

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**CLAUDIO SABBATINI CAPELLA LOPES**

**APLICAÇÃO DE EXTRATO E MICROESPUMA DE  
RAMNOLIPÍDIOS NA REMOÇÃO DE CONTAMINANTES  
METÁLICOS/METALOÍDICO DO SOLO**

**RIO DE JANEIRO**

**2021**



CLAUDIO SABBATINI CAPELLA LOPES



APLICAÇÃO DE EXTRATO E MICROESPUMA DE RAMNOLIPÍDIOS NA  
REMOÇÃO DE CONTAMINANTES METÁLICOS/ METALOÍDICO DO SOLO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

**Orientadora:** Profa. Lucy Seldin

**Coorientadora:** Denise M. Guimarães Freire

Rio de Janeiro

2021

## Ficha catalográfica

### CIP - Catalogação na Publicação

SL864a Sabbatini Capella Lopes, Claudio  
Aplicação de extrato e microespuma de  
ramnolipídios na remoção de contaminantes  
metálicos/metaloídico do solo / Claudio Sabbatini  
Capella Lopes. -- Rio de Janeiro, 2021.  
162 f.

Orientador: Lucy Seldin.  
Coorientadora: Denise Maria Guimarães Freire.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal,  
2021.

1. Biotecnologia . 2. Extrato de ramnolipídio .  
3. Microespuma de ramnolipídios. 4. Extração de  
metais/metaloídico . 5. Remediação de solos. I.  
Seldin, Lucy, orient. II. Maria Guimarães Freire,  
Denise, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## Folha de aprovação

## Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter colocado muitas pessoas importantes na minha vida ao longo deste doutorado. Em segundo lugar eu gostaria de agradecer as minhas orientadoras Lucy Seldin e Denise M. Guimarães Freire pelos inúmeros conselhos, correções e sugestões ao longo da minha tese. Eu gostaria de agradecer também o professor Ricardo Erthal Santelli pelas sugestões, correções e apoio durante a realização da minha tese de doutorado. Ao professor Hudson Jean Bianchini Couto pelas sugestões, e apoio ao longo da minha tese. Eu gostaria de agradecer aos colegas de laboratório: Bernardo Ferreira Braz, Douglas Braga Teixeira, Livia de Araújo Castilho, Rui de Paula Vieira Castro, Vanessa Rocha, Fábio Diniz Vale, Cassiano Augusto Rolim Bernadino e todos os colegas do LABIM. Gostaria de agradecer o técnico laboratorial Marlei Gomes da Silva pela troca de conhecimento na área de bacteriologia, ao técnico de microscopia Jeferson Bonfim Silva Cyprinao pelo treinamento em microscopia ótica ao técnico de laboratório da COPPE “Bob” pela assistência na montagem das minhas colunas de remediação. Eu gostaria de agradecer também a todo corpo docente e discente do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos. O esforço em conjunto de todos tem contribuído para a excelência do nosso programa de Pós-Graduação. Eu gostaria de agradecer o imenso apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado Rio de Janeiro (FAPERJ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), sem estes órgãos de fomento à pesquisa não seria possível a execução da minha tese de doutorado. Eu gostaria de agradecer a minha família, em especial a minha esposa Ana Carolina, meu filho Benjamim, minha irmã Clarice e meus pais Claudio e Rosangela por todo apoio e força em todos os momentos da minha tese. Finalmente agradeço e dedico esta tese também ao meu tio Luiz, que sempre acreditou em mim. Um tio que sempre tinha um sorriso no rosto, uma palavra amiga e um conhecimento sobre as leis da física para ensinar a quem pedisse. Obrigado por tudo tio!

*“Onde há amor e sabedoria, não há medo e  
nem ignorância” (São Francisco de Assis)*

## Resumo

Lopes, Claudio Sabbatini Capella. Aplicação de extrato e microespuma de ramnolipídios na remoção de contaminantes metálicos/metaloídico do solo. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2021.

A contaminação do solo por resíduos metálicos representa uma ameaça para o ambiente e para a saúde humana. A maioria das substâncias utilizadas em processos de remediação de solo promove alterações deletérias na composição físico-química do solo ou possui uma lenta biodegradabilidade no meio ambiente. Ramnolipídios são biossurfactantes glicolipídicos reconhecidos pelas suas propriedades extratoras de metais e apresentam uma alta biodegradabilidade; entretanto, a sua aplicação em solos contaminados é limitada devido aos custos de sua produção em larga escala. A utilização de biossurfactantes sem etapas de purificação em processos de remediação é desejável sob os aspectos econômico e ambiental. Considerando as propriedades tensoativas dos ramnolipídios, é possível modificar temporariamente as micelas de ramnolipídios em dispersão de microespumas, visando aumentar as suas propriedades de remediação de metais. Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram (i) avaliar o potencial de um ramnolipídio bruto para remover metais e um metaloide de um solo artificialmente contaminado e de um solo proveniente de uma zona de mineração; (ii) submeter o biossurfactante a ensaios de toxicidade aguda usando um micro crustáceo e a testes de inibição de crescimento de microrganismos ambientais; (iii) testar a possibilidade de precipitar arsênio, cádmio e zinco a partir de um extrato de ramnolipídios para permitir uma eliminação mais adequada de contaminantes metálicos e metaloídicos nos processos de remediação do solo; (iv) avaliar os parâmetros que influenciam a estabilidade e o diâmetro médio de bolhas de microespumas de ramnolipídios (v) testar a eficiência de microespumas de ramnolipídios para extrair contaminantes metálicos de amostras de solo. O biossurfactante apresentou propriedade extratora máxima de metais e metaloide a uma concentração de 2%, removendo 53% do arsênio, 90% do cádmio e 80% do zinco do solo artificialmente contaminado. Quando este foi testado utilizando-se amostras de solo de uma zona de mineração desativada, o extrato de ramnolipídio removeu 59% do arsênio, 57% do cádmio e 9% do zinco. O biossurfactante mostrou não ser tóxico para o bioindicador ambiental *Artemia salina* e não foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos normalmente encontrados no solo. O método de precipitação foi capaz de remover todo o arsênio e cádmio e 70% de zinco na solução de biossurfactante após ensaios de remediação de solo arenoso contaminado artificialmente. As microespumas de ramnolipídios atingiram uma estabilidade superior a 600 s e um diâmetro médio de bolha de 120  $\mu\text{m}$ . Experimentos de percolação em meio poroso demonstraram uma queda de pressão interna significativa quando as microespumas de ramnolipídios foram percoladas através da coluna de remediação preenchida com solo arenoso. Ensaios de remediação em larga escala demonstraram que as microespumas de ramnolipídios foram capazes de remover

38% de cádmio e 56% de zinco após uma percolação de 10 volumes de poros. A extração de cádmio e zinco pelas microespumas e pelo extrato de ramnolipídios foram influenciadas significativamente pelo número de volumes de poros percolados através da coluna de remediação. A aplicação de extratos e de microespumas de ramnolipídios representa uma importante ferramenta ecologicamente correta para a remediação de solos contaminados por metais/metaloídico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia, extrato de ramnolipídios, microespuma de ramnolipídios, extração de metais/metaloídico, remediação de solos.

## Abstract

Lopes, Claudio Sabbatini Capella. Application of rhamnolipid and rhamnolipid microfoams in the removal of metal/metalloid contaminants from soil. Rio de Janeiro, 2021. Thesis (Doctoral degree in Plant Biotechnology and Bioprocesses). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2021.

Soil contamination by metallic residues represents a threat to the environment and human health. Currently, most of the substances used in soil remediation processes promote deleterious changes in the physicochemical composition of the soil or have a slow biodegradability in the environment. Rhamnolipids are glycolipids recognized for their metal-extracting properties and exhibit significant biodegradability; however, their field application is sometimes hindered due to the costs of large-scale production. The possibility to apply this biosurfactant without purification steps in soil remediation processes is desirable from a socioenvironmental aspect. Considering the tensioactive properties of rhamnolipids, it is also possible to temporally modify rhamnolipids micelles into colloidal gas aphrons (CGA) as to increase their metal remediation properties. The main goals of this study was (i) to evaluate the potential of a crude rhamnolipid to remove metals and a metalloid from an artificially contaminated soil and from a long-term contamination site; (ii) to submit the rhamnolipid extract to acute toxicity assays using a microcrustacean and to growth inhibition tests using soil microorganisms; (iii) to test a precipitation method towards arsenic, cadmium, and zinc from a rhamnolipid extract to allow proper eco-friendly disposal of metal/metalloid contaminants in soil remediation processes; (iv) to evaluate the influence of several parameters towards the stability and bubble size diameter of the rhamnolipid CGAs; (v) to perform a series of soil column experiments to better understand the percolation of rhamnolipid colloidal gas aphrons and extract solutions through porous media and the efficiency of rhamnolipid CGA to extract metal contaminants from soil samples. The rhamnolipid showed a high extractive capacity for transition metals and metalloids at a concentration of 2%, removing 53% of the arsenic, 90% of the cadmium and 80% of the zinc from the artificially contaminated soil. When tested against soil samples from a deactivated mining site, the rhamnolipid removed 59% of the arsenic, 57% of cadmium and 9% of zinc. The biosurfactant showed excellent biocompatibility with *Artemia salina*. Growth inhibition tests demonstrated that the rhamnolipid was innocuous for commensally soil bacteria and yeast. The precipitation method tested was able to remove all the arsenic and cadmium, while removing 70% of zinc in the biosurfactant solution that was used to remove metal contaminants from the artificially contaminated sandy soil. Rhamnolipid CGAs reached over 600 s of stability and an average bubble size of 120  $\mu\text{m}$ . Flow rate experiments showed a significant pressure drop when rhamnolipid CGAs were pumped through the remediation column. Soil column experiments showed that a rhamnolipid CGA could remove 38% removal rate for cadmium and a 56% removal rate for zinc after a percolation of 10 pore volumes. Extraction of cadmium and zinc was highly influenced by the number of pore volumes percolated. The application

of rhamnolipid extracts and rhamnolipid CGAs in metal-contaminated soils represents an important tool for a more efficient and environmentally friendly metal remediation process.

**KEY WORDS:** Biotechnology, rhamnolipid extract, rhamnolipid colloidal gas aphrons, metal/metalloid extraction, soil remediation.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Arranjo espacial dos constituintes do solo e sua respectiva estrutura microporosa (tecido do solo) .....	19
Figura 2 - Estrutura química de uma Montmorilonita um mineral de argila silicatada.....	20
Figura 3 - Estrutura química de ácido húmico e ácido fúlvico.....	21
Figura 4 - Esquema ilustrativo das interações entre cátions e ânions em uma partícula coloidal do solo.....	21
Figura 5 - Efeito da alteração do pH na matéria orgânica do solo.....	22
Figura 6 - Desenho esquemático de cargas positivas e negativas do mineral gibsitita.....	23
Figura 7 - Desenho esquemático de uma substituição isomórfica de $\text{Si}^{+4}$ por $\text{Al}^{+3}$ no tetraedro de silício e substituição de $\text{Al}^{+3}$ por $\text{Mg}^{+2}$ $\text{Fe}^{+2}$ no octaedro de alumínio.....	23
Figura 8 - Estrutura química de (a) mono- ramnolipídio e (b) di-ramnolipídio .....	37
Figura 9 - Desenho esquemático de lavagem de solo por ramnolipídios.....	39
Figura 10 - Desenho esquemático de uma microbolha e sua tripla camada de moléculas de surfactantes.....	41
Figura 11(A) - Imagem de bolhas de uma dispersão de espumas de ramnolipídios magnificação de 10X.....	43
Figura 11 (B) - Imagem de microbolhas de ramnolipídio magnificação de 10X .....	43
Figura 12: Desenho esquemático de uma percolação de solo arenoso contaminado por chuva artificial.....	54
Figura 13 (A) - Execução do método 3051A (USEPA) na capela de exaustão de gases.....	55
Figura 13 (B) - Forno de micro-ondas de digestão.....	55
Figura 14 - Frascos contendo os extratos de metais/metaloídico referentes à extração sequencial dos ensaios de remediação de solo.....	57
Figura 15 - Desenho esquemático de uma unidade produtora de microespumas.....	62
Figura 16 - Coluna de remediação de 20 cm para os ensaios de percolação de chuva artificial.....	63
Figura 17(A) - Medição da coluna de vidro.....	64
Figura 17 (B) - Coluna de remediação montada.....	64
Figura 18 (A) - Separação das amostras de solo arenosas após a remediação em coluna.....	66
Figura 18 (B) - Processo de homogeneização das amostras de solo por quarteamento.....	66

Figura 19 (A) - Extração sequencial de arsênio de uma amostra de solo arenosa contaminada antes e após um experimento de lavagem de solo.....	72
Figura 19 (B) - Extração sequencial de cádmio de uma amostra de solo arenosa contaminada antes e após um experimento de lavagem de solo.....	72
Figura 19 (C) - Extração sequencial de zinco de uma amostra de solo arenosa contaminada antes e após um experimento de lavagem de solo.....	73
Figura 20 (A) - Extração sequencial de arsênio de amostras de solo franco-siltoso de uma zona de mineração antes e após um experimento de lavagem de solo.....	74
Figura 20 (B) - Extração sequencial de cádmio de amostras de solo franco-siltoso de uma zona de mineração antes e após um experimento de lavagem de solo.....	74
Figura 20 (C) - Extração sequencial zinco de amostras de solo franco-siltoso de uma zona de mineração antes e após um experimento de lavagem de solo.....	75
Figura 21 - Teste de difusão em placa pela técnica de poço; Linha vermelha: controle positivo de inibição de crescimento por difusão de disco antimicrobiano.....	76
Figura 22 - Precipitação química de As, Cd e Zn no extrato de ramnolipídio.....	78
Figura 23 - Concentração em mg/L de As, Cd e Zn no extrato de ramnolipídio.....	78
Figura 24 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 1%. Rotação por minuto versus tempo de preparo.....	81
Figura 25 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 0,5%. Rotação por minuto versus tempo de preparo.....	82
Figura 26- Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 1%: Rotação por minuto versus pH.....	82
Figura 27 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 0,5%: Rotação por minuto versus pH.....	83
Figura 28 - Superfície de resposta para diâmetro de bolha de microespuma a uma concentração de 1%: Rotação por minuto versus pH.....	83
Figura 29 - Superfície de resposta para diâmetro de bolha de microespuma a uma concentração de 0,5%: Rotação por minuto versus pH.....	84
Figura 30 - Queda de pressão em função da percolação do extrato líquido de ramnolipídio X microespuma de ramnolipídio.....	85
Figura 31 - Valores percentuais de remediação de metais/metaloídico por microespumas de ramnolipídio. Concentração 0,5% e pH 9; V <sub>p</sub> : Volume de poro.....	86
Figura 32 - Valores percentuais de remediação de metais/metaloídico por extrato de ramnolipídios. Concentração 0,5% e pH 9; V <sub>p</sub> : Volume de poro.....	86
Figura 33 - Análise estatística da média dos valores utilizando o teste HSD pós-hoc de Tukey (5% de probabilidade), presente no software Statística 7.0.....	130

Figura 34 - Análise estatística do DCCR para estabilidade e diâmetro de bolha de microespumas geradas a partir de um extrato de RL a uma concentração de 0,5%.....131

Figura 35- Análise estatística do DCCR para estabilidade e diâmetro de bolha de microespumas geradas a partir de um extrato de RL a uma concentração de 1%.....131

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$A_t$  – Área transversal da coluna de vidro ( $m^2$ )

**Bar** – Unidade de pressão atmosférica

BCR – Gabinete de Referência da Comunidade Europeia

**CL50** – Concentração letal de 50%

**CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**CMC** – Concentração Micelar Crítica (g/L)

**CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente

$D_p$  – Diâmetro de partícula (mm)

**h** – Altura da coluna de vidro ( $cm^2$ )

**nm** – nanômetros

**ICP-OES** – Espectrometria ótica com plasma indutivamente acoplado

$m_s$  – massa de solo (g)

$T_p$  – Tempo de preparo das microespumas (s)

$(T_{0,5})$  – Tempo de meia vida

**UE** – União Europeia

**USEPA** – United States Environmental Protection Agency

$V_p$  – Volume de poro ( $m^3$ )

$V_s$  – Volume da fase líquida da dispersão de microespuma ( $m^3$ )

$V_t$  – Volume total da dispersão de microespuma ( $m^3$ )

$\epsilon_{MP}$  – Porosidade do meio poroso (adimensional)

**$\mu m$**  – Micrômetro

$\rho_p$  – Densidade de partícula de solo (g/L)

## Sumário

1.Introdução.....	18
1.1 O solo como sistema coloidal.....	17
1.2 Aplicação do fracionamento geológico de metais .....	24
1.3. Contaminantes metálicos: definição para áreas agrícolas, residenciais e industriais.....	25
1.4. Contaminação do solo por arsênio, cádmio e zinco.....	26
1.5. Interação química de arsênio, cádmio e zinco com o solo .....	28
1.6. Tecnologias de remediação de metais pesado no solo.....	30
1.7. Uso de surfactantes químicos na mobilização de metais pesados.....	32
1.8. Ecotoxicidade de surfactantes químicos.....	34
1.9. Aplicação de biosurfactantes na mobilização contaminantes metálicos.....	35
1.10. Ramnolipídios: definição e uso de glicerol na produção.....	36
1.11 Estrutura química de ramnolipídios e interação com contaminantes metálicos.....	37
1.12. Microespumas e suas aplicações em processos de remediação.....	40
1.13. Fenômenos decorrentes da geração de microespumas.....	42
1.14. Caracterização de microespumas.....	44
2. Justificativa.....	46
3. Objetivo.....	46
3.1 Objetivo específicos.....	47
4. Materiais e métodos.....	47
4.1 Produção de ramnolipídios.....	47
4.1.1. Preparo de pré-inóculo.....	47
4.1.2. Padronização do pré- inóculo.....	48
4.1.3. Produção ramnolipídios utilizando meio mínimo.....	48
4.2. Quantificação de ramnolipídios por Cromatografia de alta eficiência.....	49
4.2.1 Caracterização de ramnolipídios por espectrometria de massa.....	49
4.2.2. Determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica .....	50

4.3. Propriedades físico-químicas das amostras de solo.....	51
4.3.1. Análise elementar das amostras de solo.....	51
4.3.2. Contaminação artificial de solo arenoso.....	52
4.4. Experimentos de remediação em frascos.....	54
4.4.1. Extração sequencial das amostras de solo.....	<del>55</del> 56
4.5. Ensaio de toxicidade aguda.....	57
4.6. Ensaio de inibição de microrganismos típicos do solo.....	58
4.7. Precipitação química de As, Cd, Zn.....	59
4.8. Produção de microespumas de ramnolipídios.....	60
4.8.1. Desenho experimental para produção de microespumas de ramnolipídios.....	60
4.8.2. Método de geração de microespumas de ramnolipídios.....	<del>61</del> 62
4.8.3. Ensaio de estabilidade e diâmetro de bolha de microespumas .....	62
4.9. Contaminação artificial de solo arenoso para os ensaios de remediação em colunas.....	63
4.10. Ensaio de percolação em coluna.....	64
4.10.1. Determinação da vazão de trabalho.....	64
4.10.2. Ensaio de remediação em coluna.....	65
5. Resultados.....	67
5.1. Produção e caracterização de ramnolipídio.....	67
5.2. Contaminação artificial de solo arenoso simulando um processo de contaminação recente.....	68
5.3. Efeito da concentração de ramnolipídios e pH na remediação de metais e metaloide.....	68
5.4. Extração sequencial de amostras de solos contaminados recentemente e de zona de mineração.....	<del>71</del> <u>70</u>
5.5. Distribuição dos contaminantes nas frações geoquímicas das amostras de solo tratadas com RML.....	71
5.6. Ensaio de toxicidade aguda.....	75
5.7. Ensaio de inibição de crescimento para bactérias típicas do solo.....	76
5.8. Precipitação química de arsênio, cádmio e zinco do extrato de ramnolipídio.....	77

5.9. Produção e caracterização do extrato de ramnolipídios para os ensaios de remediação em macroescala.....	79
5.10. Estabilidade e diâmetro médio de bolha de microespumas de ramnolipídios.....	80
5.11. Ensaios para determinação da vazão de trabalho.....	84
5.12. Eficiência de remediação das microespumas de ramnolipídios.....	85
6. Discussão.....	87
6.1. Quantificação e caracterização de ramnolipídios no extrato bruto.....	86
6.2. Efeito da concentração e do pH dos extratos de RL na remediação de metais/metaloídico.....	88
6.3. Influência dos fatores físico-químicos dos solos na adsorção de As, Cd e Zn nas frações geoquímicas do solo.....	89
6.4. Extração sequencial das amostras de solo após a remediação por extrato de ramnolipídios.....	91
6.5. Ensaio de toxicidade aguda.....	93
6.6. Ensaio de inibição de crescimento de bactérias típicos do solo... ..	94
6.7. Precipitação química de As, Cd e Zn.....	95
6.8 Determinação da estabilidade e diâmetro médio de bolha das microespumas de ramnolipídios.....	95
6.9. Determinação da vazão de trabalho em colunas de remediação de solos.....	98
6.10. Eficiência de remediação de microespumas de ramnolipídios.....	99
6.11. Influência do número de volumes de poro de extrato de RL.....	101
7. Conclusões.....	102
8. Perspectivas futuras.....	103
9. Bibliografia.....	103
ANEXOS.....	128
Anexo 1. Artigo 1.....	128
Anexo 2. Artigo 2.....	129
Anexo 3. Análise estatística dos ensaios de remediação em frasco.....	160
Anexo 4. Análise estatística do DCCR para estabilidade e diâmetro de bolhas das microespumas de RL.....	161
Anexo 5. Equações dos gráficos dos DCCR.....	162



## **1-Introdução**

### **1.1. O solo como sistema coloidal**

O solo é o resultado da interação entre rochas e minerais (litosfera) com a água (hidrosfera), com o ar (atmosfera) e com populações de organismos vivos (biosfera), podendo ainda citar o clima como regulador indireto destas interações (VORONEY & HECK, 2015). Esta interação é constante e dinâmica, podendo ser observada a nível microscópico nas três fases do solo: sólido, líquido e gasoso. A fase sólida é uma mistura de materiais orgânicos e minerais formando uma estrutura semelhante a um arcabouço poroso, o qual por sua vez é compartilhado pelas fases líquidas e gasosas do solo (Figura 1). Em termos micromorfológicos, esta combinação entre o arcabouço formado pela fase sólida do solo e os respectivos poros compõe o denominado tecido do solo (BREWER & SLEEMAN, 1960).

