismos vivos, como animais, micro-organismos e plantas e têm despertado interesse industrial em função de suas características vantajosas, como diversidade estrutural, toxicidade reduzida, maior biodegradabilidade, capacidade de ação em ambientes extremos de pH, temperatura e salinidade, maior seletividade, menor CMC e habilidade de serem produzidos a partir de fontes renováveis/resíduos industriais e de subprodutos (ROSA; FREIRE; FERRAZ, 2015).

A desvantagem atual de se utilizar biossurfactantes ocorre devido ao baixo rendimento de produção, e consequentemente ao alto custo de obtenção em relação a aplicação industrial. Entretanto algumas pesquisas tem demonstrado que os custos podem ser efetivos se durante o processo de produção dessas substâncias por meio de micro-organismos, utilizarem meios de cultura de baixo custo como resíduos industriais ou agrícolas. Esse reuso ocorre ao se utilizar, como fonte de carbono no meio de cultura, o soro de leite ou de milho, melaço, resíduos de destilaria, óleos, bagaço de cana que iriam ser descartados (JIMOH; LIN, 2019).

Os micro-organismos produtores podem ser bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Além das fontes de carbono, é necessário que os meios de cultura tenham nitrogênio, fósforo, ferro e potássio. O meio de cultura deve ter uma razão alta de carbono/nitrogênio para ter um rendimento de biossurfactante elevado, pois dessa forma aumenta o metabolismo celular, caso

contrário, vai apenas favorecer o crescimento celular. A fonte de nitrogênio pode ser um sal inorgânico como NH_4NO_3 ou um composto orgânico, vai depender dos outros componentes do meio de cultura (JIMOH; LIN, 2019).

Os biossurfactantes de origem vegetal estão amplamente distribuídos no meio ambiente, compondo um grupo diverso de substâncias caracterizadas pela sua estrutura em fosfolipídeos, proteínas, saponinas, entre outras (MUSTAFA, 2011; ROCHA E SILVA, et al., 2019). As saponinas são metabólitos secundários de natureza glicosídica facilmente encontrados em plantas, bem como em animais tais como os invertebrados marinhos (DEMEYER et al., 2014; BEZERRA et al., 2018). Tais metabólitos possuem propriedades superficiais responsáveis pela formação de espuma e/ou função biológica como a atividade hemolítica, entre outras, sendo estas propriedades atribuídas a características estruturais como a sua natureza anfipática.

Os surfactantes naturais possuem diversas aplicações como: detergência, biorremediação, formação de espumas, produção de cosméticos e de fármacos, alimentação, atividade emulsificante, dispersante, indústria petrolífera e recuperação de óleos (BEZERRA et al., 2016).

Por conta de suas propriedades singulares, as saponinas encontram aplicação em diversas indústrias onde, no setor alimentício são utilizadas devido ao seu caráter doce ou amargo, na agricultura são comumente utilizadas como aditivo na alimentação animal, na remediação do solo e como pesticidas naturais (BEZERRA et al., 2018).

Testes comparativos entre saponinas obtidas de diferentes fontes vegetais tais como, alcaçuz, alho, aveia, bucha, juá e calêndula e surfactantes químicos (Span 20 e Tween 80), demonstraram que 71% dos extratos ricos em saponinas conseguem reduzir a tensão superficial da ordem de 25 a 35 mN/m, em comparação com a água pura (72 mN/m), porém apenas 47% destes extratos conseguem promover emulsões estáveis, indicando que provavelmente seja necessário aliá-las com outros espessantes afim de estabilizar tais emulsões (RIBEIRO, 2012).

Outros estudos se referem ao efeito de surfactantes naturais obtidos a partir de vegetais sobre a biodegradação de hidrocarbonetos, remoção de compostos orgânicos e a hidrofobicidade das células resultante do uso destes surfactantes. A utilização de um biotensoativo derivado do pericarpo de *Sapindus mukorossi* para a lavagem de fenantreno em solo contaminado em comparação com o surfactante sintético Tween 80 mostrou que a *Sapindus saponina* promoveu um aumento linear na solubilização do fenantreno (ZHOU et al., 2013).

Smulek et al. (2016), demonstraram que a adição de extrato de *Sapindus mukorossi* poderá ser uma ferramenta útil para melhorar a eficácia da degradação microbiana de poluentes hidrocarbonetos por estirpes ambientais em solos contaminados, sendo registrado um aumento na biodegradação do óleo diesel para 41% para *Sphingomonas sp.* e 56% de *Pseudomonas alcaligenes* por adição de 100 mg/L de *Sapindus saponina*.

Os surfactantes naturais podem ser ramnolipídios, lipopeptídios, glicolipídios, surfactina. A caracterização de um biossurfactante pode ser realizada por Cromatografia de Camada Fina Delgada (TLC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas, Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas e Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O TLC é uma técnica que é rápida e não é cara, ela pode ser utilizada para biossurfactante bruto ou purificado, ela fornece os componentes principais da substância. Esse equipamento contém uma lâmina fina metálica ou de vidro coberta por celulose (JIMOH; LIN, 2019).

A Cromatografia de Alta Camada Fina tem o mesmo princípio do TLC, mas com uma maior precisão no momento de fornecer os componentes do biossurfactante. Já a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) é composta de um tubo e detector que fornece para o computador os picos de todos componentes do biossurfactante no cromatograma (JIMOH; LIN, 2019).

No caso da espectrometria de massas, tanto a líquida como a gasosa, o analito, que deve ser volátil ou estar dissolvido em solvente volátil, passa por um campo magnético, identificando os componentes do biossurfactante e suas respectivas massas moleculares em *daltons*, bem como a origem de cada íon. O RMN fornece todos os componentes através dos picos dos gráficos, já a espectrofotometria do infravermelho fornece os constituintes do biossurfactante através de pequenas alterações no gráfico e as amostras do tensoativo podem ser reutilizadas (JIMOH; LIN, 2019).

A seleção de surfactantes para uso em processos industriais é baseada no tipo de carga da biomolécula, o comportamento físico-químico, a adsorção e a solubilidade, estes são os critérios mais importantes para selecionar surfactantes eficientes (CAMPOS et al., 2013). As propriedades físicas e químicas, redução da tensão superficial e estabilidade de emulsões formadas são características importantes em um biossurfactante, as quais tornam possível a utilização desses agentes em diferentes setores industriais, como será discutido nas próximas seções (SANTOS et al., 2016).

3.3.1. Propriedades

Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas dessas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015):

Atividade superficial e interfacial: a eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (CAMPOS et al., 2013). Logo, os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois alcançam menor tensão superficial à menores concentrações (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015). A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que, a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m, respectivamente. Os bons surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial do n-hexadecano de 40 para 1 mN/m (ROCHA E SILVA, et al., 2019).

Tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob elevadas temperaturas e valores de pH entre 2 e 12. Os biossurfactantes também suportam concentrações de até 10% de sal (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por micro-organismos na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e no tratamento de resíduos (CAMPOS et al., 2013).

Toxicidade reduzida: os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, em cosméticos e em produtos farmacêuticos. A ausência de toxicidade também é de fundamental importância para aplicações na área ambiental (SANTOS et al., 2016).

Disponibilidade: biossurfactantes podem ser produzidos a partir de matérias-primas largamente disponíveis, além da possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos industriais (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Especificidade: os biossurfactantes sendo moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos são muitas vezes específicos em sua ação. Isto seria de particular

interesse na desintoxicação de poluentes específicos, na desemulsificação de emulsões industriais, em aplicações cosméticas, farmacêuticas e alimentares (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Biocompatibilidade e digestibilidade: o que garante a aplicação dessas biomoléculas nos mais diversos setores industriais, destacando as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Formação e quebra de emulsões: O liposan é um emulsificante solúvel em água sintetizado por *C. lipolytica*, que tem sido utilizado para emulsificar óleos comestíveis, formando emulsões estáveis (CAMPOS et al., 2013).

3.3.2. Aplicações Industriais dos Biossurfactantes

Atualmente, o mercado principal para os biossurfactantes é a indústria do petróleo, onde esses compostos podem ser utilizados na limpeza de derramamento de óleos, na remoção de resíduos de óleo de armazenamento de tanques, na recuperação de petróleo e na biorremediação de solos e da água (ALMEIDA et al., 2016). O Quadro 1 resume os campos de utilização dos biossurfactantes entre os diversos setores industriais, enquanto as principais aplicações biotecnológicas serão apresentadas em mais detalhes a seguir.

Quadro 1 – Aplicações dos biossurfactantes para usos industriais

Indústria	Aplicação	Função dos biossurfactantes	Referências
Meio Ambiente	Biorremediação; operações de limpeza de derramamentos de óleos.	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, dispersão de óleos, solubilização de óleos, umidificação, detergência, espalhamento, formação de espumas, inibição de corrosão de óleos combustíveis em equipamentos, lavagem de solos.	SILVA et al. (2014)
Petróleo	Recuperação avançada de óleo; desemulsificação.	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, desemulsificação de emulsões oleosas, solubilização de óleos, redução de viscosidade, dispersão de óleos, umidificação de superfícies sólidas, dissolução de óleos, espalhamento, formação de espumas, inibição de corrosão de óleos combustíveis em equipamentos.	SOUZA; VESSONI-PENNA; OLIVEIRA (2014)
Mineração	Operação de remoção de metais pesados; remediação de solos; flotação.	Umidificação e formação de espumas, coletores e espumantes, remoção de íons metálicos de soluções aquosas, solos e sedimentos, sequestradores de metais pesados, dispersão, inibição de corrosão de óleos	SARUBBO et al. (2015)
Alimentos	Emulsificação e desemulsificação; ingrediente funcional.	Solubilização de odores de óleos, controle de consistência, emulsificação, agente umectante, dispersante, detergente, espumante, espessante.	CAMPOS et al. (2013)
Medicina	Microbiologia; farmácia; terapêutica ações	Agentes antiadesivos, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirais, vacinas, moléculas imunomodulatórias.	MNIF; GHRIBI (2015); BANAT; DE RIENZO; QUINN (2014)
Agricultura	Biocontrole; fertilizantes.	Agentes umectantes, dispersão, suspensão de pesticidas e fertilizantes em pó, emulsificação de soluções de pesticidas, facilitação dos mecanismos de controle biológico de micróbios, eliminação de patógenos de plantas e para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes para a planta associada a micróbios benéficos.	SACHDEV; CAMEOTRA (2013)
Cosméticos	Saúde e produtos de beleza.	Agentes de emulsificação, agentes espumantes, de solubilização, umectante, limpadores, agentes antimicrobianos, mediadores da ação de enzimas.	VIJAYAKUMAR; SARAVANAN (2015)
Limpeza industrial	Detergentes.	Detergentes e sanitizantes para lavanderia, agentes umectantes e de dispersão, inibidores de corrosão.	VIJAYAKUMAR; SARAVANAN (2015)
Nanotecnologia	Síntese de nanopartículas.	Emulsificação, estabilização.	VIJAYAKUMAR; SARAVANAN (2015)

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016).

3.3.3. Aplicações Ambientais

Biorremediação: os derramamentos de petróleo ocorrem durante o transporte de carga ou na forma de derrames industriais de resíduos de óleo e derivados de petróleo. O petróleo é um hidrocarboneto hidrofóbico com efeitos negativos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares dos organismos vivos, oferecendo considerável risco de contaminação em ambos os ecossistemas marinhos e terrestres (SILVA et al., 2014; SOUZA; VESSONI-PENNA; OLIVEIRA, 2014).

Quanto maior a população de micro-organismos degradadores, mais rápido e mais eficiente será o processo de biorremediação. Portanto, essa técnica pode ser efetuada por bioestimulação, que consiste na estimulação do crescimento de micro-organismos presentes no local contaminado. Este processo pode ser realizado através da introdução de oxigênio, nutrientes e receptores específicos de elétrons para a degradação do contaminante e substâncias, a fim de corrigir o pH. O estímulo também pode ser realizado através da bioaugmentação, na qual os micro-organismos autóctones são adicionados ao ambiente contaminado para acelerar e completar a degradação do poluente (SOUZA; VESSONI-PENNA; OLIVEIRA, 2014).

A biorremediação teve importante papel na limpeza do derramamento de 41 milhões de litros de petróleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989, dando início ao desenvolvimento dessa tecnologia, demonstrando que há boas razões para se acreditar na aplicação efetiva deste método no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias apropriadas (SOUZA; VESSONI-PENNA; OLIVEIRA, 2014).

No citado acidente com o Exxon Valdez, a primeira medida tomada foi a lavagem física com jatos de água a alta pressão. Subsequentemente, surfactantes químicos foram aplicados nas áreas poluídas para acelerar o crescimento e a atividade dos micro-organismos degradadores de petróleo. Duas ou três semanas depois, as regiões tratadas com os surfactantes estavam significativamente mais limpas do que as áreas controle. Contudo, foi difícil avaliar os efeitos de tratamento devido à heterogeneidade da contaminação. De qualquer forma, outros estudos demonstraram a importância do uso de surfactantes para aumentar a biodegradação do petróleo (SOUZA; VESSONI-PENNA; OLIVEIRA, 2014).

Recuperação de petróleo: o petróleo continua a ser uma fonte essencial de energia e um motor de desenvolvimento econômico. De acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos, 83% de todas as fontes de energia primária consumida nos EUA vem de combustíveis fósseis, com o petróleo que compreende 57% dos combustíveis fósseis

consumidos. Em 2010, 19,2 milhões de m³ de petróleo foram consumidos por dia (ALMEIDA et al., 2016).

Os EUA produzem 870.000 m³ de petróleo bruto por dia a partir de 530 mil poços de produção (ALMEIDA et al., 2016), 35% do que produzem 0,16 m³/dia e 79% produzem <1,59 m³/dia. Nesse sentido, os biossurfactantes têm sido aplicados na redução da tensão interfacial entre óleo/água e óleo/rocha. Isto reduz as forças capilares impedindo que o óleo se mova através dos poros de rochas. Os biossurfactantes também podem ligar-se fortemente na interface óleo-água formando a emulsão. Isso estabiliza o óleo dessorvido na água e permite a remoção do mesmo, juntamente com a água de injeção (MAO et al., 2015).

Uma das aplicações ambientais dos biossurfactantes é a remoção de metais pesados e óleos de solos contaminados, sendo simulado de forma eficaz e não cara através de ensaio estático de bancada por meio de colunas empacotadas (JIMOH; LIN, 2019).

Lavagem dos solos por biossurfactantes: Os biossurfactantes têm sido testados na remoção de petroderivados em solos e águas contaminados. Os Raminolípídeos têm sido aplicados com sucesso em processos biotecnológicos de descontaminação (ROSA; FREIRE; FERRAZ, 2015). Outros biossurfactantes produzidos por espécies de *Pseudomonas* (SILVA et al., 2013; ROCHA E SILVA et al., 2014), *Bacillus* (VIJAYAKUMAR; SARAVANANE, 2015) e *Candida* (LUNA et al., 2015; RUFINO et al., 2013; 2014) também têm sido aplicados com sucesso na remediação de solos.

Remoção de metais pesados: os contaminantes persistentes em solos incluem metais pesados e radionuclídeos. O aumento dos níveis de metais pesados no solo, foram reportados em muitos países industrializados. Os metais e seus metalóides como cromo, cádmio, mercúrio e chumbo, podem afetar o ecossistema e a saúde humana através das cadeias alimentares por exposição direta aos solo/água contaminados (CHAKRABORTY; DAS, 2014).

Metais pesados e metalóides pesados são Pb (chumbo), Zn (zinco), Cu (cobre), Cd (cádmio), Hg (mercúrio), Ni (níquel), As (arsênio), Cr (crômio), Al (alumínio) e Mn (manganês). Tanto esses metais como esses metalóides apresentam as mesmas formas de contaminação, técnicas de remoção e a mesma toxicologia. As crescentes atividades industriais, principalmente, atividades de mineração, lançam resíduos de metais pesados no meio ambiente, contaminando solos e águas subterrâneas (KHALID et al., 2017). Esses metais, na maioria das vezes, são tóxicos para os micro-organismos, animais e plantas que vivem no solo, comprometendo a ciclagem de nutrientes, e conseqüentemente, o equilíbrio ecológico do meio ambiente. A agricultura e, em alguns casos, o abastecimento de água transportam metais

pesados através da alimentação e da água fornecida para o organismo humano (KHALID et al., 2017).

Os metais pesados, em quantidades elevadas, são tóxicos para as pessoas, pois provocam o câncer, além de afetar o sistema nervoso. O uso de agrotóxicos, muitas vezes, injeta metais pesados no solo. Esse último meio, além dos resíduos industriais, também é responsável pela emissão de metais pesados na atmosfera, estando em contato com as pessoas, e, pela chuva atinge rios e lagos. Em cursos d'água, os metais pesados atingem peixes, provocando o fenômeno da bioacumulação (KHALID et al., 2017).

As técnicas utilizadas para tratar solos contaminados por metais pesados dividem-se em métodos físicos, métodos químicos e biorremediação. Dentro desse campo, a escavação é um método físico, o qual retira um solo fértil de um lugar e o lança no solo contaminado, dissolvendo os metais pesados. Essa técnica é rápida, apresenta alto custo e é aplicada em áreas de baixa dimensão (KHALID et al., 2017).

Outro método físico é a aplicação de barreiras de contenção nos solos contaminados, o que impede a propagação dos metais pesados para os aquíferos e áreas de solo não contaminado. Essa técnica, além de apresentar alto custo e ser rápida, necessita de permanente monitoramento e é aplicada à área de baixa extensão (KHALID et al., 2017).

A remediação eletrocinética de metais pesados do solo ocorre por diferença de potencial elétrico, emitindo o campo elétrico nos dois lados do sistema eletrolítico. Esse método físico deve contar com a correção de pH do solo, apresenta baixo custo, é rápido e aplicado somente a área de baixa extensão. A vitrificação, um método físico, é a conversão de metais pesados em material vítreo estabilizando-os através da corrente elétrica emitida por eletrodos, as quais aquecem o solo à altas temperaturas na faixa de 1800°C. Essa última técnica pode ser aplicada a largas extensões de solo (KHALID et al., 2017).

Os métodos químicos apresentam menor custo e maior rapidez do que os métodos físicos. Um dos métodos químicos são as técnicas de imobilização, que por sua vez consistem em complexação, precipitação e adsorção com intuito de imobilizar os metais pesados através de reagentes inorgânicos ou orgânicos. Já o encapsulamento é um método químico, o qual imobiliza soluções de metais pesados de resíduos tóxicos no solo através do uso de cimento, cal, asfalto, concreto e CAC (cimento de aluminato de cálcio), formando blocos sólidos. Essas técnicas devem ser monitoradas (KHALID et al., 2017).

Outro método químico é a lavagem do solo, o qual consiste na retirada do solo contaminado e lixiviar os metais pesados presentes através de uma solução extratora. Essa

técnica remove por completo os metais pesados e depois o solo limpo pode ser depositado no local de origem. Esse método é rápido e econômico (KHALID et al., 2017).

As biorremediações são técnicas de baixo custo, utilizadas em áreas de larga extensão. A fitovolatilização é um desses métodos biológicos, na qual a planta retira os metais pesados do solo e os emite para a atmosfera, retirando o contaminante de um local e enviando-o para outro ambiente (KHALID et al., 2017).

A fitoestabilização, outro método biológico, consiste numa planta neutralizar os metais pesados na rizosfera. Já a fitoextração, também método biológico, caracteriza-se por plantas absorverem os metais pesados pelo xilema e incorporá-los em seus organismos, removendo por completo o contaminante do solo (KHALID et al., 2017).

A fitoextração não ocorre com todas as plantas e sim com um grupo específico. Esse método é seguro, sustentável e não degrada o meio ambiente. Essa técnica pode contar com o auxílio de micro-organismos e de quelantes como o EDTA, os quais tornam os metais pesados disponíveis para plantas (KHALID et al., 2017).

A aplicação de quelante deve ser em baixa quantidade para não agredir o solo durante o processo de fitoextração. O auxílio de micro-organismos é outra forma de colocar em prática a fitoextração, na qual o micro-organismo do solo produz o quelante. Esses auxílios reduzem o tempo de remoção completa dos metais pesados (KHALID et al., 2017).

O uso da engenharia genética otimiza a fitoextração, pois plantas transgênicas com genes, os quais aumentam a capacidade de absorção de contaminantes, produzem mais enzimas que removem metais pesados; mais este campo ainda está sujeito a mais investigação. Os custos da fitoextração ainda podem ser reduzidos mediante o uso das plantas com metais pesados como fonte de energia renovável (KHALID et al., 2017).

Mao et al. (2015) descreveram a capacidade dos surfactantes em promover a dessorção de metais contidos em plantas e a posterior absorção dos tensoativos pelas mesmas. Mais recentemente, biossurfactantes como uma saponina vegetal e raminolipídeos foram capazes de remover cromo e arsênio de solos ricos em resíduos de mineração (MAITY et al., 2013). Outros tipos de biossurfactantes produzidos por espécies do gênero *Candida* também foram empregados com sucesso na flotação de metais pesados e demonstraram capacidade de remover mais de 90% de cátions em colunas de Flotação por Ar Dissolvido (SARUBBO et al., 2015).

3.4 FLOTAÇÃO

A flotação constitui um processo de separação sólido-líquido por gravidade, onde os sólidos presentes na suspensão são recuperados pela adesão dos mesmos a bolhas de gás (geralmente ar) como meio de transporte. Ao contrário do que ocorre na sedimentação gravitacional, o agregado (definido como agregado bolha-partícula) possui densidade menor que a densidade da suspensão. Este agregado ascende na fase aquosa permitindo, assim, a separação do óleo (DELIYANNI; KYZAS; MATIS, 2017; ROCHA E SILVA et al., 2018b).

Sua utilização teve início no século passado e possui aplicação clássica no beneficiamento de minérios. Neste caso, a recuperação de espécies sólidas existentes em suspensões não homogêneas é baseada nas diferentes capacidades das partículas em suspensão de se aderirem às bolhas, permitindo uma separação seletiva. A técnica mostra-se particularmente vantajosa, em relação aos métodos tradicionais, quando a diferença entre as fases contínua e particulada é reduzida, como ocorre no tratamento de emulsões e suspensões floculentas (RUBIO; SOUZA; SMITH, 2002).

Em efluentes oleosos, o princípio da flotação baseia-se principalmente na hidrofobicidade das partículas que causam a sua ligação com a bolha de ar através de força hidrofóbica (GARG et al., 2012). Como a densidade do ar é muito menor do que a densidade das partículas é de se esperar que as bolhas ascendam na massa líquida promovendo a ocorrência do contato (choque) bolha-partícula, sendo o soluto (matéria orgânica ou metal pesado, por exemplo), flotado para a superfície pela adição de um coletor, normalmente um surfactante apropriado, onde é recuperado no final do processo (MENEZES et al., 2011). Sendo assim, existe uma série de produtos químicos que podem induzir ou melhorar a separação seletiva das fases. Estes reagentes são comumente classificados como segue (ROCHA E SILVA et al., 2018b):

- Coletores: substâncias químicas utilizadas com o objetivo de provocar uma hidrofobização seletiva nas partículas presentes na polpa de flotação, possibilitando sua aderência às bolhas de ar e aumentando a eficiência de coleta.
- Ativadores: substâncias conhecidas como ativadores são adicionadas à polpa de flotação com o objetivo de propiciar uma melhor adsorção do coletor na superfície destas partículas.

- Depressores ou Inibidores: substâncias que evitam a adsorção do coletor a uma determinada espécie, permitindo uma coleta seletiva. Formam um dos mais importantes grupos de compostos químicos usados na flotação de minérios.
- Reguladores: a eficiência da maioria dos processos de separação por flotação depende consideravelmente do pH da suspensão. Compostos que modulam o ambiente da flotação através da regulação do pH são denominados de reguladores.
- Espumantes: substâncias tensoativas heteropolares que adsorvem na interface ar-água. Sua ação na fase líquida da polpa de flotação eleva a resistência mecânica das bolhas de ar, favorecendo a dispersão das bolhas e diminuindo a coalescência. Ocorre um aumento da superfície de aderência das partículas, permitindo a formação de uma espuma estável e consistente.
- Floculantes: atuam na aglomeração das partículas, possibilitando a formação de agregados mais susceptíveis a serem separados por flotação. Em geral, são substâncias de alto peso molecular, sintéticas ou naturais.

A Flotação pode ser incorporada em regimes de tratamento de águas residuais, das seguintes maneiras (RUBIO; SOUZA; SMITH, 2002):

(1) Como uma unidade de processo para a remoção de contaminantes não separados por outros processos. Exemplos são encontrados na remoção de íons metálicos a partir de soluções diluídas de íons e na separação seletiva de íons valiosos.

(2) Como uma unidade de pré-tratamento antes de decantação primária, uma unidade-flash mais áspera.

(3) Como uma unidade de tratamento primário à frente de unidades de tratamento secundário, como lagoas de bio-oxidação.

(4) Como um processo de unidade para espessamento de lamas.

3.4.1. Aplicações da Flotação

A flotação é cada vez mais utilizada no tratamento de resíduos, através da introdução de novos dispositivos de flutuação superiores, levando a novas e melhores aplicações para a remediação de minerais, águas e sólidos contaminados da indústria, etc. A aplicação cruzada da flotação nas diversas áreas de interesse deve levar a procedimentos novos e aprimorados na indústria mineral e metalúrgica, nas indústrias químicas e petrolíferas e no tratamento de águas residuais industriais e domésticas (RUBIO; CARISSIMI; ROSA, 2007; ALBUQUERQUE

et al., 2012). O Quadro 2 resume as algumas aplicações ambientais da flotação em áreas distintas.

Quadro 2 - Algumas aplicações ambientais da flotação

AMBIENTE	(SÓLIDO/LÍQUIDO,	SÓLIDO/LÍQUIDO/LÍQUIDO	OU
LÍQUIDO/SEPARAÇÃO LÍQUIDA):			
• Tratamento de compostos orgânicos (plantas de extração por solventes), óleos, gorduras e corantes (ágatas); • Tratamento de efluente com metais pesados (As^{+3}, Cr^{+3} / Cr^{+6}, Cd^{+2}, Pb^{+2}, Mn^{+2}, Ni^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Se^{+2}) e ânions (CrO_4, S^{-2}, AsO_4, PO_4, MoO_4); • Reciclagem de água (filtros): Ânions e remoção de íons de cálcio; • Tratamento de resíduos de mineração – drenagem ácida de mina (DAM) e reuso de água.			
PROCESSO INDUSTRIAL			
• Separação de proteínas; • Remoção de impurezas na indústria de cana-de-açúcar; • Separação de óleos, gorduras, surfactantes (sabonetes), remoção de odores e resíduos sólidos na indústria de alimentos; • Reciclagem de plásticos, pigmentos, corantes e fibras; • Separação de tinta de papel, borracha, resinas, pigmentos de toner de impressora; • Remoção de óleo emulsionado na indústria química e petroquímica; • Espessamento de lodo ativado; • Reutilização (reciclagem) de águas industriais (PET, lavagem de veículos, aviões).			
OUTROS			
• Remoção-separação de micro-organismos (algas, fungos, bactérias); • Separação de metais para química analítica; • Tratamento de solos: remoção de pesticidas, óleos e elementos radioativos; • Tratamento de águas industriais no controle de corrosão, remoção de sabões, detergentes; • Tratamento de águas para uso industrial e doméstico; • Tratamento de esgoto (remoção de flocos biológicos, sólidos suspensos).			
Fonte: Rubio; Carissimi; Rosa (2007).			

Na mineração, separa-se Cu, Zn, Pb, Ni e Fe ligados em minerais como calcopirita através do processo de flotação. Nessa operação, utiliza-se coletores que se ligam a esses

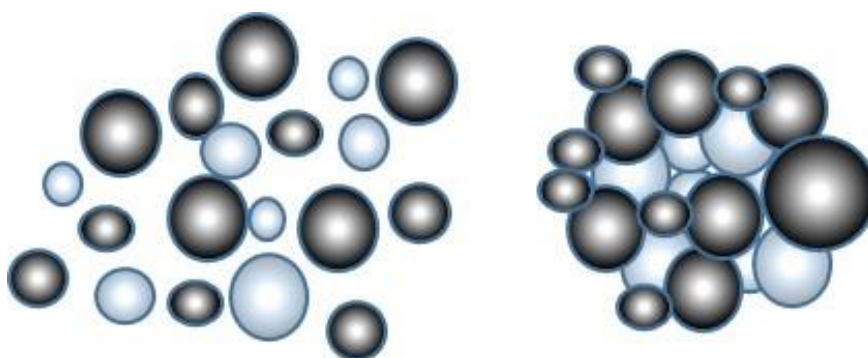
elementos, tornando-os hidrofóbicos com o uso de compostos orgânicos como xantato, que por sua vez, normalmente, é o coletor, cuja função é separar-se da fase aquosa por ser menos denso (HRŮZOVÁ et al., 2020).

Um estudo fez uso de micro e nanopartículas de lignina como coletor através do processo de organosolv, uma técnica que utiliza solvente orgânico para solubilizar lignina e hemicelulose, na flotação de minério. Avaliou-se o uso de lignina como coletor e concluiu que o composto é viável para esse fim, pois, além de ser adquirido por fontes renováveis e apresentar baixo custo, contribui para o desenvolvimento sustentável (HRŮZOVÁ et al., 2020).

3.4.2. Flotação por Ar Dissolvido

Os princípios básicos de funcionamento da FAD são bastante simples, pois se resumem ao contato das partículas sólidas com as bolhas de ar dissolvidas no líquido e no seu consequente arraste para a superfície do líquido (Figura 5) (SILVA et al., 2014).

Figura 5 - Incorporação das bolhas de gás nas gotas de óleo e incorporação ao floco no processo de flotação



Fonte: Chaprão (2020).

Os mecanismos da FAD resultam em elevada eficiência de coleta, visto que microbolhas são mais reativas devido a alcançar maiores áreas superficiais, cerca de quarenta vezes maior do que na flotação convencional (diâmetro de bolha 200 – 6500 μm) (RUBIO; SOUZA; SMITH; 2002; FAUSTINO et al., 2017). De acordo com Edzwald (2010), as microbolhas apresentam diâmetros entre 10 - 100 μm .

Pesquisas recentes revelaram a presença de nanobolhas geradas conjuntamente com microbolhas no processo FAD, assim como seu desempenho e contribuição na captura de

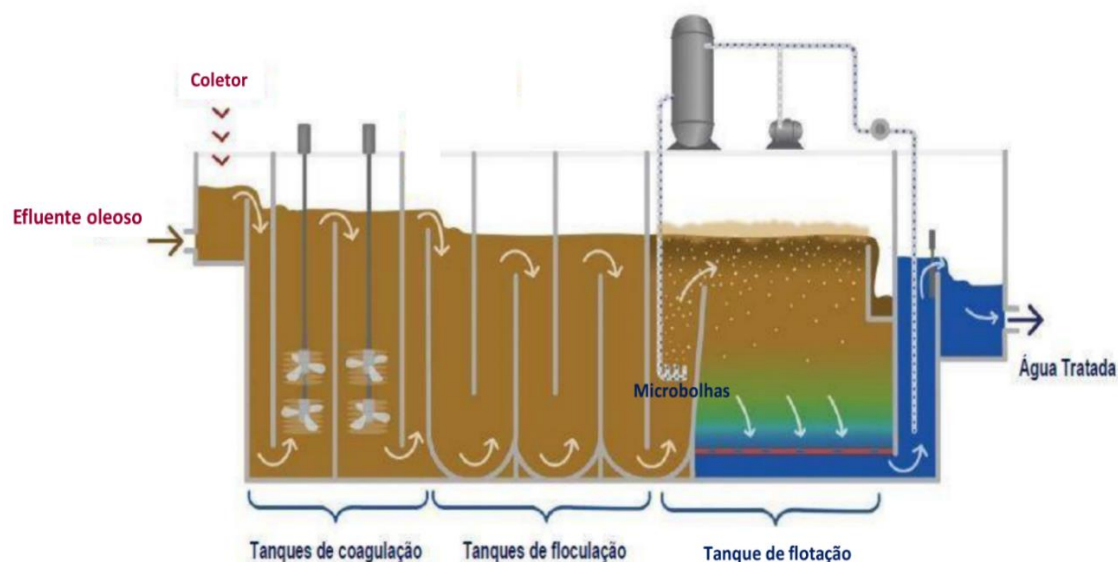
poluentes da água. A flotação assistida por microbolhas e nanobolhas revela-se uma técnica promissora para o tratamento de água potável e águas residuais, bem como para o processamento de contaminantes na indústria (ETCHEPARE, AZEVEDO, RUBIO, 2016; AZEVEDO et al., 2016; CALGAROTO, AZEVEDO, RUBIO, 2016).

Este processo de flotação é um dos mais econômicos e efetivos métodos de recuperação-remoção de sólidos, óleos emulsionados, microorganismos, redução da DBO insolúvel e no espessamento de lodos. A crescente utilização da FAD, em todos os campos, deve-se às diversas vantagens em relação ao processo de sedimentação. Entre outras podem ser citadas as seguintes: a) emprego de menores concentrações de coagulantes e/ou floculantes, o que reduz custos operacionais; b) maior concentração de sólidos no produto separado (lodo) e, por conseguinte, menor custo de desidratação do mesmo; c) alta eficiência na remoção de sólidos (elevada clarificação); d) elevada cinética de separação e portanto menor área requerida para instalação dos equipamentos: apenas uma fração da área ocupada pelas unidades de sedimentação para capacidades similares; e) maior eficiência na remoção de DBO de que outros processos de separação gravítica (MENEZES et al., 2011).

A FAD consiste na formação e aplicação de microbolhas geradas pela despressurização e passagem forçada de um volume de água saturada com ar à pressão elevada (3 a 5 kgf/cm²), através de uma válvula de constrição de fluxo do tipo Venturi, placa de orifício ou válvula agulha (RUBIO; SOUZA; SMITH, 2002; AZEVEDO et al., 2017). As unidades (agregados) formadas por microbolhas e partículas dissolvidas em água apresentam uma densidade aparente menor do que o meio aquoso e, dessa forma, "flutuam" ou "flotam" até a superfície de um reator (célula de flotação) ou interface líquido/ar, onde são removidos (Figura 6), (PENG et al., 2009; MENEZES et al., 2011).

Contudo é necessário observar alguns pontos essenciais para o êxito do processo, dentre os quais, os mais importantes são: a resistência do ar, o arraste e a distribuição do tamanho das bolhas, o grau de agitação, o tempo de residência das bolhas na polpa, o teor de sólidos, tamanho das partículas, a gravidade, a forma das partículas e os reagentes de flotação (ROCHA E SILVA et al., 2015). O tempo de retenção, taxa de reciclo e a tensão superficial são parâmetros fundamentais para o aumento da eficiência do processo de separação.

Figura 6 - Esquema simplificado do funcionamento da FAD



Fonte: Adaptado de <https://www.tratamentodeagua.com.br>.

O oleato de sódio é, comumente, utilizado como coletor na flotação no processo de extração de manganês do minério. O enriquecimento de manganês ou o *dowstream* desse metal ocorre através das bolhas da flotação por ar dissolvido (FAD) e do coagulante adicionado, os quais reduzem a Concentração Micelar Crítica do oleato de sódio (XUE; ZHONG; WANG, 2019). Os coagulantes utilizados nesse processo de purificação podem ser poliacrilamida hidrolisada (PAMH), sulfato de alumínio e potássio, cloreto férrico ou sulfato férrico. O PAMH apresentou uma melhor remoção do oleato de sódio durante a FAD. Esse mecanismo consiste na reação do íon sódio (Na^+) com o grupo carboxílico de carga negativa do PAMH, rompendo o oleato de sódio. O radical negativo oleato repele-se do PAMH, o que reduz a Concentração Micelar Crítica e favorece a remoção do coletor. A condição ótima para o sistema de coagulação e FAD para a remoção do coletor é de 20 mg/L de PAMH, 30 mg/L de oleato de sódio e pH 8 (XUE; ZHONG; WANG, 2019).

As decisões relacionadas ao desenvolvimento comercial estratégico de tecnologias terão um papel importante nesse sentido. No entanto, nem sempre é fácil implementar tecnologias limpas em indústrias estabelecidas (SATPUTE et al. 2010; ROCHA E SILVA et al. 2018b). Assim, os processos físicos e biológicos demonstram resultados promissores quando utilizados nos processos de tratamentos de efluentes em diversos setores industriais, que se interessam cada vez mais por produtos e processos limpos. As inovações determinarão a sustentabilidade e a viabilidade econômica nesse campo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. F. et al. Evaluation of biosurfactants for removal of heavy metal ions from aqueous effluent using flotation techniques. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 156–161, 2012.

ALLAM, F. et al. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biochar as an alternative cathode electrocatalyst in an air-cathode single chamber microbial fuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 10, p. 5911-5927, 2020.

ALMEIDA, D. G. et al. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1718, p. 1-14, 2016.