Tradicionalmente, o estudo a respeito das características de cada tipo de solo é abordado em função das características físico-químicas das rochas e minerais que deram origem ao solo estudado. A medida que novos avanços no campo da ecologia microbiana vão ocorrendo, é possível destacar o papel das interações entre organismos e materiais orgânicos com agentes de transformação e composição do solo. Este fato pode ser exemplificado inclusive pela presença de matéria orgânica em diversos organismos autotróficos, heterotróficos e nos diversos tipos de solos existentes na litosfera da Terra, porém ausente nas rochas e minerais (TAM, 2011).

Conforme mencionado anteriormente, os componentes sólidos que compõem o arcabouço do solo podem ser divididos em materiais inorgânicos (principalmente minerais) e materiais orgânicos (fragmentos de raízes e outros organismos) (tamanho igual ou inferior a 2 mm). Por outro lado, materiais ainda menores incluem os coloides argilominerais (plasma inorgânico) e os coloides orgânicos (plasma orgânico), ambos com tamanho inferior a 0,002 mm. A decomposição dos materiais inorgânicos gera o plasma inorgânico, assim como a deterioração dos materiais orgânicos gera o plasma orgânico (OSMOND, 2010).

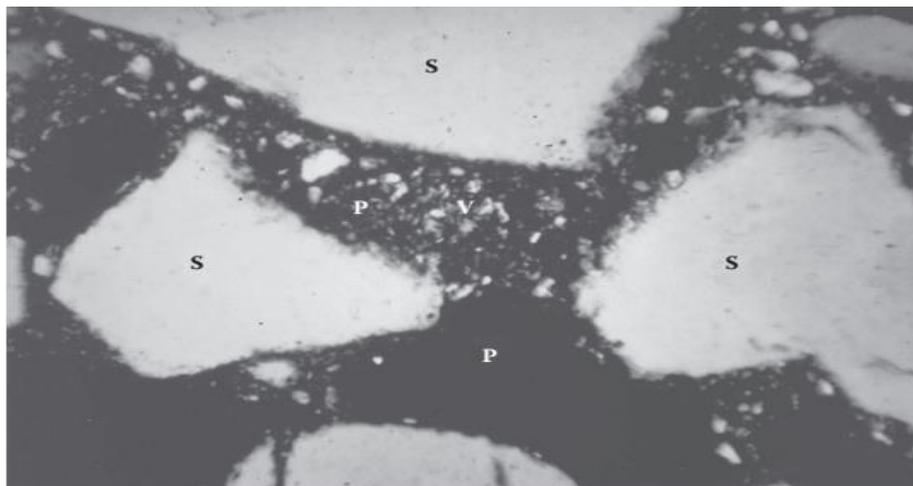


Figura 1 - Arranjo espacial dos constituintes do solo e sua respectiva estrutura microporosa (tecido do solo). (S): Grãos de areia (2-0,005 mm); (P): Plasma do solo (<0,002 mm) constituído por minerais de argila e matéria orgânica; (V) Microporo preenchido por água e ar. Retirado de TAM (2011).

O sistema coloidal pode ser definido como uma mistura de diferentes elementos químicos em fases distintas. No entanto, é possível classificar os diferentes tipos de sistemas coloidais presentes no microambiente baseado em sua composição química predominante. No plasma inorgânico, é possível encontrar os coloides inorgânicos que podem ser formados por argilominerais silicatados e não silicatados. No caso, a estrutura física de um coloide de argila silicatada é composta por flocos de formatos geralmente hexagonais e a sua estrutura assemelha-se a uma micela, abrangendo um núcleo o qual pode ser constituído basicamente por alumínio silicatos hidratados ( $\text{Si}_2\text{O}_3\text{Al}_2(\text{OH})_4$ ), sendo estes possuidores de carga negativa e, assim, capazes de atrair cátions ( $\text{K}^+$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ), formando uma segunda camada interna de cátions (Figura 2).

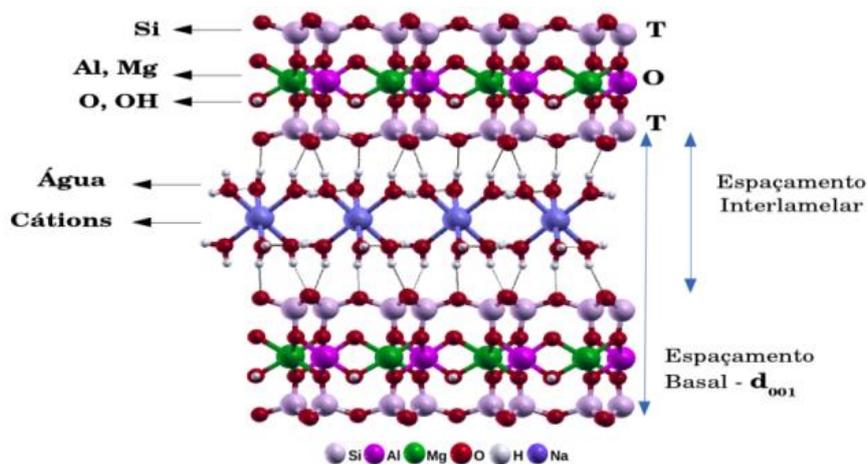


Figura 2 - Estrutura química de uma Montmorilonita, um mineral de argila silicatada. “Fonte <<https://www.ufjf.br/gfqi/linhas-de-pesquisa/materiais-lamela/montmorillonitas/>><Acesso em: maio de 2017>

Existem também os argilominerais não silicatados como: haletos, sulfatos e carbonatos. Este grupo é composto por minerais com estruturas relativamente simples. As ligações entre os cátions e ânions que compõem as suas estruturas são predominantemente iônicas. Os principais representantes desse grupo são a halita (NaCl), o gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e a calcita ( $\text{CaCO}_3$ ). Existem ainda os óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de alumínio, ferro e manganês que são resultantes de processos de intemperismo de outros minerais menos estáveis e são muito comuns em solos tropicais (LEPSCH, 2011).

O plasma orgânico do solo pode ser caracterizado como complexos coloidais orgânicos. Entretanto, ao contrário dos coloides de argila, os coloides orgânicos possuem dimensões bastante variadas e são compostos basicamente de carbono, hidrogênio e oxigênio (RICE, 2006). Possuem grupos carboxílicos e fenólicos parcialmente dissociados, resultantes da degradação biológica de ácidos húmicos, fúlvicos e ácidos orgânicos de baixa massa molecular como: cítrico, málico, oxálico e tartárico (KPOMBLEKOU-A & TABATABAI, 2003). A figura 3 exemplifica a estrutura química de ácidos húmicos e fúlvicos.

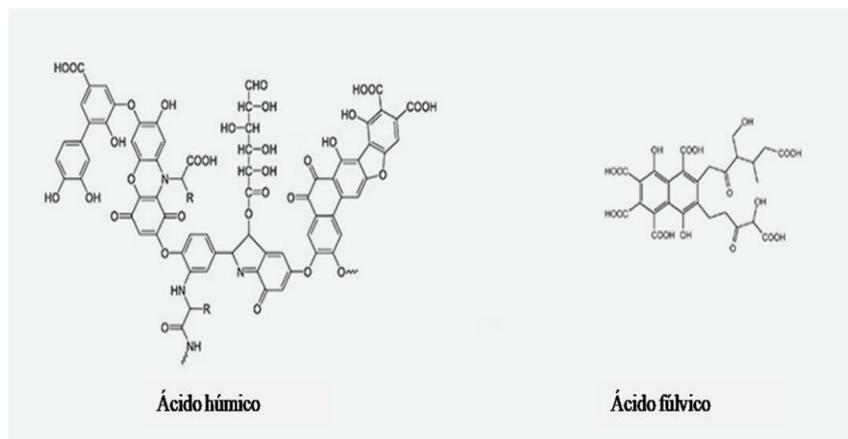


Figura 3 - Estrutura química de ácido húmico e ácido fúlvico.  
 “Fonte: <<http://www.earthgreen.com/humic-vs-fulvic-acids>> <Acesso: Janeiro de 2020>

Ao redor desta camada mais interna existe uma segunda camada formada por ânions como cloretos ( $\text{Cl}^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e parte da fração orgânica do solo, todos interligados com a camada interna de cátions através de interações químicas mais fracas formando uma matriz interligada (HAJNOS & CIESLA, 2011) (Figura 4).

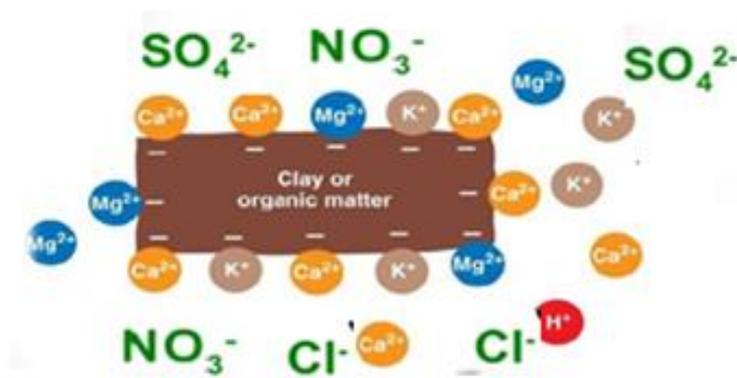


Figura 4 - Esquema ilustrativo das interações entre cátions e ânions em uma partícula coloidal do solo. “Fonte: <[www.soilandhealth.org](http://www.soilandhealth.org)>, <Acesso: Janeiro de 2017>”

As interações químicas e físicas em ambos os plasmas são muito dinâmicas, sendo responsáveis por controlarem diversas propriedades bioquímicas e físicas do solo

e desempenhando diversas funções relacionadas à fertilidade do solo, tais como: troca iônica, atividade tamponante ou como agente quelante de cátions (MILLS, LIU & FONG, 1991). Os plasmas orgânicos e inorgânicos influenciam diretamente o potencial eletroquímico do solo e, desta maneira, desempenham um papel importante na mobilização e retenção de metais.

Uma das razões para esta influência reside na grande superfície de contato e alta reatividade dos coloides de argila e coloides orgânicos e, deste modo, influenciando a adsorção de metais ao solo. Reações de adsorção ocorrem na superfície dos coloides do solo. No caso dos coloides orgânicos, o fenômeno de adsorção ocorre principalmente devido à presença dos grupos funcionais carboxila e fenol e são reações pH dependentes, conforme exemplificado na figura 5.

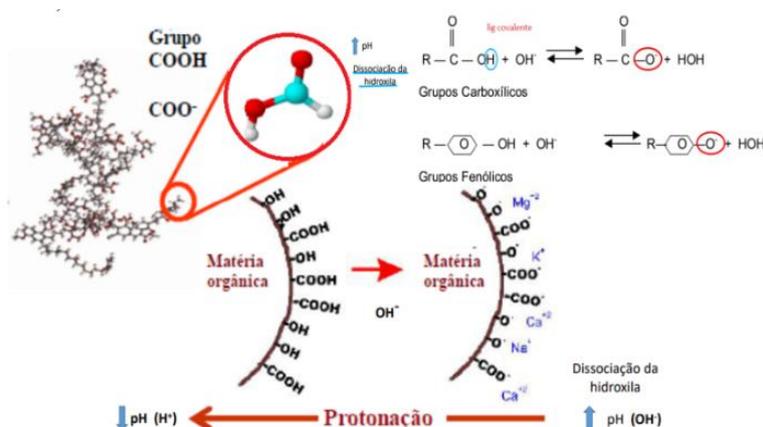


Figura 5 – Desenho esquemático mostrando o efeito da alteração do pH na matéria orgânica do solo.

“Fonte: <<https://agrofuturomil.files.wordpress.com/2016/09/02desenvolvimento-de-cargas-no-solo-2017.pdf>>, <Acesso: Janeiro de 2017> “

As reações de adsorção por coloides inorgânicos são também consideradas reações de superfície e ocorrem principalmente devido à presença de carga na superfície do argilomineral. Estas reações são consideradas pH dependente. Como exemplo desse tipo de interação química é possível citar as reações de adsorção de superfície do mineral gibbissita. A gibbissita é considerado o hidróxido de alumínio  $Al(OH)_3$  encontrado com maior frequência em solos intemperizados. Sua estrutura cristalina e octaédrica é constituída de dois planos de hidroxilas ligados a íons de alumínio ( $Al^{3+}$ ) (Figura 6). Também é possível a presença de carga na superfície do mineral de argila

devido a substituições isomórficas. Este fenômeno ocorre devido a uma substituição de cátions ao longo do processo de formação dos minerais de argila, resultando em uma carga permanente e negativa no coloide de argila (HOFFMAN, ENDELL & BLIKE, 1933). Como exemplo é possível citar a substituição de  $\text{Al}^{3+}$  por  $\text{Si}^{4+}$  no tetraedro de silício e substituição de  $\text{Al}^{3+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 7).

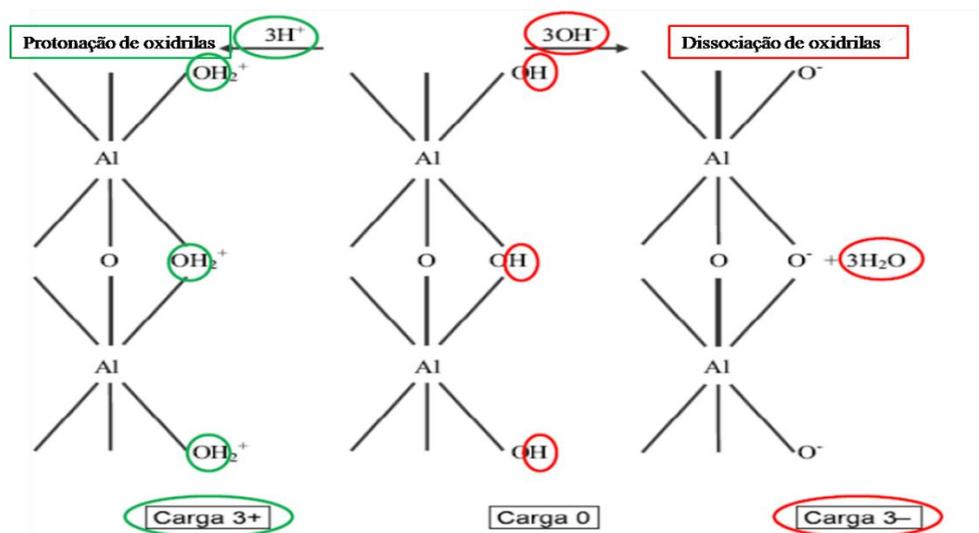


Figura 6 - Desenho esquemático de cargas positivas e negativas do mineral gibbsita.

“Fonte: <<https://agrofuturomil.files.wordpress.com/2016/09/02desenvolvimento-de-cargas-no-solo-2017.pdf>>, <Acesso em março de 2017>”

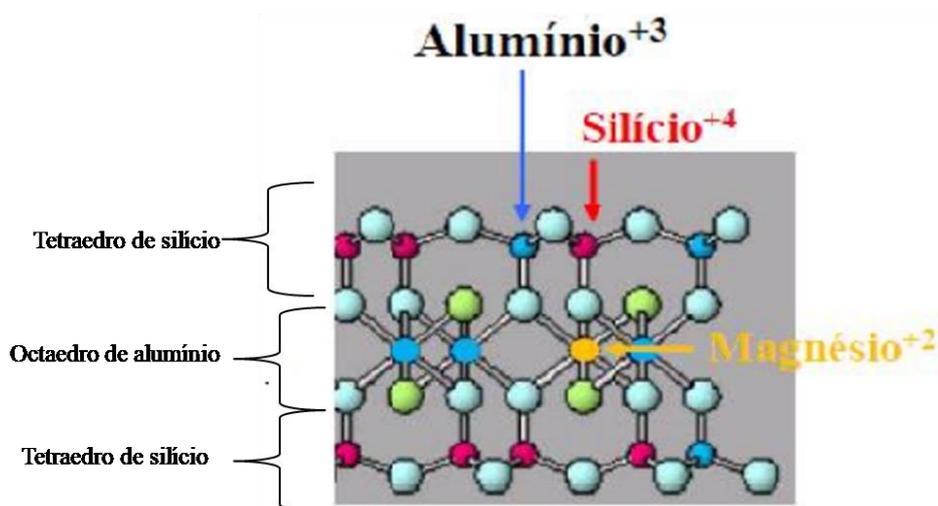


Figura 7 - Desenho esquemático de uma substituição isomórfica de  $\text{Si}^{4+}$  por  $\text{Al}^{3+}$  no tetraedro de silício e substituição de  $\text{Al}^{3+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  no octaedro de

alumínio. ”Fonte: <<https://agrofuturomil.files.wordpress.com/2016/09/02-desenvolvimento-de-cargas-no-solo-2017.pdf>>, <Acesso em Janeiro de 2017>”.

## 1.2. Aplicação do fracionamento geológico de metais

As propriedades físico-químicas dos elementos químicos, como por exemplo o grau de valência, proporcionam diferentes interações com o meio ambiente. Conforme citado anteriormente, diferentes tipos de minerais presentes em solos, sedimentos ou rejeitos de minérios, como também maior ou menor teor de matéria orgânica e ainda alterações de pH, são apenas alguns dos fatores que podem influenciar o grau de especiação de um metal no meio ambiente (ZHANG *et al.*, 2014). Portanto, devido aos inúmeros fatores que podem determinar a biodisponibilidade de metais no meio ambiente, foi desenvolvida uma série de protocolos destinados à extração sequencial de solos e sedimentos com o objetivo de compreender melhor a interação dos elementos químicos com as diferentes frações geoquímicas da matriz sólida, e fornecer informações a respeito do grau de especiação de um determinado elemento químico dentro das respectivas frações.

Diversos protocolos de extração sequencial podem ser aplicados para determinação de metais em solos e sedimentos; contudo, todos eles se baseiam na exposição das matrizes sólidas a soluções extratoras as quais são classificadas de acordo com o seu modo de ação: ácidos fracos, ácidos fortes, agentes oxidantes, agentes redutores e agentes complexantes (JULIÁN & COLLADO, 2002). O método de extração sequencial “Bureau Community Reference” (BCR) foi desenvolvido pelo Escritório Ambiental da Comunidade Europeia (EEB) e define como sendo as frações geológicas mais importantes para solos e sedimentos: (1) fração trocável, (2) fração ligada a carbonatos, (3) fração ligada à matéria orgânica e (4) fração residual (RAURET *et al.*, 2000).

(1) Fração trocável: Os metais presentes nesta fração estão ligados às partículas sólidas de sedimentos ou solos por interações químicas fracas do tipo eletrostáticas. Estas ligações podem ser desfeitas por processos de trocas iônicas. Nesta fração, mudanças na força iônica da água presente no plasma do solo influenciam

diretamente a adsorção ou a dessorção de metais na interface do solo ou sedimento com a água.

(2) Fração ligada a carbonatos: Os metais ligados a carbonatos são sensíveis à variação de pH, e o aumento de acidez nesta fração libera cátions metálicos devido à dissolução parcial ou total dos sais de carbonatos.

(3) Fração ligada à matéria orgânica: A degradação da matéria orgânica é obtida após a matriz sólida ser submetida a condições oxidantes, causando a liberação de metais solúveis que estavam ligados a substâncias orgânicas.

Existe uma grande variedade de formas químicas orgânicas capazes de interagir com metais como, por exemplo, microrganismos, detritos biológicos, entre outros. Contudo, em sedimentos e solos, o material orgânico predominantemente é constituído de substâncias húmicas. Porém, existe ainda uma porção menor da fração orgânica composta de proteínas, carboidratos, peptídeos, aminoácidos que também são passíveis de ligações com contaminantes metálicos. Em ambos os tipos de materiais orgânicos, estas ligações podem ser desfeitas mediante condições oxidantes.

(4) Fração residual: Nesta fração, os metais estão ligados à fração mineral do solo, de modo que o contaminante metálico está inserido na estrutura cristalina de minerais primários ou secundários. Os metais presentes nesta fração são considerados elementos químicos com uma biodisponibilidade reduzida.

### **1.3. Contaminantes metálicos: definição para áreas agrícolas, residenciais e industriais**

O termo metal pesado, embora amplamente utilizado na literatura como designação de um elemento tóxico ao meio ambiente, na verdade refere-se a metais ou semimetais que apresentem densidade superior a  $5\text{g/cm}^3$  como: zinco, cádmio, mercúrio e arsênio. Entretanto, o termo necessitaria de uma revisão já que existem diferenças quanto às propriedades físico-químicas, biológicas e toxicológicas destes metais quando em contato com o meio ambiente (DUFFUS, 2002). Em relação ao teor de metais pesados no solo, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) estabelece

valores limites para adoção de medidas investigativas com o intuito de constatar a ação antrópica sobre cada tipo de solo. O limite de arsênio, cádmio e zinco em solos agricultáveis são respectivamente: 35 mg/kg; 3 mg/kg; 450 mg/kg. Em solos residenciais, os limites para arsênio, cádmio e zinco são: 55 mg/kg; 8 mg/kg; 1000 mg/kg (CONAMA, 2009). O zinco também pode ser classificado como micronutriente ou elemento essencial, pois participa de diversos processos metabólicos de micro e macrorganismos. Contudo, em altas concentrações, o zinco é considerado tóxico ao meio ambiente (FADIGAS *et al.*, 2006). Atualmente, quando estes elementos químicos são citados pela literatura, se utiliza termos como “contaminantes metálicos”, “metais pesados contaminantes” ou “metais tóxicos”, especialmente quando se refere à identificação ou a processos de remediação.

#### **1.4. Contaminação do solo por arsênio, cádmio e zinco**

A alta concentração de contaminantes metálicos/metaloídico em solos e sedimentos - devido a incidentes isolados ou por exposição contínua a determinadas fontes de contaminação - representa um perigo não somente ao meio ambiente como também um risco à saúde humana. A exposição contínua de ambientes terrestres e aquáticos por contaminantes metálicos/metaloídico pode eventualmente levar à incorporação destes na cadeia alimentar humana (CAO *et al.*, 2021). Áreas próximas a mineradoras apresentam teores de metais pesados nos solos e corpos d'água superiores a outras áreas como por exemplo áreas agrícolas e residência, devido a característica desse tipo de atividade envolvendo a extração e o beneficiamento de minérios, que resultam no lançamento de uma variedade de resíduos metálicos e metaloídico no ambiente (JI *et al.*, 2013).

Arsênio é um metaloide e naturalmente presente no ar, solo, água, plantas, animais e, principalmente, em rochas sob a forma de minerais sulfídricos como arsenopirita (FeAsS). Processos erosivos ou ainda vulcânicos são exemplos de fenômenos naturais que auxiliam na dispersão natural de arsênio pelo ambiente (BISSEN & FRIMMEL, 2003). Porém, dentre as fontes antropogênicas que contribuem significativamente para a contaminação de solos por arsênio, é possível citar: a atividade de mineração, o uso de pesticidas e fungicidas contendo arsênio em sua composição e a queima de combustível fóssil (NRIAGU *et al.*, 2007). No Brasil, o uso

contínuo de pesticidas representa a maior fonte de contaminação por arsênio em solos e, conseqüentemente, leva a um acúmulo de arsênio acima do permitido pela legislação nacional em grãos consumidos diariamente pela população (como, por exemplo, o arroz) (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Outro exemplo de contaminação ambiental decorrente da atividade mineradora refere-se ao processo de mineração de zinco onde é possível citar, como exemplo, a mineração da esfarelita (ZnS), um sulfeto de zinco que possui uma estrutura cristalina correspondente a átomos de zinco e enxofre coordenados em um formato de tetraedro semelhante a um diamante. A esfarelita é o minério com maior concentração de zinco e, associado a este minério, é possível observar a presença de outros metais como cádmio, mercúrio e cobre (também na forma de sulfetos), os quais podem ser obtidos como subprodutos do processo de beneficiamento do zinco. O minério sulfetado de zinco está sujeito a grandes transformações na zona de oxidação, originando óxidos, carbonatos e silicatos de zinco (DANA & HULBURT, 1974). Todas estas formas químicas a base de zinco, são geradas em praticamente todas as etapas do beneficiamento do minério de zinco, as quais eventualmente podem ser emitidas para a atmosfera, e contaminar o meio ambiente ou áreas agrícolas próximas (VIRCIKOVA & MACALA, 1998). Em processos de metalurgia envolvendo cádmio, por exemplo, é comum ocorrer o lançamento de material particulado e poeira contendo este metal sob a forma de óxidos (CdO). Além disso, é comum a contaminação de águas subterrâneas por rejeitos líquidos contendo cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>) resultantes de vazamentos em barragens de contenção destinadas ao armazenamento deste contaminante metálico (CASTILLO *et al.*, 2013; DUMKOVA *et al.*, 2016).

Existe ainda a possibilidade de acidentes acontecerem em função do acúmulo de rejeitos metálicos sem o devido cuidado ou tratamento adequado. Em 2015, um grande desastre ambiental nacional ocorreu no Brasil resultante do rompimento de uma barragem (Barragem do Fundão) localizada no município de Mariana (MG). Aproximadamente 55-62 milhões de metros cúbicos de resíduos químicos resultantes do processamento de minério de ferro formaram uma avalanche de rejeitos metálicos que destruiu parte da cidade e contaminou a bacia hidrográfica do Rio Doce (SILVA *et al.*, 2020). Este acidente representou o maior volume de rejeitos lançados em um ecossistema na história da civilização moderna, superando os dois incidentes anteriores que aconteceram na República das Filipinas em 1982 e em 1996. No primeiro acidente

foram lançados 28 milhões de metros cúbicos de rejeitos em bacias sedimentares da região e, posteriormente, 32,2 milhões de metros cúbicos (IBAMA, 2015).

O desastre ambiental nacional mais recente envolvendo o rompimento de barragens de mineração ocorreu em novembro de 2019, quando a barragem de Córrego do Feijão localizada na cidade de Brumadinho (MG) se rompeu lançando 12 milhões de metros cúbicos de resíduos metálicos no Rio Paraopeba e áreas adjacentes, causando a morte de mais de 250 pessoas. Após o desastre, os níveis de mercúrio no rio Paraopeba aumentaram 21 vezes do valor aceitável, além de ocasionar a destruição de 133,27 hectares de mata atlântica nativa (CIONEK *et al.*, 2019).

Existem ainda outros problemas sanitários envolvendo contaminantes metálicos em território nacional. Martins *et al.* (2015) relataram altos teores de arsênio e chumbo em amostras de solo próximas a uma usina de beneficiamento de minérios na região de Apiaí, São Paulo. Alves-Neto *et al.* (2014) encontraram níveis perigosos de cádmio e zinco em amostras de água e de sedimentos provenientes do Rio Cabuçu-Piraquê no estado do Rio de Janeiro. Segundo os autores, as atividades metalúrgica, petroquímica e de fundição na região da baía de Sepetiba provocaram o transporte de altas concentrações de zinco e cádmio provenientes dos afluentes deste corpo d'água semifechado para áreas de estuário localizadas no rio Cabuçu-Piraquê. Outras atividades antrópicas também podem resultar na contaminação do solo por metais pesados. De acordo com De Mattos (2011), o despejo de “lixo eletrônico” de maneira inadequada também pode ser uma fonte de contaminação do solo por metais, como mercúrio e cádmio, entre outros, causando sérios riscos à saúde humana e à natureza. Porém, é possível citar ainda diversas outras atividades passíveis de contaminação do solo por metais pesados, como aplicação de pesticidas, fertilizantes químicos à base de arsênio, ou ainda rejeitos de tintas a base de metais pesado contendo zinco (ZHANG, LIU & WANG, 2010).

### **1.5. Interação química do arsênio, do cádmio e do zinco com o solo**

A dinâmica de adsorção de metais pesados ao solo está relacionada tanto às propriedades do solo, assim como às propriedades químicas do metal ou semimetal presente enquanto na forma iônica, implicando em ligações entre componentes orgânicos e inorgânicos do solo com este contaminante metálico (ZENTENO *et al.*,

2013). Ao entrar em contato com o solo, os metais pesados tendem a ser adsorvidos rapidamente na superfície reativa do solo, a qual é composta de hidróxidos, óxidos, matéria orgânica e minerais de argila. Estes compostos metálicos são passíveis de interações químicas com substâncias orgânicas presentes naturalmente no solo, como ácidos orgânicos alifáticos e/ou aromáticos (os quais se encontram presentes na matéria orgânica do solo) ou ainda com alguns aminoácidos. Além disso, são também precipitados por hidróxidos especialmente de ferro ( $\text{FeOH}_3$ ) e radicais fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) (MOUTA, SOARES & CASAGRANDE, 2008).

Posteriormente, ao longo do tempo, podem ocorrer reações químicas de maneira lenta e gradual durante meses ou anos e, assim, alterando a forma química destes metais. Como exemplo podemos citar as reações de alquilação ou então reações de oxirredução que modificam a mobilidade e a toxicidade de contaminantes metálicos como zinco e cádmio (SMOLDERS & DEGRYSE, 2006). Em relação à presença de formas químicas de zinco e cádmio no solo, Robson *et al.* (2014) descreveram como a dissolução experimental de minérios esfalerita em solos subtropicais, ao longo de períodos distintos, pode gerar sais inorgânicos derivados destes metais como: cloretos de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ); sulfeto de cádmio ( $\text{CdS}$ ); cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) e sulfeto de zinco ( $\text{ZnS}$ ), além de compostos óxidos como: óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ) e óxido de cádmio ( $\text{CdO}$ ).

É possível mencionar ainda a influência de eventos climáticos nas mudanças das condições de pH e potencial elétrico de solos resultando em uma maior retenção de metais como o cádmio. A incidência de chuvas em determinados tipos de solos tropicais promove o aumento no pH do solo e redução do potencial elétrico e, desse modo, resultando em cargas negativas nas superfícies das partículas coloidais do solo. Com isso, ocorre uma maior adsorção de cádmio e, conseqüentemente, uma redução da biodisponibilidade deste contaminante metálico (SOARES, DE SOUZA & ALLEONI 2021). Contudo é importante mencionar que sendo alguns destes fenômenos transitórios, a biodisponibilidade do contaminante pode aumentar significativamente, o que implicaria em um risco maior à saúde humana e ao meio ambiente. Em geral, em solos apresentando altos valores de pH ( $\text{pH} > 10$ ), a adsorção de cádmio a partículas do solo tende a aumentar ao longo do tempo, sendo o hidróxido de cádmio  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  a forma química mais predominante (ELLIOTT, LIBERATI & HUANG, 1986).

O teor de matéria orgânica também pode ser determinante para processos de mobilização e especiação química de contaminantes metálicos em solos, especialmente

quando apresentando pH alcalino, conforme relatam Sun *et al.* (2001). De acordo com os autores, solos com pH superior a 6 e apresentando um teor considerável de matéria orgânica possuem elevado poder de adsorção de cátions metálicos devido, principalmente, à dissociação de prótons ( $H^+$ ) existentes nos grupos carboxílicos e fenólicos. Deste modo, é gerado um aumento no número de sítios de cargas negativas, onde cátions metálicos são mais facilmente adsorvidos, proporcionando uma maior retenção destes contaminantes neste tipo de solo. Deste modo, um solo com baixo teor de matéria orgânica proporciona menos sítios para adsorção de cátions metálicos.

O arsênio pode ser encontrado no solo como espécies inorgânicas sob a forma arsenito ou arseniato sendo a segunda forma mais estável e predominante no solo. A imobilização de arseniato no solo pode ser influenciada por fatores bióticos como, por exemplo, a oxidação de arsênio por proteobactérias e por algumas cepas de bactérias pertencentes à espécie *Pseudomonas aeruginosa* presentes no solo. Deste modo, há um aumento da retenção deste semimetal na fração argila do solo (BACHATE, KHAPAREB & KODAM, 2012).

Em solos contaminados por arsênio, os fatores abióticos que desempenham um papel determinante na retenção e na especiação do arsênio no solo, principalmente quando sob a forma química de arseniato, são os compostos inorgânicos: óxidos de ferro, manganês e alumínio, os quais podem ser encontrados com uma relativa abundância na composição química da maioria dos solos. Compostos inorgânicos, como arseniato férrico ( $FeAsO_4$ ) e arseniato de alumínio ( $AlAsO_4$ ), são comumente encontrados em solos ácidos, ao passo que arseniato de cálcio é a forma química predominante em solos calcários (MUKHERJEE *et al.*, 2009). Estudos anteriores sobre a especiação de As (V) em diferentes tipos de solos, demonstraram que em solos apresentando condições oxidantes e pH ligeiramente ácido ( $pH < 6,9$ )  $H_2AsO_4^-$  é a forma mais abundante, ao passo que em pH alcalino ( $pH > 9,2$ ), As(V) é encontrado como  $HAsO_4^{2-}$  e  $AsO_4^{3-}$  (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002).

## **1.6. Tecnologias de remediação de metais pesado no solo**

Dentre as inúmeras tecnologias destinadas a minimizar os impactos ambientais por metais pesados, a Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos (USEPA) classifica os processos de remediação de solos em larga escala quanto ao

controle da fonte contaminante e à contenção do contaminante. O controle da fonte contaminante envolve tecnologias destinadas à remoção e/ou imobilização da fonte poluidora, podendo este ser realizado no local onde se encontra os poluentes sem qualquer tipo de escavação ou transposição do solo (*in situ*), ou então a retirada do solo para remediação e posteriormente devolução para a sua área original (*ex situ*) Uma outra estratégia é a contenção do contaminante onde há a construção de barreiras físicas, como barragens destinadas a isolar o contaminante do meio ambiente sem nenhum tipo de processo de remediação (USEPA, 2007).

A literatura cita diversos métodos para controle e remoção de contaminantes metálicos/metaloídico como: remediação eletrocinética (*in situ*), lavagem de solo (*ex situ*), solidificação/estabilização (*in situ*), fitoextração (*in situ*) (GONG, ZHAO & WANG, 2018), biorremediação (*in situ* ou *ex situ*) (WADGAONKAR *et al.*, 2019). A aplicação de tecnologias convencionais em processos de remediação *in situ* de solos contaminados por metais/metaloídico possui algumas limitações que inviabilizam a sua utilização em larga escala. Em processos de remediação *in situ* existe a possibilidade de utilizar agentes quelantes, resultando na formação de complexos metálicos insolúveis.

Contudo é discutível a aplicação de tais substâncias em processos de remediação *in situ* devido a alterações na composição físico-química do solo, além de possíveis efeitos deletérios destes complexos na microbiota do solo (GUO *et al.*, 2018). Atualmente, existem trabalhos demonstrando a possibilidade de aplicar nano materiais derivados de sais fosfatos ou sulfatos na imobilização de metais (LIAO *et al.*, 2021). Entretanto, nesses estudos faltam dados relativos ao grau de biodisponibilidade destes contaminantes metálicos imobilizados, após longos períodos de processos de intemperismo ou atividades antropogênicas.

Dentre as tecnologias para remoção de metais tóxicos do solo, a lavagem de solo é um método de remediação mais rápido e eficiente para a extração de metais de terrenos contaminados, quando comparado a outros métodos. A lavagem de solos é um método pautado pelo uso de uma ou mais substâncias extratoras com o objetivo de remover de maneira mais eficiente possível contaminantes metálicos de ambientes terrestres (GONG, ZHAO & WANG, 2018). Entretanto, as características físico-químicas dos solos podem influenciar a remoção de contaminantes metálicos do solo. Geralmente, solos arenosos possuem uma boa porosidade e um teor apropriado de umidade, apresentando assim melhores resultados quando em comparação a solos argilosos (os quais apresentam um teor maior de umidade e uma menor porosidade).

Além disso, a lavagem de solos com alto teor de matéria orgânica é menos eficaz do que de solos com baixo teor de matéria orgânica (GUO *et al.*, 2016).

A escolha da substância extratora ideal também tem implicações para uma remediação satisfatória sob o aspecto socioambiental. Substâncias oxidantes, por exemplo, mesmo quando em baixas concentrações podem promover a remoção de metais. Entretanto, tais processos de remoção podem resultar em alterações na composição físico-química do solo, principalmente na sua matriz mineralógica, implicando em custos adicionais destinados à recomposição do solo remediado (DIPU, KUMAR & THANGA, 2012).

Em alguns casos, a escolha da substância extratora pode ser feita para promover uma remediação de contaminantes metálicos ainda que parcial, porém retirando significativamente metais tóxicos das frações mais biodisponíveis do solo. Desse modo, o passivo ambiental pode ser mitigado, fazendo com que os contaminantes metálicos ou metalóidico restantes no ambiente terrestres permaneçam em formas químicas menos disponíveis para o ecossistema (DAMIAN, MICLE & SUR, 2019). Outra estratégia de remediação do ambiente terrestre por metais pesados é a aplicação de surfactantes químicos através de processos de remediação *ex situ*.

### **1.7. Uso de surfactantes químicos na mobilização de metais pesados**

Surfactantes são compostos químicos que apresentam uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica e possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial do meio aquoso (ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Surfactantes químicos podem ser sintetizados como monômeros ou, ainda, como polímeros apresentando uma estrutura química mais complexa.

Compostos surfactantes podem ainda ser classificados quanto à carga do grupamento hidrofílico, e dentre os surfactantes conhecidos podem apresentar-se como: aniônicos (carregados negativamente), catiônicos (carregados positivamente), não iônicos (não apresentam carga) ou anfótero (apresentando ambas as cargas) (REBELLO *et al.*, 2014). A utilização de substâncias surfactantes em processos de remediação de solos é considerada uma tecnologia bastante eficiente e versátil, especialmente em processos envolvendo lavagem de solos, como na remoção de hidrocarbonetos

derivados de petróleo e contaminantes metálicos (KHALLID *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2017).

As propriedades químicas distintas de cada tipo de surfactante geram interações químicas diferentes com o solo e com o tipo de metal presente. Surfactantes aniônicos como o dodecil sulfato de sódio (SDS), embora apresentem uma concentração micelar crítica (CMC) superior a surfactantes não iônicos, oferecem como vantagem a facilidade em realizar interações químicas com compostos metálicos de valência positiva, como zinco e cádmio, além de serem capazes de se adsorver ao solo e competir pelo sítio de ligação de outros compostos de carga negativa presentes no solo (compostos contendo, por exemplo, radicais hidróxidos). Assim, os surfactantes aniônicos são capazes de adsorver a íons metálicos contaminantes como arsênio quando na forma de ânions ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ). A presença de grupamentos sulfidríla em sua estrutura também possibilita a formação de ligações iônicas com diversos tipos de metais, promovendo assim a dessorção destes elementos químicos do solo (AHN *et al.*, 2009). A literatura descreve a remediação de solos arenosos apresentando níveis de Cu(II) e Zn(II) de 1,25 mg/L e 3,8 mg/L, respectivamente, aplicando SDS a uma concentração de 1,25 g/L (RAMAMURTHY *et al.*, 2008).

Surfactantes catiônicos também podem ser empregados em processos de remediação de contaminantes metálicos. Contudo, de acordo com estudos de Li, Alessi e Allen. (2002), algumas limitações foram observadas a respeito da interação entre tensoativos catiônicos com metais pesados em solos argilosos. Os autores relataram que, embora tenham a capacidade de se ligar a metais como zinco, estes surfactantes seriam menos utilizados na mobilização de metais, pois necessitam de maiores concentrações para adsorver cátions metálicos contaminantes devido a interações químicas com moléculas carregadas negativamente existentes no solo. Os autores relatam ainda que surfactantes catiônicos, como brometo de hexa-decil-trimetil amônio ( $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ ) (HTAB) e seus respectivos derivados dodecil ( $\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{BrN}$ ) e octil ( $\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{BrN}$ ), podem ter uma influência negativa na remoção de Cromo (VI) e arsênio (II), já que longas regiões hidrofóbicas presentes nestes surfactantes catiônicos poderiam se ligar à porção argilosa do solo retardando assim a dessorção destes metais do solo. Desta forma, surfactantes catiônicos poderiam ter uma melhor eficiência na remoção de metais/metaloídico à medida que apresentem cadeias de hidrocarbonetos menores em sua estrutura.

## 1.8. Ecotoxicidade de surfactantes químicos

Outro parâmetro importante a ser avaliado em relação ao surfactante empregado em processos de remediação refere-se à biocompatibilidade deste agente tensoativo com a microbiota presente no solo. A grande maioria dos surfactantes disponíveis atualmente para estes processos são derivados de fontes petroquímicas, o que confere aos mesmos uma lenta biodegradabilidade quando lançados no meio ambiente e a possibilidade de promover alterações negativas aos microrganismos presentes (VAN *et al.*, 2007). Uma vez em contato com o solo, compostos tensoativos derivados de fontes petroquímicas podem também alterar os processos de absorção de água e minerais de plantas, causando inclusive supressão e/ou morte celular das raízes. Alguns destes detergentes são capazes de interferir também no conteúdo clorofílico e promover a redução na taxa fotossintética de vegetais superiores (JOVANIC *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos relatam que a presença de surfactantes químicos no solo pode ainda promover efeitos deletérios sobre a microbiota da rizosfera como, por exemplo, a diminuição da população de bactérias solubilizadoras de fosfato pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, além da redução de bactérias pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* e *Nitrospira* capazes de oxidar amônia e de algumas cepas bioluminescentes de *Vibrio fischeri* (IVANKOVIĆ, HRENOVIĆ & GUDEL, 2009; LIMA *et al.*, 2011).

Diversos microrganismos aquáticos também podem sofrer reduções na sua população quando em contato com tensoativos de origem petroquímica. Maksimov & Parshikova (2006) relataram uma redução significativa da biomassa de duas espécies de cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*, além do decréscimo na capacidade fotossintética de ambas as espécies quando expostas a concentrações de 3-10 mg/L de surfactantes químicos. Os resultados foram ainda mais significativos quando em contato com surfactantes catiônicos.

Em relação aos efeitos de surfactantes químicos sobre organismos vertebrados superiores, Rosety *et al.* (2001) relataram a capacidade dos compostos SDS e sulfonato de alquilbenzeno linear ( $C_{16}H_{26}SO_3$ ) de causar reduções na taxa de fertilidade de peixes mesmo em baixas concentrações (0,3 a 6 mg/L) durante um tempo de exposição de até 60 minutos. Outros surfactantes aniônicos, como o nonilfenol etoxilado (renex95), pode causar alterações do sistema endócrino de organismos superiores após exposição por

longos e médios períodos (SOARES *et al.*, 2008). O detergente renex 95 é constantemente utilizado em lares domésticos e indústrias têxtil e petroquímica e, de acordo com o último relatório da comissão europeia sobre produtos químicos, este composto é constantemente monitorado por órgãos governamentais de proteção do meio ambiente, pois pode vir a ser um grande risco para os mananciais quando presente em concentrações iguais ou superiores a 2 µg/L (UE, 2006).

### **1.9. Aplicação de biossurfactantes na mobilização de contaminantes metálicos**

Uma nova estratégia, considerada mais eficiente para a remediação ambiental, consiste na busca por surfactantes biológicos, os quais são mais rapidamente biodegradados e menos tóxicos ao meio ambiente (LIU *et al.*, 2018). Estudos sobre a estrutura química destes compostos biológicos revelam que estes tensoativos apresentam excelentes propriedades de emulsificação e de redução da tensão superficial. Atualmente, o termo biossurfactante refere-se a qualquer biomolécula dotada de atividade tensoativa semelhante a de um surfactante químico convencional (HENKEL *et al.*, 2012). Estas biomoléculas podem ser produzidas por certos tipos de vegetais, ou por algumas cepas de microrganismos como: bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Os biossurfactantes também podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química, dentre as quais é possível citar: glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos, lipopeptídios ou lipoproteínas, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI & BANAT, 1997). Os biossurfactantes podem ser empregados na remediação de diferentes ecossistemas, levando a resultados promissores na recuperação de solos, sedimentos e aquíferos quando contaminados por hidrocarbonetos derivados de petróleo ou ainda por metais pesados (SACHDEV & CAMEOTRA, 2013). A remediação de solos expostos a contaminantes metálicos/metalóidico utilizando biossurfactantes tem como princípio (i) a adsorção do biossurfactante à superfície do solo, (ii) a interação química entre o metal e o grupamento hidrofílico do biossurfactante, principalmente através de reações de complexação ou troca iônica, (iii) a desorção do biossurfactante do solo, e (iv) a incorporação do complexo surfactante + metal a micelas presentes na solução surfactante (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2013).

### 1.10. Ramnolipídios: definição e uso de glicerol na sua produção

Dentre os biossurfactantes relevantes sob o aspecto industrial destacam-se compostos glicolipídicos, como por exemplo os ramnolipídios. Estes biossurfactantes aniônicos possuem excelente atividade tensoativa, além de apresentarem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (RODRIGUES *et al.*, 2006). A literatura descreve inúmeras aplicações industriais para este composto como: remediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de alto peso molecular, aditivo alimentar e componente de formulações cosméticas (VAN HAESSENDONCK & VANZEVEREN, 2006). A variedade de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* é altamente dependente da cepa bacteriana produtora, evidenciando a presença ou ausência de determinados genes relacionados à biossíntese de ramnolipídios (OCHSNER *et al.*, 1994).