AZEVEDO, A. et al. Aqueous dispersions of nanobubbles: generation, properties and features. **Minerals Engineering**, v. 94, p. 29-37, 2016.

AZEVEDO, A., ETCHEPARE, R., RUBIO, J. Raw water clarification by flotation with microbubbles and nanobubbles generated with a multiphase pump. **Water Science & Technology**, v. 75, n. 10, p. 2342 – 2349, 2017.

BANAT I. M.; DE RIENZO, M. A. D.; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agentes. **Applied Microbiology and Biotchnology**, v. 98, p. 9915-9929, 2014.

BEZERRA, K. G. O. et al. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology Progress**, v. 34(6), p.1482-1493, 2018.

BOTE, M. A.; NAIK, V. R.; JAGADEESHGOUDA, K. B. Review on water hyacinth weed as a potential bio fuel crop to meet collective energy needs. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 3, p. 397-406, 2020.

BRUNDU, G. et al. The silent invasion of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. in Italy. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 147, n. 4, p. 1120-1127, 2013.

BUSH, A. et al. DNA metabarcoding reveals metacommunity dynamics in a threatened boreal wetland wilderness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 15, p. 8539-8545, 2020.

CALGAROTO, S., AZEVEDO, A. RUBIO, J. Separation of amine-insoluble species by flotation with nano and microbubbles. **Minerals Engineering**, v. 89, p. 24–29, 2016.

CAMPOS, J. M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, p.1097-1108, 2013.

CASTRO, Y. A.; AGBLEVOR, F. A. Biomechanation of invasive water hyacinth from eutrophic waters as a post weed management practice in the Dominican Republic: a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 14138-14149, 2020.

CHAKRABORTY, J.; DAS, S. Biosurfactant-based bioremediation of toxic metals. In: DAS, S. (Org.). **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. 1. ed. Índia: Elsevier, 2014. p. 167-201.

CHAPRÃO, M. J. et al. Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 15-22, 2018.

CHAPRÃO, M.J. **Aplicação do biossurfactante de *Bacillus methylotrophicus* UCP 1616 como coletor no tratamento de águas oleosas em processos de flotação**. 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. C. Sistemas aquáticos continentais. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.). **Engenharia ambiental: conceitos, tecnologia e gestão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 161-177.

CUTHBERT, R. N. et al. Sex-skewed trophic impacts in ephemeral wetlands. **Freshwater Biology**, v. 64, n. 2, p. 359-366, 2019.

DAS, P. et al. Effluent treatment technologies in the iron and steel industry: a state of the art review. **Water Environment Research**, v. 90, n. 5, p. 395-408, 2018.

DELIYANNI, E. A.; KYZAS, G. Z.; MATIS, K. A. Various flotation techniques for metal ions removal. **Journal of Molecular Liquids**, v. 225, p. 260-264, 2017.

DURAIVADIVEL, P.; GOWTHAM, H. G.; HARIPRASAD, P. Co-occurrence of functionally diverse bacterial community as biofilm on the root surface of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laub. **Science of The Total Environment**, p. 136683, 2020.

EDZWALD, J. K. Dissolved air flotation and me. **Water Research**, v. 44, n. 7, p. 2077-2106, 2010.

ELAGIB, S. M. Antiparasitic activity of *Eichhornia crassipes* leaves extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101556, 2020.

ETCHEPARE, R., AZEVEDO, A., RUBIO, J. Nanobubbles: their role in dissolved air flotation. In: THE 7TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON FLOTATION FOR WATER AND WASTEWATER SYSTEMS, 7., 2016, Toulouse. **Anais...** Toulouse: IWA Publishing, 2016. p. 338-345.

FAUSTINO, L. M. et al. Flotação por ar dissolvido aplicada ao tratamento de água poluída por lamas de minério de ferro. In: XXVII ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E METALURGIA EXTRATIVA, 27., 2017. Belém. **Anais...** Belém: UFPA, 2017. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/321429279_FLOTACAO_POR_AR DISSOLVIDO_APLICADA_AO_TRATAMENTO_DE_AGUA_POLUIDA_POR_LAMAS_DE_MINERIO_DE_FERR O>. Acesso em: 2 abr. 2020.

FAZAL, S.; ZHANG, B.; MEHMOOD, Q. Biological treatment of combined industrial wastewater. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 551-558, 2015.

FOGLER, H.S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. p. 854.

FREITAS, B. G. et al. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1646, 2016.

GARG, S. K. **Sewage disposal and air pollution engineering**. 39. ed. Delhi: Khanna Publishers, 2012. v. 2.

GRASEL, D. et al. Brazilian wetlands on the brink. **Biodiversity and Conservation**, v. 28, n. 1, p. 255-257, 2019.

GRULL, D. Remediação e readequação de sistemas aquáticos superficiais contaminados. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.). **Engenharia ambiental: conceitos, tecnologia e gestão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, p. 621-641.

HERMOSO, V.; CLAVERO, M.; GREEN, A. J. Dams: keep wetland damage in check. **Nature**, v. 568, n. 7751, p. 171-171, 2019.

HRŮZOVÁ, K. et al. Organosolv lignin hydrophobic micro-and nanoparticles as a low-carbon footprint biodegradable flotation collector in mineral flotation. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123235, 2020.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109607, 2019.

KHALID, S. et al. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247-268, 2017.

KOUTIKA, L. S.; RAINEY, H. J. A review of the invasive, biological and beneficial characteristics of aquatic species *Eichhornia Crassipes* and *Salvinia molesta*. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 13, n. 1, p. 263-275, 2015.

KUMAR, S. et al. In vitro antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activity and in vivo effect of *Syngonium podophyllum* and *Eichhornia crassipes* leaf extracts on isoniazid induced oxidative stress and hepatic markers. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 459-452, 2014.

LIU, K. et al. Rational design, properties and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 45, p. 57-67, 2019.

LUNA, J. M. et al. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413–418, 2015.

MAITY, J. P. et al. Evaluation of remediation process with soapberry derived saponin for removal of heavy metals from contaminated soils in Hai-Pu Taiwan. **Journal Environmental Science**, v. 25, p.1180–1185, 2013.

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v.285, p.419–435, 2015.

MATTHEWS, J. H. Dam development: value both wetlands and hydropower. **Nature**, v. 568, n. 7750, p. 33, 2019.

MENEZES, C. T. B. et al. Replacing synthetic with microbial surfactants as collectors in the treatment of aqueous effluent produced by acid mine drainage, using the dissolved air flotation technique. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 4, p. 540–546, 2011.

MNIF, I., GHRIBI, D. Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 1001-1020, 2015.

PAZ-ALBERTO, A. M.; SIGUA, G. C. Phytoremediation: a green technology to remove environmental pollutants. **American Journal of Climate Change**, v. 2, n. 1, p. 71-86, 2013.

PENG, J. et al. The remediation of heavy metals contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2–3, p. 633–640, 2009.

PERBANGKHEM, T.; POLPRASERT, C. Biomass production of *Cyperus papyrus* in constructed wetland treating low-strength domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v.101, p.833-835, 2010.

PŁAZA, G.; ACHAL, V. Biosurfactants: eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 2152, 2020.

PRABAKARAN, K. et al. Managing environmental contamination through phytoremediation by invasive plants: a review. **Ecological Engineering**, v. 138, p. 28-37, 2019.

RADZUAN, A. M. R., BELOPE, M. A. A., THORPE, R. B. Removal of fine oil droplets from oil-in-water mixtures by dissolved air flotation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 115, p. 19–33, 2016.

RAMÍREZ, J. E. et al. Denitrification of metallurgic wastewater: mechanisms of inhibition by Fe, Cr and Ni. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 440-449, 2018.

RIGUETO, C. V. T. et al. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) roots, an amazon natural waste, as an alternative biosorbent to uptake a reactive textile dye from aqueous solutions. **Ecological Engineering**, v. 150, p. 105817, 2020.

ROCHA E SILVA, F. C. P. et al. Effect of biosurfactant addition in a pilot scale dissolved air flotation system. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 50, n. 4, p. 618–625, 2015.

ROCHA E SILVA, F. C. P. et al. Oil removal efficiency forecast of a dissolved air flotation (DAF) reduced scale prototype using the dimensionless number of Damköhler. **Journal of Water Process Engineering**, v. 23, n. November 2017, p. 45–49, 2018a.

ROCHA E SILVA, F. C. P. et al. Dissolved air flotation combined to biosurfactants: a clean and efficient alternative to treat industrial oily water. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 17, n. 4, p. 591-602, 2018b.

ROCHA E SILVA, N. M. P. et al. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p.132–139, 2014.

ROCHA E SILVA, N. M. P. et al. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, p. 1-15, 2019.

ROMÁN, S. et al. Suitability of hydrothermal carbonization to convert water hyacinth to added-value products. **Renewable Energy**, v. 146, p. 1649-1658, 2020.

ROSA, C. F. C.; FREIRE, D. M. G.; FERRAZ, E. C. Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, p. 89–94, 2015.

RUBIO, J.; CARISSIMI, E.; ROSA, J. J. Flotation in water and wastewater treatment and reuse: recent trends in Brazil. **International Journal of Environment and Pollution**, v. 30, n. 2, p. 197, 2007.

RUBIO, J.; SOUZA, M. L.; SMITH, R. W. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. **Minerals Engineering**, v. 15, n. 3, p. 139–155, 2002.

RUFCHAEI, R. et al. Effects of dietary administration of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaves extracts on innate immune parameters, antioxidant defence and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 515, p. 734533, 2020.

RUFINO, R. D. et al. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v.109, p.117 - 122, 2013.

RUFINO, R. D. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34–38, 2014.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p.1005–1016, 2013.

SANTOS, D.K.F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.401-430, 2016.

SARAIVA, C. B.; MATOS, A. T.; MATOS, M. P. Extraction capacity of grasses grown in constructed wetland systems using different arrangements and substrates. **Engenharia Agrícola**, v. 39, n. 5, p. 668-675, 2019.

SARKAR, S. et al. Electric fields at metal–surfactant interfaces: a combined vibrational spectroscopy and capacitance study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 7, p. 1311-1321, 2020.

SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p.707-723, 2015.

SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 127–144, 2010.

SHAH, M. et al. Performance assessment of aquatic macrophytes for treatment of municipal wastewater. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 106-118, 2014.

SHI, K. et al. Mechanism of degrading petroleum hydrocarbons by compound marine petroleum-degrading bacteria: surface adsorption, cell uptake, and biodegradation. **Energy & Fuels**, v. 33, n. 11, p. 11373-11379, 2019.

SIEVERS, M. et al. Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. **Conservation Biology**, v. 33, n. 2, p. 389-402, 2019.

SILVA, D. M. **Redução da incrustação em fornos industriais através da produção de briquetes com resíduos de biomassa de macrófitas aéreas associadas a resíduos de gesso**. 2017. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Pós-graduação UNICAP, Universidade Católica de Pernambuco, Recife.

SILVA, R. C. F. S. et al. Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v. 50, p. 137 - 142, 2013.

SILVA, R. C. F. S. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 12523-12542, 2014.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, 2013.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; OLIVEIRA, R. P. S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 88-94, 2014.

SUN, M. et al. Ecological aesthetic assessment of a rebuilt wetland restored from farmland and management implications for National Wetland Parks. **PloS One**, v. 14, n. 10, 2019.

SWAIN, G.; ADHIKARI, S.; MOHANTY, P. Phytoremediation of copper and cadmium from water using water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. **International Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

TING, W. H. T. et al. Application of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for phytoremediation of ammoniacal nitrogen: a review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 22, p. 239-249, 2018.

TING, W. H. T. et al. Ammoniacal nitrogen removal by *Eichhornia crassipes*-based phytoremediation: process optimization using response surface methodology. **Applied Water Science**, v. 10, n. 3, p. 1-11, 2020.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, p. 181-192, 2015.

WAGNER, T. V. et al. Benzotriazole removal mechanisms in pilot-scale constructed wetlands treating cooling tower water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121314, 2020.

WANG, Q. et al. Constructed wetlands: A review on the role of radial oxygen loss in the rhizosphere by macrophytes. **Water**, v. 10, n. 6, p. 678, 2018.

WANYONYI, W. C.; ONYARI, J. M.; SHIUNDU, P. M. Adsorption of Congo Red dye from aqueous solutions using roots of *Eichhornia crassipes*: kinetic and equilibrium studies. **Energy Procedia**, v. 50, p. 862-869, 2014.

WU, H. et al. Large-scale multi-stage constructed wetlands for secondary effluents treatment in northern China: carbon dynamics. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 933-942, 2018.

WU, S. et al. Sanitation in constructed wetlands: a review on the removal of human pathogens and fecal indicators. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 8-22, 2016.

XIE, D.; AN, S.; DAVIS, J. A. Preface: Coastal wetlands: services, uses, and conservation. **Hydrobiologia**, v. 827, n. 1, p. 1-2, 2019.

XUE, J.; ZHONG, H.; WANG, S. Removal of sodium oleate from synthetic manganese leaching solution by coagulation-dissolved air flotation. **Journal of Environmental Management**, v. 247, p. 1-8, 2019.

XU, W. et al. Hidden loss of wetlands in China. **Current Biology**, v. 29, n. 18, p. 3065-3071, 2019.

YUNIARTI, L. S.; NANDA, D.; PUSPITA, F. B. J. E. Nitrate and phosphate contents in catfish seed rearing ponds with various frequencies of water hyacinth replacement (*Eichhornia crassipes*). **Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences**, v. 99, n. 3, p. 77-84, 2020.

ZHIMIAO, Z. et al. Influences of seasons, N/P ratios and chemical compounds on phosphorus removal performance in algal pond combined with constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 906-914, 2016.

ZHOU, W. et al. Enhanced soil washing of phenanthrene by a plant-derived natural biosurfactant, *Sapindus saponin*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 425, p. 122– 128, 2013.

CAPÍTULO II

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *ENVIRONMENTAL ENGINEERING
AND MANAGEMENT JOURNAL***

Qualis A4

ESTUDO DE UM PROCESSO DE TRATAMENTO DE ÁGUA OLEOSA EM UM SISTEMA PILOTO HÍBRIDO COMBINANDO FLOTAÇÃO POR AR E *WETLAND* CONSTRUÍDO: ANÁLISE DE DADOS, OTIMIZAÇÃO DE EFICIÊNCIA E AUMENTO DE ESCALA

Alexandre Augusto Paredes Selva Filho¹, Laís Alexandre do Nascimento^{2,3}, Raquel Diniz Rufino^{1,2}, Juliana Moura de Luna^{1,2}, Pedro Pinto Ferreira Brasileiro^{2,3}, Rita de Cássia Freire Soares da Silva^{1,2}, Mohand Benachour^{2,3}, Valdemir Alexandre dos Santos^{1,2}, Leonie Asfora Sarubbo^{1,2*}

¹ Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil

² Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Joaquim de Brito, n. 216, Boa Vista, CEP 50070-280, Recife-Pernambuco, Brasil

³ Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

Resumo

Neste estudo, desenvolvemos um sistema híbrido para o tratamento de água oleosa composto por dois protótipos em escala piloto combinando métodos físico-químicos e biológicos de separação. A água oleosa escoou através de um protótipo de flotação por ar dissolvido (FAD) na primeira etapa. Na saída deste protótipo, parte da água foi saturada com ar atmosférico e enviada de volta para a entrada da câmara do FAD com o auxílio de bomba centrífuga e injeção de microbolhas. A outra parte da água tratada alimentou um protótipo de *wetland* construído, envolvendo macrófitas flutuantes da espécie *Eichhornia crassipes*. Com o auxílio de um delineamento composto central rotacional (DCCR, com dois parâmetros operacionais) e a metodologia de superfície de resposta (MSR), um modelo estatístico preditivo foi criado para as condições operacionais associadas a uma eficiência ótima de separação óleo-água de cerca de 97% da concentração inicial de 120 ppm de óleo, a qual é muito superior à concentração permitida pela legislação ambiental no Brasil (20 ppm). Os resultados de eficiência são discutidos e interpretados com base nos fenômenos de partículas líquidas físicas e mecânicas. A combinação de FAD e método de *wetland* construído para tratamento de água oleosa sem a adição de um agente coagulante/floculante alcançou resultados bastante satisfatórios e provou ser uma tecnologia ecologicamente correta. Leis de similaridade hidráulica foram usadas para obter correlações de aumento de escala para projetar o tamanho do equipamento da planta piloto para o tratamento de água oleosa com o processo híbrido proposto.

Palavras-chave: delineamento composto central rotacional, flotação por ar dissolvido, *Eichhornia crassipes*, separação líquido-líquido, água oleosa, *wetlands*

Recebido: março de 2020; Final revisado: julho de 2020; Aceito: setembro de 2020; Publicado na forma final editada: fevereiro de 2021

*Autor para o qual todas as correspondências deveriam ser endereçadas: E-mail: leonie.sarubbo@unicap.br;

Telefone: +0055(81) 21194084., Fax: +0055(81) 21194000

1. Introdução

A água oleosa residual resulta da produção, transporte e uso de petróleo e seus derivados. O cisalhamento causado por bombas, válvulas e outros equipamentos dispersa o óleo na água, formando uma emulsão que pode ser altamente estabilizada pela presença de sólidos finamente divididos, substâncias surfactantes naturais e outros reagentes adicionados durante o processo de produção de óleos lubrificantes e combustíveis (Rocha e Silva et al., 2018). O descarte desse resíduo só é permitido após a remoção do óleo e sólidos em suspensão para níveis internacionais aceitáveis (Rocha e Silva et al., 2018).

O aumento do volume de água oleosa residual na última década e o lançamento desse tipo de efluente no meio ambiente tornou-se uma preocupação significativa (Al-Ghouti et al., 2019; Jafarinejad e Jiang, 2019).

O óleo livre flutuante é facilmente removido com um decantador, hidrociclone, centrífuga ou dispositivo de flotação capaz de separar as gotas de óleo em suspensão devido à diferença de densidade (Santander et al., 2011). No entanto, não basta remover apenas o óleo flutuante; a remoção do óleo na forma de emulsão é igualmente essencial.

A água oleosa é convencionalmente tratada por diferentes métodos físicos, químicos e biológicos (Rocha e Silva et al., 2018). Sistemas físico-químicos compactos são comumente empregados para situações em que o espaço é limitado, como plataformas marítimas. Contudo, muitos tratamentos químicos são custosos e produzem lodo nocivo. Em instalações terrestres, a adição de uma fase de polimento de pós-tratamento biológico é um método ambientalmente correto (Abdullah et al., 2020; Stefanakis et al., 2016). Métodos como ultrafiltração e/ou filtração por membrana tem sido utilizados para refinar o efluente final (Lu et al., 2018; Tawalbeh et al. 2018). Quando existe uma necessidade por soluções menos caras, esforços podem ser concentrados na combinação de tecnologias de tratamento físico-químico e biológico para propósitos de reuso ou descarga mais segura (Rocha e Silva et al., 2015).

Nos últimos anos, um método físico-químico denominado flotação por ar dissolvido (FAD) demonstrou resultados promissores na eficiente separação de líquido-líquido e não-miscíveis, como óleo em água. Com este método, microbolhas produzidas com um gás

(geralmente ar) são adicionadas à água oleosa e aderem às gotas de óleo de uma maneira estável devido à natureza hidrofóbica do óleo. Isso leva à formação de um sistema óleo-microbolhas com uma menor densidade do que a água circundante, independentemente da adição de um agente químico para desestabilizar a emulsão. Como a velocidade de separação também é diretamente proporcional à diferença nas densidades das fases, o sistema óleo-gás formado tende a migrar para a superfície do meio com muito mais rapidez e eficiência, onde se acumula e pode ser facilmente removido (Rocha e Silva et al., 2018).

Os *wetlands* construídos com escoamento superficial constituem uma tecnologia de tratamento biológico inspirada em ambientes naturais, como lagos e pântanos, e podem ser utilizados na remoção de nutrientes em excesso e poluentes, como metais pesados e resíduos oleosos (Vymazal, 2014). Esses sistemas consistem em um canal, dispositivos de entrada e saída e plantas aquáticas (macrófitas). A facilidade operacional e a adaptabilidade considerável do projeto de *wetland* construído favorecem os mecanismos de remoção de poluentes. A utilização de equipamentos adicionais proporciona maior controle hidráulico dos *wetlands*, otimizando o processo de tratamento.

Um sistema de tratamento de efluentes baseado em macrófitas aquáticas pode ser definido como um processo natural no qual as plantas desempenham um papel na remoção de resíduos (Lakatos et al., 2014). As macrófitas aquáticas constituem uma comunidade importante em ecossistemas de águas rasas com alto índice de produtividade primária, participando da reciclagem de nutrientes e fornecendo alimentos para herbívoros e detritívoros. Os lagos de várzea no Brasil são ricos em macrófitas aquáticas, incluindo a abundante flutuante *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) (Villamagna e Murphy, 2010).

A *E. crassipes*, também conhecida como aguapé, é uma das espécies mais utilizadas em *wetlands* construídos devido à sua adaptação a ambientes hostis. Sua baixa sensibilidade ao óleo torna esta espécie adequada para uso no tratamento de efluentes oleosos em *wetlands* construídos (Crema et al., 2012). O sistema radicular do aguapé preenche verticalmente todo o comprimento do *wetland*, aumentando o contato do efluente com micro-organismos nas raízes das macrófitas e desacelerando o escoamento do fluido para aumentar o efeito da gravidade sobre os poluentes (Gunathilakae et al., 2018; Kadlec e Wallace, 2009).

Neste trabalho, um óleo lubrificante sintético foi tratado em um sistema híbrido piloto combinando um protótipo FAD sem adição de coletores químicos e um protótipo de *wetland* construído envolvendo *E. crassipes*. A eficiência do processo de tratamento na configuração híbrida única foi avaliada com base em dois parâmetros operacionais e modelada por meio de uma abordagem estatística. Os resultados foram interpretados considerando fenômenos físico-mecânicos e o processo foi otimizado ajustando as condições operacionais com o auxílio de

um delineamento composto central rotacional (DCCR) para máxima eficiência do processo de tratamento. Concluímos o estudo dimensionando os diferentes equipamentos envolvidos na planta híbrida para permitir um aumento de escala industrial utilizando a análise adimensional.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Indivíduos de *E. crassipes* (maiores que 20 cm) foram coletados em habitats naturais de água doce na cidade de Recife, Brasil, onde a espécie é abundante. Essa macrófita foi escolhida devido à sua tolerância ao óleo.

Água oleosa foi preparada com 120 ppm de óleo lubrificante. A concentração do efluente sintético foi obtida pela saturação da água com o óleo através de uma mistura intensa com o auxílio de uma bomba centrífuga e um tambor. Os testes experimentais preliminares demonstraram um teor constante de óleo na água por saturação física, obtendo-se assim um efluente sintético que consiste em uma concentração constante de lodo óleo-água. Óleo de motor (tipo SAE 20W-50; PETROBRAS) foi utilizado como óleo contaminante. Esse óleo para motores flex (gasolina, GNV e álcool) consiste em um óleo lubrificante à base de parafina, ou seja, uma mistura complexa de hidrocarbonetos e aditivos.

2.2. Unidade piloto de flotação por ar dissolvido

A Fig. 1 mostra a vista lateral do protótipo piloto FAD previamente projetado e construído para testes de separação óleo-água utilizando um fluido sintético (Vasconcelos et al., 2015). Um duto de entrada de água oleosa é visto à esquerda da figura (1). O fluido entra na parte inferior da câmara de mistura (2), que é equipada com um agitador mecânico (3) conduzido por um motor elétrico (4). Uma câmara de teste também foi projetada para uso quando uma substância auxiliar de desestabilização de emulsão óleo em água é necessária (5). Um misturador estático é utilizado para a desestabilização da emulsão (6). A emulsão óleo-em-água entra em contato com o escoamento de microbolhas emitida por um difusor (7). Na primeira câmara de flotação (8), a espuma oleosa surge como resultado da agregação das microbolhas de ar e gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Por meio da flotação devido às diferenças de densidade, a espuma de óleo é recolhida em um coletor (9) e a água passa por uma segunda câmara de flotação (10) para a interação com um escoamento adicional de microbolhas. O escoamento das microbolhas chega às câmaras de flotação por meio de dutos de distribuição (11) com auxílio de uma válvula (12) para pressurização e controle. A água tratada é então enviada através de duas câmaras subsequentes (13 e 14), sendo que esta última (14) possui uma bomba centrífuga (15) que recircula parte da água para a produção de

microbolhas. Na base desta câmara, um duto (16) libera a água tratada para reutilização ou descarte no ambiente aquático original. O óleo flotado é coletado por dutos na superfície para um tratamento adequado. Todos os experimentos foram conduzidos por uma hora.

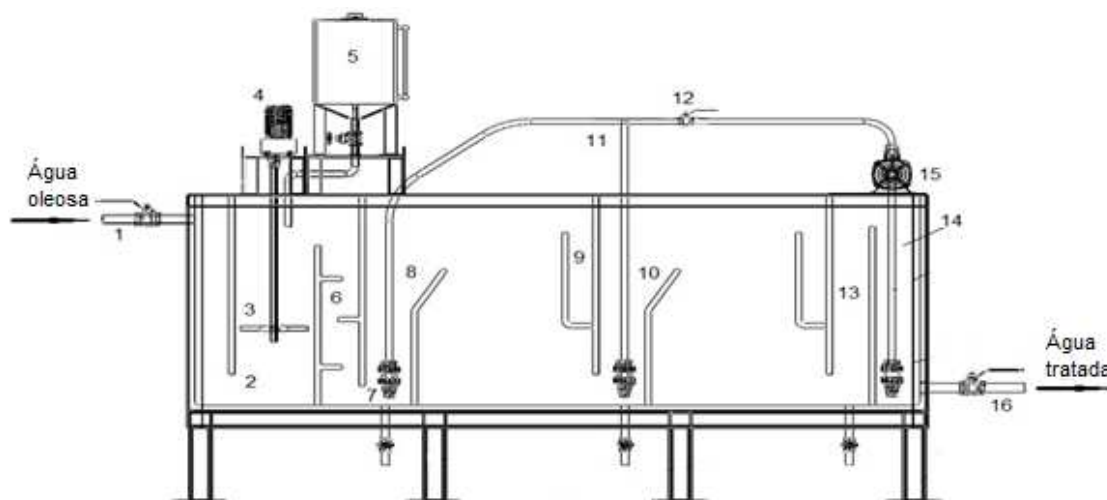


Fig. 1. Diagrama esquemático (vista lateral) do protótipo piloto da FAD (Vasconcelos et al., 2015). 1 - Duto de entrada de água oleosa. 2 - Câmara de mistura. 3 - Agitador mecânico. 4 - Motor elétrico. 5 - Câmara auxiliar. 6 - Misturador estático. 7 - Difusor. 8 - Primeira câmara de flotação. 9 - Coletor. 10 - Segunda câmara de flotação. 11 - Dutos de distribuição. 12 - Válvula de pressurização e controle. 13 e 14 - Câmaras subsequentes. 15 - Bomba centrífuga. 16 - Duto

Uma grande parte do protótipo piloto da FAD, como as paredes da câmara de flotação, foi feita de acrílico transparente medindo 10 mm de espessura. A estrutura do protótipo foi feita em aço carbono tipo L medindo 1 polegada de espessura. O protótipo pode armazenar um volume total de $1,55 \text{ m}^3$. O nivelamento da estrutura foi necessário para obter maior eficiência de separação entre a espuma oleosa e a coluna de água.

O nível de líquido no protótipo FAD foi monitorado com o auxílio do programa de *software* computacional LabView (Galdino et al., 2015). Atividades de controle e monitoramento do processo foram realizadas. Diferentes valores de referência (“pontos de ajuste”) foram estimados para definir a altura da interface entre a água e a espuma oleosa formada na câmara de FAD. A informação do sensor foi enviada para uma interface através de uma placa de aquisição de dados. As vazões de água foram medidas pelos sensores YF-S403 e YF-S201, e a vazão de ar foi controlada por um rotâmetro de $1 \text{ a } 15 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$.

2.3. Protótipo piloto de wetland construído

Como etapa biológica do sistema de tratamento, foi projetado um protótipo piloto de *wetland* construído, envolvendo a macrófita flutuante *E. crassipes* (Ansari et al., 2020; Colares et al., 2020). O protótipo de *wetland* foi baseado em três analogias através de semelhanças operacionais (Kunes, 2012): i) canal retangular com largura duas vezes a altura das laterais e a porção superior do líquido submetida à pressão atmosférica. O movimento não depende da pressão interna, mas sim da inclinação do fundo do *wetland* e superfície do líquido; ii) decantador contínuo - as duas fases entram continuamente em uma extremidade do *wetland*.

Uma relação comprimento/diâmetro hidráulico permite condições de separação adequada para as duas fases. O escoamento de água tratada é continuamente retirado da *wetland* com o auxílio de dutos fechados localizados na extremidade de saída do equipamento. Uma relação comprimento/diâmetro hidráulico superior a dez vezes permite uma excelente eficiência de separação; iii) um reator semicontínuo caracterizado pela manutenção da fase orgânica em contato com os brotos da macrófita (sistema em batelada) e um escoamento contínuo da fase aquosa. Cinéticas de primeira ordem foram adotadas com base em estudos anteriores para permitir estimar a constante cinética da reação e definir o período de poda das plantas (densidade de macrófitas). O número de mudas foi baseado na cinética de uma reação de primeira ordem (Lakatos et al., 2014).

A Fig. 2 mostra uma vista parcial do protótipo piloto de *wetland* construído. Quatro unidades de *wetland* foram construídas com placas de policarbonato transparente medindo 10 mm de espessura (dimensões: 3 m de comprimento, 0,6 m de altura e 0,8 m de largura). Após a instalação em local aberto, os protótipos de *wetland* foram enchidos com água até uma altura de 0,4 m e cada tanque foi abastecido com 40 mudas da espécie *E. crassipes*. A altura do líquido de escoamento foi mantida em 60% da altura do canal para evitar transbordamento em casos de chuvas excessivas. A densidade de macrófitas em *wetland* estava entre 30 e 40 mudas por metro quadrado (Kunes, 2012). O líquido é alimentado em uma das extremidades com o auxílio de um duto perfurado para permitir a distribuição uniforme da água oleosa. A retirada do líquido tratado (fase aquosa) é realizada por meio de duto perfurado na base do *wetland* para evitar a inclusão da camada superficial oleosa.



Fig. 2. *Wetlands* construídos em policarbonato transparente com macrófitas flutuantes

2.4. Combinação dos protótipos

Um sistema híbrido foi projetado para os testes simultâneos de tratamento físico-químico (FAD) e biológico (*wetland* construído) da água oleosa, combinando os dois métodos. Três câmaras horizontais foram utilizadas como *wetlands* e uma câmara extra foi construída para garantir a absorção total de óleo por *E. crassipes*, se necessário. Para tanto, um sistema auxiliar de produção de água oleosa foi projetado utilizando a recirculação de toda a água tratada, favorecendo o reúso da água. A água que sai do protótipo FAD entrou no protótipo do *wetland* e a água que sai desse foi enviada de volta ao sistema de produção de água oleosa antes de alimentar o protótipo FAD (Fig. 3). Porém, um sistema de controle foi necessário para a implantação do sistema híbrido. A bomba de recirculação foi ajustada para a mesma vazão aquosa da entrada da FAD.

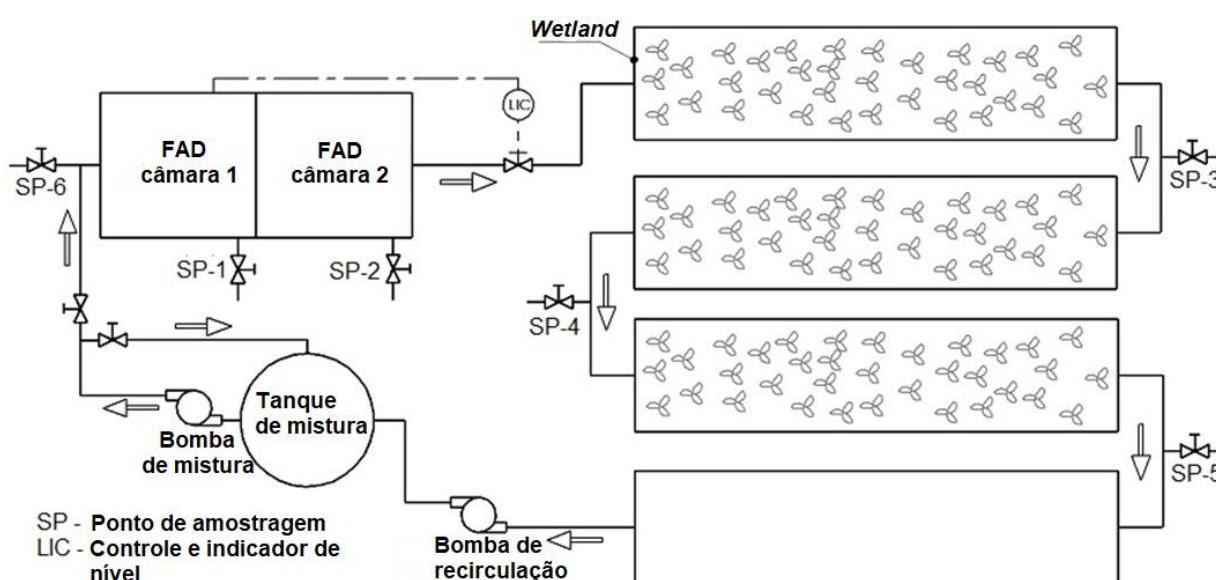


Fig. 3. Esquema da estratégia de controle para combinação dos protótipos FAD e *wetland*

Um sensor de nível foi instalado, na câmara de água tratada do protótipo FAD, para monitorar os níveis máximo e mínimo de água, para que o funcionamento dos protótipos ocorresse no estado estático. Quando o nível da câmara atingiu o mínimo programado, a bomba de recirculação foi desligada. Quando o nível atingiu o máximo programado, a bomba de mistura ou bomba de alimentação foi desligada. O teor de óleo no líquido do protótipo FAD foi mantido em 120 ppm ao longo dos testes.

2.5. Quantificação do óleo removido

O óleo foi medido no início e no final dos *wetlands* para quantificá-lo após a FAD e após a combinação da FAD e *wetlands*, respectivamente. O montante de óleo na água após o

tratamento foi determinado gravimetricamente como a quantidade de material após a extração com hexano. A taxa de óleo removido (%) foi calculada utilizando (Eq. 1):

$$\text{Óleo removido} = \frac{O_i - O_r}{O_i} \cdot 100 \% \quad (1)$$

na qual:

O_i - óleo inicial na água, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

O_r - óleo residual na água após o tratamento, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

2.6. Delineamento fatorial do experimento e metodologia da superfície de resposta

A metodologia da superfície de resposta (MSR) foi utilizada em conjunto com um delineamento composto central rotacional (DCCR), que requer menos testes do que um planejamento fatorial completo para estabelecer as relações funcionais entre duas variáveis operacionais (Bezerra et al., 2008). A MSR foi utilizada com o auxílio do programa de *software* Statistica (StatSoft®, versão 12). O DCCR foi empregado com a razão entre as vazões de saída de ar e de água para a produção de microbolhas (X_1) e a razão entre a vazão alimentadora de saída do protótipo de *wetland* e vazão de água para a produção de microbolhas (X_2). Foram necessários $2k + 2k + n_0$ experimentos, em que k é o número de variáveis independentes e n_0 é o número de repetições no ponto central para que o planejamento pudesse ser caracterizado como rotacional, totalizando 36 repetições para 12 ensaios (três repetições por ensaio). A Tabela 1 mostra as variáveis independentes e respectivos níveis calculados.

Tabela 1. Valores reais e codificados de variáveis independentes no DCCR para a eficiência de separação água-óleo

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1,00	0,00	+1,00	+1,41
Razão entre as vazões de saída de ar e de água para a produção de microbolhas ($X_1 \cdot 10^3$)	0,24	0,40	0,80	1,20	1,39
Razão entre a vazão alimentadora de saída do protótipo de <i>wetland</i> e vazão de água para a produção de microbolhas (X_2)	0,11	0,15	0,25	0,35	0,39

Significado físico de X_1 : O numerador é a vazão de ar aspirado pela bomba centrífuga. Essa vazão da bomba é controlada por uma válvula conectada a um computador para monitoramento digital. O ar aspirado passa por um rotâmetro, que mede a vazão e mantém constantes a pressão e a vazão da água de recirculação da bomba centrífuga. Como a vazão de água da bomba centrífuga é constante (denominador) e mantém a pressão invariável, $X_1 \cdot 10^3$ aumenta de 0,24 para 1,39 com o controle da válvula de gás no rotâmetro e o ar é distribuído no sistema FAD na forma de microbolhas. À medida que a vazão de gás aumenta, X_1 aumenta; a retenção de gás (acondicionamento) na célula da FAD aumenta e o tamanho das microbolhas é afetado pela coalescência. Essas duas quantidades (retenção de gás e tamanho da bolha) afetam diretamente a área interfacial de contato gás/líquido (óleo), mas de forma antagônica. Conforme o tamanho da bolha aumenta, a área interfacial de contato gás/óleo aumenta. À medida que X_1 é aumentada, a retenção de gás (a quantidade de gás presente por unidade de volume de líquido) aumenta, o que tende a aumentar a área interfacial, favorecendo a eficiência da separação óleo/água. Ao mesmo tempo, o tamanho da bolha também aumenta devido à coalescência das bolhas, reduzindo a área interfacial de contato gás/óleo. O resultado desses dois fenômenos antagônicos define o valor final da área interfacial.