A literatura descreve a possibilidade de produzir ramnolipídios em escala laboratorial a partir de inúmeros rejeitos agroindustriais, como a utilização de resíduos provenientes de indústrias de azeite e óleos vegetais (GUDIÑA *et al.*, 2016) ou vinhoto resultante da fabricação de vinhos (CHEBBI *et al.*, 2021). Até o presente momento, foram observados baixos rendimentos de produção de ramnolipídios utilizando-se estes resíduos. Por outro lado, o glicerol mostrou ser um substrato estratégico para a produção industrial nacional de ramnolipídios.

Considerando o expressivo papel do Brasil como produtor de commodities e gêneros agrícolas, torna-se evidente a grande geração de resíduos agroindustriais os quais podem ser empregados como matérias-primas para processos biotecnológicos. Em comparação com outros substratos provenientes de resíduos agroindustriais, os preços praticados pelo mercado internacional em relação ao glicerol bruto resultante do processamento industrial de biodiesel são relativamente elevados. Portanto, embora ainda não tenha sido estabelecido um mercado específico para o comércio de glicerol bruto, ainda assim, os mercados relativos aos biocombustíveis estão em franco crescimento e, portanto, é esperado que a produção de glicerol a partir da fabricação de biodiesel aumente nas próximas décadas. Em 2018, a produção total de biodiesel brasileiro foi estimada em 5,4 bilhões de litros, um aumento de 26% em comparação com o ano de 2017 (USDA, 2019).

Com base nos sucessivos aumentos anuais da produção nacional de biodiesel, o país ocupa atualmente a segunda posição em relação aos maiores produtores mundiais de biodiesel, perdendo apenas para os Estados Unidos (DA SILVA CÉSAR *et al.*, 2019). Contudo, em 2020, houve uma retração na produção mundial de biodiesel em 6% devido a pandemia por COVID-19. Entretanto de acordo com dados da Agência Internacional de Energia (IEA) os índices anuais de crescimento da produção mundial de biodiesel indicam um cenário de intensificação da produção e consumo deste biocombustível, resultando em um aumento de glicerol bruto (IEA, 2020). Com isso, vem aumentando a viabilidade econômica deste rejeito agroindustrial utilizado como substrato de processos bioindustriais.

### 1.11. Estrutura química de ramnolipídios e interação com contaminantes metálicos/metaloídico

De acordo com Déziel *et al.* (2000), a estrutura química das cadeias laterais de ácido graxo  $\beta$ -hidroxi produzidas por *P. aeruginosa* é composta predominantemente por dez carbonos (Figura 8).

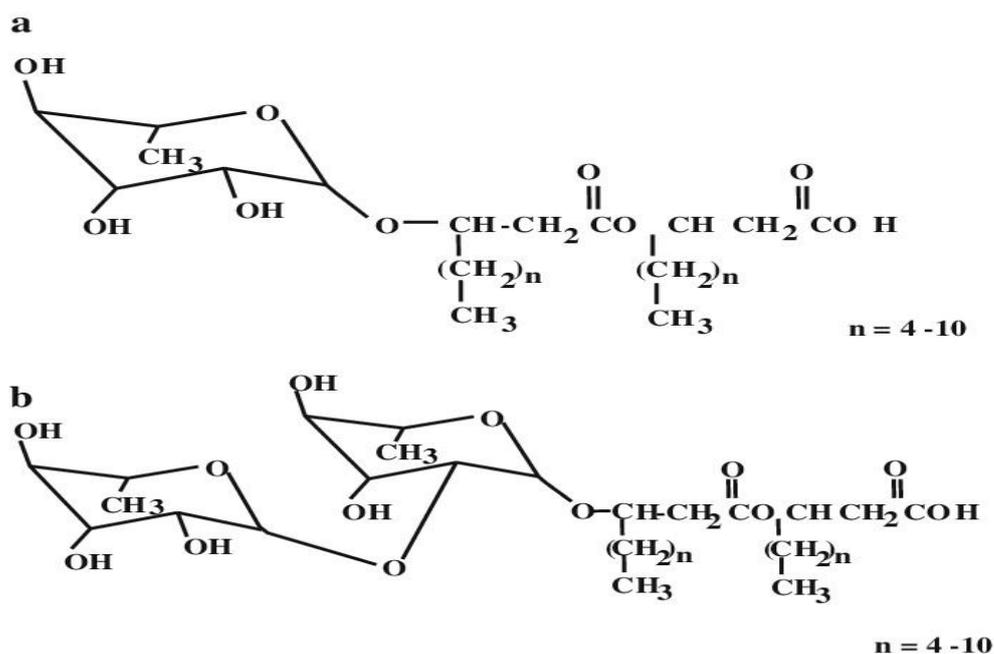


Figura 8 - Estrutura química de (a) mono- ramnolipídio e (b) di-ramnolipídio. Retirado de GUNTHER *et al.* (2006).

Em relação à presença de uma ou duas unidades de ramnose na sua fórmula estrutural, os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* geralmente produzem uma mistura de diferentes congêneres, sendo predominantes as moléculas apresentando mono e di-ramnose em sua composição. Contudo, algumas modificações nas condições de cultivo ou a utilização de cepas modificadas geneticamente podem resultar em diferentes proporções em relação aos congêneres de ramnolipídios produzidos (MÜLLER *et al.*, 2011). Uma vez no meio aquoso, o caráter aniônico da molécula se dá pela ionização do grupamento ramnose e da dissociação do grupamento carboxílico, que ocorre normalmente em uma faixa de pH entre 6 e 8.

De acordo o trabalho de Sánchez *et al.* (2007), uma solução de ramnolipídios a uma concentração de 0,11 mM e um pH igual a 7,4, 98% da molécula estará carregada negativamente, ao passo que quando em pH 4 a molécula estará no estado neutro. Isto implica em menores repulsões eletrostáticas e, conseqüentemente, uma CMC maior devido a uma redução do potencial tensoativo da substância. Atualmente, a interação entre micelas de ramnolipídios com a superfície do solo representa um importante objeto de estudo, pois à medida que novas aplicações para este biocomposto no campo da remediação de ambientes terrestres estão sendo desenvolvidos torna-se necessário compreender como ocorrem os fenômenos de adsorção deste biotensoativo no solo.

Em um estudo sobre a interação de ramnolipídios com a superfície do solo Dashtbozorg *et al.* (2016) relataram como a adsorção deste biossurfactante ocorre em concentrações acima da CMC, proporcionando a formação de hemimicelas na superfície do solo. Conforme a concentração do tensoativo aumenta, ocorre uma saturação na formação de micelas e agregados de surfactantes no meio líquido e hemimicelas começam a ser geradas na superfície do solo.

Mulligan, Yong e Gibbs, (2001) relatam sobre a capacidade de ramnolipídios de mobilizarem íons metálicos positivos como zinco e cádmio em solos arenosos devido, principalmente, às trocas iônicas resultantes do caráter aniônico da molécula surfactante.

A adsorção de cátions metálicos pela molécula de ramnolipídio está relacionada à capacidade de deprotonação desta substância orgânica aniônica, possibilitando a formação de complexos com cátions metálicos presentes no solo, sendo este fenômeno mais pronunciado entre faixas de pH entre 7 e 7,4 (WANG & MULLIGAN, 2004). Os autores ainda acrescentam que conforme o pH da fase aquosa do solo atinge faixas de pH mais alcalinos ocorre um aumento da solubilidade da água, proporcionando um

número maior de sítios de ligação para o ramnolipídios se ligar a cátions metálicos, ou seja, tornando-os mais solúveis na fase aquosa do solo (Figura 9). Contudo, fenômenos de superfície também contribuem para a adsorção de metais por biossurfactantes e são influenciados por faixas de pH distintas.

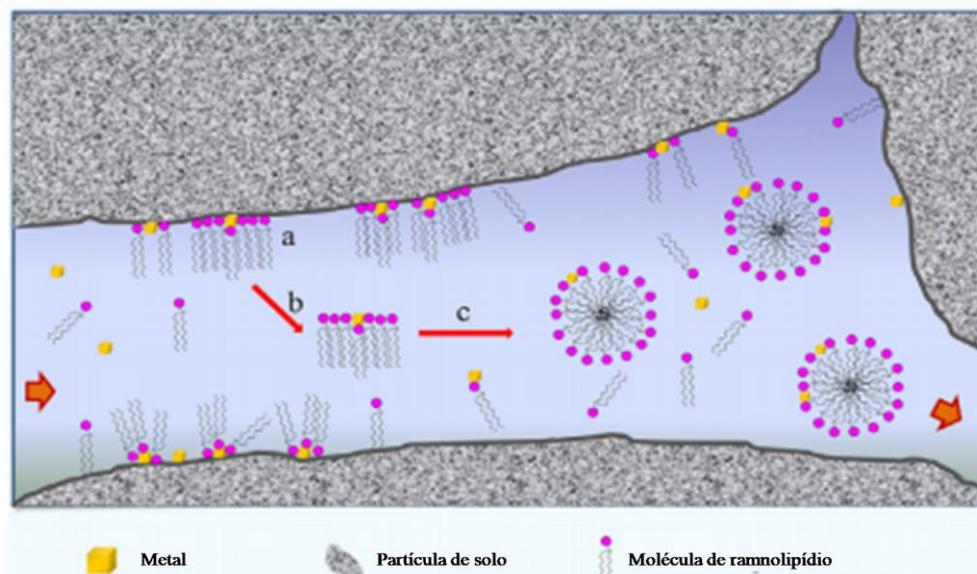


Figura 9 - Desenho esquemático de lavagem de solo por ramnolipídios. (a) Acumulação de moléculas de ramnolipídios na estrutura microporosa do solo e adsorção à superfície reativa do solo e aos contaminantes metálicos/metaloídicos; (b) ramnolipídios desorvidos da superfície reativa do solo e ligados a metais/metaloídicos; (c) Formação de micelas de ramnolipídios ligadas aos contaminantes metálicos/metaloídicos. Retirado de LIU *et al.* (2018).

Em faixas menores de pH ( $4,3 < \text{pH} < 5,6$ ), o grupamento ramnosil e o ácido carboxílico secundário estão protonados e, deste modo, a molécula de ramnolipídios assume a forma de vesículas lipossomais no meio líquido. Contudo, quando o pH da solução de ramnolipídios encontra-se na faixa de pH entre 6 e 6,8, a molécula de biossurfactante assume uma estrutura semelhante a lamelas ou membranas. E finalmente, quando o grupamento ramnosil e ácido carboxílico encontram-se carregados negativamente ( $\text{pH} > 6,8$ ) ocorre a formação de micelas de ramnolipídios (ZHANG & MILLER, 1992). A conformação física das micelas de ramnolipídios também desempenha um papel importante na mobilização de metais, de acordo com Aşçi *et al.* (2008). As micelas de ramnolipídios apresentam um tamanho reduzido (em torno de 5

nm), aumentando a superfície de contato com a partícula coloidal do solo. Além disso, a conformação típica de um agregado micelar (com as porções hidrofílicas orientadas para o meio líquido) proporciona uma maior interação das micelas com os metais presente no solo.

Quando metaloides estão presentes no solo sob forma de oxiânions, estes podem ser mobilizados pelos ramnolipídios. Os mecanismos de mobilização de oxiânions de arsênio no solo foram estudados por Wang e Mulligan (2009) e, de acordo com os autores, podem ocorrer vários mecanismos durante este processo. Dentre eles, podem ser citados: (i) uma vez lançados no solo contaminado, os ramnolipídios podem competir com oxiânions de arsênio pelos sítios de adsorção existentes nas partículas do solo; (ii) a molécula de ramnolipídio pode também ser adsorvida à superfície reativa do solo, resultando em um aumento do potencial eletronegativo do solo e, assim, gerando repulsões eletrostáticas as quais proporcionam um aumento na mobilização de arsênio do ambiente terrestre.

### **1.12. Microespumas e suas aplicações em processos de remediação**

Considerando os aspectos relacionados ao custo de emprego de biossurfactantes em processos de remediação, vários pesquisadores vêm explorando a capacidade destes compostos em formar dispersões de microespumas com propriedades coloidais. O objetivo é aumentar a eficiência dos processos de remediação utilizando uma menor concentração do biotensoativos (BOONAMNUAYVITAYA *et al.*, 2009). Microespumas ou afrons gasosos podem ser definidos como um sistema de microbolhas suspensas em uma matriz líquida. As microbolhas são constituídas por um núcleo esférico, o qual pode ser composto por ar, encapsulado por uma fina bicamada de moléculas surfactantes (SEBBA, 1979).

Belkin *et al.* (2005) descreveram a estrutura de uma microbolha como sendo composta primeiramente por uma camada interna de moléculas de surfactantes circundando um núcleo esférico. De acordo com os autores, a porção hidrofóbica de cada molécula encontra-se orientada para o interior do núcleo e as regiões hidrofílicas direcionadas para a cápsula viscosa interna a qual é composta por água e moléculas surfactantes interagindo parcialmente com a bicamada externa secundária (camada difusa). A bicamada externa elétrica é composta por moléculas de surfactantes

apresentando suas respectivas porções hidrofílicas orientadas em dois sentidos: em direção ao interior da cápsula viscosa ou voltadas para o meio líquido externo. Internamente na bicamada elétrica, as substâncias orgânicas apresentam suas respectivas regiões apolares intimamente ligadas por interações hidrofóbicas tornando, assim, a dispersão coloidal mais termodinamicamente estável e prevenindo fenômenos de coalescência (Figura 10).

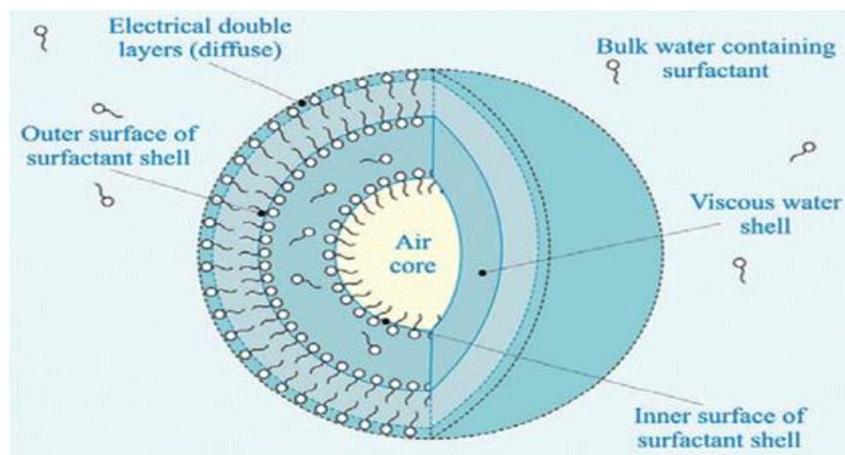


Figura 10 - Desenho esquemático de uma microbolha e sua tripla camada de moléculas de surfactantes. Retirado de Belkin *et al.* (2005).

Alguns estudos recentes têm demonstrado que dispersões de microespumas são mais vantajosas quando comparadas a soluções surfactantes, quando aplicadas em processos de remediação ambiental. Isto se deve principalmente às características distintas deste sistema de microbolhas, composto por alto teor de gás atmosférico (40-70%), o qual permite por exemplo o transporte de ozônio para áreas contaminadas por hidrocarbonetos de maneira eficiente e a um baixo custo (ZHANG *et al.*, 2019), ou aplicado em métodos de flotação para a separação de nanopartículas em meio aquoso (PAL *et al.*, 2019).

Microespumas apresentam ainda uma estabilidade alta quando comparada a espumas regulares, além de um diâmetro relativamente pequeno (10~100  $\mu\text{m}$ ) e propriedades hidráulicas semelhantes à água, permitindo a penetração em meios porosos com baixa permeabilidade (PASDAR *et al.*, 2018). Deste modo, as microespumas penetram de modo mais eficiente em solos apresentando uma baixa permeabilidade, além de preencherem poros de matrizes rochosas em operações de perfuração (AMIRI & SADEGHIALIABADI, 2014). As microespumas apresentam também grande área

interfacial o que permite uma maior eficiência na remoção de hidrocarbonetos de alto peso molecular quando comparado a soluções surfactantes (CORPUZ PAL & BANNAT, 2019). Além disso, apresentam uma rápida flutuabilidade o que pode ser útil em processos de remediação *ex situ* utilizando colunas de remediação (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2015). Contudo, ainda existe uma carência de dados demonstrando a eficiência de remediação utilizando-se microespumas em relação a solos contaminados por metais/metaloídico.

Outro fator importante a ser considerado refere-se à característica química do surfactante empregado para a produção de uma dispersão de microespumas. Surfactantes aniônicos, como por exemplo o dodecil sulfato de sódio, apresentam uma maior estabilidade quando comparados a microespumas geradas por surfactantes não iônicos (como por exemplo Tween 20 e Triton X-100). Essa maior estabilidade pode ser determinante para uma melhor eficiência para aplicações como transporte de nanopartículas em colunas de remediação, conforme evidenciado por Ding *et al.* (2013). Conforme será abordado posteriormente, diferentes fatores podem influenciar as características das dispersões de microespumas (como estabilidade e diâmetro de bolha) e, conseqüentemente, influenciar na aplicação das microespumas em diferentes situações.

### **1.13. Fenômenos decorrentes da geração de microespumas**

Ao iniciar uma agitação mecânica acima ou igual a 5.500 RPM, o sistema de microespumas é imediatamente formado. Uma vez cessado a transferência de energia cinética rotacional ao sistema é possível observar a formação de três fenômenos principais. O primeiro fenômeno é a drenagem líquida. Uma vez gerado uma dispersão de microespumas, um filme líquido é formado entre as microbolhas; porém, ocorre a transferência lenta e gradual deste líquido para a fase líquida da dispersão devido a forças gravitacionais (BHAKTA & RUCKENSTEIN, 1997).

O segundo fenômeno é a difusão de gás entre microbolhas, a qual ocorre devido a aglutinação de uma bolha menor (maior pressão interna) por uma bolha maior (menor pressão interna) resultando na transferência de gás para a bolha de maior diâmetro.

O terceiro fenômeno é denominado efeito de Gibbs-Marangoni. Este fenômeno refere-se à transferência de massa através da interface de dois fluidos devido a diferenças entre gradientes de tensão superficial (SCRIVENS & STERNLING, 1960).

Durante a geração de uma dispersão de microespumas inúmeras microbolhas serão geradas e destruídas durante o processo de transferência de energia cinética rotacional para uma solução surfactante. Este processo ocorre devido à baixa viscosidade da bicamada externa das microbolhas (geralmente devido a uma concentração insuficiente de moléculas surfactantes nas superfícies da bicamada) resultando em um aumento da tensão superficial entre a dupla camada e o meio externo, e conseqüentemente a passagem de água para o meio. Como resultado observamos microbolhas menores e menos estáveis.

Todos estes três fenômenos ocorrem concomitantemente, conforme a energia cinética rotacional é aplicada ao sistema. Uma vez cessada a transferência de energia, é possível observar diferenças na estabilidade da dispersão de microespumas e no diâmetro médio das microbolhas presentes na dispersão em função do tempo e da quantidade de energia que foi aplicada ao sistema.

Ao contrário das espumas regulares, as microespumas não formam o chamado “borda de plateau” devido ao seu formato esférico e menores dimensões comparadas às espumas regulares (Figura 11a). Em comparação com as bolhas de gás convencionais, os afrom gasosos são altamente estáveis e, portanto, mais resistentes a processos de coalescência (Figura 11b). Entretanto, diversos fatores influenciam a estabilidade das microespumas como: tempo de preparo, velocidade de rotação do agitador, qualidade do surfactante a ser empregado e até mesmo a concentração micelar crítica da solução surfactante (MATSUSHITA *et al.*, 1992).

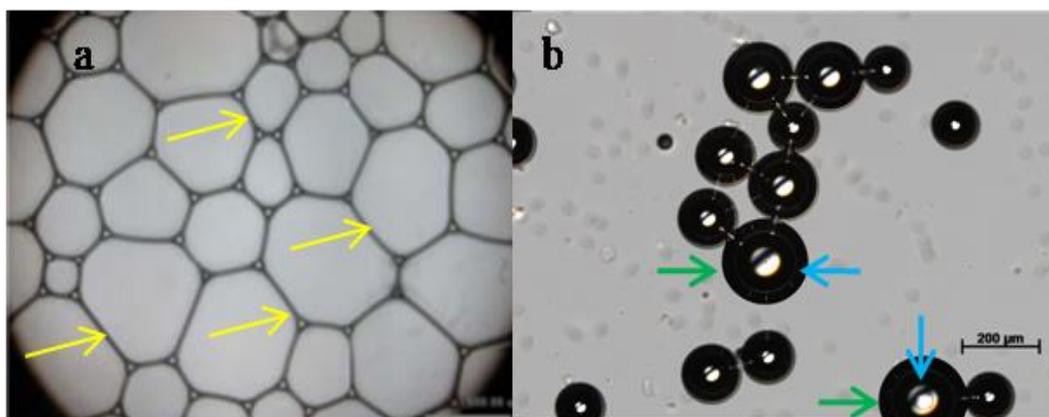


Figura 11 - (a) Imagem de bolhas de uma dispersão de espumas de ramnolipídios - magnificação de 10X. Setas amarelas: bordas de plateau. Modificado de Feng, Singhal e Swift (2009); (b) Imagem de microbolhas de ramnolipídio - magnificação de 10X, campo claro. Seta verde: bicamada externa; Seta azul: Cápsula viscosa. No centro gás atmosférico. Fonte: Compilação do próprio autor.

#### 1.14. Caracterização de microespumas

A caracterização de uma dispersão de microespumas é uma etapa fundamental para a determinação das melhores condições de geração e aplicação deste sistema de microbolhas. Microespumas podem ser caracterizadas em relação à estabilidade e ao diâmetro médio das microbolhas presente em uma dispersão de microespumas (HASHIM *et al.*, 2012). Quando uma solução surfactante é adicionada a um recipiente e inicia-se uma agitação cinética contínua (a qual posteriormente é interrompida), as microbolhas tendem a se acumular na parte superior do recipiente em função da diferença entre a densidade das fases gasosas e líquidas da dispersão. O estudo sobre a estabilidade das microespumas baseia-se inicialmente na geração da microespuma propriamente e, posteriormente, na mensuração do tempo de meia vida ( $T_{0,5}$ ) que consiste no tempo necessário para que a metade do volume inicial de uma solução surfactante retorne ao seu estado líquido, em função dos processos de coalescência ou do colapso de bolhas e microbolhas (JAUREGI, MITCHELL & VARLEY, 2000).

A caracterização do tamanho global das microbolhas que compõem um sistema de microespumas é também considerada um fator importante na aplicação deste sistema coloidal. A literatura descreve uma relação positiva entre a distribuição do tamanho global de microbolhas presentes em uma dispersão de microespumas e a estabilidade desta dispersão de afores gasosos. Estas microbolhas quando apresentam um diâmetro interno superior a 50  $\mu\text{m}$  tendem a apresentar um tempo de meia vida maior, ao passo que dispersões de microespumas que apresentam microbolhas com um diâmetro interno inferior tendem a ser menos estáveis (BELKIN *et al.*, 2005).

Métodos de visualização de microespumas por microscopia ótica são os mais indicados na avaliação do tamanho das microbolhas geradas, além de permitirem a observação de estruturas morfológicas características (NAREH'EI, SHAHRI &

ZAMANI, 2012). Ivan, Quintana e Blake, (2001) estudaram a relação entre fenômenos de coalescência em microespumas de surfactantes aniônicos através de técnicas de microscopia ótica. Os autores observaram diferenças entre a espessura da bicamada destas microbolhas, e relataram que um sistema de microespumas apresentando bolhas com espessura entre 4  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  sofrem coalescência mais rapidamente devido a um desequilíbrio da pressão interna do sistema. Dentre os fatores que podem influenciar o diâmetro global das microbolhas e a estabilidade das microespumas, é possível destacar o número de rotações por minuto empregado para a geração do sistema coloidal, a concentração e o tipo de surfactantes empregado, o pH, além da adição de sais. Kommalapati *et al.* (1996) relataram uma estabilidade e um diâmetro de bolhas de microespumas produzidas por saponinas superiores a surfactantes não iônicos, catiônicos e aniônicos sintéticos. Entretanto, em concentrações a partir de 1,5% a estabilidade de microespumas produzidas a partir de saponinas tendem a apresentar valores menores. Basu e Malpani (2001) descreveram uma redução considerável no diâmetro de microbolhas (75 - 22  $\mu\text{m}$ ) quando a velocidade de rotação da suspensão era elevada de 4.000 para 8.000 rpm.

## **2. Justificativa**

A contaminação do solo por resíduos metálicos representa uma ameaça ao ambiente assim como à saúde humana, especialmente através do acúmulo de contaminantes metálicos/metalóidico na cadeia alimentar humana ou nos corpos hídricos. Alguns métodos de remediação do solo disponíveis utilizam substâncias com propriedades extrativas de metais que apresentam baixa biodegradabilidade e alteram a composição físico-química dos solos. O estudo da aplicação de ramnolipídios sob a forma líquida e de microespumas para promover a mobilização de contaminantes metálicos em diferentes tipos de solos apresenta um elevado grau de ineditismo.

Essa aplicação permitirá a utilização de biossurfactantes em processos de remediação de solos contaminados por rejeitos metálicos de maneira muito mais eficiente, contribuindo assim para a redução de custos na reestruturação de áreas impactadas por estes rejeitos e na minimização de danos ambientais. O desenvolvimento de uma nova tecnologia de remediação capaz de preservar as características microbiológicas e físico-químicas do ambiente representa uma abordagem estratégica na recuperação de solos agricultáveis e de áreas residenciais contaminados por contaminantes metálicos. Adicionalmente, são poucos os estudos sobre a influência simultânea de múltiplos fatores na estabilidade e no diâmetro de bolhas de dispersão de microespumas, assim como a percolação de microespumas em meios porosos.

## **3. Objetivo**

Avaliar em microescala e macroescala a eficiência de remediação de um extrato de ramnolipídio empregado na forma líquida e como dispersão de microespumas na remediação de dois tipos de solos quando submetidos a uma contaminação recente e de longo prazo por metais/ metalóidico.

### 3.1. Objetivos específicos

- Avaliar em microescala os melhores parâmetros de remediação de um extrato de ramnolipídio sob a forma líquida quando em contato com solos contaminados recentemente e a longo prazo por As, Cd, Zn.
- Avaliar a eficiência de remediação de metais/metaloídico de diferentes fases geoquímicas do solo pelo extrato de ramnolipídio.
- Avaliar possíveis efeitos tóxicos do extrato de ramnolipídio a bioindicadores ambientais, além da inibição do crescimento de bactérias do solo.
- Testar um método de precipitação de As, Cd, Zn em extratos de ramnolipídios após processos de remediação.
- Produzir e caracterizar microespumas de ramnolipídios nas melhores condições de estabilidade e diâmetro de bolha.
- Avaliar o processo de remediação em macroescala de solos contaminados por As, Cd, Zn utilizando o biossurfactante ramnolipídio sob a forma de microespuma, comparando com o biossurfactante na forma líquida.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Produção de ramnolipídios

#### 4.1.1 Preparo do pré-inóculo

A cepa *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634 foi modificada geneticamente utilizando-se o Transposon ISlacZ/hah (HONNA, 2013). Esta cepa modificada, nomeada *P. aeruginosa* 1201, foi preservada em criotubos contendo glicerol (20% v/v) e armazenada no ultra freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de ser utilizada para a produção de ramnolipídios (RL). Para o pré-inóculo, uma amostra foi descongelada e, com o auxílio de uma alça estéril, uma alíquota foi inoculada em caldo Luria Bertani (HiMedia, Mumbai). As condições de cultivo foram: incubação a  $30^{\circ}\text{C}$ , por 24h em agitador rotatório (180 rpm). Após este período, foi inoculado 5 mL do crescimento bacteriano para um Erlenmeyer contendo 300 mL de meio rico com a seguinte

composição (por litro) : 1 g NaNO<sub>3</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, e 30 g de glicerol; pH 7. As condições de incubação foram: 30°C sob agitação de 180 rpm por 40 h. A seguir, 150 mL desta cultura bacteriana em meio rico foram utilizadas como pré-inóculo na fermentação para a produção de RL.

#### 4.1.2 Padronização do pré- inóculo para a produção de ramnolipídios (RL)

A concentração celular no meio rico contendo *P. aeruginosa* 1201 foi determinada através da absorbância de luz a 600 nm (Espectrofotômetro MultiSpec – 1501; Shimadzu Corporation, Japão). O valor de absorbância foi convertido no valor de concentração celular (g/L) através de uma curva de calibração previamente estabelecida por Kronenberg. (2007). O fator de conversão de absorbância em concentração celular foi calculado através da equação:

$$\text{Abs} = 1,2143 * X \text{ (g/L); onde: Abs=Absorbância e X= a concentração de células (g/L)}$$

O pré-inóculo utilizado em nossos experimentos continha entre 0,22 e 0,23 g/L, o que correspondia a uma faixa de absorbância entre 0,270 e 0,280 nm.

#### 4.1.3. Produção de RL

Após a determinação da concentração celular no meio rico, uma alíquota de 30 mL do crescimento bacteriano foi inoculada em frascos de Erlenmeyer contendo 270 mL de meio mínimo de produção de RL (diluição de 10% v/v). O meio de produção era constituído de (por litro): 30 g de glicerol, 5,54 g NaNO<sub>3</sub> (Relação C/N de 15), 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g de extrato de levedura. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (180 rpm) a 30°C, até o esgotamento completo da fonte de carbono (168 h). Posteriormente as células bacterianas foram separadas por centrifugação (8,000 rpm/15 min). O extrato bruto de RL foi então armazenado a 8°C até o momento de ser utilizado nos testes de remediação. Os extratos de RL nas concentrações de 1 e 2% foram obtidos através da concentração por evaporação forçada

(80°C) durante 48 horas. Em seguida, os extratos de RL foram diluídos em água ultrapura, quantificados e caracterizados conforme descrito a seguir.

#### **4.2. Quantificação de RL por cromatografia líquida de alta eficiência**

O extrato bruto de RL foi quantificado indiretamente por HPLC, utilizando-se como referência uma L-ramnose padrão (Sigma-Aldrich). As moléculas de RL foram hidrolisadas e precipitadas com adição de 10 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e aquecidas a 100°C durante 4 h. A reação foi interrompida pela adição de NaOH (10 mmol/L). As amostras foram filtradas com filtros de seringa de 0,22-µm (MILLIPORE, Thermo Fisher™) e analisadas por meio de HPLC. Os padrões de L-ramnose também foram filtrados e injetados em concentrações de 100-5000 mg/L para construir uma curva padrão. A concentração de ramnose foi convertida para RL utilizando um fator calculado a partir dos dados para congêneres de RL quantificados por espectrometria de massa (EM) (ROCHA *et al.*, 2021). A ramnose foi analisada por HPLC utilizando um sistema Agilent Technologies 1260 Infinity, e com uma Coluna de Exclusão de Íons Bio-Rad HPX-87H, 300 mm×7,8 mm a 45°C, sendo a fase móvel constituída por uma solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mmol/L) a uma taxa de 6 mL/min, e um detector de índice de refração (RID).

##### **4.2.1 Caracterização de RL por espectrometria de massa**

A extração total de RL por precipitação ácida foi realizada conforme a metodologia descrita por Déziel *et al.* (2003) com pequenas modificações. Em resumo, as células bacterianas foram removidas do extrato por centrifugação (10.000 rpm/10 min) e o sobrenadante acidificado a pH 3,4 utilizando HCl concentrado. Os RLs foram extraídos com 1/3 de volume de acetato de etila concentrado. O extrato orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e evaporado utilizando um evaporador rotatório.

O resíduo da evaporação foi dissolvido em metanol/clorofórmio/2-propanol na proporção 1:2:4, contendo 7,5 mmol/L de acetato de amônio (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>). Finalmente, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 min para separar as

impurezas, e o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore de 0,22- $\mu\text{m}$  e armazenado. As amostras contendo o biossurfactante foram analisadas por injeção direta em um Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific™) equipado com uma fonte de íons do tipo nanoelectrospray utilizando capilares de PicoTip Emitter (Glass Tip, 1P-4P, New Objective), com voltagem de ionização de 3,5 kV e temperatura de transferência capilar de 180°C.

Cada ciclo independente de aquisição de dados consistiu em uma varredura sob resolução de energia em massa de 60.000 (FWHM,  $m/z$  400) com um intervalo  $m/z$  de 100-2000 Da, seguido de fragmentação por espectrometria de massa (MS-MS) dos íons precursores mais abundantes por dissociação de colisão induzida (ICD). Estas colisões de altas energias ocorreram no interior da câmara de dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD). Todas as amostras foram preparadas em metanol numa proporção de 1:1 (v/v) contendo 0,1% de ácido acético glacial. O cálculo da fórmula química a partir dos valores medidos de  $m/z$  e dos dados de corrente de íons extraídos (EIC) foi realizado utilizando o software Xcalibur 2.0 (Thermo Fischer Scientific™). O EIC de alta resolução foi obtido através do processamento dos dados de varrimento completos da EM utilizando potenciais íons compatíveis com as massas referentes a ramnolipídios com 10 ppm de tolerância de massa. (STROHALM *et al.*, 2008).

#### **4.2.2. Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica**

A tensão superficial (TS) do extrato de ramnolipídio foi determinada utilizando a técnica de gota pendente (DSA 100S Goniômetro modelo OF 3210) de acordo com Song e Springer (1996). Os resultados foram expressos como o valor médio de pelo menos dez gotas pendentes a 23°C e 55% de umidade relativa. Com base em diluições seriadas do valor de TS do extrato bruto de ramnolipídio foi construído um gráfico de tensão superficial versus a concentração de RL na solução. O ponto de inflexão da curva foi considerado a CMC do extrato de RL, segundo a metodologia descrita por Sheppard e Mulligan (1987)

### 4.3. Propriedades físico-químicas das amostras de solo

#### 4.3.1. Análise elementar das amostras de solo

Para a realização de um protocolo de contaminação artificial de solos, simulando um local de contaminação recente, uma amostra de solo arenoso classificado de acordo com a classificação de solo do USDA (USDA, 1999) foi gentilmente fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA AGROBIOLOGIA). A amostra foi seca ao ar durante 24 h e peneirada com uma peneira de 2 mm de malha para separar a areia grossa e pedregulhos. Com objetivo de determinar a concentração inicial de As, Cd e Zn no solo arenoso, os elementos químicos foram extraídos segundo o método USEPA 3051A (USEPA, 2007) e analisados por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) (Tabela 1).

Para avaliar o potencial do extrato de ramnolipídios em remover As, Cd e Zn de uma amostra de solo sujeita a uma contaminação por metais/metaloídico a longo prazo, foi recolhida de uma indústria de mineração desativada do estado do Rio de Janeiro, uma amostra de solo franco-siltoso proveniente de uma área de rejeitos de mineração, a qual tinha recebido grandes quantidades de resíduos metálicos durante muitos anos. A amostra de solo foi peneirada como descrito acima e armazenada em um recipiente de plástico para posterior realização dos ensaios de remediação em frascos. As concentrações de As, Cd e Zn foram também determinadas conforme descrito anteriormente. As características físico-químicas de ambos os solos foram determinadas de acordo com os métodos estabelecidos pelo manual da Empresa Brasileira Agropecuária EMBRAPA (DONAGEMA, 1997) e estão listados na tabela 1.

**Tabela 1: Características físico-químicas das amostras de solo**

<b>Tipo de solo</b>	<b>Arenoso<sup>a</sup></b>	<b>Franco-siltoso<sup>b</sup></b>
<b>pH</b>	5,1	7,8
<b>Argila (%)</b>	21	13
<b>Silte (%)</b>	14	55
<b>Areia (%)</b>	57	24
<b>Pedregulho (%)</b>	8	8
<b>C (%)</b>	1,2	1,2

$\rho_p$ (g/L)	2,67	3,37
$D_p$ (mm)	0,25	0,027
CTC (cmol c dm <sup>-3</sup> )	6,3	2,4
Al (mg/kg)	7,3	234
K (mg/ kg)	34	156
Ca (mg/ kg)	330	3.166
Mg (mg/ kg)	106	754
As (mg/ kg)	0,1	114
Cd (mg/ kg)	1,1	122
Zn (mg/ kg)	22	3.339

C (%): Carbono orgânico total; CTC: Capacidade de troca catiônica;  $\rho_p$ : Densidade de partícula; <sup>a</sup> Solo utilizado para contaminação recente; <sup>b</sup> Solo proveniente de zona de mineração; Diâmetro de partícula.

#### 4.3.2. Contaminação artificial de solo arenoso

Para a realização de um protocolo de contaminação simulando uma contaminação recente de metais/metaloídico, sais de  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram utilizados para preparar três soluções separadas de arsênio (300 mg/L), cádmio (40 mg/L) e zinco (1500 mg/L). Posteriormente, 1 kg de solo arenoso foi pesado em um recipiente de plástico e depois misturado com as três soluções metálicas. A proporção da mistura de solo e sais de soluções contaminante foi de: 1 kg/ 3L. A mistura foi agitada durante 3 semanas e, em seguida, deixada em repouso durante um período mínimo de 3 meses.

Para simular condições ambientais de lixiviação, o solo contaminado seco foi percolado por chuva artificial em um sistema de lavagem de colunas, de acordo com Zheng, Zheng e Chen, (2012), com modificações. O solo contaminado foi transferido para um cilindro de fibra de vidro com 15 cm de altura. Para cada 3 cm de solo arenoso depositado no cilindro, redes de náilon de 5 cm de diâmetro com uma abertura de poro de 3 mm foram inseridas para prevenir a formação de canais preferenciais quando a chuva artificial fosse percolada através da coluna de remediação.

Uma vez que a coluna de remediação foi preenchida pelo solo contaminado, baseado no protocolo de contaminação artificial estabelecido por Mukhopadhy *et al.*

(2015), o solo arenoso foi percolado quatro vezes o seu volume de poro ( $4 V_p$ ) por uma chuva artificial, a fim de mimetizar as condições de lixiviação natural de solo. Para o cálculo de  $1 V_p$  foi primeiramente determinada a porosidade do meio poroso ( $\epsilon_{MP}$ ) para uma coluna vidro de 20 cm de altura ( $h$ ) e uma massa de solo ( $m_s$ ) de 574 gramas.

O procedimento consistiu primeiramente em determinar teoricamente o volume do leito das partículas, o qual pode ser obtido multiplicando a altura da coluna de vidro pela sua respectiva área transversal. Como a densidade da partícula ( $\rho_p$ ) foi previamente fornecida (tabela 1), a porosidade do meio poroso pode ser determinada segundo a equação (1):

$$\bullet \epsilon_{MP} = 1 - \left( \frac{m_s}{\rho_p \times A_t \times h} \right) \quad (1)$$

O qual ( $m_s$ ) é a massa de solo na coluna, ( $\rho_p$ ) a densidade da partícula de areia, ( $A_t$ ) a área transversal da coluna de vidro e ( $h$ ) a sua respectiva altura. A aferição do volume de poro ( $V_p$ ) é importante para normalizar o volume de solução injetado na coluna de vidro. A equação (2) corresponde à fórmula final para determinação do  $V_p$  da coluna de remediação.

$$\bullet V_p = \epsilon_{MP} \times (A_t \times h) \quad (4)$$

O valor de  $1 V_p$  calculado foi de 135mL para cada 574 g de solo. A composição da chuva artificial foi baseada em uma variedade de soluções de sais inorgânicos descritos por Oorts, Ghesquiere e Smolders (2007):  $\text{CaCl}_2$  ( $5 \times 10^{-4}$  mol/L),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $5 \times 10^{-4}$  mol/L),  $\text{MgCl}_2$  ( $5 \times 10^{-4}$  mol/L),  $\text{KCl}$  ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L). O pH da chuva artificial foi de 5,8. Após a percolação pela chuva artificial, o solo foi deixado em repouso durante 3 semanas a 28°C. As amostras de solo foram depois secas a 50°C durante 24 h e extraídas utilizando-se o Método USEPA 3051A. A concentração de As, Cd, Zn nas amostras de solo contaminado após a percolação pela chuva artificial foram analisadas por ICP OES.

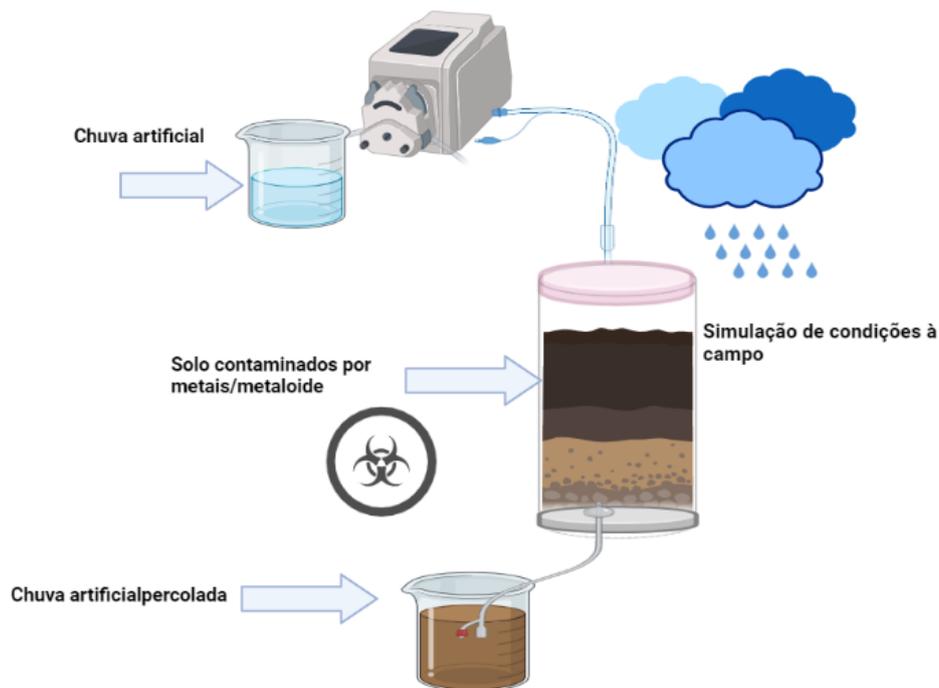


Figura 12: Desenho esquemático de uma percolação de solo arenoso contaminado por chuva artificial.

#### 4.4. Experimentos de remediação em frascos

Inicialmente, ensaios de remediação de solos contaminados por sais de As, Cd e Zn foram realizados utilizando como modelo de estudo amostras de solo arenoso contaminadas artificialmente. Nestes ensaios de remediação foi determinada a eficiência de remediação de metais/metaloídico utilizando um extrato de RL através de uma série de ensaios em frascos contendo diferentes concentrações de RL: (0,1; 1 e 2%) e pHs (8 e 10). Foi utilizada uma solução de 0,5% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para ajustar o pH do extrato de ramnolipídios bem como para ajustar o pH da água destilada utilizada para os ensaios de remediação em pH 8 e 10 para discriminar possíveis extrações de metais/metaloídico provenientes de alterações de pH. A proporção de solo contaminado por extrato de RL utilizado foi de 1:20 (m/v). Os ensaios de remediação em frascos foram realizados em tubos plásticos cônicos de 50 mL. Todos os tubos foram incubados em um agitador rotativo (60 rpm) durante 48 h a  $25^\circ\text{C}$  e depois centrifugados (6.000 rpm/5 min). Cada ensaio de remediação foi realizado em triplicata. Após os ensaios, as amostras de solo foram digeridas segundo o método USEPA 3051A (Figura 13) e os extratos ácidos resultantes foram analisados por ICP OES.

Posteriormente, foi avaliada também a eficiência de remediação de metais do extrato de ramnolipídios, quando em contato com amostras de solo apresentando diferenças quanto a classificação textural, o pH inicial e tempo de exposição a contaminantes metálicos. Amostras de solo provenientes de uma antiga área de mineração desativada foram submetidas a ensaios de remediação utilizando da melhor concentração de extrato de RL definido anteriormente. As amostras de solo foram submetidas a ensaios de remediação em frascos, sendo estas colocadas em contato com extrato de RL ajustado para o pH 6 e 10 durante 48h. Foi utilizada uma solução de 0,5% de HNO<sub>3</sub> para o ajustar o extrato de RL para pH 6, e novamente foi utilizada uma solução de 0,5% de NH<sub>4</sub>OH para ajustar o extrato de ramnolipídios para pH 10. Finalmente água destilada foi ajustada para pH 6 e 10 para discriminar possíveis extrações de metais/metaloídico provenientes de alterações de pH.