Significado físico de X_2 : O numerador é a vazão do líquido saindo dos tanques do *wetland* e retornando para alimentar o sistema FAD, considerando a vazão do líquido reciclado no tanque de mistura insignificante em comparação a vazão de líquido que sai do *wetland*. O denominador é a vazão constante de água das microbolhas produzidas pela bomba centrífuga. Se X_2 aumenta de 0,11 para 0,39, a vazão do líquido de recirculação do *wetland* é aumentada e a turbulência no sistema FAD é aumentada. O aumento na vazão do líquido de recirculação do *wetland* também leva a uma diminuição no tempo de contato entre as microbolhas e as gotas de óleo. A eficiência da remoção de óleo depende da área interfacial (retenção e tamanho da microbolha) e do tempo de contato da microbolha/gota de óleo.

3. Resultados e discussão

Nesta seção, discutimos os resultados obtidos nas diferentes etapas dos testes experimentais utilizando o DCCR, com uma avaliação do efeito dos dois parâmetros operacionais investigados (X_1 e X_2). Demonstramos a partir desses estudos a eficiência da etapa da FAD (Y_0) e a eficiência geral ao combinar o FAD e os *wetlands* construídos (Y_1) para a separação de uma mistura sintética de óleo/água.

Um modelo estatístico foi criado e a eficiência é discutida com base nos fenômenos físicos e mecânicos da suspensão das partículas líquidas. Em uma etapa final, a análise adimensional foi aplicada para dimensionar o equipamento envolvido no processo híbrido de

separação de mistura óleo/água sem adição de coagulantes/floculantes para operação em escala industrial com base nos dados obtidos no sistema piloto estudado neste trabalho.

3.1. Eficiência do FAD e do sistema híbrido: análise estatística

A matriz de planejamento obtida dos experimentos é apresentada na Tabela 2. Foram analisados quatro experimentos fatoriais, quatro experimentos axiais e quatro pontos centrais. As repetições nos pontos centrais são utilizadas para estimar o erro experimental em um projeto deste tipo. Em cada ensaio, a eficiência de separação (%) foi a média de três execuções, incluindo cada ensaio do ponto central. Nestes mesmos pontos centrais, houve um aumento considerável na eficiência da redução do teor de óleo residual no efluente tratado comparando os valores de eficiência de separação água-óleo obtidos sem (Y_0) e com (Y_1) a conexão do *wetland* ao protótipo FAD. A taxa máxima obtida experimentalmente foi de 98%, ocorrendo no ponto central. A diminuição na eficiência de separação para níveis mais altos ou mais baixos do que aqueles no ponto central foi realizada para determinar um ponto ótimo.

Tabela 2. Matriz experimental DCCR com variáveis codificadas e valores de resposta para eficiência de separação óleo-água

Ensaio	$X_1 \cdot 10^3$	X_2	Eficiência de separação (%) FAD (Y_0)	Eficiência de separação (%) FAD + <i>wetland</i> (Y_1)
1	-1,00	-1,00	23,00	44,00
2	-1,00	+1,00	70,00	88,00
3	1,00	-1,00	26,00	45,00
4	1,00	1,00	59,00	80,00
5	-1,41	0,00	44,00	62,00
6	1,41	0,00	25,00	45,00
7	0,00	-1,41	15,00	33,00
8	0,00	1,41	62,00	82,00
9	0,00	0,00	75,00	96,00
10	0,00	0,00	77,00	98,00
11	0,00	0,00	78,00	98,00
12	0,00	0,00	74,00	97,00

Os efeitos estimados com o tratamento FAD + *wetland* (Y_1) são exibidos na Tabela 3. O valor-p foi inferior a 0,05 para todos os fatores analisados. A Tabela 4 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA), indicando que um modelo pode ser criado com menores valores de falta de ajuste e menor erro experimental. Portanto, foi proposto um modelo quadrático utilizando a metodologia da superfície de resposta que se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais com um coeficiente de regressão (R^2) de 97,5% entre os valores previstos e observados (Fig. 4). Todos os termos lineares e quadráticos exibiram significância estatística considerável dentro do intervalo de confiança de 95%. As relações $F_{\text{calculado}}/F_{\text{crítico}}$ foram favoráveis e os erros experimentais permaneceram em torno de 1,0%.

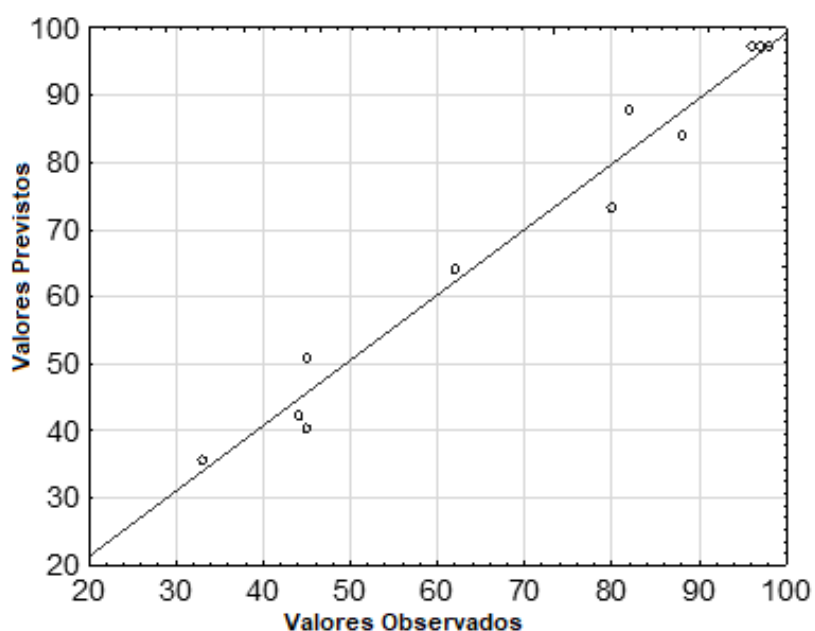
Tabela 3. Efeitos estimados do tratamento de FAD + *wetland*

	Efeito	Erro Padrão - Puro Erro	t(3)	Valor-p	-95% Limite de Confiança	+95% Limite de Confiança
Média	97,33	0,48	203,38	0,00	95,80	98,85
$X_1 \cdot 10^3$ (Linear)	-6,34	0,67	-9,43	0,00	-8,48	-4,20
$X_1 \cdot 10^3$ (Quadrático)	-38,40	0,74	-52,10	0,00	-40,75	-36,06
X_2 (Linear)	37,27	0,68	54,78	0,00	35,11	39,44
X_2 (Quadrático)	-36,22	0,77	-47,07	0,00	-38,67	-33,78
$X_1 \cdot 10^3 \cdot X_2$	-4,50	0,96	-4,70	0,02	-7,55	-1,45

Tabela 4. ANOVA para validação do modelo matemático*

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
X_1 (L)	81,54	1	81,54	88,95	0,00
X_1 (Q)	2488,13	1	2488,13	2714,33	0,00
X_2 (L)	2750,73	1	2750,73	3000,79	0,00
X_2 (Q)	2030,73	1	2030,73	2215,34	0,00
$X_1 \cdot X_2$	20,25	1	20,25	22,09	0,02
Falta de ajuste	166,42	3	55,47	60,52	0,00
Erro experimental	2,75	3	0,92		
Total	6834,67	11			

*95% nível de confiança

**Fig. 4.** Valores previstos versus observados do modelo proposto

O modelo empírico final da resposta às variáveis experimentais não codificadas é apresentado abaixo:

$$Y_1 = -144,18 + 198,15 \cdot X_1 - 120,01 \cdot X_1^2 + 1136,98 \cdot X_2 - 1811,23 \cdot X_2^2 - 56,25 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2)$$

Os fatores predominantes desse modelo quadrático são a razão quadrática entre as vazões de saída de ar e água para a produção de microbolhas ($X_1 \cdot 10^3$) e as razões linear e quadrática entre a vazão alimentadora de saída do protótipo de *wetland* e a vazão de água para a produção de microbolhas (X_2), conforme mostrado no Diagrama de Pareto (Fig. 5).

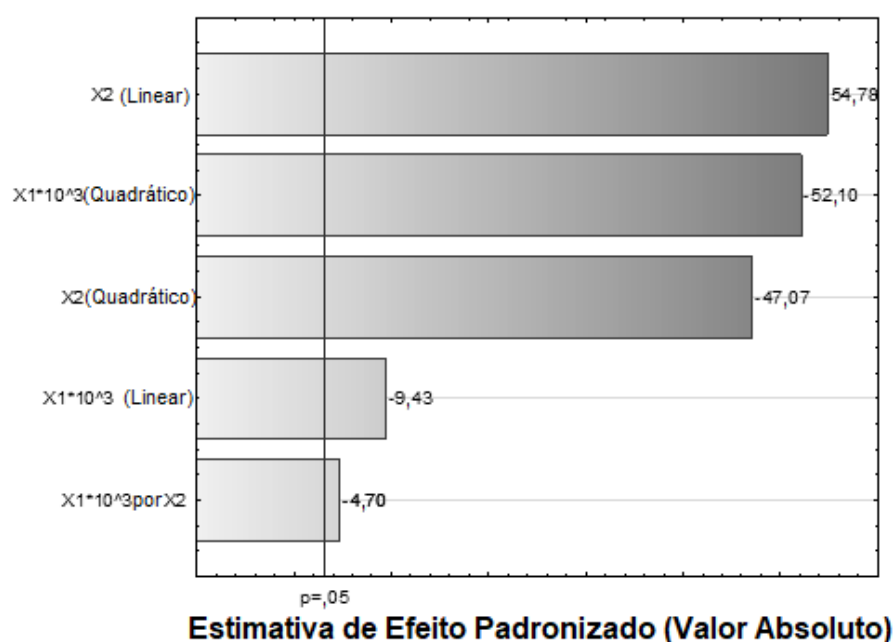


Fig. 5. Diagrama de Pareto para a estimativa dos efeitos

Baseado no modelo, foram construídas superfícies 3D (Fig. 6a) e 2D (Fig. 6b) para analisar a região da maior eficiência de separação. Assim, a região central (pontos 0,0) do DCCR (pontos 0,00, 0,00) exibiu maior remoção de óleo mesmo sem o *wetland*. Isso pode ser possível devido à combinação correta de vazões de ar e água para produzir microbolhas com pequenos diâmetros e alta uniformidade em termos do diâmetro médio de Sauter. A mensuração do diâmetro e uniformidade das microbolhas foi descrita por Brasileiro et al. (2020). Portanto, algumas adaptações podem ser feitas no sistema híbrido para medir o tamanho das microbolhas em função das vazões de água, óleo e ar.

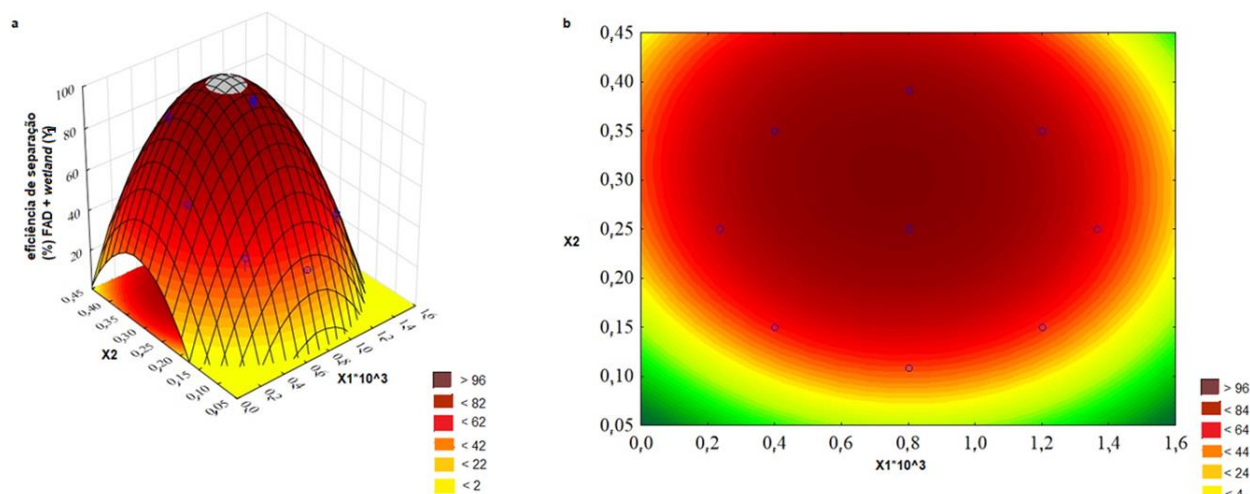


Fig. 6. Resultados de a) superfície de resposta e b) gráfico de curvas de nível para eficiência de separação com base na razão entre as vazões de saídas de ar e água para a produção de microbolhas ($X_1 \cdot 10^3$) e a razão entre a vazão de saída de alimentação do protótipo de *wetland* e vazão de água para a produção de microbolhas (X_2)

3.2. Resultados de eficiência do FAD e do sistema híbrido: análise física e mecânica

Analisando a coluna "efeito" na Tabela 3, é evidente que o efeito é negativo quando X_1 aumenta linearmente (-6,34) e ainda mais negativo quando X_1 aumenta no modo quadrático (-38,40). Assim, à medida que X_1 aumenta, a eficiência da remoção de óleo tende a ser comprometida pela redução da área interfacial. De acordo com o significado físico de X_1 , o aumento no tamanho das microbolhas devido à coalescência foi aparentemente preponderante em comparação com o aumento na retenção de gás (Chu et al., 2019).

A Tabela 2 mostra que a eficiência de remoção de gotículas de óleo é maior nos valores centrais de X_1 (vazões intermediárias de gás) no sistema FAD e no sistema combinado FAD + *wetland*. Essa vazão de ar proporciona um aumento na retenção sem favorecer um aumento considerável no tamanho das microbolhas, atingindo um equilíbrio entre os dois efeitos antagônicos, cuja otimização possibilita a máxima área interfacial possível e, consequentemente, a máxima eficiência (Prakash et al., 2018).

O efeito quadrático X_1 é ainda mais prejudicial, pois o efeito de coalescência (aumento no tamanho da microbolha) se eleva quando o quadrado do efeito da vazão de ar aumenta. Esse fenômeno leva a uma tendência de redução da eficiência de remoção de óleo, visto que o efeito do tamanho da microbolha aparentemente predomina sobre a retenção de gás.

Novamente, analisando a coluna "efeito" na Tabela 3, o aumento em X_2 levou a dois comportamentos diferentes. Na análise linear, o efeito foi de +37,27, indicando que o aumento de X_2 de forma linear tende a favorecer a eficiência pelo aumento da área interfacial das

microbolhas devido à turbulência gerada pelo aumento da vazão de líquido de recirculação do *wetland*. Essa vazão do *wetland* leva a uma redução no tamanho da microbolha e retenção de gás. O efeito do tamanho das microbolhas parece ser sempre preponderante sobre o efeito da retenção quanto à eficiência de remoção de óleo, mas sem um efeito aparente na redução do tempo de contato entre as microbolhas e as gotas de óleo (Chu et al., 2019).

Quando X_2 varia quadraticamente, entretanto, o efeito é -36,22. Nesse caso, a eficiência é prejudicada pelo aumento em X_2 provavelmente devido à redução drástica no tempo de contato de microbolhas/gotículas de óleo e à redução da biossorção de óleo pelas macrófitas. Tais condições são favorecidas pelo grau de turbulência devida à alta vazão de líquido no *wetland*. Mesmo com o aumento da área interfacial em condições quadráticas de escoamento do *wetland*, o tempo de contato foi muito curto, comprometendo a eficiência da separação óleo/água (Ansari et al., 2020; Colares et al., 2020).

A eficiência de remoção de óleo se ajustou aos valores do ponto central (valores de vazão intermediária do *wetland*) para o sistema FAD e o sistema híbrido (FAD + *wetland*) (Tabela 2). Nessas condições, os resultados indicam que a vazão do *wetland* é capaz de reduzir a retenção do gás de forma menos drástica, sem comprometer a redução do tamanho das microbolhas devido à turbulência e permitindo tempo de contato suficiente entre as microbolhas e as gotas de óleo com o aumento da área de interface e, assim, obter eficiência de separação ideal óleo/água. Com os valores centrais da vazão de líquido de recirculação da rede de *wetland*, os maiores efeitos foram obtidos com a inclusão do *wetland*, aumentando a eficiência de remoção de óleo de 77 para 98% (Teste 10), que fica em torno de 20%, pois a maior parte do óleo foi removida no sistema FAD.

Segundo Yin et al. (2017), *Eichhornia crassipes* é capaz de absorver óleo em rejeitos, o que exerce influência no crescimento da macrófita (Özbay, 2016) e, consequentemente, no controle da espécie. Além disso, resíduos de plantas em *wetlands* podem ser trituradas para obter biossurfactantes (saponinas) (Gutiérrez-Morales et al., 2017).

3.3. Correlações de aumento de escala

A inércia e a gravidade foram identificadas como fenômenos que mais afetam a dinâmica dos fluidos da câmara de flotação FAD (Kiss e Lakatos, 1996). A análise da dinâmica dos fluidos deste equipamento por análise dimensional leva ao seguinte modelo de aumento de escala (Eq. 3):

$$Q_r = \frac{Q_m}{Q_p} = \frac{L_r^3}{L_r^{1/2}} = L_r^{5/2} \quad (3)$$

onde: subscrito m e p = modelo de bancada e protótipo industrial, respectivamente; Q_r = razão das vazões volumétricas do modelo de bancada e do protótipo industrial; Q_m = vazão volumétrica do modelo de bancada, $m^3 \cdot s^{-1}$; Q_p = vazão volumétrica protótipo industrial, $m^3 \cdot s^{-1}$; L_r = razão das dimensões geométricas do modelo e do protótipo industrial; L_m = dimensão geométrica do modelo, m e L_p = dimensão geométrica do protótipo industrial, m .

De acordo com os critérios de aumento de escala, o comportamento hidráulico de *wetlands* retangulares otimizados com decantadores contínuos depende do número de Reynolds turbulento (Re_t). A aplicação dos critérios de aumento de escala (Ludwig, 1999), leva as Eqs. (4-5):

$$(Re_t)_m = (Re_t)_p \quad (4)$$

e:

$$Re_t = \frac{v_c \cdot D_H \cdot \rho_c}{\mu_c} \quad (5)$$

onde: v_c = velocidade superficial da fase contínua (água) ($m \cdot s^{-1}$); D_H - diâmetro hidráulico, m ; ρ_c = densidade da água, $kg \cdot m^{-3}$ e μ_c = viscosidade absoluta da água, $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$.

O diâmetro hidráulico pode ser estimado conforme a Eq. (6):

$$D_H = 4 \cdot R_H = 4 \cdot \frac{\text{Área molhada}}{\text{Perímetro molhado}} = \frac{4 \cdot h \cdot b}{2(h+b)} \quad (6)$$

onde: h é a profundidade do líquido na seção, em m , e b é a largura do líquido na seção em m .

A seção eficiente e econômica é dada pela Eq. (7):

$$D_H = 2 \cdot h \quad (7)$$

Considerando que $h \ll b$, também, substituindo a velocidade pela razão da vazão (Q) e a área da seção transversal (A), isso levou à Eq. (8):

$$v_c = \frac{Q}{A} = \frac{Q}{0,7854 \cdot h \cdot b} = \frac{Q}{1,5708 \cdot h^2} \quad (8)$$

Portanto, a Eq. (9) dá o número Reynolds (Re_t):

$$Re_t = \frac{Q \cdot 2h \cdot \rho_c}{1,5708 \cdot h^2 \cdot \mu_c} = \frac{2 \cdot Q \cdot \rho_c}{1,5708 \cdot h \cdot \mu_c} \quad (9)$$

e para uma operação dentro dos critérios otimizados: $Re_t < 5000$

O projeto preliminar da estrutura piloto foi baseado em correlações de aumento de escala obtidas das Eqs. (3-7). Os cálculos foram realizados utilizando dados estimados de uma usina termelétrica para a unidade de tratamento de água oleosa híbrida em escala comercial. O volume máximo de uso do mesmo por dia foi em torno de 100 mil litros durante o período de

Novembro de 2017 a Setembro de 2018. Em seguida, estimou-se a vazão média do efluente de $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ a ser tratado bem como o volume do tanque pulmão de 100 mil litros para armazenamento de efluente, em caso de parada para manutenção.

O volume do modelo de bancada, em aumento de escala, da câmara de flotação do protótipo FAD foi de $1,5 \text{ m}^3$ (dupla câmara), que combinando com as vazões de saída de microbolhas e efluente a ser tratado (Q_m), totalizando $2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, levou à Eq. (10):

$$\tau_m = \frac{V_m}{Q_m} = \frac{1,5}{2} = 0,75 \text{ h} \quad (10)$$

Assumindo que o modelo de aumento de escala foi construído com base na escala 1:5, isso leva à seguinte estimativa para o tempo médio de residência do protótipo industrial (Eq. 11):

$$\tau_p = \frac{L_r^{5/2}}{L_r^3} \cdot \tau_m = \frac{\tau_m}{L_r^{1/2}} = 0,75 \cdot \sqrt{5} = 1,68 \text{ h} \quad (11)$$

O volume do protótipo industrial foi recalculado, o valor obtido foi de $8,4 \text{ m}^3$ ($4,2 \text{ m}^3$ para cada câmara de flotação). Com base na escala 1:5, a unidade FAD comercial atendeu aos requisitos de similaridade dinâmica. O tempo máximo de permanência e a vazão máxima prática ($Re_t \geq 5000$) se relacionam. Em seguida, o tempo máximo de permanência no modelo físico dos *wetlands*, em policarbonato ($Re_t = 725$; $Q_m = 1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ e $h = 0,4 \text{ m}$), poderia ser estimado dividindo o volume de líquido do equipamento pela vazão máxima permitida. O tempo máximo de permanência, em cada unidade, foi estimado em 3456 s ($\sim 1 \text{ h}$) para um modelo de protótipo (laboratório) (volume: $0,96 \text{ m}^3$ por unidade; comprimento: 3 m). Considerando o modelo de aumento de escala para um equipamento industrial (vazão: $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), o número de Reynolds de 5.000 exigia a altura da água (a) de 0,6 m e largura do tanque de 1,2 m, levando o volume do *wetland* de $21,6 \text{ m}^3$ e comprimento de 30 m (único *wetland*). Nesse caso, o tempo de permanência foi estimado em 4,32 h. O *wetland* industrial foi projetado para altura lateral da água de 1,0 m com largura de 2,0 m, levando o número de turbulência de Reynolds na ordem de 2500 (bem dentro dos critérios de segurança). A Fig. 7 ilustra um protótipo piloto projetado com o auxílio do programa de software SolidWorks®.

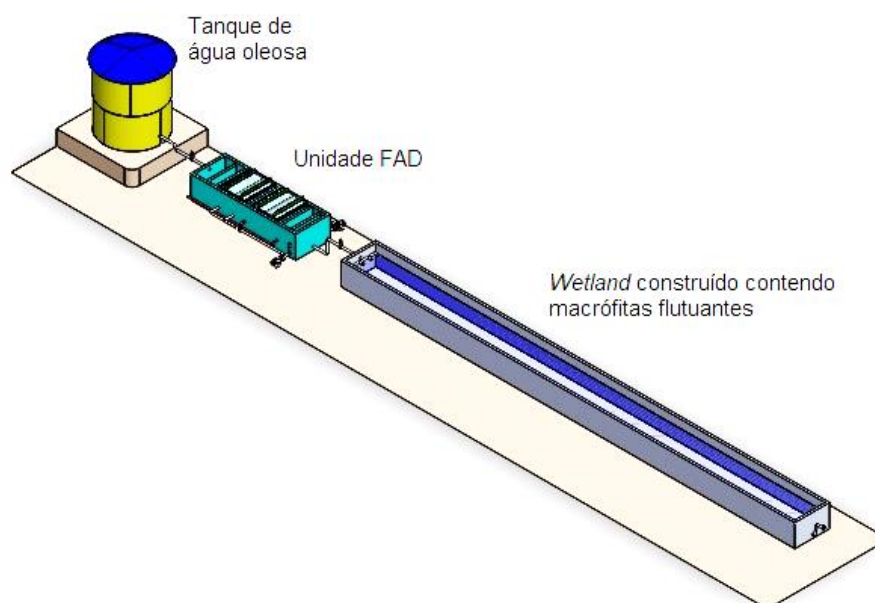


Fig. 7. Isométricas no SolidWorks do protótipo híbrido comercial FAD-wetland

4. Conclusões

A combinação dos métodos de FAD e de *wetland* construído demonstrou resultados bastante satisfatórios e foi capaz de atingir uma taxa de remoção de óleo de 98% sem a adição de qualquer agente coagulante para auxiliar na coagulação ou floculação das partículas de óleo. Além da eficiência, o sistema não emprega aditivos químicos que podem causar problemas no reaproveitamento da água reutilizada e que apresentem graus consideráveis de toxicidade para a flora ou fauna dos corpos d'água que recebem o descarte.

Os valores centrais das variáveis X_1 (efeito da vazão de gás aspirado pela bomba centrífuga com geração de microbolhas) de $0,80 \cdot 10^{-3}$ e X_2 (efeito da vazão de líquido de recirculação do *wetland* construído) de 0,25 no delineamento experimental realizado dentro dos limites de variação estudados exibiu a maior eficiência quanto à remoção de óleo em ambos os sistemas FAD e FAD + *wetland*, com uma contribuição significativa do *wetland* na remoção de efluente oleoso sintético (20% de aumento na eficiência). O modelo estatístico proposto foi capaz de prever os valores de eficiência (Y_1) em função dos parâmetros operacionais avaliados (X_1 e X_2) e suas interações, com um coeficiente de regressão (R_2) de 97,50%.

Uma análise rigorosa baseada em critérios adimensionais foi proposta para extrapolar o processo híbrido estudado em escala laboratorial para escala industrial, com o dimensionamento dos equipamentos envolvidos no processo. Este trabalho propõe uma tecnologia inovadora e eficiente com um investimento e custo operacional relativamente baixo, essa tecnologia é limpa e ecologicamente correta. A automação dos protótipos individualmente e em conjunto favoreceu esse alto rendimento e a padronização do processo. Porém,

adaptações do sistema devem ser testadas em estudos futuros para o tratamento de diferentes tipos de águas oleosas, tais como efluentes com alto grau de emulsificação (indústria alimentícia) e aqueles produzidos por instalações mecânicas de indústria metalúrgica (óleo-água-grafite), para que este processo híbrido se torne um candidato adequado para comercialização no mercado nacional e internacional.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Programa de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), Companhia Energética de Candeias (CEC) do Grupo Global, por meio do código do projeto PD-06961-0005/2016, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Abdullah S.R.S., Al-Baldawi I.A., Almansoory A.F., Purwanti I.F., Al-Sbani N.H., Sharuddin S.S.N., (2020), Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: application, mechanisms, challenges and opportunities, *Chemosphere*, **247**, 125932, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.125932.
- Al-Ghouti M.A., Al-Kaabi M.A., Ashfaq M.Y., Da'na D.A., (2019), Produced water characteristics, treatment and reuse: A review, *Journal of Water Process Engineering*, **28**, 222-239.
- Ansari A.A., Neem M., Gill S.S., AlZuaibr F.M., (2020), Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application, *Egyptian Journal of Aquatic Research*, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>.
- Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A., (2008), Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, **76**, 965-977.
- Brasileiro P.P.F., Santos L.B., Chaprão M.J., Almeida D.G., Soares da Silva R.C.F., Roque B.A.C., Santos V.A., Sarubbo L.A., Benachour M., (2020), Construction of a microbubble generation and measurement unit for use in flotation systems, *Chemical Engineering Research and Design*, **153**, 212-219.
- Chu P., Finch J., Bournival G., Ata S., Hamlett C., Pugh R.J., (2019), A review of bubble break-up, *Advances in Colloid and Interface Science*, **270**, 108-122.

- Colares G.S., Dell'Osbel N., Wiesel P.G., Oliveira G.A., Lemos P.H.Z., Silva F.P., Lutterbeck C.A., Kist L., Machado E.L., (2020), Floating treatment wetlands: A review and bibliometric analysis, *Science of The Total Environment*, **714**, 136776, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136776.
- Crema L.C., Biudes J.F.V., Camargo A.F.M., (2012), Effect of Urucu oil (Brazilian Amazon) on the biomass of the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Potenderiaceae), *Acta Limnologica Brasiliensia*, **23**, 406-411.
- Galdino R.A., Moura A.E., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2015), Strategy for controlling the level in a Dissolved Air Flotation chamber, *Journal of Chemical Engineering*, **93**, 344-352.
- Gunathilakae N., Yapa N., Hettiarachchi R., (2018), Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the cadmium phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Groundwater for Sustainable Development*, **7**, 477-482.
- Gutiérrez-Morales A., Velásquez-Ordoñez V., Khusro A., Salem A.Z.M., Estrada-Zúñiga E., Salem M.Z.M., Valladares-Carranza B., Burrola-Aguilar C., (2017), Anti-staphylococcal properties of *Eichhornia crassipes*, *Pistacia vera*, and *Ziziphus amole* leaf extracts: Isolates from cattle and rabbits, *Microbial Pathogens*, **113**, 181-189.
- Jafarinejad S., Jiang S. C., (2019), Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **7**, 103326, doi:10.1016/J.JECE.2019.103326.
- Kadlec R.H., Wallace S.D., (2009), *Treatment Wetlands*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, 1-348.
- Kiss K.M., Lakatos G., (1996), *Operation of Constructed Wetland System for Post-Purification of Oily Sewage*, 5th Int. Conf. on Wetland Systems for Water Pollution Control, Viena, **18**, 1-3.
- Kunes J., (2012), *Similarity and Modeling in Science and Engineering*, International Science Publishing Springer, Cambridge, 1-442.
- Lakatos G., Veres Z., Kundrát J., Mészáros I., (2014), The management and development of constructed wetlands for treatment of petrochemical waste waters in Hungary: 35 years of experience, *Ecohydrology and Hydrobiology*, **14**, 83-88.
- Lu D., Liu Q., Zhao Y., Liu H., Ma J., (2018), Treatment and energy utilization of *oily water* via integrated ultrafiltration-forward osmosis-membrane distillation (UF-FO-MD) system, *Journal of Membrane Science*, **54815**, 275-287.
- Ludwig E.E., (1999), *Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants*, 3rd Edition, Butterworth-Heinemann, United States.
- Özbay H., (2016), The effects of motor oil on the growth of three aquatic macrophytes, *Acta Ecologica Sinica*, **36**, 504-508.

- Prakash R., Majumder S.K., Singh A., (2018), Flotation technique: Its mechanisms and design parameters, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, **127**, 249-270.
- Rocha e Silva F.C.P., Rocha e Silva N.M.P., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2018), Dissolved air flotation (DAF) combined to biosurfactants: a clean and efficient alternative to treat industrial oily water, *Reviews in Environmental Science in Biology and Technology*, **17**, 591-602.
- Rocha e Silva F.C.P., Rocha e Silva N.M.P., Moura A.E., Galdino R.A., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2015), Effect of biosurfactant addition in a pilot scale dissolved air flotation system. *Separation Science and Technology*, **50**, 618-625.
- Santander M., Rodrigues R.T., Rubio J., (2011), Modified jet flotation in oil (petroleum) emulsion/water separations, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **375**, 237-244.
- Stefanakis A.I., Seeger E., Dorer C., Sinke, A., Thullner M., (2016), Performance of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands treating groundwater contaminated with phenols and petroleum derivatives, *Ecological Engineering*, **95**, 514-526.
- Tawalbeh M., Al Mojily A., Al-Othman A., Hilal N., (2018), Membrane separation as a pre-treatment process for oily saline water, *Desalination*, **4471**, 182-202.
- Vasconcelos R.S., Henauth R.C.S., Moura A.E., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2015), Strategy for a scale-up correlation in a dissolved air flotation chamber, *Chemical Engineering and Technology*, **38**, 813-818.
- Villamagna A.M., Murphy B.R., (2010), Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review, *Freshwater Biology*, **55**, 282-298.
- Vymazal J., (2014), Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review, *Ecological Engineering*, **73**, 724-751.
- Yin T., Zhang X., Liu X., Wang C., (2017), Resource recovery of *Eichhornia crassipes* as oil superabsorbent, *Marine Pollution Bulletin*, **118**, 267-274.

CAPÍTULO III

*ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO **PROCESS BIOCHEMISTRY***
Qualis A4

Análise das propriedades surfactantes da *Eichhornia crassipes* para aplicação na remediação de ambientes impactados por petroderivados

Alexandre Augusto P. Selva Filho ^{a,b}; Fabíola Carolina G. Almeida^b; Rita de Cássia Freire Soares da Silva ^{a,b}; Leonie Asfora Sarubbo^{a,b*}

^a Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife - Pernambuco, Brasil.

^b Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação - IATI, Rua Potira, n 31, Prado, CEP: 50751-310, Recife - Pernambuco, Brasil.

* Correspondence para: leonie.sarubbo@unicap.com.br; Tel.: +55-81-2119-4084

Resumo

Derramamentos de petróleo impactam negativamente ecossistemas. Uma solução para isso consiste no uso de biossurfactantes, agentes tensoativos capazes de solubilizar manchas de óleo. Assim, o uso da espécie invasiva *Eichhornia crassipes* como fonte de agentes tensoativos representa a possibilidade de geração de novos compostos de valor agregado a partir do reaproveitamento de resíduos vegetais. Nesse sentido, as propriedades surfactantes do extrato da macrófita foram investigadas, assim como sua estabilidade em diferentes níveis de pH, temperatura e concentrações de NaCl e a caracterização química do extrato vegetal obtido. A ecotoxicidade do tensoativo foi estudada para bioindicadores como, *Artemia salina* e *Brassica oleracea*, visando seu uso na remoção de poluentes ambientais em areia e água do mar. A Concentração Micelar Crítica do extrato vegetal foi de 1,4 g/L e a tensão superficial nesse ponto foi de 25,84 mN/m. O tensoativo comprovou estabilidade e inocuidade para os bioindicadores avaliados. O índice de emulsificação obtido foi superior a 65% para o óleo motor. A caracterização química sugere uma estrutura formada por um ácido graxo insaturado. O extrato vegetal foi capaz de dispersar 100% de óleo em água do mar e os percentuais de óleo motor removido da areia alcançaram 67,50%, enquanto que a remoção de metais pesados alcançou percentuais em torno de 59% para Cu e Zn. O tensoativo vegetal em estudo demonstrou claramente a viabilidade de sua aplicação como aditivo biotecnológico para os processos de remediação ambiental.

Palavras-chave: petróleo; *Eichhornia crassipes*; resíduos vegetais; macrófita; tensoativo.

1. Introdução

Os surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfipáticas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas que possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água [1]. Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases [2].

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinada a novas legislações de controle do meio ambiente, tem levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes [3].

Os biossurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixas toxicidades, estabilidade frente a uma ampla faixa de pH e temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas [4].

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até micro-organismos (glicolipídios) e também no organismo humano (saís biliares), sendo considerados surfactantes naturais [5].

O maior mercado para os biossurfactantes é na indústria petrolífera, onde podem ser amplamente utilizados na recuperação avançada de petróleo (MEOR – Microbial Enhanced Oil Recovery), na remoção e mobilização de resíduos oleosos, na tecnologia da biorremediação e na remoção de metais pesados [6].

Em refinarias de petróleo os biossurfactantes contribuem para separação de óleos da borra composta por sólido, óleo e água. A ação de biossurfactantes contribui com a redução da tensão interfacial de água e óleo reduzindo a viscosidade da borra e facilitando o processo de separação. Em determinadas concentrações os biotensoativos são capazes de formar micelas ao atingir a sua Concentração Micelar Crítica (CMC), o que eleva a emulsão dos sistemas favorecendo o retorno do óleo aprisionado para a superfície do sólido, possibilitando a sua separação e reutilização. A aplicação de biossurfactantes em associação a temperatura e agitação acima do valor ótimo também contribuem, por exemplo, para a recuperação do óleo contido na borra oleosa residual [7].

Por outro lado, outros biossurfactantes devem ser investigados para aplicações ambientais e industriais, porque eles também podem apresentar propriedades mais promissoras, como os biossurfactantes derivados de plantas. As saponinas, por exemplo, são uma classe de biossurfactantes naturais amplamente distribuídas no reino vegetal [1]. Alguns

estudos têm mostrado que as saponinas podem efetivamente remover metais pesados ou óleos de solos contaminados [4].