Os resultados para cada ensaio de remediação foram expressos como a média de cada triplicata realizada, assim como seus respectivos desvios padrões. Os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA, e as médias foram analisadas pelo teste HSD pós-hoc de Tukey (5% de probabilidade), usando o software Statistica 7.0 (StatSoft, EUA). A taxa de remediação também foi expressa como a porcentagem de metais/metaloídico removidos pelo extrato de RL em cada fração do solo, baseado no balanço de massa dos contaminantes metálicos presentes nas amostras de solo antes e depois dos ensaios de remediação.

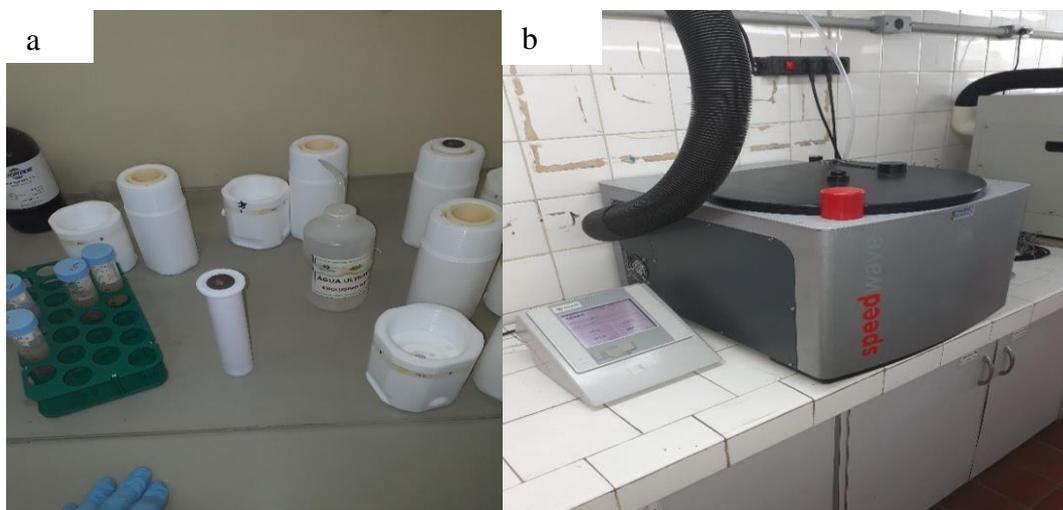


Figura 13 - (a) Execução do método 3051A (USEPA) na capela de exaustão de gases. Fonte: Compilação do próprio autor; (b) Forno de micro-ondas de digestão de solos e sedimentos. Compilação do próprio autor.

#### 4.4.1. Extração sequencial das amostras de solo

Foi realizado a extração sequencial em amostras de solo arenoso contaminadas artificialmente e amostras de solo provenientes de áreas de mineração antes e após os experimentos de remediação utilizando os extratos de ramnolipídios. A extração sequencial dos elementos As, Cd e Zn obedeceu ao seguinte critério de fracionamento geoquímico: (1) metais/metaloídico trocáveis, (2) metal(oides) adsorvidos à carbonato, (3) metal(oides) adsorvidos à matéria orgânica. Esta extração sequencial foi realizada de acordo com o procedimento de extração sequencial segundo o Gabinete de Referência da Comunidade Europeia (BCR) descrito por Rauret *et al.* (2010).

Foi utilizado uma amostra de sedimento de lago certificada (sedimento do lago de Michigan, BCR -701) para o controle de qualidade do processo de extração sequencial. As extrações sequenciais foram realizadas em triplicata para cada amostra de solo, como também para o material de referência certificado.

(1) Fração trocável: Um total de 0,5 g de cada amostra foi colocado em frascos cônicos de 50 mL. Foi adicionado a cada amostra 20 mL de uma solução de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 0,11 mol/L; pH 2,9) e mantido sob agitação constante por 16 h, seguido de centrifugação (3.500 rpm/15 min) e posterior coleta do sobrenadante.

(2) Fração adsorvida à carbonato: Foi adicionado à fração sólida residual resultante da fração (1) 20 mL de cloridrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ; 0,5 mol/L; pH 2) e, após 16h de agitação, o sobrenadante foi centrifugado e coletado.

(3) Fração adsorvida à matéria orgânica: A terceira fração foi obtida após adição de 5mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 30% m/v) à matriz sólida resultante da fração (2). Posteriormente, os resíduos sólidos foram deixados em repouso por um período de 1h em temperatura ambiente com as respectivas tampas sobre os frascos para captar os vapores resultantes da digestão da matéria orgânica por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Novamente 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram adicionados às amostras e estas foram submetidas a aquecimento (85°C /1h). Após esta etapa, as amostras que tiveram o volume de peróxido de hidrogênio reduzido para menos de 3 mL foram novamente avolumadas para 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e submetidas a aquecimento por mais 1 hora. Amostras em que o volume ainda não havia reduzido para um volume inferior a 3 mL foram mantidas sob aquecimento até atingir este limite.

Ao final do processo, todas as amostras foram submetidas a pelo menos duas etapas de digestão da matéria orgânica. Os frascos foram deixados em temperatura ambiente até que pudessem ser manuseados novamente e então foram adicionados 25 mL de acetato de amônio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ; 1 mol/L; pH 2) seguido de agitação por 16 h.

O sobrenadante foi coletado após centrifugação (3,500 rpm/15 min) e estocado sob refrigeração (4°C) até o momento das análises de ICP OES (figura 14). A taxa de remediação também foi expressa como a porcentagem de metais/metaloídico removidos pelo extrato de RL em cada fração do solo, baseado no balanço de massa dos contaminantes metálicos presentes nas amostras de solo antes e depois dos ensaios de remediação.



Figura 14 - Frascos contendo os extratos de metais/metaloídico referentes à extração sequencial dos ensaios de remediação de solo. Fonte: Compilação do próprio autor.

#### 4.5. Ensaios de toxicidade aguda

Para a avaliação do possível efeito nocivo do extrato de ramnolipídios a organismos aquáticos, foi utilizado o crustáceo *Artemia salina* (Linnaeus) como indicador ambiental de toxicidade aguda. Ensaios de toxicidade aguda foram realizados de acordo com o método descrito por Pimentel *et al.* (2011), com modificações. Cistos primários de *A. salina* foram hidratados em 33 g/L de água do mar sintética (Aquaforest®). Após 24 h, os cistos que não eclodiram foram removidos e os cistos que

se desenvolveram para as larvas (nauplius) de fase I foram incubadas por mais 24 h sob oxigenação e iluminação para que se desenvolvessem para a fase adulta. Adicionalmente, água do mar sintética foi utilizada em substituição ao extrato de ramnolipídios como controle negativo.

Após 24 h, 10-20 larvas de *A. salina* (fase II) foram selecionadas e colocadas em placas de petri estéreis contendo diferentes concentrações do extrato de RL (0,01-0,2 g/L). As larvas foram contadas após 24h de contato com as soluções contendo RL para determinar a concentração letal 50% (CL50). Os dados foram tratados por análise de regressão de probit conforme descrito por Finney (1949), utilizando o programa estatístico Statistica 7.0. Foi considerado que uma CL50 seria a dose mínima necessária para causar a morte de 50% larvas de *A. salina* (fase II), considerando um intervalo de confiança de 95%.

#### 4.6. Ensaio de inibição de microrganismos típicos do solo

A fim de investigar o efeito de inibição de bactérias típicas do solo pelo extrato de biosurfactante, foram selecionadas duas espécies Gram-positivas, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212™ e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) ATCC19659™, e duas espécies Gram-negativas, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC13076™ e *P. aeruginosa* ATCC27853™. Como representante de fungos saprófitos para o ensaio de inibição foi selecionada uma cepa de *Candida albicans* ATCC10231™. Os ensaios de inibição das cepas bacterianas foram baseados no teste de difusão em placa pela técnica de poço conforme descrito por Casla, Requena, Gómez (1996) com modificações. Os ensaios de inibição de microrganismos representantes de fungos saprófitos foram baseados na metodologia de Magaldi *et al.* (2004).

As culturas bacterianas de referência citadas acima, que se encontravam estocadas a -22°C, foram reativadas em caldo líquido de infusão de cérebro coração (BHI, Himedia Laboratories®, Mumbai, Índia). A cepa padrão de *Candida albicans* foi cultivada em agar batata dextrose (Merck®, Alemanha) durante 24 h a 37°C. Após o período de incubação, os microrganismos em fase exponencial de crescimento foram inoculados separadamente em água peptonada tamponada (PBW). As suspensões de células bacterianas e de *C. albicans* foram padronizadas a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$

e  $1,5 \times 10^6$ , respectivamente, usando o padrão de turbidez McFarland 0,5. Uma vez padronizado o inóculo para cada microrganismo, foi semeado um volume de 1 mL em meio sólido pela técnica de espalhamento utilizando uma alça de drigalski descartável.

O meio ágar Muller Hinton e o meio ágar Sabouraud Dextrose (ambos da Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) foram utilizados para os ensaios de inibição bacteriana e fúngica, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os poços foram feitos com um dispositivo contendo cilindros metálicos esterilizados de 4 mm de diâmetro.

A seguir, os poços foram completamente preenchidos com 50  $\mu$ L de extrato bruto de RL em uma concentração de 2%. As placas foram então incubadas a 37°C por 24h. Água destilada (ao invés do extrato de RL) foi utilizada como controle negativo, e como controle positivo foram utilizados discos de antibióticos de acordo com a metodologia proposta pela organização americana Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). A ciprofloxacina (5  $\mu$ g) foi selecionada como controle positivo para bactérias Gram-negativas, enquanto a eritromicina (15  $\mu$ g) foi utilizada como controle positivo para bactérias Gram-positivas. A anfotericina B (0,11 mg) foi utilizada como controle positivo para *C. albicans*. O possível halo formado pela presença do extrato de RL foi comparado ao halo de inibição resultante do disco de antibióticos. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e as placas foram mantidas por mais 72 horas para observação de algum possível halo de inibição tardio, indicando uma possível inibição pelo extrato de RL.

#### **4.7. Precipitação química de As, Cd, Zn**

Para remoção de As, Cd e Zn do extrato de RL foi utilizado o método de precipitação química descrito por Da Silva *et al.* (2018) com modificações. Os extratos de RL empregados na remediação de amostras de solo arenosa contaminadas artificialmente, à uma concentração de 2% e pH 10, foram centrifugados (6.000 rpm/5 min) e os sobrenadantes foram despejados em um becker de 100 mL. Uma alíquota de 20 mL do extrato de RL foi previamente acidificado utilizando HNO<sub>3</sub> (65%) para mensuração da concentração de As, Cd, Zn no extrato de RL por espectroscopia ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). As concentrações de As, Cd e Zn no

extrato foram respectivamente: 109, 7 e 308 mg/L. Baseado na concentração inicial de arsênio, após o processo de remediação foi realizado os seguintes procedimentos para a precipitação de As, Cd, Zn.

Primeiramente, o extrato de RL contendo os contaminantes metálicos acima mencionados foi acidificado para a faixa de pH 4 utilizando 5 mol/L de HNO<sub>3</sub>. Foi adicionado então MgCl<sub>2</sub> ao extrato a uma razão As:Mg de 1:400. Após esta etapa o extrato foi submetido a centrifugação (8.000 rpm/5 min), resultando na formação de um precipitado branco. O extrato de RL foi ajustado para pH 9,5 pela adição de gotas de NH<sub>4</sub>OH (28% m/v). A seguir, o extrato foi centrifugado (8,000 rpm/5 min) separando o precipitado branco do extrato de RL. Posteriormente, gotas de NH<sub>4</sub>OH (28% m/v) foram adicionadas ao extrato de RL elevando o pH da solução para 10,5 e, novamente, o extrato foi centrifugado nas mesmas condições citadas. Posteriormente o extrato foi novamente submetido a análise de ICP OES para determinação de As, Cd e Zn.

#### **4.8. Produção de microespumas de RL**

##### **4.8.1. Desenho experimental para produção de microespumas de RL**

Com base em estudos anteriores sobre estabilidade e diâmetro médio das microbolhas de microespumas de ramnolipídios (FENG, SINGHAL & SWIFT, 2009), foi estabelecido para o extrato de RL em duas concentrações distintas (0,5 e 1%) dois desenhos rotacional composto (RCCD) com cinco pontos centrais (c) com base nas seguintes variáveis Rotação (6000-12000 rpm), pH (6-9), e tempo de preparo (30-120 s). Os parâmetros de resposta foram: Estabilidade e diâmetro médio da bolha (tabela 2). O software Design Expert, versão 7.0.0 (Stat-Easy, Minneapolis, EUA) foi utilizado para desenvolver e analisar os desenhos experimentais.

**Tabela 2. Desenho rotacional composto para a determinação da estabilidade e diâmetro médio de microbolha para microespumas de RL em duas concentrações distintas (0,5 e 1%)**

<b>Ensaios</b>	<b>Rotação (rpm)</b>	<b>pH</b>	<b>Tempo de preparação (s)</b>
----------------	----------------------	-----------	--------------------------------

---

1	7214	5,8	48
2	7214	5,8	102
3	7214	8,2	48
4	7214	8,2	102
5	10786	5,8	48
6	10786	5,8	102
7	10786	8,2	48
8	10786	8,2	102
9	6000	7	75
10	12000	7	75
11	9000	5	75
12	9000	9	75
13	9000	7	30
14	9000	7	120
15 (c)	9000	7	75
16 (c)	9000	7	75
17 (c)	9000	7	75
18 (c)	9000	7	75
19 (c)	9000	7	75

---

**(c): Pontos centrais do RCCD; RL: Ramnolipídio**

---

#### **4.8.2. Método de geração de microespumas de RL**

As microespumas de ramnolipídios foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Sebba (1985). O volume inicial do extrato de ramnolipídios empregado para os ensaios de estabilidade e diâmetro de bolha foi de 150 mL. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente ( $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Um dispersor automático de alta velocidade foi utilizado para gerar a micro dispersão de bolhas (Ultra Turrax IKA T25 Digital Staufen, Alemanha) com uma velocidade máxima de 24.000 rpm. O dispersor foi mantido a uma altura fixa durante todas as experiências com CGA.

#### **4.8.3. Ensaios de estabilidade e diâmetro de bolha de microespumas**

A estabilidade das microespumas de ramnolipídios foram mensuradas seguindo a metodologia proposta por Sebba (1987). Após a aplicação de a uma energia cinética rotacional sobre o extrato de RL de acordo com os parâmetros pré-determinados baseado no RCCD, a dispersão coloidal foi transferida para um cilindro graduado de 150 mL com auxílio de uma bomba peristáltica para medição do líquido de drenagem das microespumas. A estabilidade das microespumas foi quantificada com o auxílio de um cronômetro e o tempo necessário para drenar metade do líquido da dispersão foi considerado o tempo de meia-vida ( $L1/2$ ) da dispersão de microespumas. Cada ensaio de estabilidade foi realizado 6 vezes e a média aritmética uma vez calculada foi registrada e armazenada para análises estatísticas futuras (Figura 15).

As aferições do diâmetro médio de bolha foram realizadas de acordo com Feng, Singhal e Swift (2009). Após a geração de uma dispersão de microbolhas, uma alíquota de 3 mL foi colocada numa lâmina de vidro escavada sob um microscópio de luz (Axioscoco, modelo-40, Zeiss, Alemanha) operando em modo padrão com uma amplificação ocular de 4 vezes acoplada a uma câmera fotográfica (AxioCam ICC-1, Zeiss) (Figura 15).

Para cada ensaio pré-estabelecido para a produção das microespumas de ramnolipídios foram geradas 5 fotografias e foram contadas um total de 300 bolhas por ensaios. O respectivo diâmetro de cada microbolha foi medido utilizando o software Microscope axiovision® versão 4.6.3 (Zeiss). O diâmetro médio de bolha de cada

dispersão de microespuma foi calculado e registrado para ser empregado em análises estatísticas futuras.

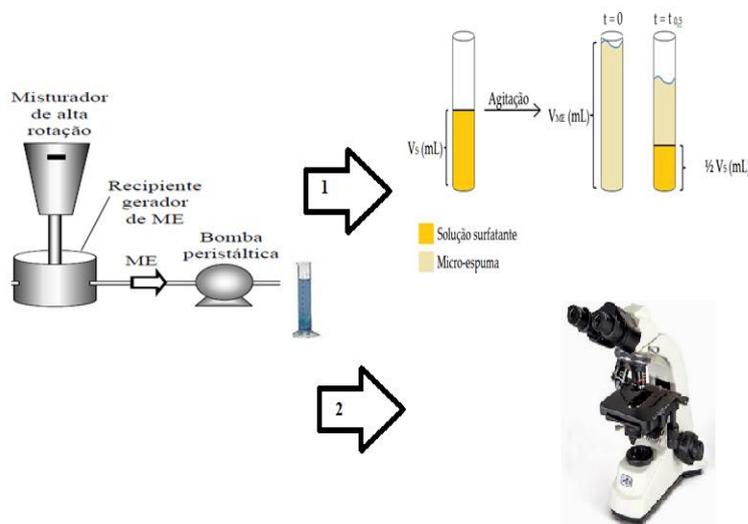


Figura 15 - Desenho esquemático de uma unidade produtora de microespumas. Seta 1: Esquema ilustrativo do ensaio de tempo de meia vida ( $T_{0,5}$ ); Seta 2: Esquema ilustrativo de aferição de diâmetro de microbolha. Modificado de Couto (2007).

#### 4.9. Contaminação artificial de solo arenoso para os ensaios de remediação em colunas

O protocolo de contaminação artificial do solo arenoso seguiu a mesma metodologia descrita no item 4.3.2, com algumas modificações. Foram contaminados um total de 4 kg de solo arenoso e misturado com soluções saturadas de  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , e  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , nas respectivas concentrações para As (300 mg/L), Cd (40 mg/L) e Zn (1000 mg/L). Para os ensaios de percolação por chuva artificial foi adicionado 574 gramas de amostra contaminada em um cilindro de fibra de vidro de 20 cm (Figura 16).

Para cada 574 gramas de amostra de solo contaminada  $1 V_p$  foi calculado como sendo 135 mL. Após percolação de 4 kg de solo contaminado pela chuva artificial, a amostra foi deixada em repouso por mais 3 semanas em temperatura ambiente ( $28^\circ\text{C}$ ) e depois misturada manualmente por quarteamento. Foi coletado um total de 10 gramas

de solo proveniente do montante contaminado inicialmente e submetido a um processo de secagem em estufa a 40°C durante 24 h para aplicação do método de digestão/extração de metais provenientes de solos e sedimentos (USEPA 3051A). Posteriormente, no extrato ácido resultante foi determinada a concentração de As, Cd e Zn por ICP OES para determinação da concentração inicial de contaminantes metálicos/metaloídico na amostra de solo arenoso. Os ensaios foram feitos em duplicata.



Figura 16 - Coluna de remediação de 20 cm para os ensaios de percolação de chuva artificial.

#### **4.10. Ensaios de percolação em coluna**

##### **4.10.1. Determinação da vazão de trabalho**

Foram realizados ensaios de percolação utilizando como objeto de estudo o solo arenoso livre de contaminantes metálicos, no intuito de determinar a vazão de trabalho para os ensaios de remediação em coluna. Os ensaios foram realizados em colunas de remediação de fibra de vidro de 5 cm de altura (h), sendo previamente calculado o  $V_p$  (massa de solo: 125g /  $1 V_p = 38$  ml) (Figura 17). Posteriormente, a coluna foi preenchida com solo arenoso e percolada com o extrato de RL (0,5%; pH 7,2) e depois com as microespumas de ramnolípídios em vazões crescentes (10, 15, 18, 30, 40, 45, 49, 58, 64, 78, 115 e 130 mL/min) com auxílio de uma bomba peristáltica e um rotâmetro para

ajustar a vazão a jusante da coluna. Um manômetro foi instalado na entrada da coluna de remediação. Quando a vazão desejada estava devidamente ajustada e após o completo preenchimento da coluna, aguardava-se até que o manômetro atingisse um valor constante (3-5 s) e, então, a leitura e o registro da pressão na entrada da coluna de remediação eram realizados. Para cada vazão testada foram realizadas três leituras distintas.

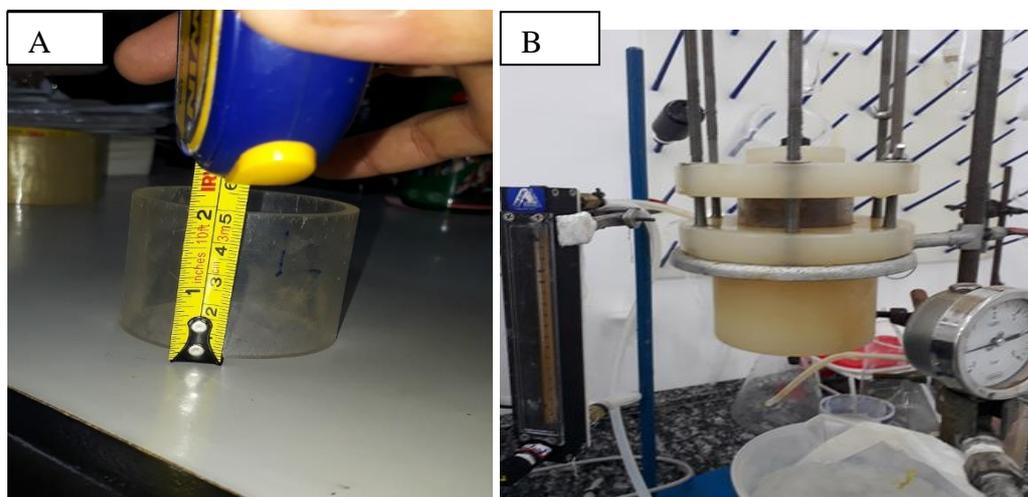


Figura 17 - (A) Medição da coluna de vidro; (B) Coluna de remediação montada.

#### 4.10.2. Ensaios de remediação em coluna

Considerando os experimentos de remediação em frascos, realizados anteriormente, foram montados os experimentos de remediação de uma amostra de solo arenoso contaminada por metais/metaloídico utilizando colunas de remediação de solo. A quantidade de solo contaminado submetido a ensaios de remediação foi de 125 gramas e a altura da coluna de remediação foi de 5 cm. O número de  $V_p$  calculado foi de 38 mL.