As macrófitas da espécie *Eichhornia crassipes* são nativas da América do Sul (Brasil e região equatorial), mas se adaptam bem em regiões tropicais [8]. A literatura demonstra que entre as macrófitas aéreas existentes e disponíveis no Brasil para aplicação na fitorremediação, aquela que mais se adapta às condições de poluição intensa é a *E. crassipes*, popularmente conhecida como aguapé. O aguapé (*E. crassipes*) é uma macrófita aquática pertencente à família Pontederiaceae. Essa espécie possui importância ecológica devido à sua capacidade de atuar como biofiltro, acumular metais pesados e produzir compostos de interesse biotecnológico [9].

A *E. crassipes* é invasiva, pois se reproduz rapidamente em uma grande quantidade de ambientes de lagos e rios contaminados por uma larga taxa de nutrientes, formando uma camada sobre esses locais. Essa larga expansão impede que o oxigênio seja introduzido no interior dos cursos d'água, reduzindo a presença de algas e espécies nativas de uma região [8]. Por isto, as macrófitas aquáticas são utilizadas com sucesso na recuperação de rios e lagos poluídos. Entretanto, devido ao seu rápido crescimento e falta de manejo adequado, pode se tornar um problema ambiental, dificultando a navegação e a geração de energia elétrica [10].

Uma importante característica da macrófita na retenção de poluentes, como os metais pesados e petroderivados, consiste na preservação de suas folhas da contaminação, uma vez que 95 a 98% desses poluentes acumulam-se no sistema radicular da planta. A macrófita também é utilizada como ração para bovinos, biofertilizante, biogás, composto orgânico e carvão vegetal. Outra alternativa é a utilização na forma seca, moída e transformada em um material adsorvente e/ou absorvente apresentando vantagens, podendo ser embalado, armazenado, transportado e usado em reatores nos tratamentos de efluentes líquidos [11].

O reaproveitamento das raízes das macrófitas para a geração de agentes surfactantes, entretanto, nunca foi descrito na literatura. Nesse sentido, considerando a vasta distribuição de macrófitas e seu caráter renovável, o objetivo desse estudo foi investigar, pela primeira vez, suas propriedades tensoativas com vistas à aplicação desse aguapé como coadjuvante dos processos de remediação de poluentes hidrofóbicos gerados na indústria de petróleo.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta das amostras

A coleta das macrófitas (*Eichhornia crassipes*) foi realizada no Açude de Apipucos, na cidade de Recife-PE, Brasil. As plantas tiveram suas folhas, caules e raízes separados e

lavados em água corrente. As amostras de raízes foram pesadas e as raízes obtidas secas e trituradas [12].

2.2. Extração das substâncias surfactantes

A obtenção de substância surfactantes foi feita por meio do método de precipitação ácida e extração por solvente [13]. A matéria vegetal foi peneirada em um béquer de 2 L, sendo adicionado 700 mL de solução de NaOH à 1%. Em seguida, a mistura foi filtrada por tecido. Posteriormente, os resíduos gerados foram adicionados de 300 mL da solução de NaOH e submetidos a uma nova filtração.

A solução de raízes filtrada foi separada em quatro partes. A quantidade de extrato vegetal medida foi centrifugada a 4700 rpm por 15 minutos a 7°C. A solução filtrada a vácuo foi acidificada com ácido cítrico até atingir pH 2,5. A solução ácida foi adicionada de 250 mL de clorofórmio em um funil de separação, sendo a fração de clorofórmio e emulsão decantada em erlenmeyer. Já a parte aquosa e a de sedimentos foram submetidas novamente a extração com clorofórmio. Em seguida, foi realizada uma filtração a vácuo, para separar a fase de emulsão. O extrato filtrado, que ainda continha a fase aquosa, foi colocado no funil de decantação para separação e filtração por gravitação e posto para evaporar em béquer, cuja massa foi previamente anotada para a determinação do rendimento.

2.3. Determinação da tensão superficial e da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A tensão superficial do extrato vegetal foi medida em tensiômetro automático (KSV Sigma 700, Finland) através do método do anel de Du Noüy. A grandeza foi medida através da imersão do anel de platina no líquido metabólico, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido. A CMC foi determinada automaticamente por medidas das tensões superficiais de uma amostra de água gradativamente adicionada do surfactante até se atingir um valor constante de tensão.

2.4. Determinação da capacidade de emulsificação

A atividade emulsificante do extrato vegetal em meio básico foi determinada segundo a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg [14]: 2,0 mL de substrato oleoso adicionado a 2 mL do extrato vegetal em tubo graduado e a mistura agitada em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas, as emulsões de extrato em óleo foram expressas em centímetros, devido à altura da espuma formada. As atividades de emulsificação foram testadas para diferentes compostos orgânicos (óleo de motor, óleo diesel, querosene, n-hexadecano, óleo de milho e óleo de soja).

Os experimentos foram realizados em triplicata. A taxa de emulsificação do extrato vegetal em óleos foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de Emulsão} = (\text{altura de emulsão/altura total}) \times 100\%.$$

2.5. Determinação da estabilidade do extrato vegetal

Os efeitos de diferentes temperaturas (5°C, 70°C, 90°C e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0%), de diferentes pHs (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0 e 14,0) e de diferentes tempos de aquecimento a 90°C (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos) na atividade do extrato vegetal contendo o biossurfactante foram avaliados para determinação da tensão superficial. O método realizado para esse fim baseou-se em Santos [15].

2.6. Método colorimétrico de determinação de saponinas

O método colorimétrico de determinação de saponinas, com base em Hiai [16], foi utilizado, adicionando-se 800 mg de vanilina em 10 mL de etanol a 99,5% (v/v). Em seguida, o extrato vegetal contendo biossurfactante foi dissolvido em solução de NaOH à 1%. Depois, adicionou-se 0,5 mL da solução de vanilina e 5,0 mL de ácido sulfúrico à solução contendo biossurfactante, misturando bem em banho de água gelada. Posteriormente, a mistura foi aquecida num banho-maria à 60°C durante 10 minutos e resfriada em água gelada.

A preparação do branco foi realizada colocando etanol à 99,5% no lugar da solução do extrato. Já os padrões utilizados na curva de calibração foram preparados, adicionando no lugar da solução de biossurfactantes para cada tubo de ensaio uma concentração diferente de padrão de saponina. As concentrações utilizadas em triplicata foram 0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L e 1,5 g/L.

Posteriormente, a mistura na concentração 0,4 g/L de saponina padrão foi colocada em uma cubeta e o branco em outra cubeta, ambas foram colocadas em um espectrofotômetro, zerando a absorbância no branco e determinando as absorbâncias na concentração de 0,4 g/L de saponina. O comprimento de onda utilizado foi de 500 nm para montar a curva de calibração. O valor da absorbância do extrato vegetal foi utilizado na equação e o cálculo resultou na concentração de saponina presente no extrato.

2.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O extrato vegetal extraído e purificado foi redissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e os respectivos espectros de ¹H RMN foram registrados em 25°C utilizando um espectrômetro Agilent 300Mz que opera a 300,13 MHz. Deslocamentos químicos (δ) são dadas

na escala de ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS).

2.8. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectrômetro no infravermelho (BRUKER IFS66) registrou o extrato vegetal purificado dissolvido em metanol na região espectral de 4.000 a 400 cm^{-1} . O número de onda teve sua precisão mantida em -0,1 a +0,1 cm^{-1} [17].

2.9. Teste de fitotoxicidade

A fitotoxicidade foi avaliada em ensaio estático através da germinação das sementes e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*), de acordo com Tiquia [18]. Soluções teste do extrato vegetal foram preparadas em água destilada em diferentes concentrações (1/2 x CMC, 1 x CMC e 2 x CMC). A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman N°1. As sementes foram previamente tratadas com NaClO, sendo 10 sementes simetricamente adicionadas por placa, que foram inoculadas com 5 mL da solução teste a 28°C, tendo a água destilada utilizada como controle. No decorrer de cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o crescimento da raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

Germinação relativa das sementes (%) = $(\text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas no extrato} / \text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas no controle}) \times 100$

Comprimento relativo da raiz (%) = $(\text{média do comprimento da raiz no extrato} / \text{média do comprimento da raiz no controle}) \times 100$

IG = $[(\% \text{ germinação das sementes}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})] / 100\%$.

2.10. Teste de toxicidade com *Artemia salina*

A toxicidade foi avaliada utilizando-se larvas de camarão (microcrustáceo *Artemia salina*) como indicador. Os ovos de camarão foram obtidos em uma loja local. As larvas foram usadas dentro de 24 horas após a eclosão. As análises foram conduzidas em frascos de penicilina de 10 mL de capacidade contendo 10 larvas em 5 mL de água contendo sal marinho sintético (33 mg/L) e soluções do extrato vegetal em diferentes concentrações (1/2 x CMC, 1 x CMC e 2 x CMC) por frasco. A solução marinha sintética foi utilizada como controle. As larvas foram observadas quanto à mortalidade durante 24 horas de incubação [19]. A concentração tóxica limite foi definida como a menor concentração capaz de provocar a morte do microcrustáceo em 24 horas.

2.11. Experimentos de dispersão de composto hidrofóbico em água do mar

A capacidade de dispersão de manchas de derivados de petróleo foi simulada em laboratório contaminando-se amostras de água do mar com 5% de óleo de motor. Os testes foram conduzidos pela adição dos extratos vegetais contendo o surfactante na proporção 1:2, 1:8 e 1:25 (vol./vol.) de extrato:óleo. Os resultados foram observados visualmente e as relações entre os volumes de extrato vegetal e as dimensões de “gota” foram calculados [20].

2.12. Ensaio cinético de remoção de óleo em areia

A capacidade de remoção do contaminante hidrofóbico foi testada através da saturação de 60,0 g de areia “in natura” com 5 mL do contaminante adsorvido. Porções de 20,0 g das amostras preparadas foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL, sendo adicionados 20 mL do extrato vegetal em concentrações na metade da CMC, na CMC e duas vezes a CMC. A adição de 20 mL de água destilada foi testada como controle. Os frascos foram agitados a 150 rpm por 24 horas, a temperatura ambiente e então centrifugados a 5.000 rpm por 20 minutos para separação da solução de lavagem do solo, conforme Rufino [21]. O percentual de contaminante remanescente na areia lavada foi determinado por gravimetria após extração com hexano, segundo Rocha e Silva [22].

2.13. Ensaio estático de remoção de óleo em areia em colunas empacotadas

Colunas de vidro (57 cm de altura e 3,7 cm de diâmetro) foram preenchidas com areia padrão adsorvida de óleo de motor, a partir dos topos. A quantidade de óleo aplicada às colunas foi calculada de modo a atingir a concentração final de 10% (p/p) da areia. Os níveis de penetração da água, do óleo e do extrato vegetal através da areia foram medidos em intervalos de 15 e 30 minutos, sendo expressos como percentuais da altura esvaziada da areia. As soluções utilizadas para a movimentação do contaminante hidrofóbico adsorvido na areia foram as seguintes: água deionizada, como controle; e soluções do extrato vegetal na CMC e em duas vezes à CMC. Após a lavagem, as amostras de areia contida foram lavadas com 300 mL de hexano para remoção do óleo residual, sendo o solvente evaporado a 50°C e a quantidade de óleo extraída determinada por gravimetria [23].

2.14. Remoção de metais pesados contidos em efluente sintético pelo extrato vegetal

Soluções salinas contendo os metais pesados Cu, Pb e Zn ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) foram preparadas por dissolução dos sais separadamente em água deionizada a fim de atingir a concentração de 1000 mg/L. A capacidade de remoção de metais pesados pelo extrato vegetal foi determinada em um efluente sintético contendo Cu, Zn e Pb. Soluções do

extrato vegetal na CMC e duas vezes a CMC foram adicionadas a soluções do efluente sintético preparado. Posteriormente, o precipitado metal-extrato vegetal foi removido por centrifugação a 5.000 g por 15 min e a condutividade da solução medida. O condutivímetro foi calibrado com água deionizada antes de medir cada amostra [24].

2.15. Análise estatística dos dados obtidos

Os dados colhidos foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão dos testes realizados em triplicata. A análise estatística de variância de ANOVA foi aplicada para determinar a significância, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados e discussão

3.1. Tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A presença de um surfactante reduz a tensão superficial ar/água, sendo este efeito proporcional à concentração do biossurfactante em solução, até se atingir a CMC [5]. De acordo com a Figura 1, a CMC do extrato vegetal contendo biossurfactante foi de aproximadamente 1,4 g/L e a tensão superficial nesse ponto foi de 25,84 mN/m. Este valor de tensão é semelhante aos valores relatados para biossurfactantes produzidos por micro-organismos [3].

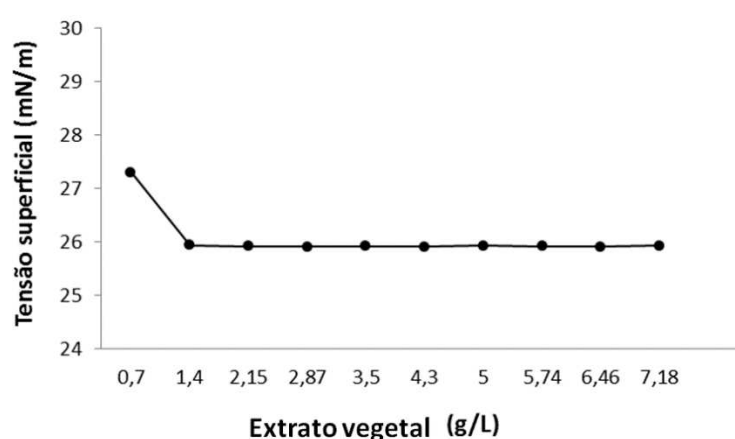


Fig. 1. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do extrato vegetal contendo surfactante de *E. crassipes*

O método de extração utilizado demonstrou que, para uma quantidade de 1 kg de raízes finas (grande superfície de contato), a realização de apenas 2 filtrações a vácuo, uma depois da centrifugação e a outra após a última separação de fases, é ideal para produzir uma quantidade suficiente de extrato vegetal. As perdas de extrato ocorreram, em parte, devido às filtrações a vácuo. Além disso, houve pequenas perdas no transporte, demonstrando que o transporte de fluidos deve ser rápido. Por fim, o rendimento depende da superfície de contato das raízes, podendo ser otimizado em função do tamanho das macrófitas coletadas.

O biossurfactante purificado produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* SNP0614, segundo Liu [25], reduziu a tensão superficial da água de 72,32 mN/m para 28,40 mN/m com a Concentração Micelar Crítica (CMC) de 0,045 g/L. A CMC é a menor concentração capaz de reduzir ao máximo a tensão superficial da água. A CMC do extrato vegetal contido na *E. crassipes* foi mais alta que a CMC do biossurfactante bacteriano, mesmo assim o composto tensoativo vegetal reduziu ainda mais a tensão superficial da água, trazendo uma compensação para o volume obtido e indicando uma maior eficiência para o extrato em estudo.

3.2. Estabilidade do extrato vegetal frente à tensão superficial e capacidade de emulsificação

A qualidade de um novo agente surfactante normalmente é avaliada por medidas de tensão superficial e capacidade emulsificante [26].

A tensão superficial, que consiste em mensurar a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos na sua superfície é a maneira mais efetiva de caracterizar um bom biossurfactante. Quanto menor a tensão superficial do biossurfactante, maior a sua efetividade, uma vez que será mais fácil a ocorrência de interação entre as moléculas [27].

Nesse sentido, os testes de estabilidade do biossurfactante foram realizados utilizando o extrato vegetal da *E. crassipes* submetido a diferentes valores de pH, temperatura e concentrações crescentes de NaCl em função da tensão superficial. O extrato vegetal demonstrou estabilidade em sua tensão superficial em todas as condições estabelecidas de pH (Figura 2A), salinidade (Figura 2B), temperatura (Figura 2C) e tempo de aquecimento a 90°C (Figura 2D), demonstrando a alta estabilidade do biotensoativo no estudo.

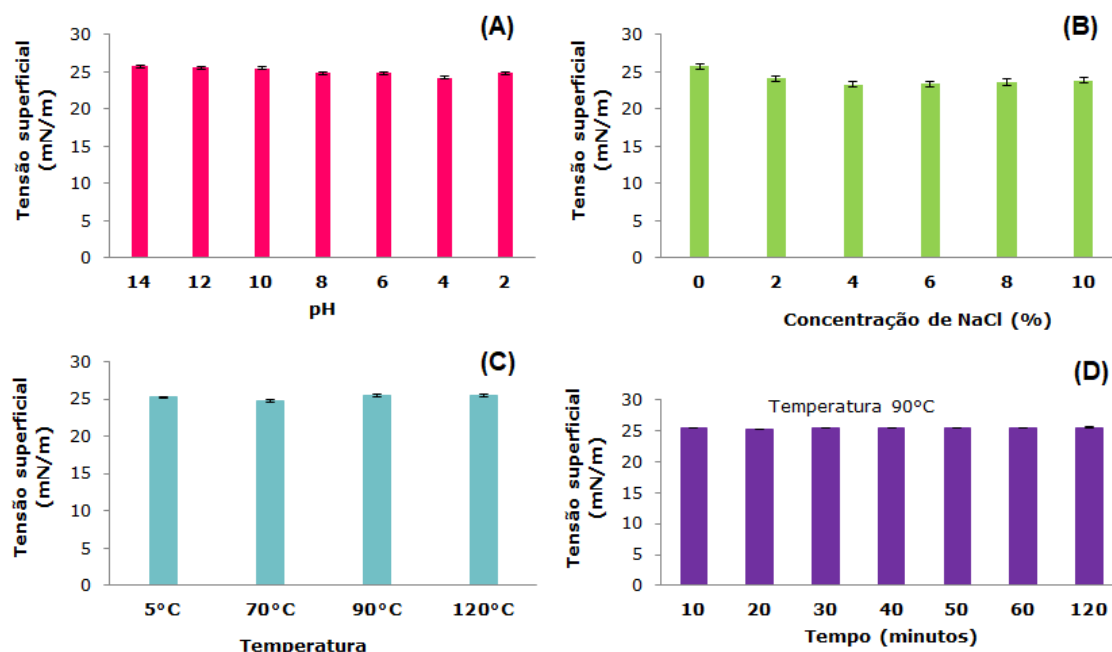


Fig. 2. Estabilidade do extrato vegetal de *E. crassipes* contendo surfactante determinada através da tensão superficial em: (A) diferentes valores de pH; (B) diferentes concentrações de NaCl; (C) diferentes temperaturas e (D) temperatura de 90°C em diferentes intervalos de tempo

Inicialmente, a tensão superficial do extrato vegetal obtido no processo de extração foi de 25,57 mN/m e mantendo-se estável para todos os níveis. Considerando que biossurfactantes potentes descritos na literatura são capazes de reduzir a tensão da água para valores em torno de 30 mN/m, o extrato vegetal obtido apresentou ótimo potencial como agente tensoativo.

A tensão superficial do biossurfactante da bactéria filamentosa *Streptomyces* sp., segundo Santos [15], apresentou uma constância no pH 2 e pH 12 ($30,23 \pm 0,04$ mN/m), mas na faixa intermediária de pH (4, 6, 8 e 10), a tensão foi levemente alterada, apresentando valores entre 27,14 mN/m e 30,26 mN/m. No caso das concentrações de NaCl de 0% a 100%, os valores obtidos foram entre 33,38 mN/m e 30,06 mN/m. Com relação à variação da temperatura, a propriedade tensoativa foi estável de 4°C a 80°C, mas teve um aumento na faixa de 100°C e 120°C (29,06 a 30,19 mN/m). Assim, os valores de tensão superficial obtidos para o surfactante contido no extrato vegetal da *E. crassipes* (Figura 1) foram mais significativos e mais estáveis em comparação aos valores do biossurfactante bacteriano descrito.

Em adição à tensão superficial e/ou interfacial, a estabilidade de emulsões óleo/água também é muito utilizada como um indicador de atividade superficial, embora a habilidade de

uma molécula em formar uma emulsão estável não esteja sempre associada à redução da tensão superficial [26].

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida se encontra dispersa como gotas microscópicas em uma outra fase líquida contínua. Quando um líquido é disperso em outro, as pequenas gotas formadas promovem uma grande quantidade de área interfacial e superficial. Na presença de surfactantes, as emulsões formadas podem permanecer estáveis através da redução da tensão interfacial e da redução do grau de coalescência [3].

A maioria dos surfactantes microbianos é específica para determinados substratos, solubilizando ou emulsificando diferentes hidrocarbonetos em proporções variáveis. A capacidade reduzida ou até mesmo a total incapacidade de emulsificar alguns hidrocarbonetos, pode ser devido à incapacidade de estabilizar as gotículas microscópicas [4].

Assim, a estabilização de emulsões de óleo em água e vice-versa pode ser utilizada, ao lado da tensão superficial e interfacial, como um indicador de atividade surfactante.

Testes da atividade de emulsificação foram realizados para os seguintes compostos: óleo de motor, óleo diesel, querosene, n-hexadecano, óleo de milho, e óleo de soja. Os resultados obtidos para o óleo motor, para o diesel, para o querosene, para o n-hexadecano, para o óleo de milho e óleo de soja foram de 67,4%, 40,4%, 43,6%, 46,7%, 42,5% e 35,6% respectivamente, indicando maior afinidade dos extratos vegetais pelo óleo de motor (Figura 3).

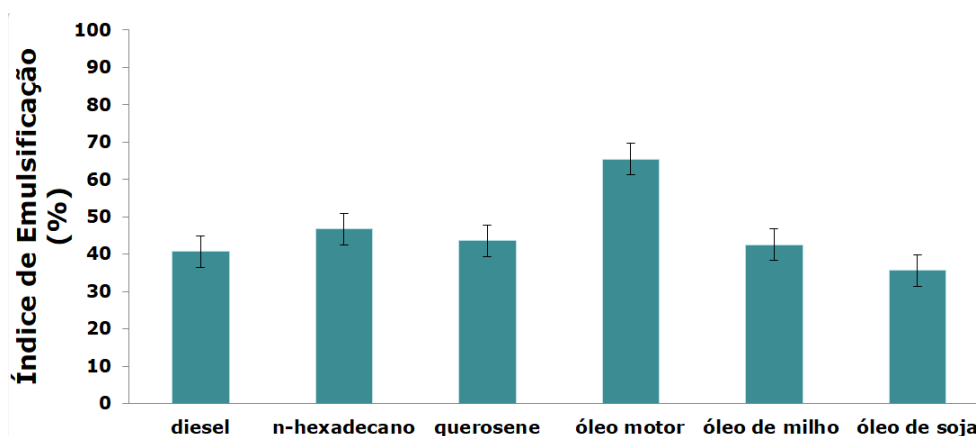


Fig. 3. Índice de emulsificação do extrato vegetal de *E. crassipes* contendo biossurfactante em diferentes substratos hidrofóbicos

Embora a capacidade de emulsificação dos óleos vegetais seja comparável às obtidas com biossurfactantes microbianos descritos na literatura, esses resultados são significativos quando comparados aos relatados por Lima [28], utilizando *E. crassipes* (Mart.), coletadas de águas contaminadas com óleo, para avaliar seu potencial de produção de biossurfactantes, obtiveram redução da tensão superficial de 51,03 mN/m e índice de emulsificação de 52,0%.

Segundo Silva [29], os índices de emulsão do biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas cepacia* foram maiores utilizando os substratos óleo motor e óleo diesel, respectivamente, com valores de $90,0 \pm 4,35\%$ e $51,2 \pm 3,40\%$. Já a emulsão do querosene, n-hexadecano e óleo de soja foram menores para esse biossurfactante, respectivamente, com valores de $10,50 \pm 3,02\%$, $6,02 \pm 1,35\%$ e $6,02 \pm 2,50\%$. Isso demonstra uma maior flexibilidade na utilização do extrato vegetal da *E. crassipes* para fins de emulsão.

Em função das raízes usadas na extração, a taxa de emulsão, que reflete a capacidade do biossurfactante solubilizar óleos provenientes de derramamentos no meio ambiente, pode aumentar de acordo com o tipo e a quantidade de raízes utilizadas.

3.3. Determinação do teor de saponina no extrato de *E. crassipes*

Geralmente, qualquer parte da planta pode conter vários ingredientes ativos. Entre as plantas, os compostos ativos surfactantes são as saponinas, que tradicionalmente são usadas como detergentes naturais. O nome 'saponin' vem da palavra latina 'sapo', que significa 'sabão', pois as saponinas mostram as propriedades únicas de agentes espumantes e emulsionantes [30]. Nesse sentido, o teor de saponinas foi avaliado no extrato de *E. crassipes*. O resultado da curva de calibração está exposto na Figura 4. Com base na equação da reta, foi possível indicar uma concentração de 1,29 g/L de compostos com características que podem indicar a presença de saponina no extrato vegetal. Esse valor pode ser considerado favorável em comparação à concentração de saponina encontrada no açafrão (*Crocus sativa*), que está entre 1,2 e 3,4 g/L [31] e no alimento *Tahini Halvah*, que está entre 0,032 a 0,172 g/L [32], indicando a contribuição desses compostos na atividade surfactante do extrato avaliado.

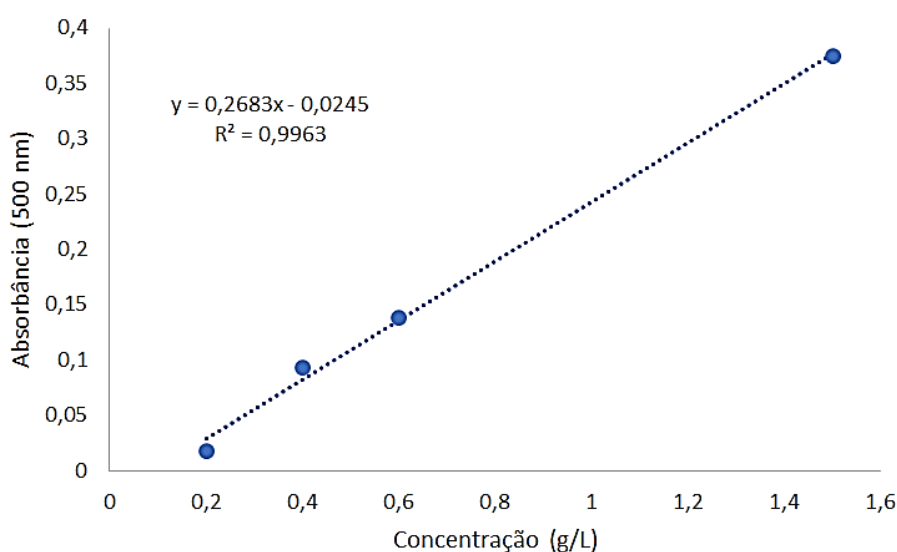


Fig. 4. Curva de calibração do padrão de saponina junto com a equação da reta e coeficiente de determinação para o extrato de *E. crassipes*

3.4. Caracterização química do extrato vegetal da *E. crassipes*

A caracterização do extrato vegetal utilizando espectroscopia de RMN tem sido descrita na literatura [33]. Portanto, a composição do extrato contendo surfactante obtido das raízes de *E. crassipes* foi sondada por análise de RMN de ^1H (Figura 5). O espectro ^1H do extrato de *E. crassipes* demonstrou cinco regiões bem definidas. Os sinais entre δ 0,55 e 1,7 ppm sugerem a presença de grupos metílicos e alifáticos no extrato; entre 1,8 e 2,1 ppm e aquelas entre 5,1 e 5,6 ppm indicam a presença de ligações duplas; entre 2,2 e 2,5 ppm sugerem a presença de carbonila e aquelas entre 2,6 e 3,8 ppm correspondem a hidroxila ligada ao carbono. Os sinais a 0 e 7,25 ppm foram atribuídos ao tetrametilsilano e ao sinal residual do solvente (clorofórmio), respectivamente.

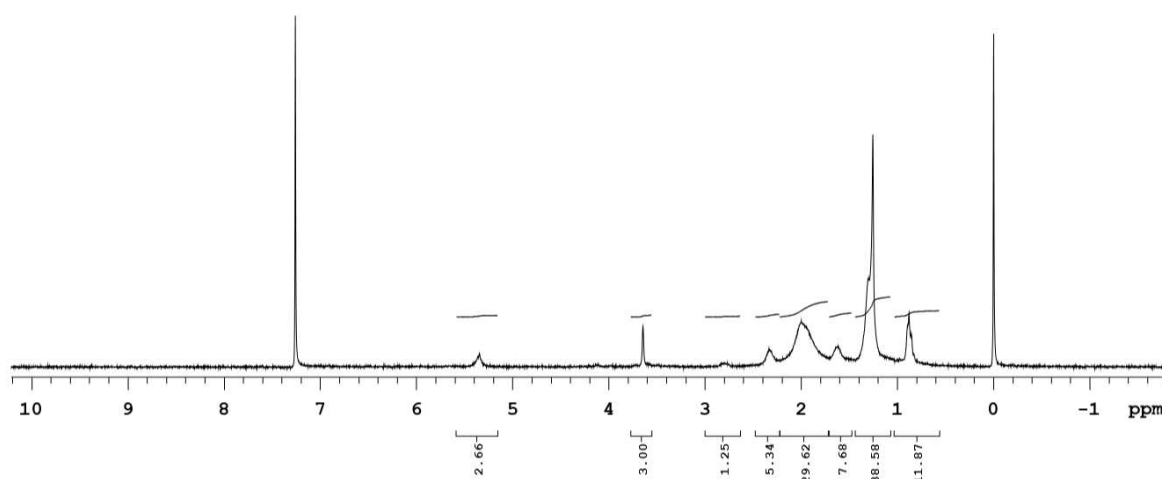


Fig. 5. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do extrato vegetal isolado das raízes de *E. crassipes*

A análise de RMN de ^{13}C , de acordo com a Figura 6, revela sinais dos carbonos alifáticos na região entre 12 e 38 ppm, carbonos ligados às hidroxilas nos sinais entre 40 e 69 ppm, ácido carboxílico entre 176 e 179 ppm. Assim, o extrato vegetal extraído das raízes de *E. crassipes* caracteriza-se por ser um ácido graxo insaturado com hidroxila, semelhantemente ao ácido abiético analisado por Llevot et al. [33]. Tyagi e Agarwal [34]. detectaram a presença de éster de ácido palmítico, que também é um ácido graxo, na *Eichhornia crassipes*. Esse último ácido graxo pode estar contido de forma hidroxilada em saponinas como crocomiosídeos A e B [35].

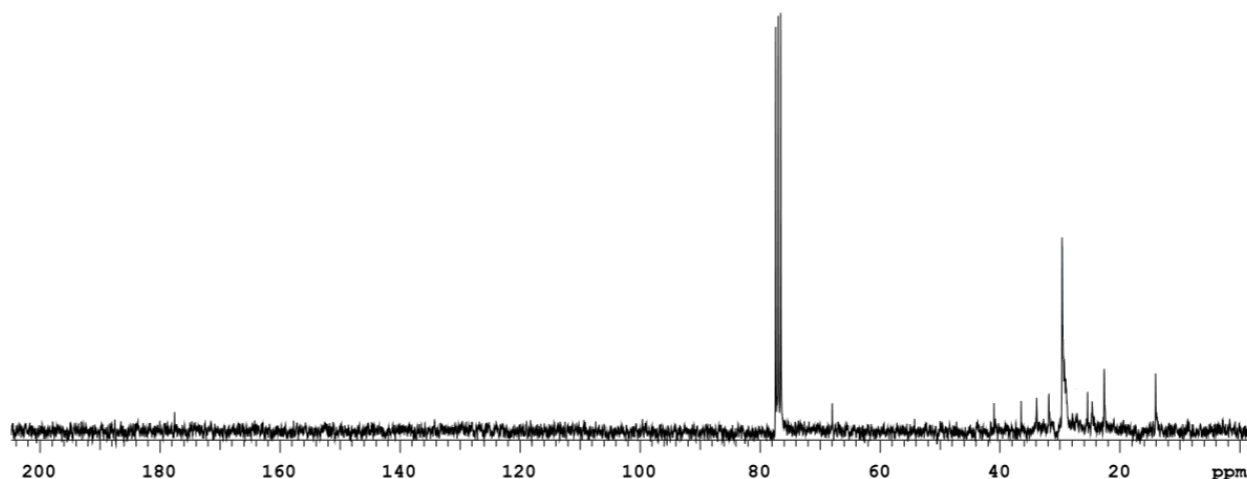


Fig. 6. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) do extrato vegetal isolado das raízes de *E. crassipes*

O resultado da espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) está ilustrado na Figura 7. O alongamento característico entre 3.000 e 3.500 números de onda (cm^{-1}) corresponde à ligação OH, também encontrado por Silva et al. [36] para um biossurfactante microbiano. Já o pico de absorção presente entre 2.800 e 3.000 cm^{-1} pode se referir à deformação axial do ligamento C-H da cadeia carbônica. A ligação C=O é indicada em 1.703 cm^{-1} . Por fim, as vibrações obtidas em 1.595 cm^{-1} e 1.631 cm^{-1} sugerem a presença de ligação dupla na cadeia carbônica.

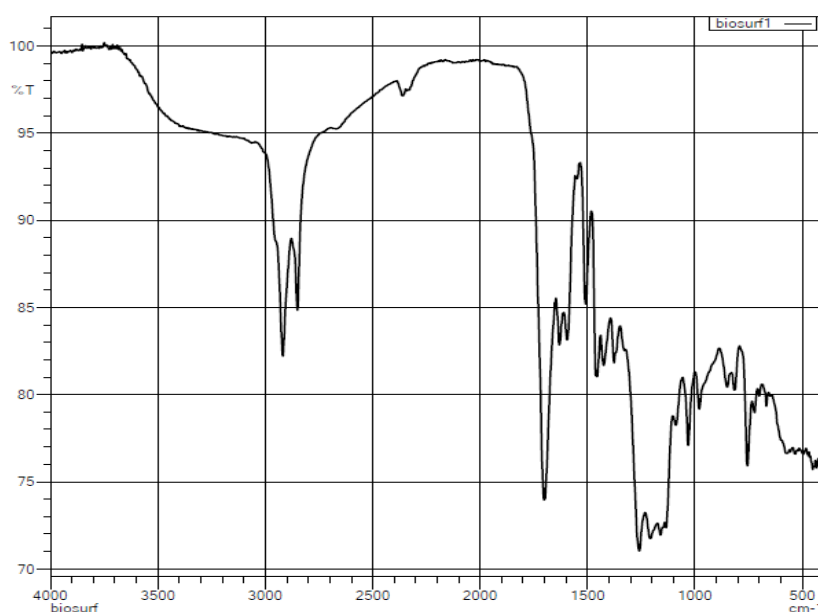


Fig. 7. Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

3.5. Toxicologia do extrato vegetal de *E. crassipes*

O extrato vegetal de *E. crassipes*, conforme a Figura 8, provou ser atóxico para a espécie *Artemia salina*. Neste caso, o agente surfactante do aguapé apresentou apenas 20% de letalidade em 2% de 2,8 g/L (56 mg/L), ou seja, menor do que 50% de letalidade em comparação a avaliação realizada por Ayaz [37], em 31,25 mg/L da saponina da erva-de-bicho (*Polygonum hydropiper*).

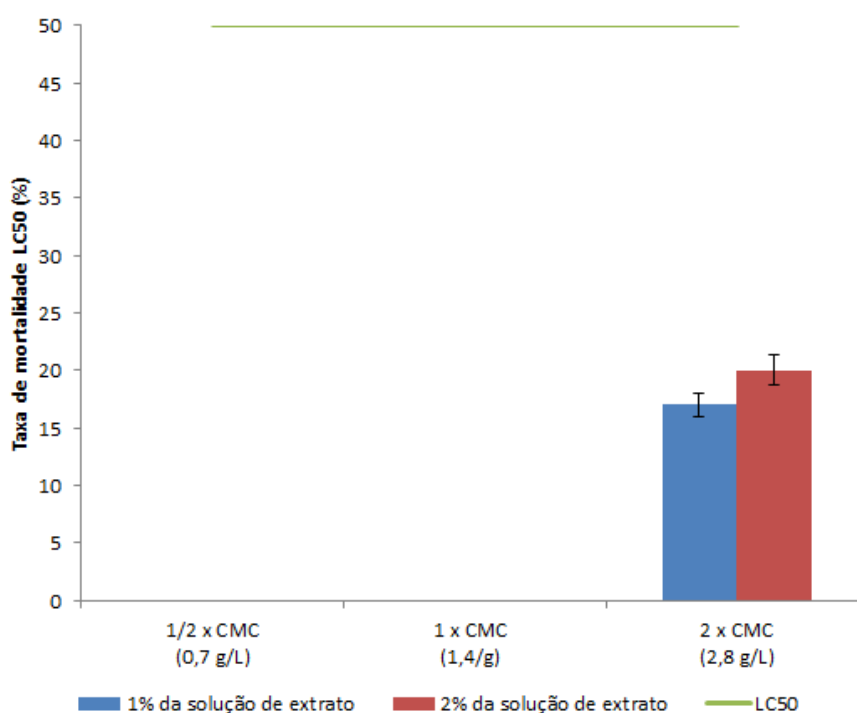


Fig. 8. Mortalidade de *Artemia salina* em percentual com relação às concentrações do extrato vegetal de *E. crassipes*

Os resultados do teste de fitotoxicidade para o repolho (*Brassica oleracea*) estão apresentados na Figura 9. Dessa forma, é possível observar que o índice de germinação em 0,7 g/L do extrato vegetal de *E. crassipes* foi de 98,97%, apresentando valor próximo ao resultado obtido pelo tensoativo vegetal do *Artocarpus heterophyllus* investigado por Almeida [38], que, por sua vez foi de 98% na concentração de 1,0 g/L. Em geral, os índices de germinação, neste estudo, aproximaram-se de 100%.

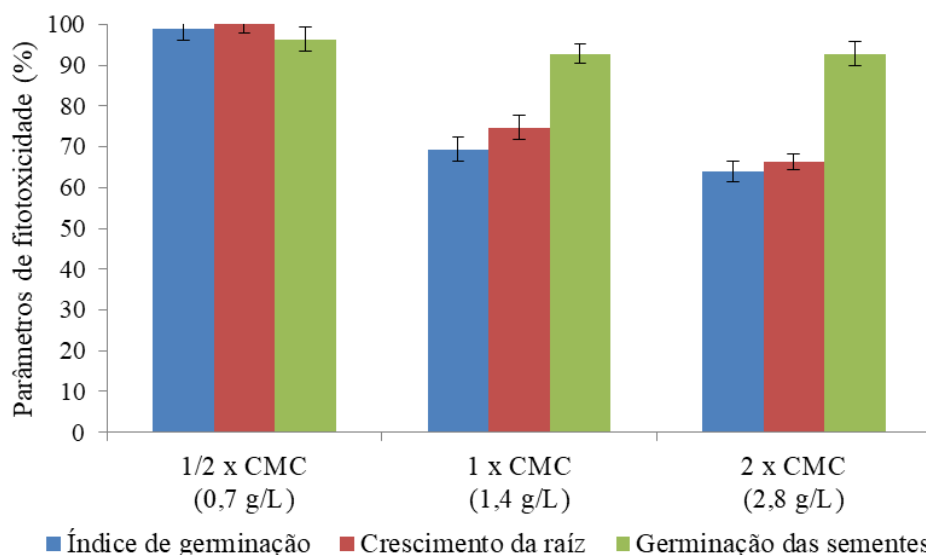


Fig. 9. Parâmetros de fitotoxicidade em percentual para sementes de *Brassica oleracea* com relação às concentrações avaliadas do extrato vegetal de *E. crassipes*

3.6. Dispersão de composto hidrofóbico pelo extrato vegetal em água do mar

A Figura 10 ilustra o potencial dos extratos vegetais na dispersão de manchas de óleo. Os valores obtidos foram proporcionais à razão extrato vegetal:óleo (vol/vol), considerando percentuais de 100, 75 e 50% de dispersão para razões 1:2 (A), 1:8 (B) e 1:25 (C) (vol/vol), respectivamente. Os resultados obtidos sugerem grande potencial do extrato vegetal no direcionamento de derramamentos de petróleo e derivados em ambientes marinhos.

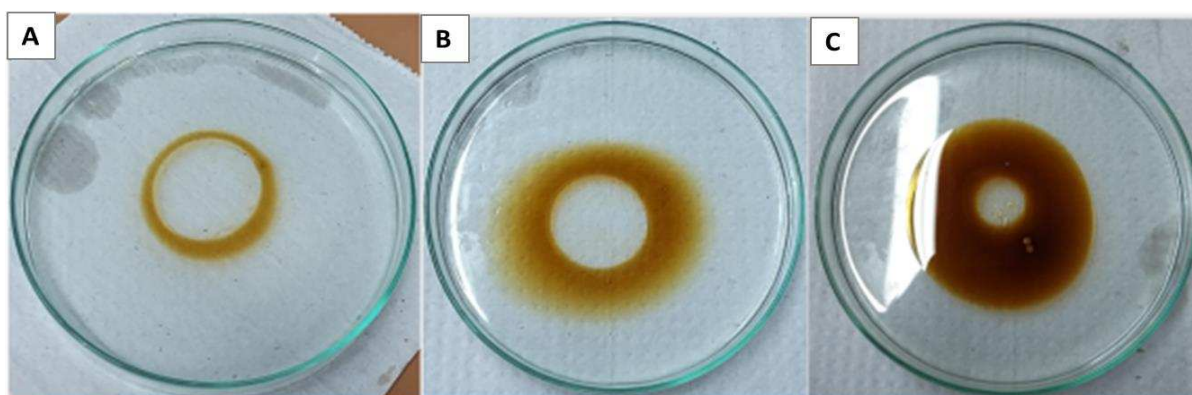


Fig. 10. Ilustração da gota de óleo de motor dispersa por ação dos extratos vegetais contendo surfactante nas razões de extrato vegetal:óleo de 1:2 (A), 1:8 (B) e 1:25 (C) (vol/vol)

O biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com Silva [39], apresentou um índice de dispersão em água do mar próximo de 100% em pH 8 ao estar em contato com o óleo motor, além de valores acima de 70% em condições de aquecimento. O composto tensoativo da bactéria demonstrou ser sensível a altas concentrações de NaCl e os melhores valores de dispersão foram encontrados na proporção 1:25 de biossurfactante/óleo. Assim, pelo fato de o pH da água do mar ser de aproximadamente 8,0 e a salinidade em torno de 3,5%, o biotensoativo descrito demonstrou maiores valores de dispersão para estas condições em água do mar. De forma semelhante, podemos observar nos resultados obtidos para o agente surfactante contido no extrato da macrófita.

3.7. Remoção de óleo motor em areia pelo extrato vegetal de *E. crassipes* em ensaios cinético e estático

O percentual de óleo motor removido da areia nas concentrações do extrato vegetal na metade da CMC, na CMC e em 2 vezes a CMC pelo método cinético e pelas colunas empacotadas se encontram nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Em geral, os dados de remoção foram similares em todas as concentrações utilizadas.

Segundo Chaprão [40], após realizar o mesmo teste, as remoções de óleo motor da areia pelos biossurfactantes produzidos pela bactéria *Bacillus* sp. e pela levedura *Candida sphaerica* foram eficientes, apesar de a remoção pelo biossurfactante bacteriano ter sido um pouco maior, próximo de 85%. O aumento da concentração de biossurfactante não influenciou a remoção do óleo adsorvido na areia.

Tabela 1. Percentual de óleo de motor removido da areia através do método cinético pelo extrato vegetal de *E. crassipes* na metade da CMC, CMC e 2 vezes a CMC

Concentração de extrato vegetal (kg/m ³)	Taxa de óleo removido (%)
0,7 (1/2xCMC)	66,25
1,4 (1xCMC)	67,75
2,8 (2xCMC)	67,50

Tabela 2. Percentual de óleo de motor removido da areia através das colunas empacotadas pelo extrato vegetal de *E. crassipes* na metade da CMC, CMC e 2 vezes a CMC

Concentração de extrato vegetal (kg/m ³)	Taxa de óleo removido (%)
Controle	35,08
0,7 (1/2xCMC)	55,02
1,4 (1xCMC)	57,41
2,8 (2xCMC)	68,04

Os resultados da remoção de óleo motor da areia pelo extrato vegetal de *E. crassipes* na metade da CMC, na CMC e em 2 vezes a CMC são considerados promissores se considerar os resultados obtidos por Rufino et al. [21], utilizando biossurfactante isolado de *Candida lipolytica* em solos compactados em colunas utilizando caldo livre de células, com uma remoção máxima de óleo de 30% para argila e 33,1% e 37,3% em areia, utilizando concentrações isoladas de biossurfactante a 1 x CMC e 3 x CMC, respectivamente.

Apesar disso, o mecanismo de remoção efetuado pelo extrato vegetal foi a mobilização, similarmente como ocorreu com a levedura, pois o aumento da concentração não influenciou significativamente nos resultados.

A mobilização se dá por concentrações de biossurfactantes abaixo da CMC com a redução da tensão interfacial e consequentemente da força capilar de repulsão do solo com o óleo. Já o mecanismo de solubilização ocorre quando as concentrações dos compostos tensoativos estão acima da CMC, onde a parte hidrofóbica das micelas se liga ao óleo e a parte hidrofílica externa permite que o sistema com diferentes polaridades esteja em solução [40].

3.8. Remoção de metais pesados pelo extrato vegetal de *E. crassipes*

A remoção de metais pesados contidos em efluente sintético pelo extrato vegetal de *E. crassipes* estão descritos na Tabela 3. Valores em torno de 59% de remoção tanto para Cu como para Zn foram alcançados. Esses resultados foram considerados bons ao serem comparados com os do biossurfactante produzido pela levedura *Candida tropicalis* UCP0996 [41], que por sua vez demonstrou valores próximos de 90%. Por outro lado, ao comparar os percentuais de remoção de metais pesados obtidos nesse trabalho com as remoções obtidas para saponinas, de 85-98% de Zn [42].

Tabela 3. Condutividade da solução de metais pesados, os quais foram removidos do efluente sintético pelo extrato vegetal de *E. crassipes* na metade da CMC e na CMC

Metal pesado	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) da solução metálica	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) solução metálica pós-tratamento	
		1/2 CMC	CMC
Zn	1986 $\pm$ 30	864,0 $\pm$ 0,1	864,7 $\pm$ 23,5
Cu	2557 $\pm$ 35	1037,0 $\pm$ 28,9	985,3 $\pm$ 25,6
Pb	1150 $\pm$ 37	830,7 $\pm$ 10,4	886,7 $\pm$ 22,5

4. Conclusões

A pesquisa relacionada aos biossurfactantes tem demonstrado vasto campo de aplicação, por conta da necessidade atual da substituição de compostos sintéticos por naturais. O agente surfactante obtido nos extratos vegetais de *E. crassipes* foi considerado promissor no contexto do controle da poluição ambiental causada por compostos oleosos derivados do petróleo. As propriedades tensoativas, assim como os resultados dos experimentos de dispersão e remoção de óleo demonstraram claramente a viabilidade de aplicação desse extrato vegetal com propriedades surfactantes como aditivo biotecnológico para os processos de remediação que considerem a preservação e a redução dos impactos ambientais sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres, aspectos essenciais para a manutenção da qualidade de vida e do bem-estar social e ambiental.

Agradecimentos: Este estudo foi realizado com apoio financeiro de projeto de pesquisa desenvolvido pelo Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), com assistência da equipe do Laboratório de Bioengenharia da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP). Os autores também são gratos às agências de fomento brasileiras, Coordenação de Desenvolvimento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- [1] K.G.O. Bezerra, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics, *Biotechnol. Prog.* 34 (2018) 1482–1493. <https://doi.org/10.1002/btpr.2682>.

- [2] A.A. Jimoh, J. Lin, Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 184 (2019) 109607.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>.
- [3] R.C.F.S. Silva, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>.
- [4] N.M.P. Rocha e Silva, H.M. Meira, F.C.G. Almeida, R. de C.F. Soares da Silva, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. dos Santos, L.A. Sarubbo, Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry, *Sep. Purif. Rev.* 48 (2019) 267–281.
<https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1474477>.
- [5] J.M. Campos, T.L.M. Stamford, L.A. Sarubbo, J.M. Luna, R.D. Rufino, I.M. Banat, Microbial biosurfactants as additives for food industries, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>.
- [6] D.G. Almeida, R. de C.F. Soares da Silva, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. dos Santos, I.M. Banat, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>.
- [7] H. Ren, S. Zhou, B. Wang, L. Peng, X. Li, Treatment mechanism of sludge containing highly viscous heavy oil using biosurfactant, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 585 (2020) 124117. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124117>.
- [8] U.F.C. Sayago, Y.P. Castro, L.R.C. Rivera, A.G. Mariaca, Estimation of equilibrium times and maximum capacity of adsorption of heavy metals by *E. crassipes*, *Environ. Monit. Assess.* 192 (2020) 141. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8032-9>.
- [9] T.T. Almeida, R.C. Orlandelli, J.L. Azevedo, J.A. Pamphile, Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil, *Genet. Mol. Res.* 14 (2015) 4920–4931.
<https://doi.org/10.4238/2015.May.11.25>.
- [10] M.A. Bote, V.R. Naik, K.B. Jagadeeshgouda, Review on water hyacinth weed as a potential bio fuel crop to meet collective energy needs, *Mater. Sci. Energy Technol.* 3 (2020) 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.02.003>.
- [11] W.H.T. Ting, I.A.W. Tan, S.F. Salleh, N.A. Wahab, Application of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for phytoremediation of ammoniacal nitrogen: a review, *J. Water Process Eng.* 22 (2018) 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.02.011>.
- [12] W.C. Wanyonyi, J.M. Onyari, P.M. Shiundu, Adsorption of Congo Red dye from aqueous solutions using roots of *Eichhornia crassipes*: kinetic and equilibrium studies, *Energy*

- Procedia. 50 (2014) 862–869. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.06.105>.
- [13] H. Abbasi, M.M. Hamed, T.B. Lotfabad, H.S. Zahiri, H. Sharafi, F. Masoomi, A.A. Moosavi-Movahedi, A. Ortiz, M. Amanlou, K.A. Noghabi, Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant, J. Biosci. Bioeng. 113 (2012) 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.002>.
- [14] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface-active agents from two *Bacillus* species, Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 224–229. [https://doi.org/10.1009/0099-2240\(87\)020224](https://doi.org/10.1009/0099-2240(87)020224).
- [15] A.P.P. Santos, M.D.S. Silva, E.V.L. Costa, R.D. Rufino, V.A. Santos, C.S. Ramos, L.A. Sarubbo, A.L.F. Porto, Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region, Brazilian J. Med. Biol. Res. 51 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176657>.
- [16] S. Hiai, H. Oura, T. Nakajima, Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid, Planta Med. 29 (1976) 116–122.
- [17] S.J. Varjani, V.N. Upasani, Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant, Bioresour. Technol. 221 (2016) 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.080>.
- [18] S.M. Tiquia, N.F.Y. Tam, I.J. Hodgkiss, Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter, Environ. Pollut. 93 (1996) 249–256. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(96\)00091-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(96)00091-9).
- [19] S.N.R.L. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 79 (2010) 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>.
- [20] H. Saeki, M. Sasaki, K. Komatsu, A. Miura, H. Matsuda, Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058, Bioresour. Technol. 100 (2009) 572–577. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.046>.
- [21] R.D. Rufino, J.M. Luna, P.H.C. Marinho, C.B.B. Farias, S.R.M. Ferreira, L.A. Sarubbo, Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*, J. Pet. Sci. Eng. 109 (2013) 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2013.08.014>.
- [22] N.M.P. Rocha e Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates, Biocatal.

- Agric. Biotechnol. 3 (2014) 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005>.
- [23] B. Dahrazma, C.N. Mulligan, Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration, Chemosphere. 69 (2007) 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.037>.
- [24] P. Das, S. Mukherjee, R. Sen, Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties, Bioresour. Technol. 100 (2009) 4887–4890. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.028>.
- [25] W.J. Liu, X.D. Duan, L.P. Wu, K. Masakorala, Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SNP0614 and its effect on biodegradation of petroleum, Appl. Biochem. Microbiol. 54 (2018) 155–162. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020060>.
- [26] L.A. Sarubbo, R.B. Rocha Júnior, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. Santos, I.M. Banat, Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants, Chem. Ecol. 31 (2015) 707–723. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>.
- [27] D.K.F. Santos, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century, Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.
- [28] J.M.S. Lima, J.O. Pereira, I.H. Batista, P.Q. Costa Neto, J.C. Santos, S.P. Araújo, M.C. Pantoja, A.J. Mota, J.L. Azevedo, Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil, African J. Biotechnol. 15 (2016) 1217–1223. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.15131>.
- [29] R.C.F.S. Silva, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, Int. J. Mol. Sci. 15 (2014) 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>.
- [30] D Kregiel, J. Berlowska, I. Witonska, H. Antolak, C. Proestos, M. Babic, L. Babic, B. Zhang. Saponin-based, biological-active surfactants from plants, in: R. Najjar (Eds.), Application and Characterization of Surfactants, IntechOpen, London, 2017, pp. 183-205. <https://doi.org/10.5772/68062>
- [31] M.A. Mir, K. Parihar, U. Tabasum, E. Kumari, Estimation of alkaloid, saponin and flavonoid, content in various extracts of *Crocus sativa*, J. Med. Plants Stud. 4 (2016) 171–174.
- [32] A.E.C. Sezgin, N. Artik, Determination of saponin content in turkish Tahini Halvah by using HPLC, Adv. J. Food Sci. Technol. 2 (2010) 109–115.
- [33] A. Llevot, E. Grau, S. Carlloti, S. Grelier, H. Cramail, Dimerization of abietic acid for the design of renewable polymers by ADMET, Eur. Polym. J. 67 (2015) 409–417.

- <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.10.021>.
- [34] T. Tyagi, M. Agarwal, Phytochemical screenig and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms, J. Pharmacogn. Phytochem. 6 (2017) 195–206.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.10.021>.
- [35] K. Hostettmann, A. Marston, Saponins, in: J. D. Phillipson, D. C. Ayres, H. Baxter (Eds.), Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Cambridge University Press, New York, 2005, pp. 18-121.
- [36] E.J. Silva, I.A. Silva, P.P.F. Brasileiro, P.F. Correa, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Treatment of oily effluent using a low-cost biosurfactant in a flotation system, Biodegradat. 30 (2019) 335–350. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09881-y>.
- [37] M. Ayaz, M. Junaid, F. Ullah, A. Sadiq, F. Subhan, M.A. Khan, W. Ahmad, G. Ali, M. Imran, S. Ahmad, Molecularly characterized solvent extracts and saponins from *Polygonum hydropiper* L. show high anti-angiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity, Front. Pharmacol. 7 (2016) 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00074>.
- [38] F.C.G. Almeida, N.M.P. Rocha e Silva, T.C. Souza, D. G. Almeida, J.M. Luna, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Surfactant activity of *Artocarpus heterophyllus* fruit extract and application in oil removal of solid surface, Chem. Eng. Trans. 74 (2019) 1135–1140. <https://doi.org/10.3303/CET1974190>.
- [39] E.J. Silva, P.F. Correa, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation, Colloids and Surfaces B Biointerfaces. 172 (2018) 127–135.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.034>.
- [40] M.J. Chaprão, I.N.S Ferreira, P.F. Correa, R.D. Rufino, J.M. Luna, E.J. Silva, L.A. Sarubbo, Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand, Electron. J. Biotechnol. 18 (2015) 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.005>.
- [41] R.B. Rocha Junior, H.M. Meira, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes, Biodegradat. 30 (2019) 215–233. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9833-1>.
- [42] K-J. Hong, S. Tokunaga, T. Kajiuchi. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. Chemosphere 49 (2002) 379–387. PII: S0045-6535 (02)00321-1.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nessa pesquisa permitem as seguintes conclusões:

- A *Eichhornia crassipes* apresenta potencial como insumo biotecnológico de elevado valor agregado, considerando seu uso como fitorremediador e gerador de agentes tensoativos.
- A combinação das tecnologias de FAD e *wetlands* construídos foi satisfatória como estratégia eficiente de tratamento de águas oleosas geradas em ambientes industriais.
- A *E. crassipes* pode ser considerada como uma planta promissora para utilização em *wetlands* construídos no controle da poluição ambiental causada por compostos oleosos derivados do petróleo.
- As propriedades tensoativas, assim como os resultados dos experimentos de estabilidade e toxicidade demonstram claramente a viabilidade de aplicação desse extrato vegetal como aditivo biotecnológico em diversos processos ambientais.
- Há grande indício de que o extrato da planta indicou pela curva de calibração uma concentração significativa de saponina e foi considerado como um ácido graxo insaturado na caracterização química.
- O extrato vegetal obtido demonstrou grande desempenho na remoção de petroderivado adsorvido em areia sob condições estáticas e cinéticas e nos testes de dispersão de óleo em água do mar, exibindo potencial para aplicação no controle da poluição ambiental causada por compostos oleosos derivados do petróleo.
- O agente surfactante obtido do reaproveitamento de *E. crassipes* pode ser considerado promissor para preservação e a redução dos impactos ambientais sobre os ecossistemas aquáticos essenciais para a manutenção da qualidade de vida e do bem-estar social.

APÊNDICE

*ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO **ENVIRONMENTAL
ENGINEERING AND MANAGEMENT JOURNAL***
Qualis A4



“Gheorghe Asachi” Technical University of Iasi, Romania



STUDY OF AN OILY WATER TREATMENT PROCESS IN A PILOT HYBRID SYSTEM COMBINING AIR FLOTATION AND A CONSTRUCTED WETLAND: DATA ANALYSIS, EFFICIENCY OPTIMIZATION AND SCALE-UP

Alexandre Augusto Paredes Selva Filho¹, Laís Alexandre do Nascimento^{2,3},
Raquel Diniz Rufino^{1,2}, Juliana Moura de Luna^{1,2}, Pedro Pinto Ferreira Brasileiro^{2,3}, Rita de
Cássia Freire Soares da Silva^{1,2}, Mohand Benachour^{2,3},
Valdemir Alexandre dos Santos^{1,2}, Leonie Asfora Sarubbo^{1,2*}

¹Science and Technology Center, Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil

²Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Rua Joaquim de Brito, n. 216, Boa Vista, CEP 50070-280, Recife-Pernambuco, Brasil

³Technology and Geoscience Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

Abstract

In this study, we developed a hybrid system for the treatment of oily water composed of two pilot-scale prototypes combining physicochemical and biological separation methods. Oily water flowed through a dissolved air flotation (DAF) prototype in the first step. At the exit of this prototype, part of the water was saturated with atmospheric air and sent back into the DAF chamber with the aid of a centrifuge pump and the injection of microbubbles. The other part of the treated water fed a constructed wetland prototype involving floating macrophytes of the species *Eichhornia crassipes*. With the aid of a central composite rotatable design (CCRD, with two operating parameters) and the response surface methodology (RSM), a predictive statistical model was created for the operating conditions associated with an optimal oil-water separation efficiency of around 97% of the initial concentration of 120 ppm of oil, which is much higher than the concentration permitted by environmental legislation in Brazil (20 ppm). The efficiency results are discussed and interpreted based on the phenomena of physical and mechanical liquid particles. The combination of DAF and constructed wetland methods for oily water treatment without the addition of a coagulant/flocculant agent achieved quite satisfactory results and proved to be an eco-friendly technology. Hydraulic similarity laws were used to obtain scale-up correlations for designing the size of pilot plant equipment for the treatment of oily water with the proposed hybrid process.

Key words: central composite rotatable design, dissolved air flotation, *Eichhornia crassipes*, liquid-liquid separation, oily water, wetlands

Received: March, 2020; Revised final: July, 2020; Accepted: September, 2020; Published in final edited form: February, 2021

1. Introduction

Residual oily water results from the production, transportation and use of petroleum and petroleum by-

products. The shearing caused by pumps, valves and other equipment disperses oil in water, forming an emulsion that can be highly stabilized by the presence of finely divided solids, natural surfactant substances

and other reagents added during the production process of lubricating oils and fuels (Rocha e Silva et al., 2018). The discarding of this residue is only permitted after the removal of oil and suspended solids to acceptable international levels (Rocha e Silva et al., 2018).

The increase in the volume of residual oily water in the past decade and the discharge of this type of effluent into the environment has become a significant concern (Al-Ghouti et al., 2019; Jafarinejad and Jiang, 2019).

Free-floating oil is easily removed with a decanter, hydrocyclone, centrifuge or flotation device capable of separating suspended oil droplets due to the difference in density (Santander et al., 2011). However, it is not enough to remove only the free-floating oil; the removal of oil in emulsion form is equally essential.

Oily water is conventionally treated with different physical, chemical and biological methods (Rocha e Silva et al., 2018). Compact physicochemical systems are commonly employed for situations in which space is limited, such as offshore rigs. However, many chemical treatments are costly and produce harmful sludge. At onshore facilities, the addition of a biological post-treatment polishing step is an environmentally friendly method (Abdullah et al., 2020; Stefanakis et al., 2016). Methods such as ultrafiltration and/or membrane filtration have been used to refine the final effluent (Lu et al., 2018; Tawalbeh et al., 2018). When there is a need for less expensive solutions, efforts can be concentrated on combining physicochemical and biological treatment technologies for the purposes of reuse or safer discharge (Rocha e Silva et al., 2015).

In recent years, a physicochemical method denominated dissolved air flotation (DAF) has demonstrated promising results in the efficient separation of liquid-liquid and non-miscible mixtures, such as oil in water. With this method, microbubbles produced with a gas (generally air) are added to the oily water and adhere to the oil droplets in a stable manner due to the hydrophobic nature of oil. This leads to the formation of an oil-microbubble system with a lower density than the surrounding water, regardless of the addition of a chemical agent to destabilize the emulsion. As separation speed is also directly proportional to the difference in the densities of the phases, the formed oil-gas system tends to migrate to the surface of the medium much faster and more efficiently, where it accumulates and can be easily removed (Rocha e Silva et al., 2018).

Constructed wetlands with surface flow are constitute a biological treatment technology inspired by natural environments, such as lakes and swamps, and can be used in the removal of excess nutrients and pollutants, such as heavy metals and oily residues (Vymazal, 2014). Such systems consist of a channel, input and output devices, and aquatic plants (macrophytes). The operational ease and considerable adaptability of the constructed wetland design favor pollutant removal mechanisms. The use of additional

equipment provides greater hydraulic control of the wetlands, thereby optimizing the treatment process.

An effluent treatment system based on aquatic macrophytes may be defined as a natural process in which the plants play the role in the removal of residues (Lakatos et al., 2014). Aquatic macrophytes constitute an important community in shallow-water ecosystems with a high rate of primary production, participating in nutrient recycling and providing food for herbivores and detritivores. Floodplain lakes in Brazil are rich in aquatic macrophytes, including the abundant free-floating *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) (Villamagna and Murphy, 2010).

E. crassipes, also known as water hyacinth, is one of the most widely used species in constructed wetlands due to its adaptation to hostile environments. Its low sensitivity to oil makes this species suitable for use in the treatment of oily effluents in constructed wetlands (Crema et al., 2012). The water hyacinth root system vertically fills the entire length of the wetland, increasing the contact of the effluent with microorganisms on the macrophyte roots and slowing the flow of the fluid to enhance the effect of gravity on the pollutants (Gunathilake et al., 2018; Kadlec and Wallace, 2009).

In this work, a synthetic lubricating oil was treated in a pilot hybrid system combining a DAF prototype without addition of chemical collectors and a constructed wetland prototype involving *E. crassipes*. The efficiency of the treatment process in the single hybrid configuration was evaluated based on two operational parameters and modelled using a statistical approach. The results were interpreted considering physical-mechanical phenomena and the process was optimized by adjusting the operational conditions with the aid of a central composite rotatable design (CCRD) for maximal efficiency of the treatment process. We complete the study by dimensioning the different equipment involved in the hybrid plant to enable an industrial scale-up using dimensionless analysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Individuals of *E. crassipes* (higher than 20 cm) were collected from natural freshwater habitats in the city of Recife, Brazil, where the species is abundant. This macrophyte was chosen due to its tolerance to oil.

Oily water was prepared with 120 ppm of lubricating oil. The concentration of the synthetic effluent was obtained by saturating water with the oil through intense mixing with the aid of a centrifugal pump and a drum. Preliminary experimental tests demonstrated a constant oil content in the water by physical saturation, thereby achieving a synthetic effluent consisting of a constant concentration of the oil-water slurry. Motor oil (type SAE 20W-50; PETROBRAS) was used as the contaminant oil. This flex engine oil (gasoline, VNG and alcohol) consists of

a paraffin-based lubricating oil, i.e., a complex mixture of hydrocarbons and additives.

2.2. Dissolved air flotation pilot unit

Fig. 1 shows the side view of the DAF pilot prototype previously designed and constructed for oil-water separation tests using a synthetic fluid (Vasconcelos et al., 2015). An oily water input duct is seen on the left of the Fig. (1). The fluid enters the lower portion of the mixture chamber (2), which is equipped with a mechanical agitator (3) driven by an electric motor (4). A test chamber was also designed for use when an auxiliary oil-in-water emulsion destabilization substance is needed (5). A static mixer is used for the destabilization of the emulsion (6). The oil-in-water emulsion comes into contact with the flow of microbubbles emitted from a diffuser (7). In the first floatation chamber (8), oily foam appears as the result of the aggregation of the air microbubbles and oil droplets dispersed in the aqueous phase. Through flotation due to differences in density, the oil foam is gathered into a collector (9) and the water passes through a second floatation chamber (10) for the interaction with an additional flow of microbubbles. The flow of microbubbles reaches the floatation chambers through distribution ducts (11) with the aid of a valve (12) for pressurization and control. The treated water is then sent through two subsequent chambers (13 and 14), the latter of which (14) has a centrifuge pump (15) that re-circulates part of the water for the production of microbubbles. At the base of this chamber, a duct (16) releases the treated water for reuse or discharge into the original aquatic environment. The floated oil is collected by ducts at the surface for a suitable treatment. All experiments were conducted for one hour.

A large part of the DAF pilot prototype, such as the floatation chamber walls, was made from transparent acrylic measuring 10 mm in thickness. The framework of the prototype was made from type L carbon steel measuring 1 inch in thickness. The prototype can hold a total volume of 1.55 m³. Levelling of the framework was necessary to achieve greater separation efficiency of the floated oily foam and water column.

The level of liquid in the DAF prototype was monitored with the aid of the LabView computational software program (Galdino et al., 2015). Control and monitoring activities of the process were performed. Different reference values ("set points") were stipulated to define the height of the interface between the water and oily foam formed in the DAF chamber. The information from the sensor was sent to an interface through a data acquisition board. The aqueous flows were measured by the YF-S403 and YF-S201 sensors and air flow was controlled by a rotameter from 1 to 15 L·h⁻¹.

2.3. Constructed wetland pilot prototype

As a biological step of the treatment system, a constructed wetland pilot prototype was designed involving the floating macrophyte *E. crassipes* (Ansari et al., 2020; Colares et al., 2020). The wetland prototype was based on three analogies through operational similarities (Kunes, 2012): i) rectangular channel with width twice the height of the sides and the upper portion of the liquid subjected to atmospheric pressure. The movement does not depend on internal pressure, but rather the slope of the bottom of the wetland and the surface of the liquid; ii) continuous decanter - the two phases continuously enter one end of the wetland. The length-to-hydraulic diameter ratio enables adequate separation conditions for the two phases. The flow of treated water is continuously removed from the wetland with the aid of closed conduits located at the output end of the equipment.

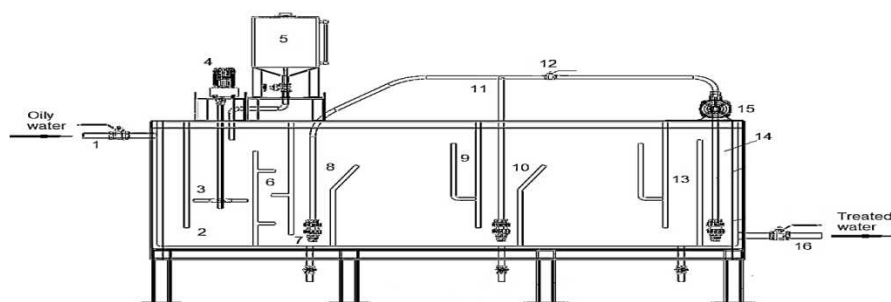


Fig. 1. Schematic (side view) of DAF pilot prototype (Vasconcelos et al., 2015). 1 - Oily water input duct. 2 - Mixture chamber. 3 - Mechanical agitator. 4 - Electric motor. 5 - Auxiliary chamber. 6 - Static mixer. 7 - Diffuser. 8 - First floatation chamber. 9 - Collector. 10 - Second floatation chamber. 11 - Distribution ducts. 12 - Pressurization and control valve. 13 and 14 - Subsequent chambers. 15 - Centrifuge pump. 16 - Duct

A length-to-hydraulic diameter ratio greater than tenfold enables excellent separation efficiency; iii) a semi-continuous reactor characterized by the maintenance of the organic phase in contact with the macrophyte shoots (batch system) and a continuous flow of the aqueous phase. First-order kinetics were adopted based on previous studies to enable the estimation of the kinetic constant of the reaction and define the period of pruning of the plants (macrophyte density). The number of seedlings was based on the kinetics of a first-order reaction (Lakatos et al., 2014).

Fig. 2 displays a partial view of the constructed wetland pilot prototype. Four wetland units were constructed with plates of transparent polycarbonate measuring 10 mm in thickness (dimensions: 3 m in length, 0.6 m in height and 0.8 m in width). After installation in an open location, the wetland prototypes were filled with water to a height of 0.4 m and each tank was stocked with 40 seedlings of the species *E. crassipes*.



Fig 2. Wetlands constructed in transparent polycarbonate with floating macrophytes

The height of the runoff liquid was maintained at 60% of the height of the channel to avoid overflow

in cases of excessive rainfall. The macrophyte density in each wetland was between 30 and 40 seedlings per meter squared (Kunes, 2012). The liquid is fed into one of the ends with the aid of a perforated duct to enable the even distribution of the oily water. The removal of the treated liquid (aqueous phase) is performed using a perforated duct at the base of the wetland to avoid including the oily surface layer.

2.4. Combination of prototypes

For the simultaneous tests of the physicochemical (DAF) and biological (constructed wetland) treatment of oily water, a hybrid system was designed combining both methods. Three horizontal chambers were used as wetlands and an extra chamber was built to ensure total oil absorption by *E. crassipes*, if necessary. For such, an auxiliary oily water production system was designed using the recirculation of all treated water, favoring the reuse of the water. The water exiting the DAF prototype entered the wetland prototype and the water exiting the wetland was sent back to the oily water production system prior to feeding the DAF prototype (Fig. 3). However, a control system was needed for the implantation of the hybrid system. The recirculation pump was adjusted for the same aqueous flow from the DAF entrance.

For the operation of the prototypes to occur in a static state, a level sensor was installed in the treated water chamber of the DAF prototype to monitor maximum and minimum water levels. When the level in the chamber reached the programmed minimum, the re-circulation pump was switched off. When the level reached the programmed maximum, the mixture pump or feed pump was switched off. The oil content in the liquid of the DAF prototype was maintained at 120 ppm throughout the tests.

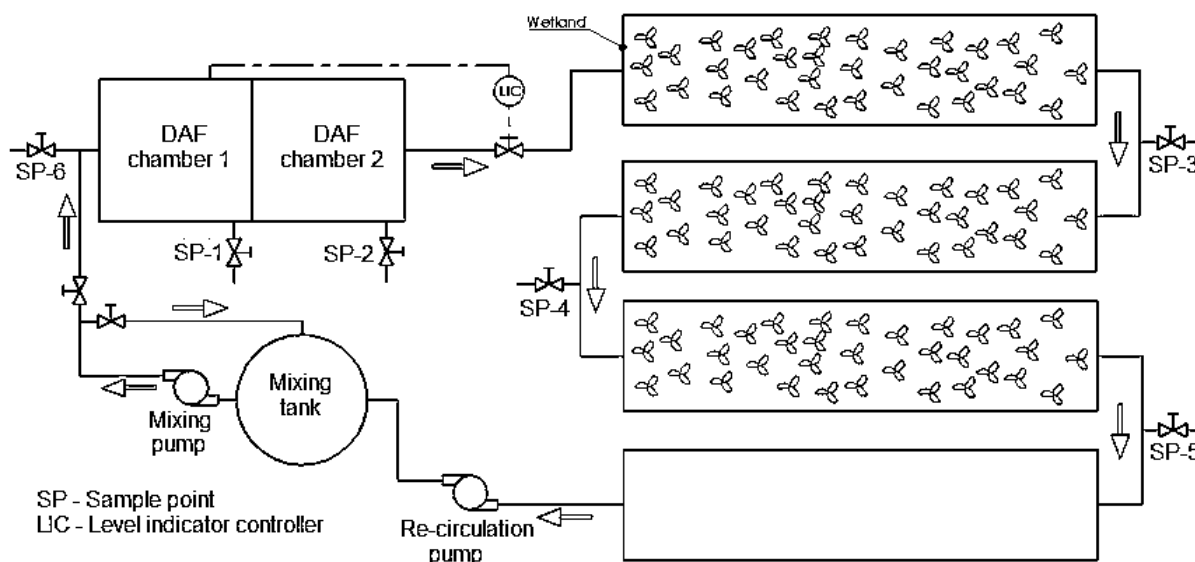


Fig. 3. Schematic of control strategy for combination of DAF and wetland prototypes

2.5. Quantification of oil removal

Oil was measured at the beginning and end of the wetlands to quantify the amount after the DAF and after the combination of the DAF and wetlands, respectively. The amount of oil in the water after treatment was determined gravimetrically as the amount of material after extraction with hexane. The oil removal rate (%) was calculated using (Eq. 1):

$$\text{Oil removed} = \frac{O_i - O_r}{O_i} \cdot 100\% \quad (1)$$

in which: O_i - initial oil in water, mg·L⁻¹; O_r - remaining oil in water after treatment, mg·L⁻¹;

2.6. Experimental factorial design and response surface methodology

Response surface methodology (RSM) was used in conjunction with a central composite rotatable design (CCRD), which requires fewer tests than a full factorial design to establish functional relations between two operating variables (Bezerra et al., 2008). RSM was used with the aid of the Statistica software program (StatSoft®, version 12). The CCRD was employed with the ratio between the air and water outflows for microbubble production (X_1) and the ratio between the feed outflow of the wetland prototype and water for microbubble production (X_2). A total of $2k + 2k + n_0$ experiments were needed, in which k is the number of independent variables and n_0 is the number of repetitions at the central point so that the planning could be characterized as rotational, totaling 36 runs for 12 assays (three runs per assay). Table 1 displays the independent variables and respective calculated levels.