As microespumas de ramnolipídios e o extrato de ramnolipídios, ambos a uma concentração de 0,5% e pH 9, foram comparados entre si quanto à eficiência de remediação de contaminantes metálicos/metaloídico, após a percolação pelo mesmo número crescente de volumes de poros ( $V_p$ : 4= 152 mL e  $V_p$ :10= 380 mL). Em relação aos experimentos de percolação por microespuma de ramnolipídios baseado em ensaios anteriores relativos à estabilidade e ao diâmetro de bolha das microespumas de

ramnolipídios, a velocidade de rotação e o tempo de preparo foram mantidos constantes (12.000 rpm/120s). Como controle negativo do experimento, amostras de solo contaminado foram percoladas por água deionizada ajustada a pH 9 respeitando o mesmo número de volumes de poros (4 e 10).

Após os ensaios de remediação em coluna, todas as amostras de solo remediadas foram separadamente homogeneizadas por quarteamento e depois secas a 40°C durante 24 horas (Figura 18). Todas as amostras de solo remediadas foram submetidas a procedimentos de extração de metais/metaloídico de acordo com o método USEPA 3051A. A concentração de As, Cd e Zn nas amostras de solo foi analisada por ICP OES. Os resultados e o desvio padrão foram expressos como média dos ensaios em duplicata.

Os dados também foram analisados estatisticamente usando ANOVA e as médias comparadas usando teste HSD-Tukey (5% de probabilidade), usando o software Statistica 7.0. Finalmente, os resultados foram convertidos em valores percentuais e a eficiência de remediação foi definida como a porcentagem de remoção de metais/metaloídico de microespumas ou extrato líquido de ramnolipídios e deduzidas da porcentagem de remoção de água a pH 9 (controle negativo).

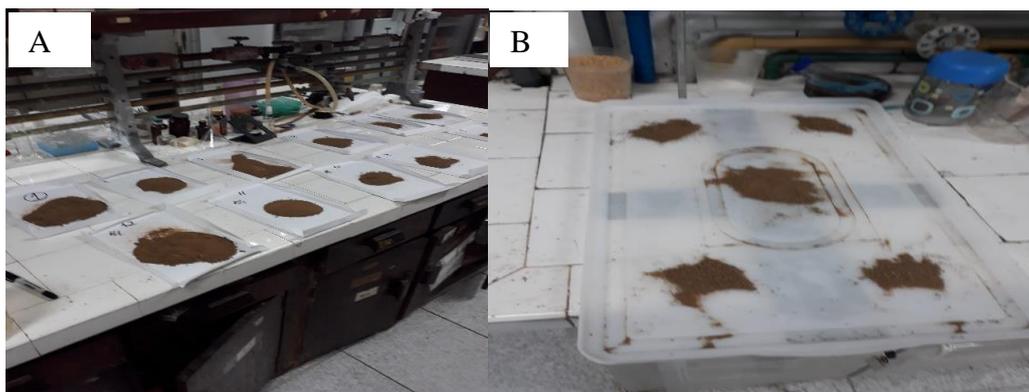


Figura 18 (A) - Separação das amostras de solo arenoso após a remediação em coluna. (B) - Processo de homogeneização das amostras de solo por quarteamento.

## 5. Resultados

### 5.1. Produção e caracterização de RL para os ensaios de remediação em microescala

No presente estudo, o extrato de ramnolipídio foi produzido utilizando glicerol como a sua principal fonte de carbono, segundo metodologia descrita em Kronenberg (2007). Em 168 h de cultivo o meio bruto livre de células contendo o RML foi utilizado para todos os ensaios deste trabalho. A quantificação de ramnolipídio (RL) por Técnicas de cromatografia de alta eficiência (CLAE), são usualmente consideradas como padrão para identificação e quantificação de congêneres de ramnolipídios (BEHRENS et al. 2016). Esta análise revelou uma concentração de 5,9 g/L (0,6%) do biossurfactante do tipo RML no extrato bruto. A análise de EM do extrato bruto revelou que os congêneres do tipo di-RL apresentavam uma quantidade relativa de 85%, e predominavam sobre os mono-ramnolipídios (15%). O congêneres RhaRha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> foi identificado como o mais abundante (~ 65%) (Tabela 3). O extrato bruto de RL apresentou uma CMC de 260 mg/L.

**Tabela 3. Identificação de congêneres de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas* sp. 1201 através de análise de EM.**

Íon molecular m/z [M-H]	Quantidade relativa (%) <sup>a</sup>	Congêneres de RL	
649.3291	65,3	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	
621.3001	13,1	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>8</sub>	
503.2826	10,1	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	
675.3433	3,6	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	RhaRhaC <sub>12:1</sub> C <sub>10</sub>
677.3588	2,8	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	
475.2533	5,3	Rha-C <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>8</sub>

Rha: Ramnose; <sup>a</sup>: Calculado pela adição de [M-H]<sup>-</sup> e fragmentos produzidos por

---

fragmentação interna.

## **5.2. Contaminação artificial de solo arenoso simulando um processo de contaminação recente**

O solo arenoso artificialmente contaminado apresentou uma concentração final de arsênio, cádmio e zinco de 182, 20 e 983 mg/kg. A concentração de As no solo arenoso foi considerada acima do limite estabelecido pelo Conselho Nacional do Ambiente Brasileiro (CONAMA, 2009) para uma zona industrial (As: 150 mg/kg), enquanto que a concentração de cádmio foi classificada como permitida para uma zona industrial (Cd: 20 mg/kg) e a concentração de zinco estava próxima do limite para uma zona residencial (Zn: 1000 mg/kg).

No segundo experimento de contaminação artificial para os ensaios de remediação em coluna conforme descrito no item 4.9, após a percolação por chuva artificial as concentrações finais de As, Cd e Zn foram de 160, 39 e 511 mg/kg, respectivamente. A concentração de arsênio foi considerada acima do permitido para uma zona industrial, do mesmo modo que a concentração de cádmio foi considerada acima da concentração recomendada para uma zona industrial e a concentração de zinco foi considerada acima do limite tolerado para uma zona agrícola (Zn: 450 mg/kg).

## **5.3. Efeito da concentração de ramnolipídios e do pH na remediação de metais e metaloide**

Para determinar a quantidade de contaminantes metálicos extraídos em função da concentração de ramnolipídios adicionada, foi realizada uma série de experimentos de lavagem de solo em frascos utilizando amostras de solo arenoso contaminados artificialmente, simulando um local de contaminação recente. Pode-se observar que à medida que foi utilizado o extrato de RL em concentrações crescentes, as quantidades de As, Cd e Zn que eram removidas das amostras de solo também aumentaram (Tabela 4).

O extrato de RL quando à uma concentração de 2% e pH 10 e pH 8 resultaram em uma remoção de metais semelhante. As concentrações de arsênio no solo submetido a uma contaminação recente diminuíram de 182 mg/kg para 85 mg/kg (remoção de

53%), enquanto a concentração de cádmio diminuiu de 20 mg/kg para 2 mg/kg (90%) e a concentração de zinco diminuiu de 983 mg/kg para 198 mg/kg (80%) (Tabela 4).

**Tabela 4. Concentração de As, Cd, Zn em amostras de solo arenoso extraída pelo método 3051A antes e após os métodos de lavagem de solo em frascos utilizando o RL 1201 ajustado para diferentes pHs.**

	As (mg/ kg)	Taxa de Remoção (%)	Cd (mg/ kg)	Taxa de Remoção (%)	Zn (mg/ kg)	Taxa de Remoção (%)
<b>Solo contaminado recentemente</b>	182 ± 10		20 ± 0,8		983 ± 30	
<b>Água + NH<sub>4</sub>(OH) pH 10</b>	179 ± 5,3	2	19 ± 0,6	5	754 ± 14	23
<b>RL 0,1% (pH 10)</b>	170 ± 3,4	7	17 ± 0,4	15	653 ± 16	34
<b>RL 1% (pH 10)</b>	108 ± 4,0	41	7 ± 0,6	65	262 ± 19	73
<b>RL 2% (pH 10)</b>	85 ± 8,3	53	2 ± 1	90	197 ± 13	80
<b>RL 0,1% (pH 8)</b>	179 ± 1,5	1,7	18 ± 0,3	1,3	670 ± 32	32
<b>RL 1% (pH 8)</b>	114 ± 5,0	37	12 ± 1,2	43	283 ± 13	71
<b>RL 2% (pH 8)</b>	86 ± 6,0	53	3 ± 0,2	85	215 ± 11	78

RL: Extrato de ramnolipídios; Os resultados e os desvios padrões são expressos como a média de dois experimentos distintos e estão apresentados no anexo 3

Quando utilizado em amostras de solo proveniente de uma indústria de mineração, o extrato de ramnolipídios em pH 10 foi capaz de reduzir o arsênio de 114 mg/kg para 51 mg/kg (redução de 55%). Entretanto, as concentrações de cádmio e zinco não sofreram reduções significativas pela solução de ramnolipídios, quando ajustado para pHs alcalinos (Tabela 5). Por outro lado, os experimentos de lavagem do solo realizados com o extrato de ramnolipídios à uma concentração de 2% e ajustado para pH 6 resultaram em uma diminuição de 114 mg/kg de As para 47 mg/kg (59%), 122

mg/kg de Cd para 53 mg/kg (57%) e o teor de Zn de 3339 mg/kg para 3032 mg/kg (9%), indicando um efeito do pH na remediação de solos contaminados por metais (Tabela 5).

**Tabela 5. Concentração de As, Cd, Zn em amostras de solo franco-siltoso extraída pelo método 3051A antes e após os métodos de lavagem de solo em frascos utilizando o RL 1201 ajustado para diferentes pHs.**

	As (mg/ kg)	Taxa de Remoção (%)	Cd (mg/ kg)	Taxa de Remoção (%)	Zn (mg/ kg)	Taxa de Remoção (%)
<b>Solo de área de mineração</b>	114 ± 0,8		122 ± 3,5	–	3339 ± 60	–
<b>Água+ NH<sub>4</sub>(OH) pH 10</b>	109 ± 1,3	4,4	119 ± 12	2,5	3291 ± 52	1,4
<b>Água+HNO<sub>3</sub> pH 6</b>	105 ± 3,8	8	103 ± 1,5	16	3169 ± 29	5
<b>Água+ NH<sub>4</sub>(OH) pH 10</b>	109 ± 1,3	4,4	119 ± 12	2,5	3291 ± 52	1,4
<b>Água+HNO<sub>3</sub> pH 6</b>	105 ± 3,8	8	103 ± 1,5	16	3169 ± 29	5
<b>RL 2% (pH 10)</b>	51 ± 2,5	55	117 ± 8,6	4	3251 ± 77	3
<b>RL 2% (pH 6)</b>	47 ± 0,8	59	53 ± 6	57	3032 ± 119	9

RL: Extrato de ramnolípídios; Os resultados e os desvios padrões são expressos como a média de dois experimentos distintos e estão apresentados no anexo 3.

#### **5.4. Extração sequencial de amostras de solos contaminados recentemente e de zona de mineração**

Extrações sequenciais de As, Cd e Zn foram realizadas em amostras de solos contaminados recentemente, assim como em amostras provenientes de área de

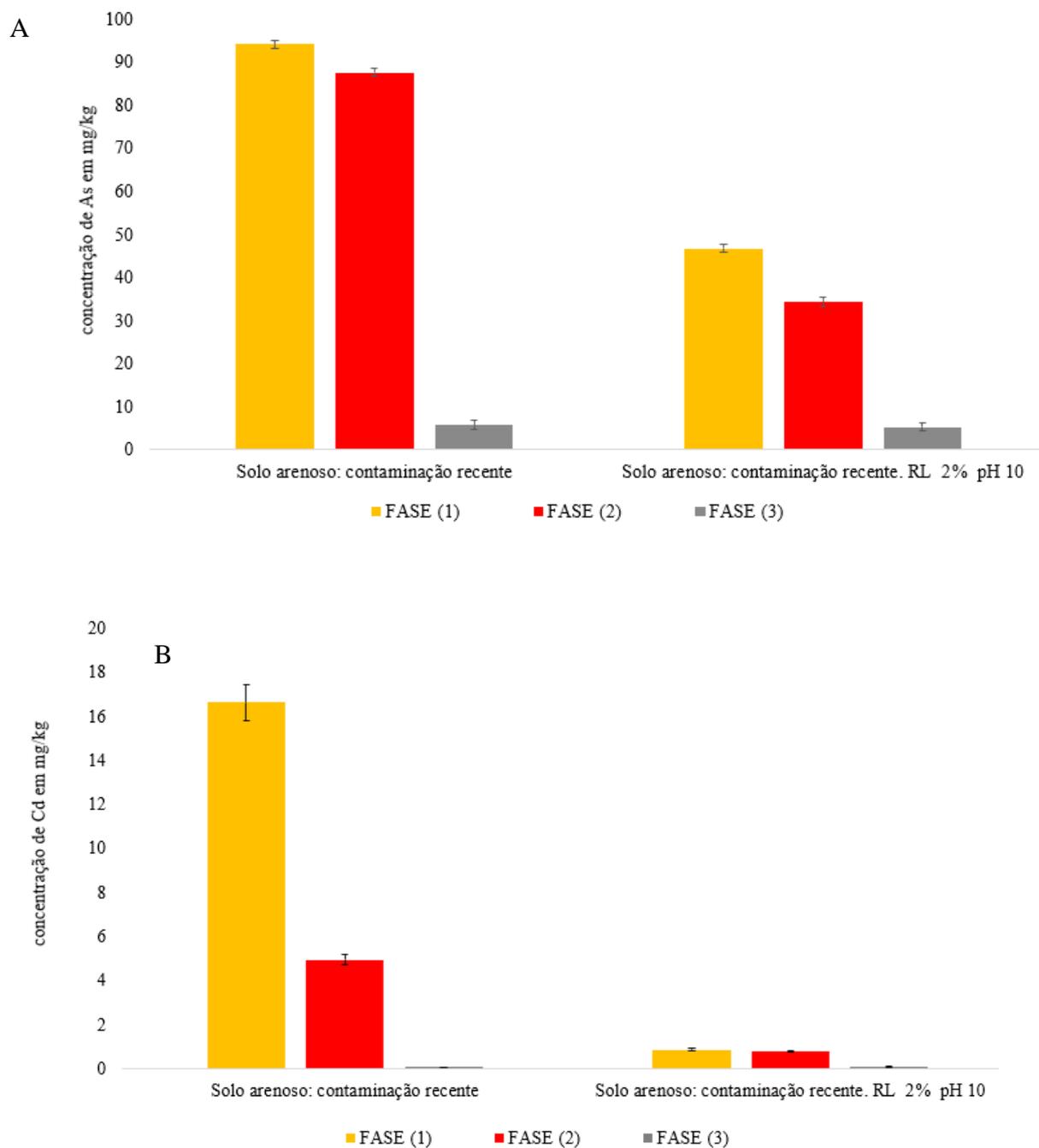
mineração, para determinar a especiação destes metais/metaloídico dentro das três principais frações geoquímicas do solo. Em todas as amostras foram observadas concentrações mais elevadas de As, Cd e Zn na fração (1) quando comparado às frações (2) e (3) (Figura 18). A especiação de As na amostra de solo submetida a uma contaminação recente, demonstrou que 94 mg/kg (50%) estava associado à fração (1) enquanto 88 mg/kg (47%) de As foi quantificado na fração (2) e 7 mg/kg (3%) na fração (3). A concentração de Cd na fração (1) foi de 17 mg/kg (77%) e na fração (2) de 5 mg/kg (23%). Não houve adsorção de cádmio na fração (3) (Figura 18A). A análise da especiação do Zn mostrou a presença de 681 mg/kg (73%) na fração (1), 242 mg/kg (26%) na fração (2) e 10 mg/kg (1%) na fração (3) (Figura 18A, B, C).

Também foi determinado as concentrações de As, Cd e Zn nas amostras de solo proveniente da zona industrial em três diferentes frações geoquímicas, apresentando os seguintes valores médios: 45 mg/kg (37%) de As na fração (1), 67 mg/kg (55%) na fração (2) e 10 mg/kg (8%) na fração (3). Concentrações elevadas de Cd foram mensuradas na fração (1) - 116 mg/kg (85%), enquanto 12 mg/kg (9%) de Cd foi quantificado na fração (2). A concentração de Cd na fração (3) foi de 8 mg/kg (6%). A especiação de Zn revelou uma quantidade de 708 mg/kg (21%) de Zn na fração (1), 1427 mg/kg (42%) na fração (2) e 1251 mg/kg (37%) na fração (3) (Figura 19).

### **5.5. Distribuição dos contaminantes nas frações geoquímicas das amostras de solo tratadas com RML.**

A Figura 19 A, B e C ilustra a extração sequencial após as experiências de lavagem do solo, para avaliar a eficiência de remoção de metal/oide do extrato de ramnolípidios em diferentes frações geoquímicas das amostras de solo. Na lavagem de solo utilizando amostras contaminadas recentemente foi observado que em pH 10 a concentração de As na fração (1) foi reduzida de 94 mg/kg para 47 mg/kg (50%), enquanto a concentração de As na fração (2) diminuiu de 88 mg/kg para 34 mg/kg (61%). Não foi observada qualquer redução significativa na fração (3) (Figura 19 A). Na fração (1) o Cd foi reduzido de 17 mg/kg para 0,9 mg/kg (95%), e na fração (2) de 5 mg/kg para 0,8 mg/kg (84%). Mais uma vez não foi observada nenhuma remoção significativa na fração (3) (Figura 19 B). O extrato de RL também foi capaz de reduzir o teor de Zn na fração (1) de 681 mg/kg para 23 mg/kg (97%), enquanto na fração (2) a

concentração inicial de Zn foi reduzida de 241 mg/kg para 173 mg/kg (29%). A concentração de Zn na fração (3) também permaneceu a mesma após as experiências de lavagem do solo (Figura 19 C).



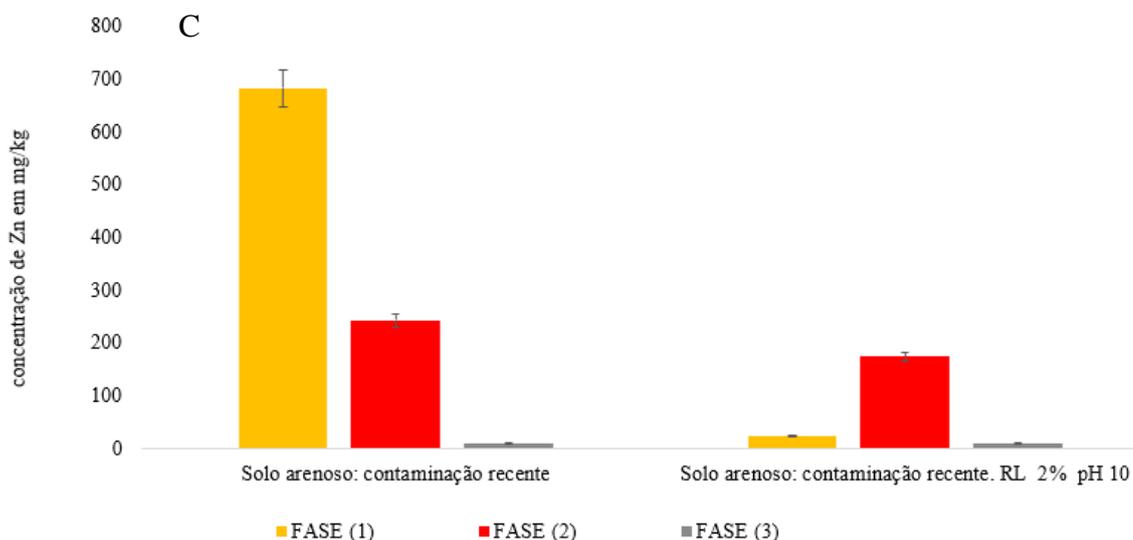
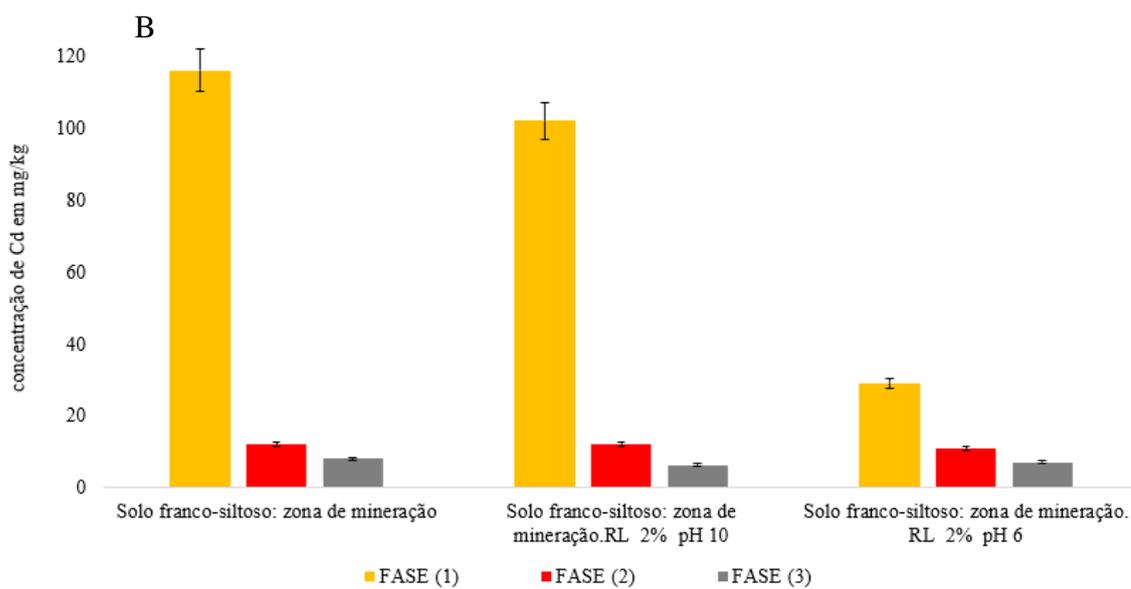
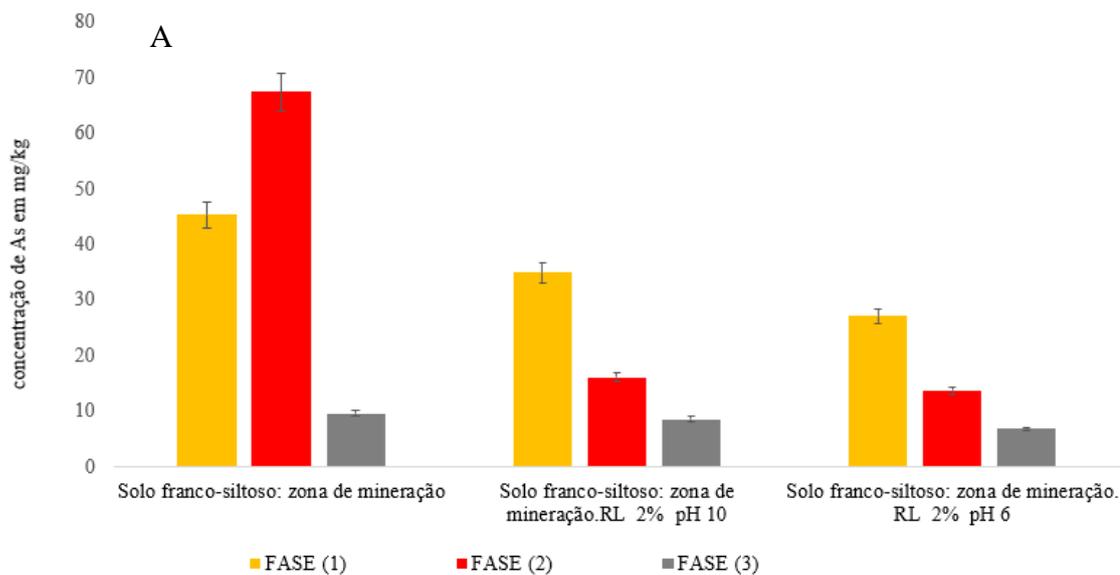


Figura 19 - Extração sequencial de (A) arsênio, (B) cádmio e zinco (C) de uma amostra de solo arenosa contaminada antes e após um experimento de lavagem de solo. RL: Extrato de ramnolipídios. As médias e desvios padrões foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata.