Physical meaning of X_1 : The numerator is the flow of air aspirated by the centrifugal pump. This liquid flow of the pump is controlled by a valve connected to a computer for digital monitoring. The aspirated air passes through a rotameter, which measures the flow and keeps the pressure and flow of the recirculating water from the centrifugal pump constant. Since the water flow of the centrifugal pump is constant (denominator) and maintains the pressure invariable, $X_1 \cdot 10^3$ increases from 0.24 to 1.39 with the control of the gas rotameter valve and the air is distributed in the DAF system in the form of microbubbles. As the gas flow increases, X_1 increases; the gas retention (hold-up) in the DAF cell increases and the size of the microbubbles is affected by

coalescence. These two quantities (hold-up and bubble size) directly affect the interfacial area of gas/liquid (oil) contact, but in an antagonistic way. As the bubble size increases, the interfacial area of gas/oil contact increases. As X_1 is increased, the gas hold-up (the amount of gas present per unit of liquid volume) increases, which tends to increase the interfacial area, favoring the efficiency of oil/water separation. At the same time, bubble size also increases due to the coalescence of the bubbles, reducing the interfacial area of gas/oil contact. The result of these two antagonistic phenomena defines the final value of the interfacial area.

Physical meaning of X_2 : The numerator is the flow of the liquid leaving the wetland tanks and returning to feed the DAF system, considering the flow of the recycled liquid in the mixing tank negligible in comparison to the flow of liquid leaving the wetland. The denominator is the constant flow of water from the microbubbles produced by the centrifugal pump. If X_2 increases from 0.11 to 0.39, the flow rate of the wetland recirculation liquid is increased and the turbulence in the DAF system is increased. The increase in the flow rate of the wetland recirculation liquid also leads to a decrease in the contact time between the microbubbles and oil droplets. Oil removal efficiency depends on the interfacial area (hold-up and microbubble size) and microbubble/oil droplet contact time.

3. Results and discussion

In this section, we discuss the results obtained in the different stages of the experimental tests using the CCRD, with an evaluation of the effect of the two operational parameters investigated (X_1 and X_2). We demonstrate from these studies the efficiency of the DAF (Y_0) stage and overall efficiency when combining the DAF and constructed wetlands (Y_1) for the separation of a synthetic oil/water mixture.

A statistical model was created and efficiency is discussed based on the physical and mechanical phenomena of the suspension of the liquid particles. In a final step, dimensionless analysis was applied to dimension the equipment involved in the hybrid oil/water mixture separation process without the addition of coagulants/flocculants for operation on an industrial scale based on data obtained in the pilot system studied in this work.

Table 1. Real and coded values of independent variables in CCRD for oil-water separation efficiency

Variables	Levels				
	-1.41	-1.00	0.00	+1.00	+1.41
Ratio between air and water outflow for microbubble production ($X_1 \cdot 10^3$)	0.24	0.40	0.80	1.20	1.39
Ratio between feed outflow of wetland prototype and water for microbubble production (X_2)	0.11	0.15	0.25	0.35	0.39

3.1. Efficiency of DAF and hybrid system: statistical analysis

The planning matrix obtained from the experiments is shown in Table 2.

Four factorial experiments, four axial experiments and four central points were analyzed. The repetitions at the central points are used to estimate the experimental error in a design of this type. In each assay, separation efficiency (%) was the average of three runs, including each assay of the central point. At these same central points, there was a considerable increase in efficiency in reducing the residual oil content in the treated effluent comparing the water-oil separation efficiency values obtained without (Y_0) and with (Y_1) the connection of the wetland to the DAF prototype. The maximum experimentally obtained rate was 98%, occurring at the central point. The decrease in separation efficiency to higher or lower levels than those at the central point was performed to determine an optimal point.

Table 2. Experimental CCRD matrix with coded variables and response values for oil-water separation efficiency

Assays	$X_1 \times 10^3$	X_2	Separation efficiency (%) DAF (Y_0)	Separation efficiency (%) DAF + wetland (Y_1)
1	-1.00	-1.00	23.00	44.00
2	-1.00	+1.00	70.00	88.00
3	1.00	-1.00	26.00	45.00
4	1.00	1.00	59.00	80.00
5	-1.41	0.00	44.00	62.00
6	1.41	0.00	25.00	45.00
7	0.00	-1.41	15.00	33.00
8	0.00	1.41	62.00	82.00
9	0.00	0.00	75.00	96.00
10	0.00	0.00	77.00	98.00
11	0.00	0.00	78.00	98.00
12	0.00	0.00	74.00	97.00

The estimated effects with the DAF + wetland treatment (Y_1) are displayed in Table 3. The p-value was lower than 0.05 for every factor analyzed. Table 4 displays the results of the analysis of variance (ANOVA), indicating that a model can be created with lower lack-of-fit results and smaller experimental error. Therefore, a quadratic model was proposed using the response surface method that satisfactorily fit the experimental data with a regression coefficient (R^2) of 97.5% between predicted and observed values (Fig. 4). All linear and quadratic terms exhibited considerable statistical significance within the 95% confidence interval. The $F_{\text{calculated}}/F_{\text{critical}}$ ratios were favorable and experimental errors remained around 1.0%. The final empirical model of the response to the non-coded experimental variables is presented below in Eq. (2). The predominant factors of this quadratic model are the quadratic ratio between air and water outflows for microbubble production ($X_1 \cdot 10^3$) and the linear and quadratic ratios between the feed outflow of wetland

prototype and water for microbubble production (X_2), as shown in the Pareto Chart (Fig. 5).

$$Y_1 = -144.18 + 198.15 \cdot X_1 + 120.01 \cdot X_1^2 + 1136.98 \cdot X_2 + 1811.23 \cdot X_2^2 - 56.25 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2)$$

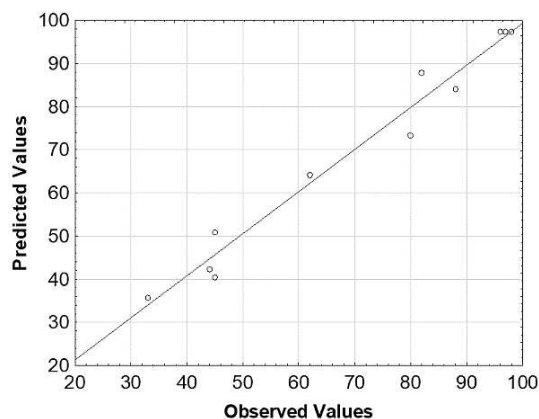


Fig. 4. Predicted versus observed values of proposed model

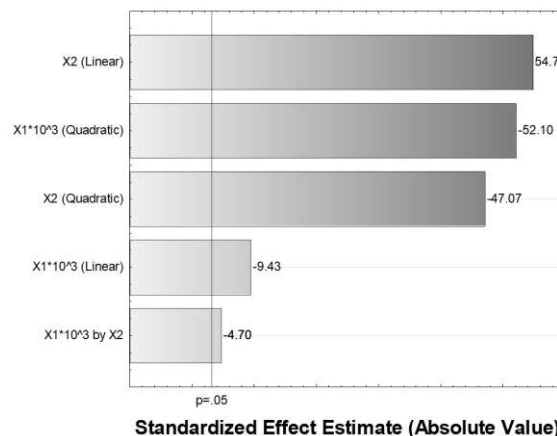


Fig. 5. Pareto chart for estimate of effects

Based on the model, 3D (Fig. 6a) and 2D (Fig. 6b) surfaces were built to analyze the region of greater separation efficiency. Thus, the central region (points 0,0) of the CCRD (points 0.00, 0.00) exhibited greater oil removal even without the wetland. This may be possible due to the correct combination of air and water flows to produce microbubbles with small diameters and high uniformity in terms of the Sauter mean diameter. The measurement of the diameter and uniformity of microbubbles was described by Brasileiro et al. (2020). Therefore, some adaptations can be made to the hybrid system to measure the size of microbubbles as the result of the flows of water, oil and air.

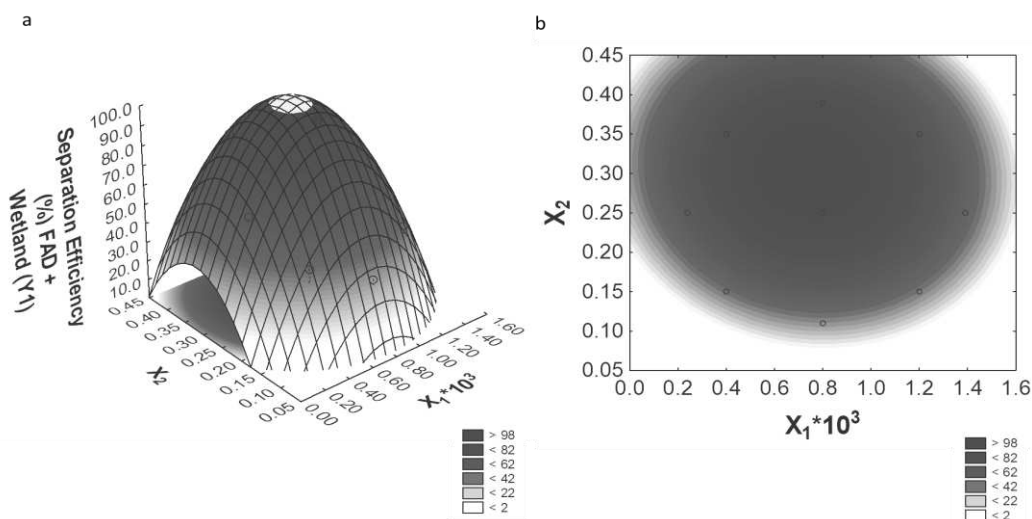
Table 3. Estimated effects of DAF + wetland treatment

	<i>Effect</i>	<i>Standard Error - Pure Error</i>	<i>t(3)</i>	<i>p-value</i>	<i>-95% Confidence Limit</i>	<i>+95% Confidence Limit</i>
Mean	97.33	0.48	203.38	0.00	95.80	98.85
$X_1 \cdot 10^3$ (Linear)	-6.34	0.67	-9.43	0.00	-8.48	-4.20
$X_1 \cdot 10^3$ (Quadratic)	-38.40	0.74	-52.10	0.00	-40.75	-36.06
X_2 (Linear)	37.27	0.68	54.78	0.00	35.11	39.44
X_2 (Quadratic)	-36.22	0.77	-47.07	0.00	-38.67	-33.78
$X_1 \cdot 10^3 \cdot X_2$	-4.50	0.96	-4.70	0.02	-7.55	-1.45

Table 4. ANOVA for validation of mathematical model*

<i>Source of variation</i>	<i>Quadratic sum</i>	<i>Degrees of freedom</i>	<i>Quadratic mean</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
X_1 (L)	81.54	1	81.54	88.95	0.00
X_1 (Q)	2488.13	1	2488.13	2714.33	0.00
X_2 (L)	2750.73	1	2750.73	3000.79	0.00
X_2 (Q)	2030.73	1	2030.73	2215.34	0.00
$X_1 \cdot X_2$	20.25	1	20.25	22.09	0.02
Lack of fit	166.42	3	55.47	60.52	0.00
Experimental error	2.75	3	0.92		
Total	6834.67	11			

*95% confidence level

**Fig. 6.** Results of a) response surface and b) contour plot for separation efficiency based on ratio between air and water outflows for microbubble production ($X_1 \cdot 10^3$) and ratio between feed outflow of wetland prototype and water for microbubble production (X_2)

3.2. Efficiency results of DAF and hybrid system: Physical and mechanical analysis

Analyzing the "effect" column in Table 3, it is evident that the effect is negative as X_1 increases linearly (-6.34) and even more negative as X_1 increases in quadratic mode (-38.40). Thus, as X_1 increases, oil removal efficiency tends to be compromised by the reduction in interfacial area. According to the physical meaning of X_1 , the increase in microbubble size due to coalescence was apparently preponderant compared to the increase in the hold-up of the gas (Chu et al., 2019).

Table 2 shows that oil droplet removal efficiency is greater higher at the central values of X_1 (intermediate gas flows) in both the DAF system and

the combined DAF + wetland system. This air flow provides an increase in the hold-up without favoring a considerable increase in microbubble size, reaching a balance between the two antagonistic effects, the optimization of which enables the maximum possible interfacial area and, consequently, maximum efficiency (Prakash et al., 2018).

The X_1 quadratic effect is even more detrimental, as the effect of coalescence (increase in microbubble size) increases when the square of the effect of the air flow increases. This phenomenon leads to a tendency to reduce oil removal efficiency, as the

effect of microbubble size apparently predominates over gas hold-up.

Again, analyzing the "effect" column in Table 3, the increase in X_2 led to two different behaviors. In the linear analysis, the effect was +37.27, indicating that the increase in X_2 in a linear mode tends to favor efficiency by increasing the interfacial area of the microbubbles due to the turbulence created by the increase in the net flow of wetland recirculation. This flow from the wetland leads to a reduction in the microbubble size and gas hold-up. The effect of the microbubble size seems to be always preponderant over the effect of hold-up regarding oil removal efficiency but without an apparent effect on the reduction in the contact time between the microbubbles and oil droplets (Chu et al., 2019).

When X_2 varies quadratically, however, the effect is -36.22. In this case, efficiency is hampered by the increase in X_2 likely due to the drastic reduction in the microbubble/oil droplet contact time and the reduced biosorption of oil by the macrophytes. Such conditions are favored by the degree of turbulence due to the high liquid flow in the wetland. Even with the increase in the interfacial area under quadratic conditions of wetland flow, the contact time was very short, compromising oil/water separation efficiency (Ansari et al., 2020; Colares et al., 2020).

Oil removal efficiency fit the values of the central point (intermediate wetland flow values) for both the FAD system and hybrid system (DAF + wetland) (Table 2). Under these conditions, the results indicate that the flow of the wetland is able to reduce the hold-up of the gas less drastically without compromising the reduction in microbubble size due to turbulence and enabling sufficient contact time between the microbubbles and oil droplets to increase the interfacial area and achieve optimal oil/water separation efficiency. With the central values of the net wetland recirculation flow, the largest effects were obtained with the inclusion of the wetland, increasing oil removal efficiency from 77 to 98% (Test 10), which is around 20%, as most of the oil was removed in the DAF system.

According to Yin et al. (2017), *Eichhornia crassipes* is able to absorb oil in wastewater, which exerts an influence on macrophyte growth (Özbay, 2016) and, consequently, the control of the species. Moreover, residual plants in wetlands can be triturated to obtain biosurfactants (saponins) (Gutiérrez-Morales et al., 2017).

3.3. Scale-up correlations

Inertia and gravity have been identified as phenomena that affect the DAF flotation chamber fluid dynamics the most (Kiss and Lakatos, 1996). Analyzing the fluid dynamics of this equipment by dimensional analysis, leads to the following scale-up model (Eq. 3):

$$Q_r = \frac{Q_m}{Q_p} = \frac{L_r^3}{L_r^{1/2}} = L_r^{5/2} \quad (3)$$

where: subscript m and p = scale-up model and prototype, respectively; Q_r = ratio of the scale-up model and prototype volumetric outflows; Q_m = scale-up model volumetric outflow, $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$; Q_p = prototype volumetric outflow, $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$; L_r = ratio of the geometric dimensions of the scale-up model and prototype; L_m = geometric dimension of the scale-up model, m and L_p = geometric dimension of the prototype, m.

According the scale-up criteria, the hydraulic behavior of optimized-rectangular wetlands with continuous decanters depends on the turbulent Reynolds number (Re_t). The application of the scale-up criteria (Ludwig, 1999), leads to Eqs. (4-5):

$$(Re_t)_m = (Re_t)_p \quad (4)$$

and:

$$Re_t = \frac{v_c \cdot D_H \cdot \rho_c}{\mu_c} \quad (5)$$

where: v_c = surface velocity of continuous phase (water) (m s^{-1}); D_H - hydraulic diameter, m; ρ_c = density of water, kg m^{-3} and μ_c = absolute viscosity of water, $\text{kg m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

The hydraulic diameter can be estimated as Eq. (6):

$$D_H = 4 \cdot R_H = 4 \cdot \frac{\text{Outflow area}}{\text{Wet perimeter}} = \frac{4 \cdot h \cdot b}{2 \cdot (h+b)} \quad (6)$$

where: h is the liquid depth at the section, in m, and b is the liquid width at the section in m.

The most efficient and economic section is given by Eq. (7):

$$D_H = 2 \cdot h \quad (7)$$

Considering than $h \ll b$, also, replacing the velocity by the ratio of outflow (Q) and the cross-section area (A), led to Eq. (8):

$$v_c = \frac{Q}{A} = \frac{Q}{0.7854 \cdot h \cdot b} = \frac{Q}{1.5708 \cdot h^2} \quad (8)$$

Therefore, Eq. (9) gives the Reynolds number (Re_t):

$$Re_t = \frac{Q \cdot 2h \cdot \rho_c}{1.5708 \cdot h^2 \cdot \mu_c} = \frac{2 \cdot Q \cdot \rho_c}{1.5708 \cdot h \cdot \mu_c} \quad (9)$$

and for an operation within the optimized criteria: $Re_t < 5000$

The pilot structure preliminary design was based on scale-up correlations obtained from Eqs. (3-7). For the commercial scale hybrid oily water treatment unit, calculations were done using estimated data of a thermoelectric plant. The maximum volume of the use of it per day was around 100 thousand liters during the period of November 2017 and September 2018. Then, it was estimated the average effluent outflow of $5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ to be treated as well as the lung tank volume of 100 thousand liters for effluent storage, in case of maintenance shut-down.

The volume of the DAF prototype flotation chamber scale-up model was of 1.5 m^3 (dual chamber), which combining with the outflows of microbubbles and effluent to be treated (Q_m), totalizing $2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, led to Eq. (10):

$$\tau_m = \frac{V_m}{Q_m} = \frac{1.5}{2} = 0.75 \text{ h} \quad (10)$$

Assuming the scale-up model was built on the basis of 1:5 scale, leads to the following estimation for the prototype average residence time (Eq. 11):

$$\tau_p = \frac{L_r^{5/2}}{L_r^3} \cdot \tau_m = \frac{\tau_m}{L_r^{1/2}} = 0.75 \cdot \sqrt{5} = 1.68 \text{ h} \quad (11)$$

Prototype volume was re-calculated, the value obtained was 8.4 m^3 (4.2 m^3 for each flotation chamber). Based on the 1:5 scale, the commercial DAF unit met the dynamic similarity requirements. The maximum permanence time and practical maximum outflow ($\text{Ret} \geq 5000$) are related themselves. Then, the maximum permanence time at the physical model of the wetlands in polycarbonate (725 ; $Q_m = 1 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ and $h = 0.4 \text{ m}$), could estimate by dividing the equipment volume of liquid by the maximum permissible outflow. For a prototype (laboratory) model (volume: 0.96 m^3 per unit; length: 3 m), the maximum permanence time, in each unit, was estimated in 3456 s ($\sim 1 \text{ h}$). Considering the scale-up model for an industrial equipment (outflow: $5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$), the Reynolds number of 5000 required the water height (a) of 0.6 m and tank width of 1.2 m , leading the wetland volume of 21.6 m^3 and length of 30 m (single wetland). In this case, the permanence time was estimate in 4.32 h . The pilot wetland was designed for lateral water height of 1.0 m with width of 2.0 m , leading Reynolds turbulence number on the order of 2500 (well within safety criteria). Fig. 7 illustrates a pilot prototype designed with the aid of the SolidWorks® software program.

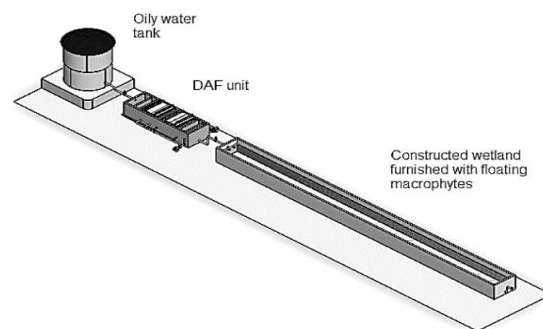


Fig. 7. Isometrics in SolidWorks of commercial DAF-wetland hybrid prototype

4. Conclusions

The combination of DAF and constructed wetland showed quite satisfactory results and was able of achieving an oil removal rate of 98% without the addition of any coagulant agent to assist in the coagulation or flocculation of the oil particles. In addition to efficiency, the system does not employ chemical additives that may cause problems in reusing the recovered water and have considerable degrees of toxicity to the flora or fauna in water bodies that receive the discharge.

The central values of variables X_1 (effect of the gas flow aspirated by the centrifugal pump with generation of microbubbles) of $0.80 \cdot 10^{-3}$ and X_2 (effect of the flow of recirculation liquid from the constructed wetland) of 0.25 in the experimental design carried out within the studied ranges of variation exhibited the highest efficiency regarding oil removal in both the DAF and combined DAF + wetland systems, with a significant contribution of the wetland in the removal of synthetic oily effluent (20% increase in efficiency). The proposed statistical model was able to predict the efficiency values (Y_1) as a function of the operational parameters evaluated (X_1 and X_2) and their interactions, with a regression coefficient (R^2) of 97.50% .

A rigorous analysis based on dimensionless criteria was proposed to extrapolate the hybrid process studied on a pilot scale to an industrial scale, with the dimensioning of the equipment involved in the process. This work proposes an innovative, efficient technology with a relatively low investment and operational cost that is clean and friendly to the environment. The automation of the prototypes both individually and together favored this high yield and the standardization of the process. However, adaptations of the system should be tested in future studies for the treatment of different types of oily waters, such as effluents with a high degree of emulsification (food industry) and those produced by mechanical metal industry facilities (oil-water-graphite), so that this hybrid process can become a suitable candidate for commercialization in the national and international market.

Acknowledgements

This study was funded by the Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE), the Research and Development Program from National Agency of Electrical Energy (ANEEL), the Candeias Energy Company (CEC) from Global Group, through the Project code PD-06961-0005/2016, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES).

References

- Abdullah S.R.S., Al-Baldawi I.A., Almansoori A.F., Purwanti I.F., Al-Sbani N.H., Sharuddin S.S.N., (2020), Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: application, mechanisms, challenges and opportunities, *Chemosphere*, **247**, 125932, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.125932.
- Al-Ghouti M.A., Al-Kaabi M.A., Ashfaq M.Y., Da'na D.A., (2019), Produced water characteristics, treatment and reuse: A review, *Journal of Water Process Engineering*, **28**, 222-239.
- Ansari A.A., Neem M., Gill S.S., AlZuaibr F.M., (2020), Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application, *Egyptian Journal of Aquatic Research*, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>.
- Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalreira L.A., (2008), Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, **76**, 965-977.
- Brasileiro P.P.F., Santos L.B., Chaprão M.J., Almeida D.G., Soares da Silva R.C.F., Roque B.A.C., Santos V.A., Sarubbo L.A., Benachour M., (2020), Construction of a microbubble generation and measurement unit for use in flotation systems, *Chemical Engineering Research and Design*, **153**, 212-219.
- Chu P., Finch J., Bournival G., Ata, S., Hamlett C., Pugh R.J., (2019), A review of bubble break-up, *Advances in Colloid and Interface Science*, **270**, 108-122.
- Colares G.S., Dell'Osbel N., Wiesel P.G., Oliveira G.A., Lemos P.H.Z., Silva F.P., Lutterbeck C.A., Kist L., Machado E.L., (2020), Floating treatment wetlands: A review and bibliometric analysis, *Science of The Total Environment*, **714**, 136776, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136776.
- Crema L.C., Biudes J.F.V., Camargo A.F.M., (2012), Effect of Urucu oil (Brazilian Amazon) on the biomass of the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Potentillaceae), *Acta Limnologica Brasiliensia*, **23**, 406-411.
- Galdino R.A., Moura A.E., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2015), Strategy for controlling the level in a Dissolved Air Flotation chamber, *Journal of Chemical Engineering*, **93**, 344-352.
- Gunathilake N., Yapa N., Hettiarachchi R., (2018), Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the cadmium phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Groundwater for Sustainable Development*, **7**, 477-482.
- Gutiérrez-Morales A., Velásquez-Ordoñez V., Khusro A., Salem A.Z.M., Estrada-Zúñiga E., Salem M.Z.M., Valladares-Carranza B., Burrola-Aguilar C., (2017), Anti-staphylococcal properties of *Eichhornia crassipes*, *Pistacia vera*, and *Ziziphus amole* leaf extracts: Isolates from cattle and rabbits, *Microbial Pathogens*, **113**, 181-189.
- Jafarinejad S., Jiang S.C., (2019), Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **7**, 103326, doi:10.1016/J.JECE.2019.103326.
- Kadlec R.H., Wallace S.D., (2009), *Treatment Wetlands*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, 1-348.
- Kiss K.M., Lakatos G., (1996), *Operation of Constructed Wetland System for Post-Purification of Oily Sewage*, 5th Int. Conf. on Wetland Systems for Water Pollution Control, Viena, **18**, 1-3.
- Kunes J., (2012), *Similarity and Modeling in Science and Engineering*, International Science Publishing Springer, Cambridge, 1-442.
- Lakatos G., Veres Z., Kundrát J., Mészáros I., (2014), The management and development of constructed wetlands for treatment of petrochemical waste waters in Hungary: 35 years of experience, *Ecology and Hydrobiology*, **14**, 83-88.
- Lu D., Liu Q., Zhao Y., Liu H., Ma J., (2018), Treatment and energy utilization of oily water via integrated ultrafiltration-forward osmosis-membrane distillation (UF-FO-MD) system, *Journal of Membrane Science*, **54815**, 275-287.
- Ludwig E.E., (1999), *Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants*, 3rd Edition, Butterworth-Heinemann, United States.
- Özbay H., (2016), The effects of motor oil on the growth of three aquatic macrophytes, *Acta Ecologica Sinica*, **36**, 504-508.
- Prakash R., Majumder S.K., Singh A., (2018), Flotation technique: Its mechanisms and design parameters, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, **127**, 249-270.
- Rocha e Silva F.C.P., Rocha e Silva N.M.P., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2018), Dissolved air flotation (DAF) combined to biosurfactants: a clean and efficient alternative to treat industrial oily water, *Reviews in Environmental Science in Biology and Technology*, **17**, 591-602.
- Rocha e Silva F.C.P., Rocha e Silva N.M.P., Moura A.E., Galdino R.A., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2015), Effect of biosurfactant addition in a pilot scale dissolved air flotation system. *Separation Science and Technology*, **50**, 618-625.
- Santander M., Rodrigues R.T., Rubio J., (2011), Modified jet flotation in oil (petroleum) emulsion/water separations, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **375**, 237-244.
- Stefanakis A.I., Seeger E., Dorer C., Sinke, A., Thullner M., (2016), Performance of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands treating groundwater contaminated with phenols and petroleum derivatives, *Ecological Engineering*, **95**, 514-526.
- Tawalbeh M., Al Mojily A., Al-Othman A., Hilal N., (2018), Membrane separation as a pre-treatment process for oily saline water, *Desalination*, **4471**, 182-202.
- Vasconcelos R.S., Henauth R.C.S., Moura A.E., Santos V.A., Sarubbo L.A., (2015), Strategy for a scale-up correlation in a dissolved air flotation chamber, *Chemical Engineering and Technology*, **38**, 813-818.
- Villamagna A.M., Murphy B.R., (2010), Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review, *Freshwater Biology*, **55**, 282-298.
- Vymazal J., (2014), Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review, *Ecological Engineering*, **73**, 724-751.
- Yin T., Zhang X., Liu X., Wang C., (2017), Resource recovery of *Eichhornia crassipes* as oil superabsorbent, *Marine Pollution Bulletin*, **118**, 267-274.

*ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO **PROCESS BIOCHEMISTRY***
Qualis A4

Analysis of the surfactant properties of *Eichhornia crassipes* for application in the remediation of environments impacted by petroleum products

Alexandre Augusto P. Selva Filho^a; Fabíola Carolina G. Almeida^b; Rita de Cássia F. Soares da Silva^{a,b}; Leonie A. Sarubbo^{a,b,*}

^a *Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife – Pernambuco, Brazil.*

^b *Advanced Institute of Technology and Innovation - IATI, Rua Joaquim de Brito, n 216, Boa Vista, 50070-280, Recife, Pernambuco, Brazil*

* Correspondence: leonie.sarubbo@unicap.com.br; Tel.: +55-81-2119-4084

Abstract

Oil spills exert a negative impact on ecosystems. One solution for this problem consists of the use of biosurfactants, which are tensioactive agents capable of solubilising oil slicks. The invasive aquatic plant *Eichhornia crassipes* as a biosurfactant source may enable the generation of novel compounds with aggregate value for use in bioremediation processes. The surfactant properties of the plant extract were investigated and its stability was tested in a range of pH values, temperatures, and concentrations of NaCl. The chemical characterisation of the plant extract was also determined. The ecotoxicity of the biosurfactant was studied using bioindicators (*Artemia salina* and *Brassica oleracea*). We also tested the viability of the biosurfactant for the removal of environmental pollutants from sand and seawater. The critical micelle concentration of the plant extract was 1.4 g/L and the surface tension at this point was 25.84 mN/m. The biosurfactant proved to be stable and non-toxic to the bioindicators evaluated. The emulsification index was higher than 65% for motor oil. The chemical characterisation suggested that the structure of the biosurfactant was formed by an unsaturated fatty acid. The plant extract was capable of dispersing 100% of oil in seawater. The motor oil removal from sand reached a rate of 67.50% and the removal of heavy metals reached rates of around 40%. The plant-based biosurfactant studied clearly demonstrated viability regarding its use as a biotechnological additive for environmental remediation processes.

Keywords: petroleum; *Eichhornia crassipes*; plant residues; macrophyte; tensioactive.

1. Introduction

Surfactants are chemical compounds containing amphipathic molecules with hydrophilic and hydrophobic portions that preferably partition at the interface of liquid phases that have different degrees of polarity and hydrogen bridges, such as oil/water or air/water interfaces [1]. Such properties enable a broad gamut of industrial applications involving detergency, emulsification, lubrication, foaming capacity, wetting capacity, solubilisation, and phase dispersion [2].

Most commercially available surfactants are synthesised from petroleum products. However, environmental concerns on the part of consumers and new environmental legislation has led to the search for natural surfactants as an alternative to existing products [3]. Biosurfactants have numerous advantages over their synthetic counterparts, such as low toxicity, stability in a broad pH range and at high temperatures, as well as tolerance to high saline concentrations [4]. Several natural surfactants are synthesised by living organisms, such as plants (saponins), microorganisms (glycolipids), and even humans (bile salts) [5].

The largest market for biosurfactants is the petroleum industry, where such products can be widely used in microbial enhanced oil recovery (MEOR), the removal and mobilisation of oily residues, bioremediation processes, and the removal of heavy metals [6]. At oil refineries, biosurfactants contribute to the separation of oil from sludge. The action of biosurfactants leads to a reduction in the interfacial tension between the water and oil, reducing the viscosity of the sludge and facilitating the separation process. Biosurfactants form micelles at a given concentration, known as the critical micelle concentration (CMC), which enhances the emulsion of systems, favouring the return of the trapped oil to the surface of the solid, thereby enabling its separation and reutilisation. The use of biosurfactants in combination with a high temperature and stirring also contributes to the recovery of oil contained in sludge [7].

Other biosurfactants, such as those derived from plants, should also be investigated with regards to environmental and industrial applications, as these natural compounds also have promising properties. For instance, saponins are a class of natural biosurfactants that are widely distributed in the plant kingdom [1]. Some studies have shown that saponins can effectively remove heavy metals and oils from contaminated soils [4].

The common water hyacinth, *Eichhornia crassipes*, is native to South America (Brazil and the equatorial region), but adapts well to other tropical regions [8]. The literature demonstrates that among the floating macrophytes found in Brazil for applications in phytoremediation, the one that adapts most to conditions of intense pollution is *E. crassipes*. This plant is an aquatic macrophyte belonging to the family Pontederiaceae and has

ecological importance due to its capacity to serve as a biofilter, accumulate heavy metals, and produce compounds of biotechnological interest [9].

E. crassipes is an invasive species that reproduces quickly in lake and river environments contaminated by a broad range of nutrients, forming a mat that can cover the entire system. This considerable expansion impedes the input of oxygen into waterbodies, reducing the presence of algae and native species in a region [8]. Thus, this aquatic macrophyte has been successfully employed in the recuperation of polluted rivers and lakes. However, it can become an environmental problem due to its rapid growth and a lack of adequate management [10].

An important characteristic of the plant in the retention of pollutants, such as heavy metals and oil products, consists of the preservation of its leaves from contamination, as 95 to 98% of these pollutants accumulate in the root system of the plant. The water hyacinth is also used as a biofertiliser, biogas, organic compound, charcoal, and feed for cattle. Another option is the use of this plant in its dried, ground form as adsorbent and/or adsorbent material that can be packaged, stored, and transported for use in reactors for the treatment of liquid effluents [11].

The use of the roots of macrophytes for the generation of surfactant agents, however, has never been described in the literature. Considering the vast distribution of macrophytes and their renewability, the aim of the present study was to investigate, for the first time, the surfactant properties of the common water hyacinth and its application as an adjuvant in remediation processes targeting hydrophobic pollutants generated by the petroleum industry.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of samples

Eichhornia crassipes was collected from Apipucos Lake in the city of Recife, Brazil. The leaves, stems, and roots were separated and washed in running water. The root samples were weighed, dried, and ground [12].

2.2. Extraction of surfactant substances

Surfactant substances were obtained through acid precipitation and solvent extraction [13]. The plant material was placed in a 2-L beaker, to which 700 mL of a 1% NaOH solution was added. The mixture was cloth filtered. The residue was then added to 300 mL of NaOH solution and submitted to further filtration.

The filtered root solution was separated into four parts. The measured quantity of plant extract was centrifuged at 4700 rpm for 15 minutes at 8°C. The vacuum filtered solution was acidified with citric acid until reaching pH 2.5. Next, 250 mL of chloroform were added to the acidic solution in a separation funnel. The chloroform fraction and emulsion were decanted into an Erlenmeyer flask. The aqueous portion and sediment were submitted again to chloroform extraction. Vacuum filtration was then performed to separate the emulsion phase. The filtered extract, which still contained the aqueous phase, was placed into a decantation funnel for separation and gravity filtration. The extract was then set to evaporate in a beaker, the mass of which had previously been recorded for the determination of the yield.

2.3. Determination of surface tension and critical micelle concentration

The surface tension of the plant extract was measured in an automatic tensiometer (KSV Sigma 700, Finland) using a du Noüy ring. The platinum ring was immersed in the metabolic broth and the force required to pull the ring through the liquid-air interface was recorded. The critical micelle concentration (CMC) was determined automatically by surface tension measurements of a water sample to which the surfactant was gradually added until reaching a constant tension.

2.4. Determination of emulsification capacity

The emulsifying activity of the plant extract in a basic medium was determined using the method proposed by Cooper and Goldenberg [14]: 2.0 mL of oily substrate added to 2 mL of the plant extract in a graduated cylinder and the mixture was vortexed for two minutes. After 24 horas, the extract-in-oil emulsions were expressed in centimetres bases on the height of the foam. Emulsification activity was tested with different organic compounds (motor oil, diesel oil, kerosene, n-hexadecane, corn oil, and soybean oil). The experiments were performed in triplicate. The emulsification index of the plant extract in the oils was calculated as follows:

$$\text{Emulsification index} = (\text{emulsion height} / \text{total height}) \times 100\%.$$

2.5. Determination of stability of plant extract

The effects of different temperatures (5, 70, 90, and 120°C), concentrations of NaCl (2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0%), pH values (2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, and 14.0), and heating times at 90°C (10, 20, 30, 40, 50, 60, and 120 minutes) on the activity of the plant extract containing biosurfactant were evaluated based on the determination of surface tension. The method used for this purpose was that described by Santos et al. [15].

2.6. Colorimetric method for determination of saponins

The colorimetric method for the determination of saponins was based on Hiai et al. [16]. A total of 800 mg of vanillin was added to 10 mL of 99.5% ethanol (v/v). The plant extract containing biosurfactant was dissolved in a 1% NaOH solution. Next, 0.5 mL of the vanillin solution and 5.0 mL of sulfuric acid were added to the solution containing the biosurfactant, followed by ample mixing in a cold-water bath. The mixture was then heated in a water bath at 60°C for 10 minutes and cooled in cold water.

The blank was prepared using 99.5% ethanol in place of the extract solution. The standards used for the calibration curve were prepared by adding different concentrations of the saponin standard in place of the biosurfactant solution to each test tube. The concentrations used (in triplicate) were 0.2, 0.4, 0.6, and 1.5 g/L.

The blank and mixture of standard saponin at a concentration of 0.4 g/L were placed in different cuvettes and both were placed in a spectrophotometer. Absorbance in the blank was zeroed and absorbance of saponin at a concentration of 0.4 g/L was determined. The wavelength of 500 nm was used for the calibration curve. Absorbance of the plant extract was used in the equation to calculate the concentration of saponin in the extract.

2.7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

The purified plant extract was redissolved in deuterated chloroform (CDCl_3) and the respective ^1H NMR values were recorded at 25°C using an Agilent 300 Mz spectrometer, which operates at 300.13 MHz. Chemical shifts (δ) were given on the ppm scale in relation to tetramethylsilane (TMS).

2.8. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

The purified plant extract dissolved in methanol was read in a BRUKER IFS66 infrared spectrometer in the spectral region ranging from 4000 to 400 cm^{-1} . The precision of the wavenumber was maintained from -0.1 to +0.1 cm^{-1} [17].

2.9. Phytotoxicity test

Phytotoxicity was assessed in a static assay involving the determination of cabbage (*Brassica oleracea*) seed germination and root growth, according to Tiquia et al. [18]. Test solutions of the plant extract at different concentrations (1/2 x CMC, 1 x CMC, and 2 x CMC) were prepared in distilled water. Toxicity was determined in sterile Petri dishes (10 cm) containing discs of Whatman N°1 filter paper. Ten seeds previously treated with NaClO were symmetrically placed in each plate and inoculated with 5 mL of the test solution at 28°C. Distilled water was used as the control. During five days of incubation in the dark, seed germination, root growth (≥ 5 mm), and the germination index were calculated using the following formulas:

$$\text{Relative germination of seeds (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ of seeds germinated in extract} / \text{n}^\circ \text{ of seeds germinated in control}) \times 100$$
$$\text{Relative growth of root (\%)} = (\text{average length of root in extract} / \text{average length of root in control}) \times 100$$
$$\text{Germination index} = [(\% \text{ of seed germination}) \times (\% \text{ of root growth})] / 100\%.$$

2.10. Toxicity test with *Artemia salina*

Toxicity was assessed using brine shrimp (*Artemia salina*) larvae as the indicator. Eggs of the microcrustacean were obtained from a local shop. The larvae were used within 24 hours after hatching. The analyses were conducted in 10-mL penicillin vials containing 10 larvae in 5 mL of water with synthetic marine salt (33 mg/L) and different concentrations of the plant extract solution (1/2 x CMC, 1 x CMC, and 2 x CMC). A synthetic marine salt solution was used as the control. Mortality was observed during 24 hours of incubation [19]. The toxic limit was defined as the lowest concentration capable of causing the death of the brine shrimp in 24 hours.

2.11. Dispersion experiments with hydrophobic compound in seawater

Petroleum product dispersion capacity was tested under simulated laboratory conditions involving the contamination of seawater with 5% motor oil. The plants extract containing the surfactant was added at extract-to-oil proportions of 1:2, 1:8, and 1:25 (vol./vol.). The results were observed visually and the ratio between the volume of plant extract and “drop” size was calculated [20].

2.12. Kinetic assay – removal of oil adsorbed to sand

Hydrophobic contaminant removal capacity was tested by saturating 60.0 g of sand *in natura* with 5 mL of contaminant. Aliquots (20.0 g) of the prepared samples were transferred to 250-mL Erlenmeyer flasks, followed by the addition of 20 mL of the plant extract at half the CMC, the CMC, and twice the CMC. For the control, the plant extract was replaced with 20 mL of distilled water. The flasks were stirred at 150 rpm for 24 hours at room temperature and then centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes for separation of the washing solution from the soil, as described by Rufino et al. [21]. The percentage of contaminant remaining on the washed sand was determined by gravimetry after extraction with hexane, as described by Rocha e Silva et al. [22].

2.13. Static assay – removal of oil adsorbed to sand in packed columns

Glass columns (57 cm in height and 3.7 cm in diameter) were packed with standard sand to which motor oil was absorbed. The quantity of oil added to the columns was calculated to achieve a final concentration of 10% (p/p) of the sand. The penetration of the water, oil, and plant extract into the sand was measured at intervals of 15 and 30 minutes and expressed as the percentage of the emptied height of the sand. Deionised water (control) and solutions of the plant extract at the CMC and two times the CMC were used for the flushing of the hydrophobic contaminant adsorbed to the sand. After flushing, the sand samples were washed with 300 mL of hexane for the removal of the residual oil. The solvent was evaporated in a rotary evaporator at 50°C and the quantity of oil extracted was determined by gravimetry [23].

2.14. Removal of heavy metals in synthetic effluent by plant extract

Saline solutions containing the heavy metals Cu, Pb, and Zn [$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, and $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$] were prepared by dissolution of the salts separately in deionised water until reaching a concentration of 1000 mg/L. The removal capacity of the plant extract was determined in a synthetic effluent containing Cu, Zn, and Pb. Solutions of the plant extract at the CMC and two times the CMC were added to the solutions of the prepared synthetic effluent. The metal-plant extract precipitate was removed by centrifugation at 5000 g for 15 min and the conductivity of the solution was measured. The conductivity metre was calibrated with deionised water prior to measuring each sample [24].

2.15. Statistical analysis of data

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation of the tests performed in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significance. A p-value < 0.05 was considered indicative of statistical significance.

3. Results and Discussion

3.1. Surface tension and critical micelle concentration

The presence of a surfactant reduces the surface tension between water and air and this effect is proportional to the concentration of the biosurfactant in the solution until reaching the CMC [5]. As shown in Figure 1, the CMC of the plant extract containing biosurfactant was approximately 1.4 g/L and the surface tension at this point was 25.84 mN/m. This tension value is similar to values reported for biosurfactants produced by microorganisms [3].

Insert Figure 1

With the extraction method employed, 1 kg of fine roots (large contact surface) submitted to two vacuum filtrations (one after centrifugation and another after the last phase separation) was ideal for producing a sufficient quantity of plant extract. Losses of extract occurred partially due to the vacuum filtrations. Moreover, the small losses

in the transport demonstrate that the fluid transport must be fast. The yield depends on the contact surface of the roots and can be optimised as a function of the size of the macrophytes collected.

Liu et al. [25] found that a purified biosurfactant produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* SNP0614 reduced the surface tension of water from 72.32 mN/m to 28.40 mN/m and had a CMC (lowest concentration required for the maximum reduction in tension) of 0.045 g/L. The CMC of the plant extract in the *E. crassipes* extract was higher than that of the bacterial biosurfactant, but reduced the surface tension of water more, which compensates for the greater volume and demonstrates the greater efficiency of the extract analysed herein.

3.2. Stability of plant extract in presence of different pH values, temperatures, and concentrations of NaCl

The quality of a novel surfactant is assessed based on measures of surface tension and emulsification capacity [26]. Surface tension is the attraction force between molecules at the surface of liquids. A lower surface tension denotes greater effectiveness of a biosurfactant, facilitating the interaction among the molecules [27]. The stability tests in the present study were performed using the plant extract from *E. crassipes* submitted to a range of pH values, temperatures, and concentrations of NaCl. Based on the surface tension readings, the plant extract exhibited stability under all conditions of pH (Figure 2A), salinity (Figure 2B), temperature (Figure 2C), and heating time at 90°C (Figure 2D), demonstrating the considerable stability of the biosurfactant.

Insert Figure 2

The surface tension of the plant extract obtained in the extraction process was 25.57 mN/m and remained stable under all conditions. As potent biosurfactants described in the literature are capable of reducing the surface tension of water to around 30 mN/m, the plant extract has excellent potential as a tensioactive agent.

Santos et al. [15] found that the surface tension of the biosurfactant from the filamentous bacterium *Streptomyces* sp. was constant at pH 2 and pH 12 (30.23 ± 0.04 mN/m), but slightly altered in the intermediate range (pH 4, 6, 8, and 10), with values ranging from 27.14 mN/m to 30.26 mN/m. In the presence of concentrations of NaCl from 0% to 100%, the surface tension ranged from 30.06 to 33.38 mN/m. Regarding the variation in temperature, the surfactant property was stable between 4 and 80°C, but an increase was found between 100°C and

120°C (29.06 to 30.19 mN/m). Thus, the surface tension values obtained with the surfactant contained in the plant extract from *E. crassipes* (Figure 1) were more significant and more stable in comparison to those of the cited bacterial biosurfactant.

In addition to surface and/or interfacial tension, the stability of oil-in-water emulsions is also used as an indicator of surface activity, although the ability of a molecule to form a stable emulsion is not always associated with a reduction in surface tension [26]. An emulsion is formed when a liquid phase is dispersed in the form of microscopic droplets in another, continuous liquid phase. When one liquid is dispersed in another, the droplets form a large area of interfacial and surface tensions. In the presence of surfactants, emulsions can remain stable through the reduction in interfacial tension and reduction in the degree of coalescence [3].

Most microbial surfactants are specific to given substrates, solubilising or emulsifying different hydrocarbons in variable proportions. The diminished capacity or even incapacity to emulsify some hydrocarbons may be due to the inability to stabilise the microscopic droplets [4]. Thus, the stabilisation of oil-in-water or water-in-oil emulsions can be used, along with surface and interfacial tensions, as an indicator of surfactant activity.

Tests were performed with motor oil, diesel oil, kerosene, n-hexadecane, corn oil, and soybean oil, the emulsification indices of which were 67.4%, 40.4%, 43.6%, 46.7%, 42.5%, and 35.6%, respectively. Thus the plant extract exhibited greater affinity for motor oil (Figure 3).

Insert Figure 3

Although the emulsification capacity regarding the vegetable oils is comparable to that described in the literature for microbial biosurfactants, these results are significant in comparison to those reported by in a study by Lima et al. [28] using *E. crassipes* (Mart.) collected from waters contaminated with oil, the aim of which was to assess its biosurfactant production potential. The authors found a reduction in surface tension to 51.03 mN/m and an emulsification index of 52.0%.

According to Silva et al. [29], the emulsification indices of a biosurfactant produced by the bacterium *Pseudomonas cepacia* were higher when using motor oil and diesel oil substrates ($90.0 \pm 4.35\%$ and $51.2 \pm 3.40\%$,

respectively). The emulsification indices for this biosurfactant were lower for kerosene, n-hexadecane, and soybean oil ($10.50 \pm 3.02\%$, $6.02 \pm 1.35\%$, and $6.02 \pm 2.50\%$, respectively). This demonstrates the greater versatility of the plant extract from *E. crassipes* for the purposes of emulsion. The emulsion index, which reflects the capacity of the biosurfactant to solubilise oils from spills in the environment, can be increased depending on the type and quantity of plant roots used.

3.3. Determination of saponin content in *E. crassipes* extract

Any part of a plant can contain several active ingredients. The surfactant compounds in plants are saponins, which have traditionally been used as natural detergents. The name 'saponin' comes from the Latin 'sapo', which means 'soap', as saponins exhibit the unique properties of foaming and emulsifying agents [30]. Saponin content was evaluated in the *E. crassipes* extract and the result of the calibration curve is shown in Figure 4. Based on the line equation, it was possible to indicate a concentration of 1.29 g/L of compounds with characteristics that may indicate the presence of saponin in the plant extract. This content is favourable when compared to the concentration of saponin found in saffron (*Crocus sativa*), which is between 1.2 and 3.4 g/L [31], and in the food Tahini Halvah, which is between 0.032 to 0.172 g/L [32], indicating the contribution of these compounds to the surfactant activity of the extract evaluated.

Insert Figure 4

3.4. Chemical characterisation of plant extract from *E. crassipes*

The characterisation of plant extracts using NMR spectroscopy has been described in the literature [33]. Therefore, the composition of the extract containing surfactant obtained from the roots of *E. crassipes* was submitted to ^1H NMR (Figure 5). The ^1H spectrum of the extract had five well-defined regions. The signals between δ 0.55 and 1.7 ppm suggest the presence of methyl and aliphatic groups in the extract. The signals between 1.8 and 2.1 ppm and those between 5.1 and 5.6 ppm indicate the presence of double bonds. The signals between 2.2 and 2.5 ppm suggest the presence of carbonyl and the signals between 2.6 and 3.8 ppm correspond to hydroxyl bonded to carbon. The signals at 0 and 7.25 ppm were respectively attributed to tetramethylsilane and the residual signal of the solvent (chloroform).

Insert Figure 5

The ^{13}C NMR analysis (Figure 6) revealed signals of aliphatic carbons in the region between 12 and 38 ppm, carbons bound to hydroxyls between 40 and 69 ppm, and carboxylic acid between 176 and 179 ppm. Thus, the plant extract from the roots of *E. crassipes* is characterised as an unsaturated fatty acid with hydroxyl, similar to the abietic acid analysed by Llevot et al. [33]. Tyagi and Agarwal [34] detected the presence of ester of palmitic acid, which is also a fatty acid, in *Eichhornia crassipes*. This latter fatty acid may be contained in a hydroxylated form in saponins such as crocomiosides A and B [35].

Insert Figure 6

The results of the FTIR analysis are shown in Figure 7. The characteristic stretching between wavenumbers 3000 and 3500 cm^{-1} corresponds to the OH bond, which Silva et al. [36] also found for a microbial biosurfactant. The absorption peak between 2800 and 3000 cm^{-1} may correspond to the axial deformation of the C-H bond of the carbon chain. The C=O bond is indicated at 1703 cm^{-1} . The vibrations at 1595 cm^{-1} and 1631 cm^{-1} suggest the presence of a double bond in the carbon chain.

Insert Figure 7

3.5. Toxicology of *E. crassipes* extract

The plant extract from *E. crassipes* was non-toxic to *Artemia salina* as shown in Figure 8. The surfactant from the common water hyacinth had only 20% lethality at 2% of 2.8 g/L (56 mg/L), which is less than 50% lethality in comparison to the evaluation performed by Ayaz et al. [37] in 31.25 mg/L of saponin from the water pepper (*Polygonum hydropiper*).

Insert Figure 8

The results of the phytotoxicity test with cabbage (*Brassica oleracea*) are shown in Figure 9. The germination index at a concentration of 0.7 g/L of the plant extract from *E. crassipes* was 98.97%. This is similar to the result found for a biosurfactant from *Artocarpus heterophyllus* investigated by Almeida et al. [38], which was 98% at a concentration of 1.0 g/L. The germination indices in the present study were generally close to 100%.

Insert Figure 9

3.6. Dispersion of hydrophobic compound in seawater by plant extract

Figure 10 illustrates the potential of the plant extract to disperse an oil slick. The values were proportional to the plant extract to oil ratio (vol/vol), with 100, 75, and 50% dispersion for ratios of 1:2 (A), 1:8 (B), 1:25 (B) (vol/vol), respectively. These results suggest the considerable potential of the plant extract for the guidance of oil spills in marine environments.

Insert Figure 10

The biosurfactant produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* investigated by Silva et al. [39] had a dispersion index in seawater close to 100% at pH 8 when in contact with motor oil as well as rates higher than 70% under conditions of heating. The bacterial biosurfactant proved to be sensitive to high concentrations of NaCl and the best dispersion values were found at a biosurfactant to oil proportion of 1:25. As the pH of seawater is approximately 8.0 and salinity is around 3.5%, the biosurfactant had better dispersion values for these conditions in seawater. Similar results were found for the surfactant agent contained in the extract from the common water hyacinth.

3.7. Removal of motor oil adsorbed to sand by plant extract from *E. crassipes* in kinetic and static assays

The percentages of motor oil removed from the sand with the plant extract at half the CMC, the CMC, and twice the CMC using the kinetic method and packed columns are displayed in Tables 1 and 2, respectively. The removal rates were similar for all concentrations used (66.27, 67.75, and 67.50% using the kinetic method and 55.02, 57.41, and 68.04 in packed columns).

Performing the same test, Chaprão et al. [40] found that motor oil removal rates from sand by biosurfactants produced by the bacterium *Bacillus* sp. and the yeast *Candida sphaerica* were efficient, with a slightly better removal rate when using the bacterial biosurfactant (close to 85%). The increase in the concentration of the biosurfactant did not exert an influence on the removal of oil adsorbed to sand.

Insert Tables 1 and 2

The motor oil removal rates from sand by the plant extract and *E. crassipes* at half the CMC, the CMC, and twice the CMC are promising. In comparison, Rufino et al. [21] investigated a biosurfactant isolated from *Candida lipolytica* in soils packed in columns using the cell-free broth and found a maximum removal rate of 30% for oil adsorbed to clay and 33.1% and 37.3% for oil adsorbed to sand using concentrations of the isolated biosurfactant at the CMC and three times the CMC, respectively.

The removal mechanism effected by the plant was mobilisation, as the increase in concentration did not exert a significant influence on the results. The same was found for the yeast cited above. Mobilisation occurs with biosurfactants at concentrations lower than the CMC, with a reduction in interfacial tension and, consequently, the capillary repulsion force between the soil and oil. The solubilisation mechanism occurs when the concentration of the tensioactive agent is above the CMC; the hydrophobic portion of the micelles bonds to the oil and the external hydrophilic portion enables the system with different polarities to be in solution [40].

3.8. Removal of heavy metals by plant extract from *E. crassipes*

The removal rates of heavy metals from the synthetic effluent by the plant extract from *E. crassipes* are displayed in Table 3. Removal rates of around 59% were found for Zn and Cu. These results are considered good in comparison to those achieved with a biosurfactant produced by the yeast *Candida tropicalis* UCP0996 [41], for which rates close to 90% were found. However, another study found an 85-98% removal rate of Zn by a plant-based biosurfactant (saponin) [42].

Insert Table 3

4. Conclusions

Research on biosurfactants has demonstrated a vast field of application due to the current need to replace synthetic compounds with natural ones. The biosurfactant contained in the plant extract from *E. crassipes* is promising for the control of environmental pollution caused by oily compounds derived from petroleum. The tensioactive properties as well as the experimental results of oil dispersion and removal clearly demonstrate the viability of the application of this plant extract as biotechnological additive in remediation processes in impacted aquatic and terrestrial ecosystems.

Acknowledgments: This study was conducted with financial support from a research project developed by the *Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação* (IATI [Advanced Institute of Technology and Innovation]) and assistance from the team at the Bioengineering Lab of the *Universidade Católica de Pernambuco* (UNICAP [Catholic University of Pernambuco]). The authors are also grateful to the Brazilian fostering agencies *Coordenação de Desenvolvimento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES [Coordination for the Advancement of Higher Education Personnel]) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq [National Council of Scientific and Technological Development]).

References

- [1] K.G.O. Bezerra, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics, *Biotechnol. Prog.* 34 (2018) 1482–1493. doi:10.1002/btpr.2682.
- [2] A.A. Jimoh, J. Lin, Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 184 (2019) 109607. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109607.
- [3] R.C.F.S. Silva, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 12523–12542. doi:10.3390/ijms150712523.
- [4] N.M.P. Rocha e Silva, H.M. Meira, F.C.G. Almeida, R. de C.F. Soares da Silva, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. dos Santos, L.A. Sarubbo, Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry, *Sep. Purif. Rev.* 48 (2019) 267–281. doi:10.1080/15422119.2018.1474477.
- [5] J.M. Campos, T.L.M. Stamford, L.A. Sarubbo, J.M. Luna, R.D. Rufino, I.M. Banat, Microbial biosurfactants as additives for food industries, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 1097–1108. doi:10.1002/btpr.1796.
- [6] D.G. Almeida, R. de C.F. Soares da Silva, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. dos Santos, I.M. Banat, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.01718 .
- [7] H. Ren, S. Zhou, B. Wang, L. Peng, X. Li, Treatment mechanism of sludge containing highly viscous heavy oil using biosurfactant, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 585 (2020) 124117. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.124117.
- [8] U.F.C. Sayago, Y.P. Castro, L.R.C. Rivera, A.G. Mariaca, Estimation of equilibrium times and maximum capacity of adsorption of heavy metals by *E. crassipes*, *Environ. Monit. Assess.* 192 (2020) 141. doi:10.1007/s10661-019-8032-9.
- [9] T.T. Almeida, R.C. Orlandelli, J.L. Azevedo, J.A. Pamphile, Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil, *Genet. Mol. Res.* 14 (2015) 4920–

4931. doi:10.4238/2015.May.11.25.
- [10] M.A. Bote, V.R. Naik, K.B. Jagadeeshgouda, Review on water hyacinth weed as a potential bio fuel crop to meet collective energy needs, *Mater. Sci. Energy Technol.* 3 (2020) 397–406.
doi:10.1016/j.mset.2020.02.003.
- [11] W.H.T. Ting, I.A.W. Tan, S.F. Salleh, N.A. Wahab, Application of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for phytoremediation of ammoniacal nitrogen: a review, *J. Water Process Eng.* 22 (2018) 239–249.
doi:10.1016/j.jwpe.2018.02.011.
- [12] W.C. Wanyonyi, J.M. Onyari, P.M. Shiundu, Adsorption of Congo Red dye from aqueous solutions using roots of *Eichhornia crassipes*: kinetic and equilibrium studies, *Energy Procedia.* 50 (2014) 862–869.
doi:10.1016/j.egypro.2014.06.105.
- [13] H. Abbasi, M.M. Hamed, T.B. Lotfabad, H.S. Zahiri, H. Sharafi, F. Masoomi, A.A. Moosavi-Movahedi, A. Ortiz, M. Amanlou, K.A. Noghabi, Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant, *J. Biosci. Bioeng.* 113 (2012) 211–219. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.002.
- [14] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 224–229. doi:0099-2240/87/020224.
- [15] A.P.P. Santos, M.D.S. Silva, E.V.L. Costa, R.D. Rufino, V.A. Santos, C.S. Ramos, L.A. Sarubbo, A.L.F. Porto, Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 51 (2018) 1–10. doi:10.1590/1414-431x20176657.
- [16] S. Hiai, H. Oura, T. Nakajima, Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid, *Planta Med.* 29 (1976) 116–122.
- [17] S.J. Varjani, V.N. Upasani, Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 510–516. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.080.
- [18] S.M. Tiquia, N.F.Y. Tam, I.J. Hodgkiss, Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure

- sawdust litter, Environ. Pollut. 93 (1996) 249–256. doi:0269-7491/96.
- [19] S.N.R.L. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 79 (2010) 174–183. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.03.050.
- [20] H. Saeki, M. Sasaki, K. Komatsu, A. Miura, H. Matsuda, Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058, Bioresour. Technol. 100 (2009) 572–577. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.046.
- [21] R.D. Rufino, J.M. Luna, P.H.C. Marinho, C.B.B. Farias, S.R.M. Ferreira, L.A. Sarubbo, Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*, J. Pet. Sci. Eng. 109 (2013) 117–122. doi:10.1016/j.petrol.2013.08.014.
- [22] N.M.P. Rocha e Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates, Biocatal. Agric. Biotechnol. 3 (2014) 132–139. doi:10.1016/j.bcab.2013.09.005.
- [23] B. Dahrazma, C.N. Mulligan, Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration, Chemosphere. 69 (2007) 705–711. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.037.
- [24] P. Das, S. Mukherjee, R. Sen, Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties, Bioresour. Technol. 100 (2009) 4887–4890. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.028.
- [25] W.J. Liu, X.D. Duan, L.P. Wu, K. Masakorala, Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SNP0614 and its effect on biodegradation of petroleum, Appl. Biochem. Microbiol. 54 (2018) 155–162. doi:10.1134/S0003683818020060.
- [26] L.A. Sarubbo, R.B. Rocha Júnior, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. Santos, I.M. Banat, Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants, Chem. Ecol. 31 (2015) 707–723. doi:10.1080/02757540.2015.1095293.
- [27] D.K.F. Santos, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century, Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1–31. doi:10.3390/ijms17030401.

- [28] J.M.S. Lima, J.O. Pereira, I.H. Batista, P.Q. Costa Neto, J.C. Santos, S.P. Araújo, M.C. Pantoja, A.J. Mota, J.L. Azevedo, Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil, *African J. Biotechnol.* 15 (2016) 1217–1223. doi:10.5897/ajb2015.15131.
- [29] R.C.F.S. Silva, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 12523–12542. doi:10.3390/ijms150712523.
- [30] D. Kregiel, J. Berlowska, I. Witonska, H. Antolak, C. Proestos, M. Babic, L. Babic, B. Zhang. Saponin-based, biological-active surfactants from plants, in: R. Najjar (Eds.), *Application and Characterization of Surfactants*, IntechOpen, London, 2017, pp. 183-205. doi: 10.5772/68062
- [31] M.A. Mir, K. Parihar, U. Tabasum, E. Kumari, Estimation of alkaloid, saponin and flavonoid, content in various extracts of *Crocus sativa*, *J. Med. Plants Stud.* 4 (2016) 171–174.
- [32] A.E.C. Sezgin, N. Artik, Determination of saponin content in turkish Tahini Halvah by using HPLC, *Adv. J. Food Sci. Technol.* 2 (2010) 109–115.
- [33] A. Llevot, E. Grau, S. Carlloti, S. Grelier, H. Cramail, Dimerization of abietic acid for the design of renewable polymers by ADMET, *Eur. Polym. J.* 67 (2015) 409–417. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.10.021.
- [34] T. Tyagi, M. Agarwal, Phytochemical screenig and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms, *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6 (2017) 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.10.021>.
- [35] K. Hostettmann, A. Marston, Saponins, in: J. D. Phillipson, D. C. Ayres, H. Baxter (Eds.), *Chemistry and Pharmacology of Natural Products*, Cambridge University Press, New York, 2005, pp. 18-121.
- [36] E.J. Silva, I.A. Silva, P.P.F. Brasileiro, P.F. Correa, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Treatment of oily effluent using a low-cost biosurfactant in a flotation system, *Biodegradat.* 30 (2019) 335–350. doi:10.1007/s10532-019-09881-y.
- [37] M. Ayaz, M. Junaid, F. Ullah, A. Sadiq, F. Subhan, M.A. Khan, W. Ahmad, G. Ali, M. Imran, S. Ahmad, Molecularly characterized solvent extracts and saponins from *Polygonum hydropiper* L. show high anti-

- angiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 1–13. doi:10.3389/fphar.2016.00074.
- [38] F.C.G. Almeida, N.M.P. Rocha e Silva, T.C. Souza, D. G. Almeida, J.M. Luna, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Surfactant activity of *Artocarpus heterophyllus* fruit extract and application in oil removal of solid surface, *Chem. Eng. Trans.* 74 (2019) 1135–1140. doi:10.3303/CET1974190.
- [39] E.J. Silva, P.F. Correa, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation, *Colloids and Surfaces B Biointerfaces.* 172 (2018) 127–135. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.08.034.
- [40] M.J. Chaprão, I.N.S. Ferreira, P.F. Correa, R.D. Rufino, J.M. Luna, E.J. Silva, L.A. Sarubbo, Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand, *Electron. J. Biotechnol.* 18 (2015) 471–479. doi:10.1016/j.ejbt.2015.09.005.
- [41] R.B. Rocha Junior, H.M. Meira, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes, *Biodegradat.* 30 (2019) 215–233. doi:10.1007/s10532-018-9833-1.
- [42] K-J. Hong, S. Tokunaga, T. Kajiuchi. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. *Chemosphere* 49 (2002) 379–387. PII: S0045-6535 (02)00321-1

FIGURE LEGENDS

Fig. 2. Determination of critical micelle concentration (CMC) of plant extract from *E. crassipes* containing surfactant

Fig. 2. Stability of plant extract from *E. crassipes* containing surfactant determined based on surface tension in (A) different pH values; (B) different concentrations of NaCl; (C) different temperatures and (D) different heating times at 90°C

Fig. 3. Emulsification index of plant extract from *E. crassipes* containing biosurfactant with different hydrophobic substrates

Fig. 4. Calibration curve of saponin standard together with slope equation and coefficient of determination for *E. crassipes* extract

Fig. 5. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of plant extract isolated from roots of *E. crassipes*

Fig. 6. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of plant extract isolated from roots of *E. crassipes*

Fig. 7. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of plant extract isolated from roots of *E. crassipes*

Fig. 8. Mortality rate of *Artemia salina* as function of concentration of plant extract from *E. crassipes*

Fig. 9. Phytotoxicity to seeds of *Brassica oleracea* as function of concentration of plant extract from *E. crassipes*

Fig. 10. Drop of motor oil dispersed by action of plant extract containing surfactant at extract to oil ratios of 1:2 (A), 1:8 (B), and 1:25 (C) (vol/vol)

Table 1

Percentage of motor oil removed from sand using kinetic method with plant extract from *E. crassipes* at half CMC, CMC, and two times CMC

Concentration of vegetal extract (kg/m ³)	Rate of oil removed (%)
0.7 (1/2 x CMC)	66.25
1.4 (1 x CMC)	67.75
2.8 (2 x CMC)	67.50

Table 2

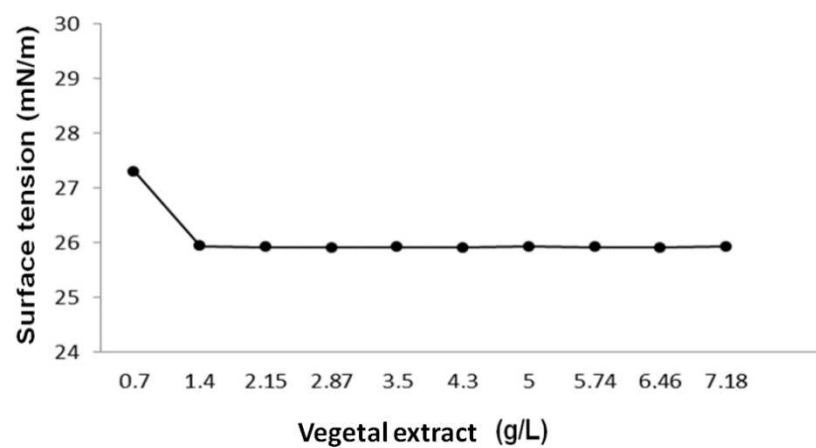
Percentage of motor oil removed from sand in packed columns with plant extract from *E. crassipes* at half CMC, CMC, and two times CMC

Concentration of vegetal extract (kg/m ³)	Rate of oil removed (%)
Control	35.08
0.7 (1/2 x CMC)	55.02
1.4 (1 x CMC)	57.41
2.8 (2 x CMC)	68.04

Table 3

Conductivity of heavy metals solution, the pollutant from synthetic effluent was removed with plant extract from *E. crassipes* at half CMC and CMC

Heavy metal	Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) of metal solution	Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) of heavy metals after treatment with vegetal extract solution	
		1/2 CMC	CMC
Zn	1986 ± 30	864.0 ± 0.1	864.7 ± 23.5
Cu	2557 ± 35	1037.0 ± 28.9	985.3 ± 25.6
Pb	1150 ± 37	$830,7 \pm 10.4$	886.7 ± 22.5

**Fig. 1.**

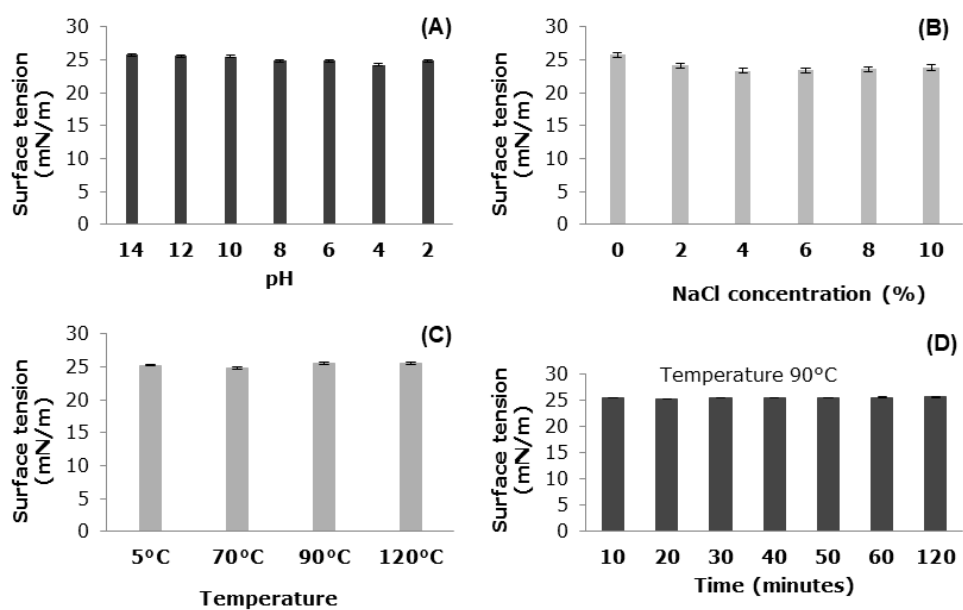


Fig. 2.

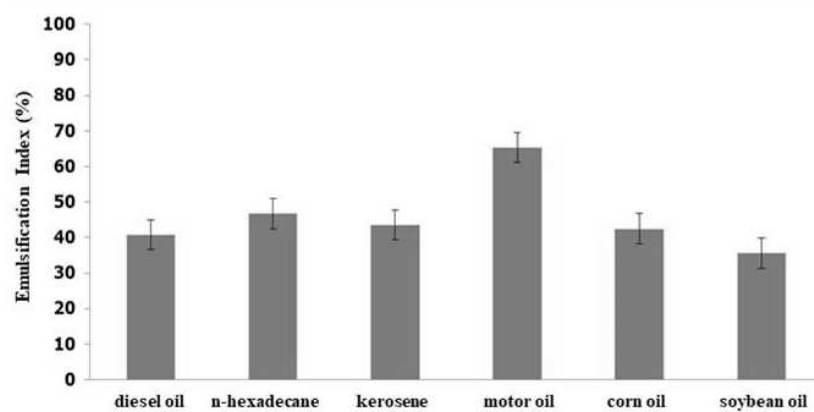
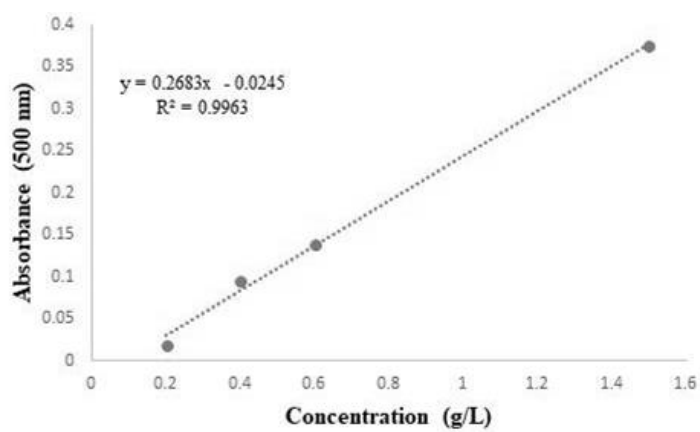
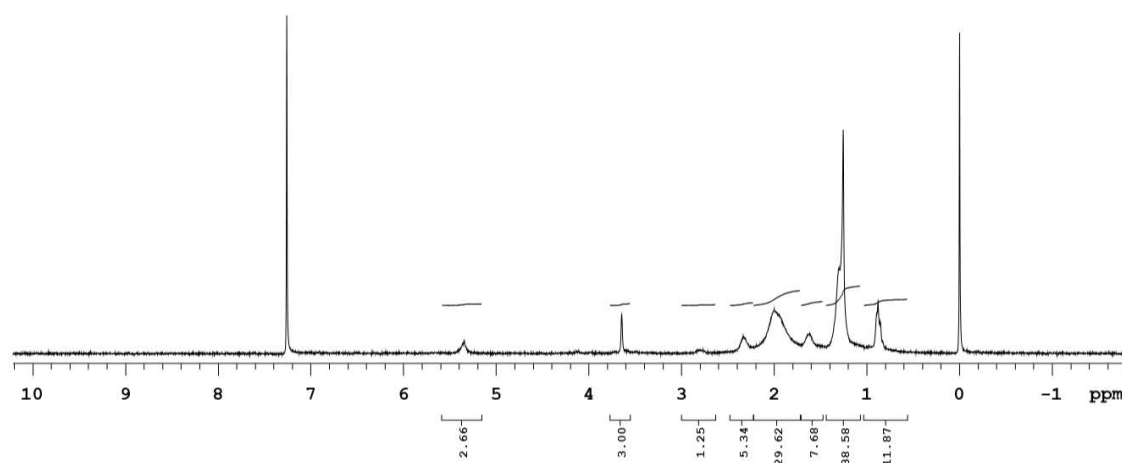
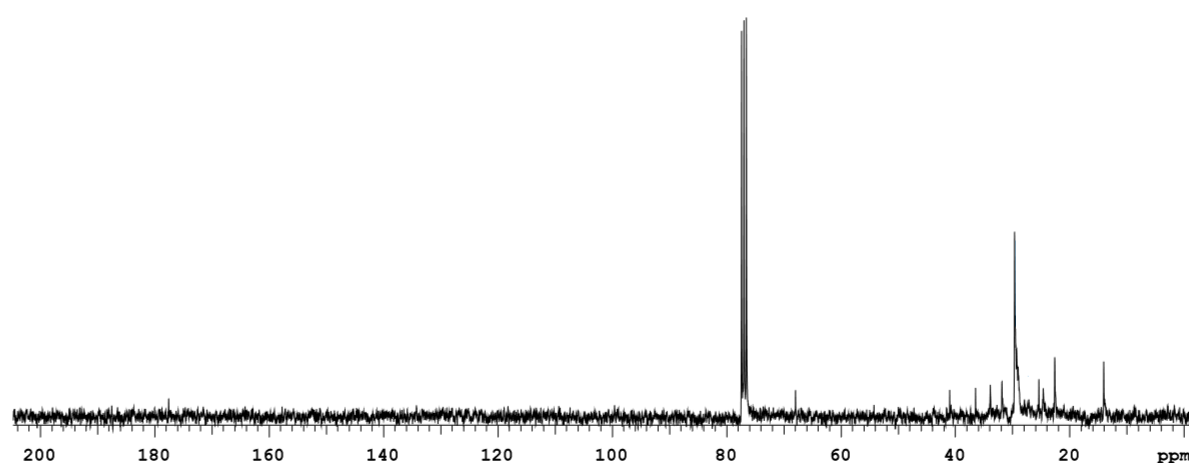
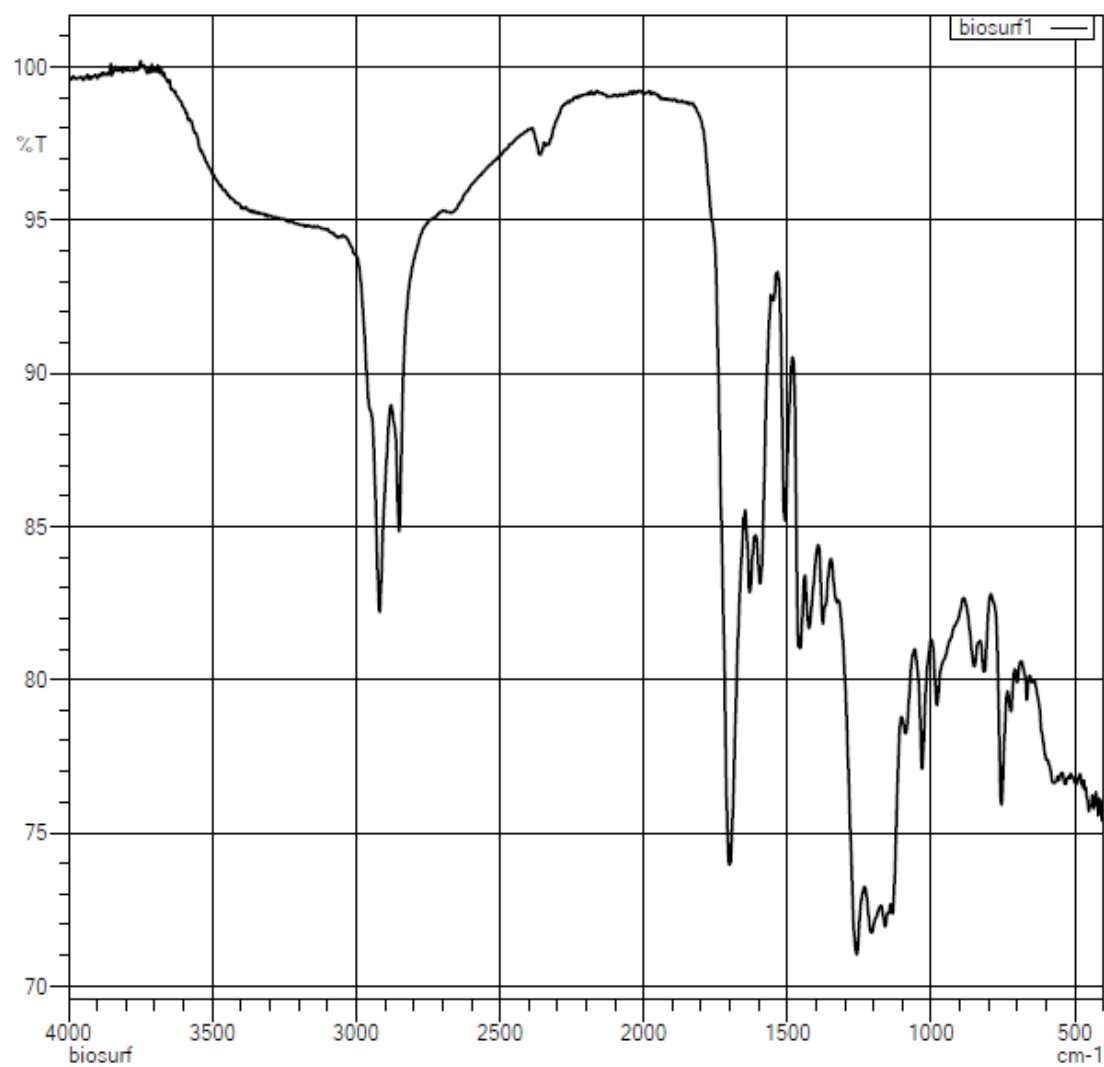


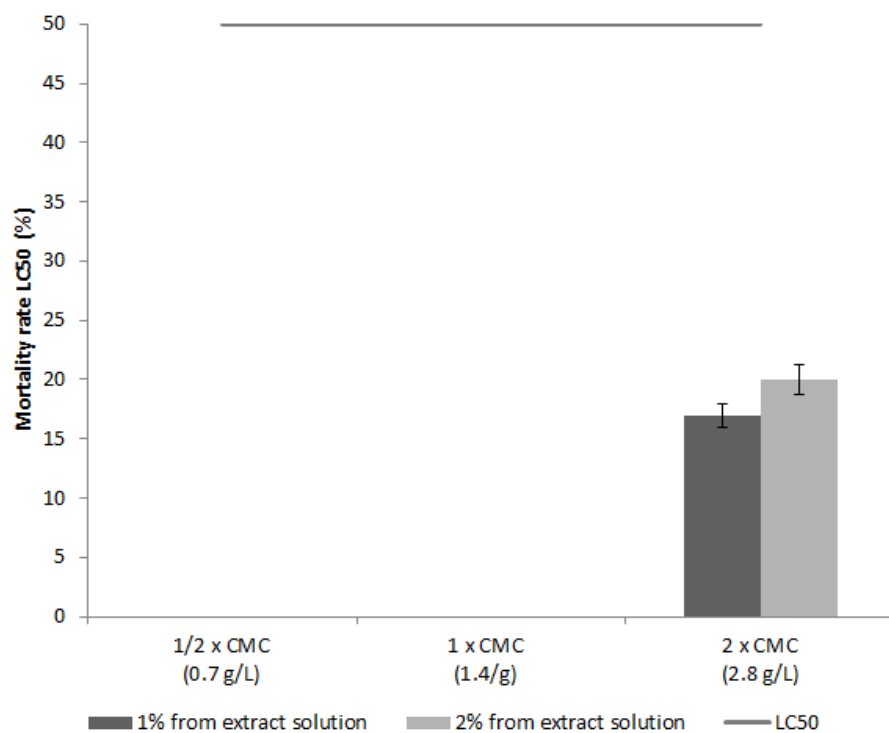
Fig. 3.

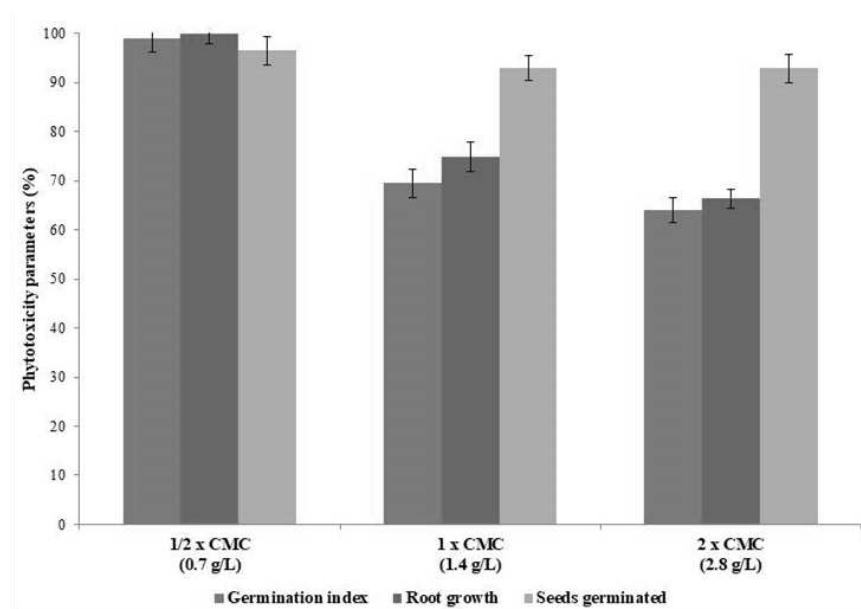
**Fig. 4.**

**Fig. 5.**

**Fig. 6.**

**Fig. 7.**

**Fig. 8.**

**Fig. 9.**

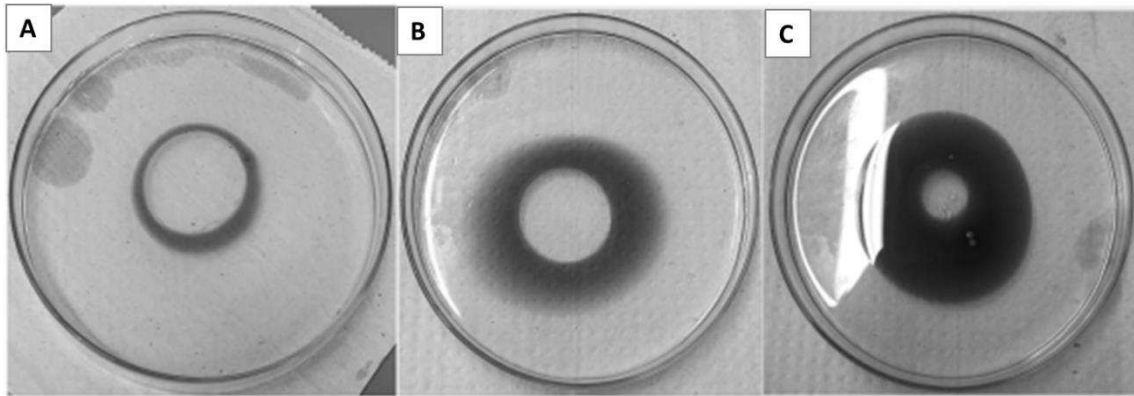


Fig. 10.

NORMAS DA REVISTA ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND MANAGEMENT JOURNAL (EEMJ)

1. Introduction

Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ) is an international medium for publication of Original Papers, Reviews, Case Studies, Book Reviews on the fundamentals, applications in environmental engineering and technologies, applied environmental sciences, environmental health, management, sustainable development, education for sustainability. Advertising is also accepted with contractual payment forms.

Submission of a manuscript implies that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis); that it is not under consideration for publication elsewhere; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well.

Papers, books for review, offers to review, suggestions and commercials (advertising) should be submitted to the Editor-in-Chief. All papers will be published in English. Non-English speaking authors should seek the advice of a professional language expert or an English speaker to help translate the paper.

2. Legal requirements

The author(s) guarantee(s) that the manuscript is/will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders, that the rights of third parties will not be violated, and that the publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Authors wishing to include figures or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright holder(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

The author(s) are encouraged to transfer the copyright of the article to the publisher upon acceptance of an article by the journal, using the Authors' Warranty and Assignment of Copyright agreement. This transfer enables the Editor to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The publication of an article is

conditioned by the signature of the author to whom correspondence should be addressed on this Authors' Warranty and Assignment of Copyright that is provided by the Editor.

Ethics in publishing

For information on ethics in publishing for journal publication please read the **Important notice for authors**.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest such as any financial, personal or other relationships with other people or organizations concerning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

3. Editorial procedure

For original papers, maximum 7000 words are accepted (including Abstract, Keywords, References, Figures and Tables), processed with MS editing facilities.

For review papers (critical evaluation of existing data, defined topics or emerging fields of investigation, critical issues of public concern), maximum of 15000 words are accepted (including Abstract, Keywords, References, Figures and Tables).

Manuscripts should be written in US English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these) and submitted electronically, in .doc format (please do not use .docx) to the Editor-in-Chief, at one (**only one**) of the following e-mail addresses:

**eemjournal at yahoo.com, eem_journal at yahoo.com, eemjeditor at yahoo.com,
eemj_editor at yahoo.com,
eemjournal at gmail.com, eemjeditor at gmail.com, eemj.office at gmail.com**

Please be sure to include your full affiliation and e-mail address.

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a cover letter to the editor. The cover letter must state:

- that all authors mutually agree that the manuscript can be submitted to EEMJ
- that the manuscript contains the original work of the authors
- the novelty in results/findings, or significance of results
- that the manuscript has not already been published, or is not under consideration for publication elsewhere

Manuscripts are evaluated first in the Editorial Office (as a preliminary condition for acceptance) in terms of meeting the requirements of the journal, including attempts of plagiarism.

The author is responsible for the accuracy of the whole paper and references. Authors will be notified about the registration of their contribution. Only those contributions which conform to the following instructions can be accepted for the peer-review process. Otherwise, the manuscripts are returned to the authors with observations, comments and annotations.

The peer review process is decisive for paper acceptance. It could be done in several stages, depending on the revision quality of the manuscript in accordance with the requirements of paper evaluators. Please do not transmit electronic data or requirements to the publisher until your manuscript has been reviewed and accepted for publication. Please follow the instructions below.

A minimum of four suitable potential reviewers should be provided by the authors. Please provide their name, e-mail address and institutional affiliation. When compiling the list of potential reviewers please consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the subject area of the manuscript; they must not be from the authors' own institution or country; they should not have recent (less than five years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.

4. Manuscript preparation

Authors must follow the instructions for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the formatting style to conform to the standards of the journal.

Manuscripts should be concise, in 1.5 line spacing, and should have 2 cm all over margins. The font should be Times New Roman of size 12 points. The numbering of chapters should be in

decimal form. Ensure that each new paragraph is clearly indicated, using TAB at 1.25 pts.

The text layout should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the manuscript. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Assign the line numbering and page numbers. To avoid unnecessary errors it is strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor.

Title page will contain

- A concise and informative title (Times New Roman bold, all caps of size 14 points); the maximum length of the title should be maximum 100 letters and spaces;
The full name(s) of the author(s) (first name, then last name, with Times New Roman bold 12 points) should be written below the title. The affiliation(s) and complete postal address(es) of the author(s) will be provided immediately after the full name of the authors and will be written with Times New Roman 12 points. When the paper has more than one author, their name will be followed by a mark (Arabic numeral) as superscript; for the corresponding author, an asterix will be added
using *Word_Insert_Reference_Footnote_Symbol* sequence.
Also, the full and e-mail addresses, telephone and fax numbers of the corresponding author will be provided in the footer of the first page, as: Author to whom all correspondence should be addressed: email..., Phone..., Fax... .
- **Abstract:** each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words. Do not include citations in the Abstract.

Keywords: three to five keywords should be supplied after the Abstract for indexing purposes, **ordered alphabetically**, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

- The text of the paper should be divided into **Introduction, Materials and Methods (or Experimental), Results and Discussion, Conclusions, References** (for papers dealing

with environmental management, policy, education etc., the Experimental part can be replaced by a case-studies presentation).

1. Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

2. Material and methods (or Experimental)

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

3. Results and Discussion

Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

4. Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section. Do not include citations in this section.

Formulae, symbols and abbreviations Formulae will be typeset in Italics (preferably with the Equation Editor of Microsoft Office 2003) and should be written or marked as such in the manuscript, unless they require a different styling. The formulae should be numbered on the right side, between brackets:

$$a^3 = 3M / 4N \quad (1)$$

Always refer in the text to the Equations as (Eq. 1), Eqs. (1-4) etc.

The more complex Chemical Formulae should be presented as Figures.

Abbreviations should be defined when first mentioned in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

SI units must be used throughout.

Footnotes should be avoided.

References The list of References should only include works that are cited in the text and that have been published. References should be cited in the text in brackets (Harvard style) as in the following examples: (Chisti, 1989), (Gavrilescu and Roman, 1996), (Moo-Young et al., 1999).

References should be alphabetically listed at the end of paper, with complete details, as follows:

Books: Names and initials of the authors, year (between brackets), chapter title, title of the book, editors, edition, volume number, publisher, place, page number:

Mauch K., Vaseghi S., Reuss M., (2000), *Quantitative Analysis of Metabolic and Signaling Pathways in Saccharomyces cerevisiae*, In: *Bioreaction Engineering*, Schugerl K., Bellgardt K.H. (Eds.), Springer, Berlin Heidelberg New York, 435-477.

Faber K., (2000), *Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook*, vol.VIII, 4th Edition, Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

Handbook, (1951), *Handbook of Chemical Engineer*, vol. II, (in Romanian), Technical Press, Bucharest, Romania.

Symposia volumes: Names and initials of the authors, year, paper title, symposium name, volume number, place, date, page numbers:

Clark T. A., Steward D., (1991), *Wood and Environment*, Proc. 6th Int. Symp. on Wood and Pulping Chemistry, Melbourne, vol. 1, 493-498.

Journal papers: Names and initials of authors, year (between brackets), full title of the paper, full name of the journal (italic), volume number (bold), first and last page numbers:

Tanabe S., Iwata H., Tatsukawa R., (1994), Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals, *Science of the Total Environment*, **154**, 163-177.

Patents: Names and initials of authors, year, patent title, country, patent number (italic):

Grant P., (1989), Device for Elementary Analyses. USA Patent, No. 123456.

Dissertations: Names and initials of authors, year (between brackets), title, specification (PhD Thesis, MSc Thesis), institution, place:

Aelenei N., (1982), *Thermodynamic study of polymer solutions*, PhD Thesis, Institute of Macromolecular Chemistry Petru Poni, Iasi, Romania.

Star K., (2008), *Environmental risk assessment generated by natural hazards*, MSc Thesis, Institute of Hazard Research, Town, Country.

Legal regulations and laws, organizations: Abbreviated name, year (between brackets), full name of the referred text, document type, author, URL address:

ESC, (2007), Improving access to modern energy services for all fundamental challenge, Economic and Social Council, ENV/DEV/927, On line at:
<http://www.un.org/News/Press/docs/2007/envdev927.doc.htm>

EPA, (2007), Biomass Conversion: Emerging Technologies, Feedstocks, and Products, Sustainability Program, Office of Research and Development, EPA/600/R-07/144, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., On line at:
<http://www.epa.gov/Sustainability/pdfs/Biomass%20Conversion.pdf>

EC Directive, (2000), Directive 2000/76/EC of the European Parliament and of the Council of 4 December 2000, on the incineration of waste, Annex V, Official Journal of the European Communities, L 332/91, 28.12.2000, Brussels.

GD, (2004), Governmental Decision no. 1076/2004 surnamed SEA Governmental Decision, regarding the procedure for strategic environmental impact assessment for plans or programs, published in Romanian Official Monitor, part I, no. 707 from 5th of August, 2004.

Web references: The full URL should be given in text as a citation, if no other data are known. If the authors, year, title of the documents are known and the reference is taken from a website, the URL address has to be mentioned after these data.

Burja C., Burja V., (2008), Adapting the Romanian rural economy to the European agricultural policy from the perspective of sustainable development, MPRA, Munich Personal RePEc

Archive, On line at: http://mpra.ub.uni-muenchen.de/7989/1/MPRA_paper_7989.pdf

Web references must not be listed separately, after the reference list.

All references must be provided in English with a specification of original language in round brackets.

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Do not cite references in the abstract and conclusions.

Unpublished results, personal communications as well as URL addresses are not recommended in the reference list.

Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Papers which have been accepted for publication should be included in the list of references with the name of the journal and the specification "in press".

Reference style Text: All citations in the text may be made directly (or parenthetically) and should refer to:

- *single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication: "as previously demonstrated (Smith, 2007)"; "as Smith (2007) demonstrated"
- *two authors*: both authors' names and the year of publication: (Arnold and Sebastian, 2008; Smith and Hansel, 2006; Stern and Lars, 2009)
- *three or more authors*: first author's name followed by "et al." and the year of publication: "As has recently been shown (Werner et al., 2005)...", "Kramer et al. (2000) have recently shown..."

Citations of groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Aden, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995)".

Abbreviations

Define all abbreviations at their first mention in the text. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Include acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, funding supports etc.).

Footnotes

Footnotes must be avoided. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables

Draw the Tables in grid format using a basic, solid line style without shadows.

Ensure that the data presented in Tables do not duplicate results described in Figures or elsewhere in the paper.

Figures

Number Figures consecutively in accordance with their appearance in the text. All illustrations should be provided in camera-ready form, suitable for reproduction, which may include reduction without retouching.

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as Figure(s) and should be numbered consecutively, in the order to which they are referred.

Figures may be inserted preferably as black line drawings. They should be pasted on, rather than taped, since the latter results in unclear edges upon reproduction.

Ensure that each illustration has a caption, placed below the Figure. Supply also captions

separately, not attached to the figure. A maximum limit of 8 Figures are allowed per manuscript. A caption should comprise a brief title (not on the Figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Multiple Figures can be expressed as one Figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6.

ALL Figures must be submitted in either .jpg or .tiff format with a very good resolution (but do not submit graphics that are disproportionately large for the content).

Figures and Tables must be embedded in the text.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author (by e-mail) and should be returned within 72 hours of receipt. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other changes may be charged to the authors.

Paper in electronic format

Authors are asked to submit their final and accepted manuscript as an attachment to one of the above-mentioned e-mail addresses. Use the .doc format (not .docx !).

5. Page charge

There is no charge per printed page for regular papers.

6. Reprints

The corresponding author will be provided with a .pdf file containing the paper, via e-mail, free of charge. A hard copy of the issue containing the paper can be provided on request, for a fee. This request will be formulated when the final form of the manuscript (the electronic one) is provided.

Additional procedures for the editorial management of Environmental Engineering and Management Journal

Starting with volume 13/2014, the members of the Scientific Advisory Board and the Corresponding authors will receive each issue of the journal in electronic .pdf format. Printed copies can be delivered on request.

An author cannot appear on more than two papers per regular issue. An author cannot appear on more than three papers in a Guest Editor/Conference issue.

The evaluation/peer-review process of manuscripts submitted for Guest Editor/Conference issues published according to journal editorial procedure and policy will be handled and evaluated as with regular manuscripts, so that only consistent papers will be published. The manuscripts must be sent at least six months before the presumed data of publication. Those manuscripts which do not fulfill the journal requirements will be rejected. This is to discourage superficiality in the development of the manuscript, from formal and scientific points of view. No amount of money will be refunded following the rejection of manuscripts.

No more than 160 pages and no more than 20 papers are acceptable for regular issues. No more than 180 pages and no more than 25 papers are opportune for special issues. The number of pages is based on the published version of an article, not on the submitted version (for instance, when page breaks are changed and when images are enlarged for easier viewing).

A regular issue can include, as an exception, a number of 25-30 papers as a maximum. This situation could appear when subscribers to our journal ask for early publication of their already accepted papers, against the position in the list of accepted papers, published on the journal webpage (<http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/accepted.htm>). The annual subscription is 500 Euro, and the subscribers may ask for early publication of one accepted paper per subscription. If the authors of a newly-registered manuscript ask for a rapid evaluation of their manuscript (in maximum 6 months after its registration), a deposit of 200 Euro shall be paid in advance. If the manuscript is deemed unsuitable for publication, the authors will not be eligible for a refund. In all cases, the corresponding author will send a signed Requirement letter to the Editor-in-Chief, according to the Editorial Policy and Procedures (http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/pdfs/EEMJ_Procedure_Sixth_revision.pdf). All payment will be made in the Journal account (<http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/subscription.htm>) and will be confirmed according to the legal procedures, based on delivered invoice and tracking of the fee payment. The journal could publish maximum six Guest Editor issues, according to the Editorial

Policy and Procedures

(http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/pdfs/EEMJ_Procedure_Sixth_revision.pdf).

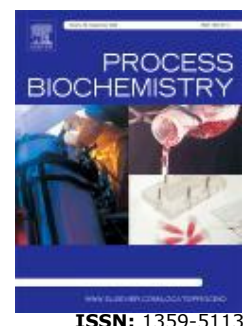
Automated software is used for checking against plagiarism. In order to avoid false results, the generated reports are cautiously checked and confirmed by journal staff. We do not send plagiarism reports to authors. Any manuscripts which do not prove to be at least 90% original will be rejected. The rejection for plagiarism may arise at any phase of the editorial / review process, even if the manuscript was accepted for publication. The authors are solely responsible for the originality of their submission. Therefore, any manuscript should be carefully checked for such inconsistencies before submitting to EEMJ. The authors are required to follow academic publishing rules, to adhere to the principles of scientific ethics and to sign the Authors' warranty and Copyright transfer.

Detailed information concerning these issues may be found on the EEMJ website, under **Editorial Procedure and Policy**.

NORMAS DA REVISTA PROCESS BIOCHEMISTRY

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the **processes** involving **bioactive molecules** and living **organisms**. These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds using tools and methods of current **biology** and **engineering**. Its main areas of interest include novel **bioprocesses** and enabling technologies (such as nanobiotechnology, tissue engineering, directed evolution, metabolic engineering, systems biology, and synthetic biology) applicable in food (nutraceutical), healthcare (medical, pharmaceutical, cosmetic), energy (biofuels), environmental, and biorefinery industries and their underlying biological and engineering principles.

Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application:

- Fermentation, biochemical and bioreactor engineering
- Biotechnology processes and their life science aspects
- Biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation
- Downstream processing
- Modeling, optimization and control techniques.

Particular aspects related to the processes, raw materials and products, also include:

- Quantitative microbial physiology, stress response, signal transduction
- Genetic engineering and metabolic engineering
- Proteomics, functional genomics, metabolomics, and bioinformatics
- Chiral compounds production, cell free protein system, high-throughput screening, in-vivo/in-vitro evolution, enzyme immobilization, enzyme reaction in non-aqueous media
- Mass transfer, mixing, scale-up and scale-down, bioprocess monitoring, bio-manufacturing
- Cell, tissue and antibody engineering: animal and plant cells/tissues, algae, micro-algae, extremophile, antibody screening and production
- Environmental biotechnology: biodegradation, bioremediation, wastewater treatment, biosorption and bioaccumulation
- Bio-commodity engineering: biomass, bio-refinery, bio-energy
- Bioseparation, purification, protein refolding.

- Other new bioprocess and bioreactor related topics especially on application to healthcare sectors

IMPACT FACTOR

2019: 2.952 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Aqualine Abstracts

CAB International

EMBiology

BIOSIS Citation Index

Current Biotechnology Abstracts

Current Technology Index

Current Contents

FSTA (Food Science and Technology Abstracts)

Chemical Abstracts

Elsevier BIOBASE

Agricultural and Environmental Biotechnology Abstracts

Biocommerce Data

Web of Science

Science Citation Index

Research Alert

Nutrition Abstracts

Dairy Science Abstracts

Chemical Engineering Abstracts

INSPEC

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

J. Boudrant, University of Lorraine, Nancy, France

J.J. Zhong, Shanghai Jiao Tong University - Fahu Campus, Shanghai, China

Reviews Associate Editor

E.J. Vandamme, Ghent University, Gent, Belgium

Associate Editors

V. Chotteau, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

R. Fernandez-Lafuente, Spanish Scientific Research Council, Madrid, Spain
X-Y. Li, University of Hong Kong, Hong Kong, Hong Kong

K. Shimizu, Kyushu Institute of Technology Faculty of Computer Science and Systems Engineering
 Department of Bioscience and Bioinformatics, Iizuka, Japan

S-T. Yang, OHIO STATE UNIVERSITY, Columbus, Ohio, United States

Editorial Board

Z. Aksu, Hacettepe University, Ankara, Turkey

F. Aulenta, Water Research Institute National Research Council Brugherio Branch, Brugherio, Italy
V.S. Bisaria, Indian Institute of Technology Delhi, New Delhi, India

R. Borja, Spanish Scientific Research Council Andalucia Office, Sevilla, Spain
D. Cantero, University of Cadiz, Cadiz, Spain

H.J. Cha, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea, Republic of
F. Chen, University of Hong Kong, Hong Kong, Hong Kong
J. Chen, Yangtze University, Jingzhou, China

A. D'Annibale, University of Tuscia, Viterbo, Italy
Z.X. Deng, Shanghai Jiao Tong University - Fahu Campus, Shanghai, China
F. Fatone, University of Verona, Verona, Italy

E. Guedon, CNRS Delegation Centre-Est, Vandoeuvre Les Nancy, France
J.M. Guisan, Spanish Scientific Research Council, Madrid, Spain

M. N. Gupta, Indian Institute of Technology Delhi, New Delhi, India
J.Y. Hu, National University of Singapore, Singapore, Singapore

W.-S. Hu, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United States
A. Illanes, Universidad Catolica de Valparaiso Faculty of Philosophy and Education, Valparaiso, Chile
B-G. Kim, Seoul National University School of Chemical and Biological Engineering, Seoul, Korea, Republic of
Y-M. Koo, Inha University, Incheon, Korea, Republic of

S.Y. Lee, Korea Advanced Institute of Science and Technology Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Daejeon, Korea, Republic of

M. Linder, University of Lorraine, Nancy, France
B. McNeil, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, United Kingdom
U. Mehmetoglu, Ankara University, Ankara, Turkey

M. Nasri, University of Sfax, Sfax, Tunisia
H. Ohtake, Osaka University School of Engineering Graduate School of Engineering, Osaka, Japan
K-Y. Paek, Cheongju National University of Education, Cheongju, Korea, Republic of

A. Pandey, CSIR-Indian Institute of Toxicology Research, Lucknow, India
A. Rapoport, University of Latvia, Riga, Latvia

R. C. Rodrigues, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
B.C. Saha, USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, United States
T. Scheper, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany

H. Shimizu, Osaka University Graduate School of Information Science and Technology Information Systems Engineering Bioinformatic Engineering, Osaka, Japan

R.Y. Surampalli, Global Institute for Energy Environment and Sustainability, Lenexa, Kansas, United States
R.D. Tyagi, INRS – Research Centre on Water Earth and the Environment, Quebec, Quebec, Canada
J. Vioque, Fat Institute, Sevilla, Spain

J. Wang, Tsinghua University, Beijing, China
V.F. Wendisch, Bielefeld University, Bielefeld, Germany

W-T. Wu, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

J.H. Xu, East China University of Science and Technology, Shanghai, China **P. Xu**, Shanghai Jiao Tong University - Fahu Campus, Shanghai, China **L.R. Yang**, Zhejiang University, Hangzhou, China

A-P. Zeng, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany **Y.-H. Zhang**, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States

GUIDE FOR AUTHORS

Main points of the Guide for Authors

The text must be double spaced The lines and pages must be numbered Highlights: Use short and very concise sentences. Not more than one line per item of highlight is recommended. Generally 3-5 items of highlight are acceptable Two parts "Results" and "Discussion" which could be merged into one part "Results and discussion" Reproducibility data are required Illustrations must have high quality of resolution Reference list must be written as indicated in the PRBI GfA Legends must be detailed as indicated in the PRBI GfA All the legends must be gathered on specific pages placed after the text and before the Tables and Figures Five referees of international standing should be suggested, either whose work is cited in the submitted work or who have been working on the topic(s) Language should be carefully checked by one English Language Editing Service (or at least by a professional colleague whose technical English is fluent)

INTRODUCTION

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules and living organisms. These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds using tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest include novel bioprocesses and enabling technologies (such as nanobiotechnology, tissue engineering, directed evolution, metabolic engineering, systems biology, and synthetic biology) applicable in food (nutraceutical), healthcare (medical, pharmaceutical, cosmetic), energy (biofuels), environmental, and biorefinery industries and their underlying biological and engineering principles.

Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: cell culture and fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; and downstream processing.

Manuscripts and data using response surface methodology (RSM) which are mainly descriptive, without any physiological or systemic explanation or correlations are not suitable for submission to the journal.

Types of paper

Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications, Reviews and Correspondence.

Full length articles should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Correspondence articles (Letter to the Editor) discussing papers recently published in the journal or matters of general interest to the readership will be considered for publication. Authors of papers that are the subject of comment will be given an opportunity to reply. Letters may not exceed 800 words and 10 references.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should clearly explain their request for accelerated handling in the cover letter.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
 - All figures (include relevant captions)
 - All tables (including titles, description, footnotes)
 - Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures
- in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described

has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the

[Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical](#)

[Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as

per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for

experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in

accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU](#)

[Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care

and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should

clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must

be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations

that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests

include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent

applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two

places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the

manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations

of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.

2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the

journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an

'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

[More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or

preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in

the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to

submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy

offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through

the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources

to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of

these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible

grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English](#)

[Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article

details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in

the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for

final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for

revision, is sent by e-mail.

A cover letter should be submitted on-line by the authors together with the manuscript, which includes

the following points: 1) all authors agree to submit the work to *Process Biochemistry*, 2) the work has

not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant

contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least three independent referees (and

preferably up to five, outside their own institution) with their position, institution, and email address;

and preferably the suggested referees are of international standing and are working on the same or

similar topics. The final choice of referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by

at least two referees. But, manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to

the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause

misunderstanding.

When a manuscript is rejected by an editor, generally it should not be resubmitted in its original

version, but may be resubmitted after substantial modifications and/or addition of significant

experimental data. It is up to the discretion of the editors to reconsider such resubmitted manuscripts

as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a resubmitted manuscript

should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the editors/reviewers

and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement)

must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years

of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility

assays, that is to say, to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard

deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be

then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or

in press.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the

editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of

two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible

for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More](#)

[information on types of peer review.](#)

Double-blind review

This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from

the reviewers, and vice versa. [More information](#) is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the

corresponding author including an e-mail address.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text

should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting

codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word

processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts,

superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each

individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see

also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics

will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic

artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check'

functions of your word processor.

Article Structure

The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: Title page; second page contains the

Abstract and keywords; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results,

Discussion, Acknowledgement(s), References, Figure legends, Tables, and Figures. Figure legends

should be gathered on a separate page(s), followed by Tables and Figures with a separate page

for each one. For experimental design results, as they are scientifically not usable, 3D figures

are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrams. Page numeration

starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but should be

thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without

sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete

and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted. It is recommended to use a concise and short title, followed by another sentence(s) including specific details.

Introduction

Should be concise in the related background description and lead to the objectives and novelty of the work.

Material and Methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced, including the information about suppliers and catalogue numbers when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results and discussion

These two parts can be separated as "Results" and "Discussion" or combined into one section.

The discussion about each major point of the results is very important, and should not repeat the experimental results; generally citation of related references is necessary.

Conclusions

This section is not obligatory and can exist as a short paragraph at the end of "Results and Discussion"

section. **When it exists as a section**, it should be short and concise but should not repeat the

Abstract. Generally the Conclusion does not cite references, and it is different from the discussion.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid

abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s)

of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between

parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation

addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase

superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the

e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing

and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about

Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details**

are kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was

done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

Word limits : 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews Provide a brief background of the research and a description of the results without extensive experimental detail Summarize the significance of the findings Do not include reference citations Avoid uncommon abbreviations

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for research papers, but not for Review articles. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. A graphical abstract should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See

<https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991.

The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and /

should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity

or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy];

the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes

of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When

funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research

institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or

not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is

necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given

in degrees Celsius. The unit 'billion': 10⁹ in America (ten to the power 9), and 10¹² in Europe (ten

to the power 12), is ambiguous and should not be used.

Footnotes

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included

in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising

nature will not be accepted.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then

please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is

finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution

requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or

MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit

usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear

in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please

indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

References

References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets.

A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in

this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private

communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice

versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal

communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these

references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/process-biochemistry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear

in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun.

163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon.

19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z.

Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt

disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific

research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are

strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the

same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body

text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly

relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly

usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum

size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in

the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#).

Please supply

'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate

image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For

more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation

cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic

and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link

your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley

Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into

one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data.

Data articles

ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly

available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an

additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is

accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be

editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open

access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data](#)

[in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access

or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process,

for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your

published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof

corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to

MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.