Foi observado na extração sequencial de amostras de solo proveniente de zona de mineração uma maior taxa de remoção de As, Cd e Zn utilizando-se o extrato de RL em pH 6 em comparação com o pH 10 (Figura 20). Com o uso do extrato de ramnolipídios em pH 10 a quantidade de As na fração (1) foi reduzida de 45 mg/kg para 35 mg/kg (22%), ao passo que a aplicação do extrato de ramnolipídios em pH 6 a quantidade de As na fração (1) foi reduzida de 45 mg/kg para 27 mg/kg (40%). Na fração (2), o uso do biossurfactante em pH 10 resultou em uma redução no teor de As de 67 mg/kg para 16 mg/kg (76%) ao passo que a solução de RL em pH 6 resultou em uma redução de 67 mg/kg a 14 mg/kg (79%) (Figura 20 A).

A solução de RL quando ajustada em pH 10 resultou na redução de As na fração (3) de 10 mg/kg para 9 mg/kg (10%), e quando em pH 6 a quantidade de As foi reduzida para 7 mg/kg (30%). O extrato de ramnolipídios quando ajustado em pH 10 foi capaz de reduzir a quantidade de Cd na fração (1) de 116 mg/kg para 102 mg/kg (12%), enquanto nas frações (2) e (3) não foi observada qualquer extração significativa (Figura 20 B). O extrato de ramnolipídios em pH 10 também não removeu quantidades significativas de Zn em nenhuma das três frações (Figura 20 C). O ajuste de pH do extrato de RL para 6 resultou no aumento da remoção de Cd e Zn do solo de zona de mineração. A concentração de Cd na fração (1) foi reduzida de 116 mg/kg para 29

mg/kg (75%), enquanto a concentração de Zn foi reduzida de 708 mg/kg para 581 mg/kg (59%) (Figuras 20 B e C).



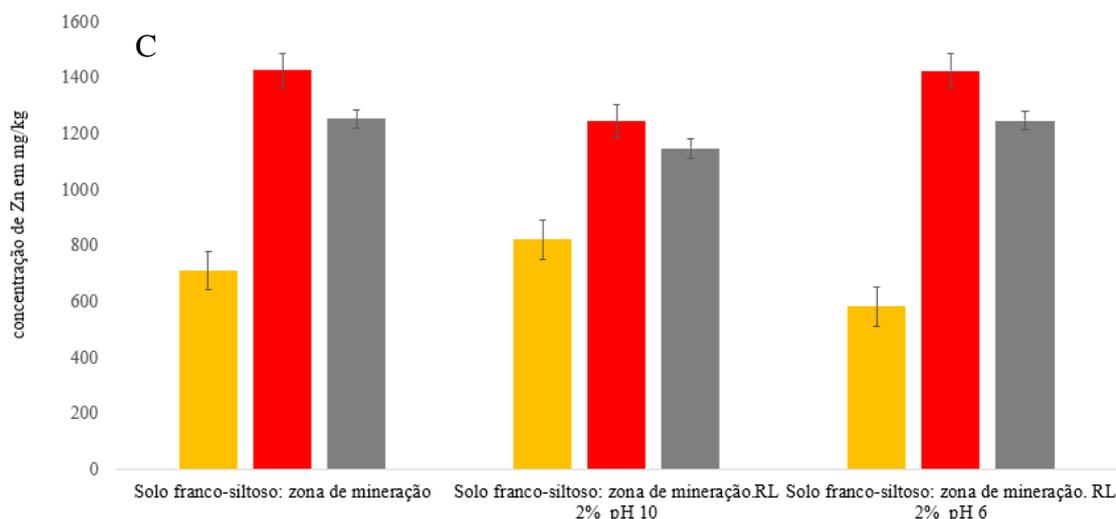


Figura 20 - Extração sequencial de (A) arsênio, cádmio (B) e zinco (C) de amostras de solo franco-siltoso de uma zona de mineração antes e após um experimento de lavagem de solo. RL: Solo remediado por ramnolipídios. Médias e desvios padrões são resultados de experimentos em triplicata.

## 5.6. Ensaio de toxicidade aguda

De acordo com a instrução diretiva da União Europeia n.º 67/548/CEE (Comunidade Econômica Europeia (CEE), 1967), um tensoativo é classificado como altamente tóxico quando apresenta uma CL50 inferior a 1 mg/L. O tensoativo é considerado tóxico quando apresentar uma CL50 entre 1 e 10 mg/L e nocivo entre 10 e 100 mg/L. No presente estudo, testes de toxicidade aguda demonstraram que o extrato de ramnolipídios apresentou uma CL50 de 219 mg/L e, portanto, foi considerado seguro na faixa de concentrações de 0,01-0,2 g/L (Tabela 5).

**Tabela 6. Concentração letal de extrato de ramnolipídio na faixa de concentração de 0,01–0,2 g/L.**

Surfactante	CL50 (mg/L)	Intervalo de confiança (95%)	Classificação*
Extrato de RL	219	213–225	Seguro

\*: Classificação de acordo com a Instrução diretiva da UE N.º. 67/548/EE  
Os resultados estão expressos como a média de três experimentos separados.

### 5.7. Inibição do crescimento de bactérias típicas do solo

Os efeitos inibitórios do extrato de ramnolipídios em relação a microrganismos de solo foram testados com o método de difusão em placa pela técnica de poço (Tabela 6). Não foi observada a inibição de crescimento de duas representantes de bactérias Gram-positivas, *E. faecalis* e *B. subtilis*, e nem das bactérias Gram-negativas, *S. enterica* e *P. aeruginosa*, quando foi utilizada a concentração de 2% do extrato de RL (0,2 g/L) (Figura 21). A atividade fungicida do extrato de ramnolipídios foi testada contra *C. albicans* a uma concentração de 2%. O crescimento do microrganismo não foi inibido pela presença do ramnolipídio.

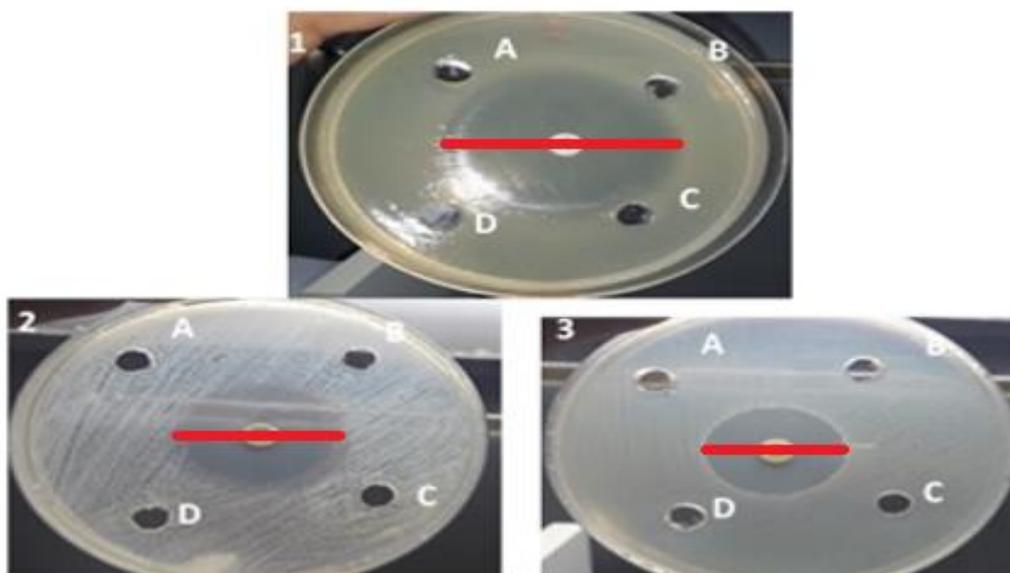


Figura 21 - Teste de difusão em placa pela técnica de poço; Linha vermelha: controle positivo de inibição de crescimento por difusão de disco antimicrobiano; (1) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis* ATCC®13076™; (2) *Enterococcus faecalis* ATCC®29212™; (3) *P. aeruginosa* ATCC®27853™; Poços (A) e (D): ramnolipídio 1201 (2%); Poços (B) e (C) água deionizada estéril.

**Tabela 6: Ensaio de inibição de crescimento do extrato de RL a uma concentração de 0,2 g/L (2%)**

Microrganismo testado	Substância testada /Halo de inibição	
	RL	antimicrobiano (Controle +)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ND	25 mm
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	ND	23 mm
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	ND	25 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ND	20 mm
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ND	10 mm

ND: Não foi detectado halo de inibição; RL: Ramnolipídio; (+): Controle positivo para inibição microbiana

### 5.8. Precipitação química de arsênio, cádmio e zinco do extrato de RL

No presente estudo, um método de precipitação de As foi adaptado de estudos anteriores (da Silva *et al.*, 2018), para a precipitação de As, Cd e Zn do extrato de biossurfactante após a aplicação em experiências de remediação de solo. Inicialmente, as concentrações iniciais de As, Cd e Zn foram determinadas a partir de um extrato de RL após sua utilização em um processo de remediação do solo. Os valores obtidos foram 109, 7 e 308 mg/L de As, Cd e Zn, respectivamente. A seguir, o biossurfactante foi ajustado para o pH 3,8 mantendo As, Cd e Zn sob estado ionizado e, ao mesmo tempo, mantendo as moléculas de RL no extrato bruto em um estado protonado. Após a acidificação do meio, foi adicionado MgCl<sub>2</sub> ao extrato (proporção As/Mg 1:400), formando uma suspensão de coloração branca e de aspecto turvo. Após centrifugação, o precipitado branco foi descartado. O sobrenadante foi alcalinizado com NH<sub>4</sub>OH (28% v/v) a pH 10,5, resultando em um precipitado branco amarelado (Figura 22). Após a

centrifugação da suspensão e a análise dos contaminantes metálicos no extrato de RL, não foi detectado concentrações significativas de As (0,58 mg/kg) e Cd (0,02 mg/kg), e apenas 100 mg/L de Zn (30%) no extrato bruto (Figura 23).

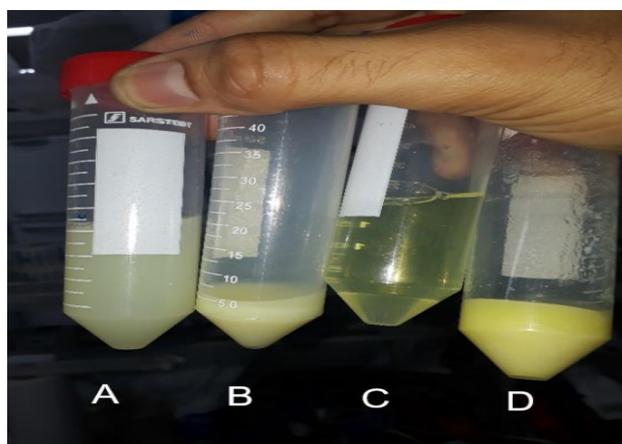


Figura 22 - Precipitação química de As, Cd e Zn no extrato de RL. (a) Extrato de RL após a adição de  $MgCl_2$ ; (b) Precipitado branco após a primeira centrifugação; (c) Extrato de RL após ajuste de pH para 10,5 e novamente centrifugado; (d) Precipitado amarelado. Fonte: Próprio autor.

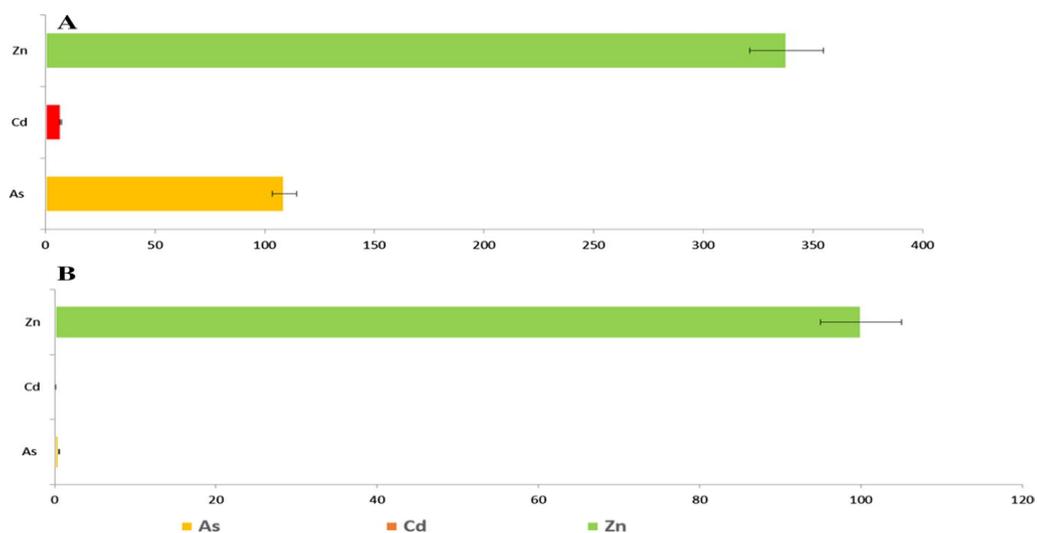


Figura 23 - Concentração em mg/L de As, Cd e Zn no extrato de RL. (A) Contaminantes metálicos antes do ensaio de precipitação; (B) Contaminantes metálicos após o ensaio de precipitação. Resultados são expressos utilizando-se a média de três experimentos.

### **5.9. Estabilidade e diâmetro médio de bolha de microespumas de ramnolipídios**

As microespumas são influenciadas por diversos parâmetros como: a concentração de biossurfactante, velocidade de rotação, tempo de preparo e pH. Contudo até o momento poucos estudos procuraram estudar a influência destes parâmetros sobre a estabilidade e ao diâmetro médio de bolha de microespumas. Para uma melhor avaliação desses parâmetros, foram realizados dois desenhos rotacionais compostos considerando duas concentrações distintas de RL 1201 (1 e 0,5%) e alguns parâmetros que poderiam influenciar diretamente na estabilidade e no diâmetro médio de bolha de microespumas de ramnolipídios. Em relação aos ensaios de estabilidade das dispersões de microespuma quando na concentração de 1%, foi observado um aumento no tempo de meia via das microespumas (800 s aproximadamente) concomitante ao aumento do binômio rotação por minuto e o tempo de preparo (Figura 24). Esta tendência também foi evidenciada nos ensaios de microespumas de RL a uma concentração de 0,5% (Figura 25).

As microespumas de RL a uma concentração de 0,5% atingiram um tempo de meia-vida máximo de 600 s quando uma rotação de 10.786-12.000 rpm foi aplicada ao extrato de RL durante um período de 102-120 s. A estabilidade das microespumas na concentração de 1% foi em torno de 500 s quando sob uma baixa rotação de 6.000 rpm durante 102-120 s (Figura 25). Estes dados evidenciam uma tendência de maiores valores de estabilidade, quando o binômio rotação por minuto e tempo de preparação são aplicados na geração de microespumas, e que a concentração também exerce uma influência na estabilidade das microespumas de RL.

Adicionalmente, em ambas as concentrações de microespumas usadas, quando aplicadas as rotações de 6.000 e 8.500 rpm durante um tempo de preparo de 30-120 s, foi observado um tempo médio de meia-vida das microespumas de RL de 400 s (Figuras 24 e 25). Quanto à influência do pH (5,8-9), não foi observada qualquer influência positiva ou negativa na estabilidade das microespumas de ramnolipídios em ambas as concentrações (1 ou 0,5%) (Figuras 26 e 27).

O diâmetro médio da bolha foi influenciado pela velocidade de rotação e tempo de preparo. As microespumas de ramnolipídios a uma concentração de 1% apresentaram diâmetros médios de microbolhas entre 70-130  $\mu\text{m}$ . As dispersões de microespumas a uma concentração de 0,5% apresentaram diâmetros médios de microbolhas que

variaram entre 60-220  $\mu\text{m}$  (Figuras 28 e 29). Em relação às microespumas de ramnolipídios a uma concentração de 0,5%, foi observado também que um aumento gradual da energia cinética rotacional entre os tempos de preparo de 102 e 120 s levou a um aumento significativo do diâmetro médio de bolha, resultando em microespumas cada vez maiores, com um diâmetro médio de 220  $\mu\text{m}$ . Contudo, entre 10.786 e 12.000 rpm, o diâmetro médio de bolha das microespumas de ramnolipídios diminuiu para 120  $\mu\text{m}$ , demonstrando um limite para a aplicação da velocidade de rotação no diâmetro médio das microespumas de ramnolipídios.

Em ambas as concentrações das microespumas de ramnolipídios (0,5 e 1%) foi demonstrado que, entre 75-120 segundos e entre as faixas de rotação de 10.786 e 12.000 rpm, as microbolhas apresentaram um diâmetro médio entre 70 e 120  $\mu\text{m}$ . É possível observar que estes são os mesmos parâmetros observados para os melhores valores de estabilidade das microespumas em suas respectivas concentrações (0,5%: 600s; 1%: 800s).

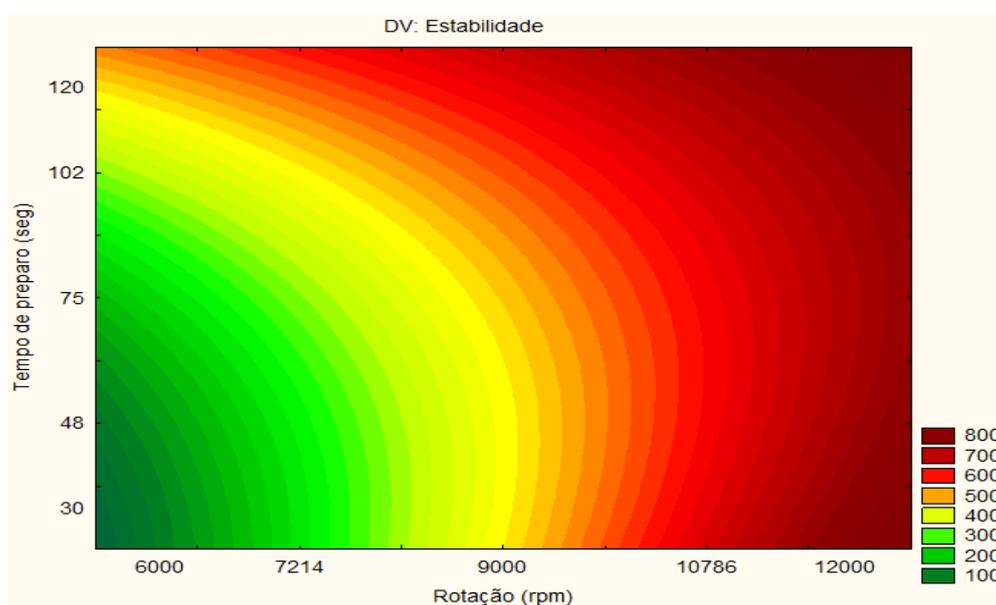


Figura 24 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 1%. Rotação por minuto versus tempo de preparo.

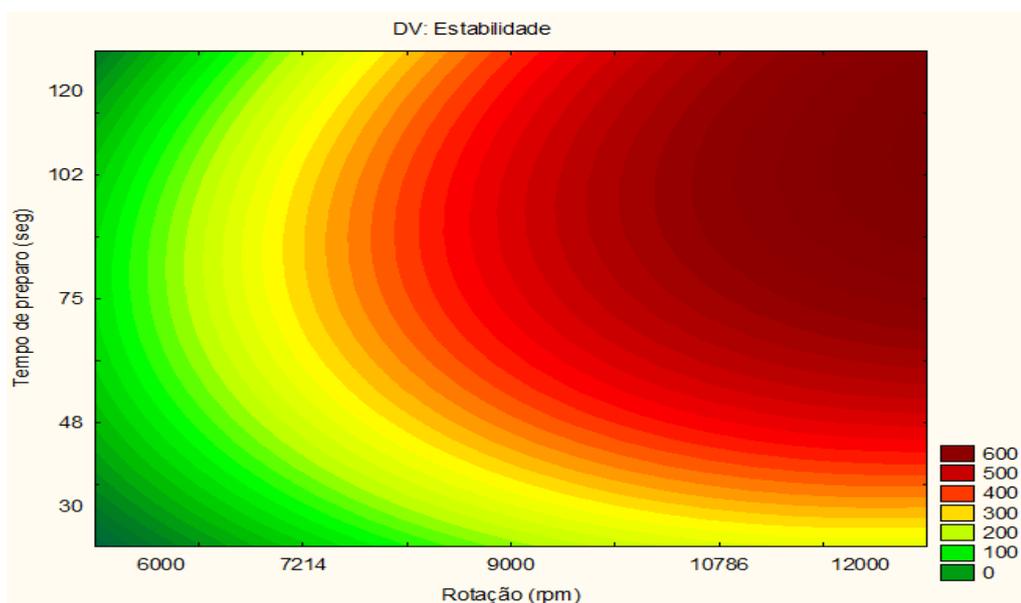


Figura 25 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 0,5%. Rotação por minuto versus tempo de preparo.

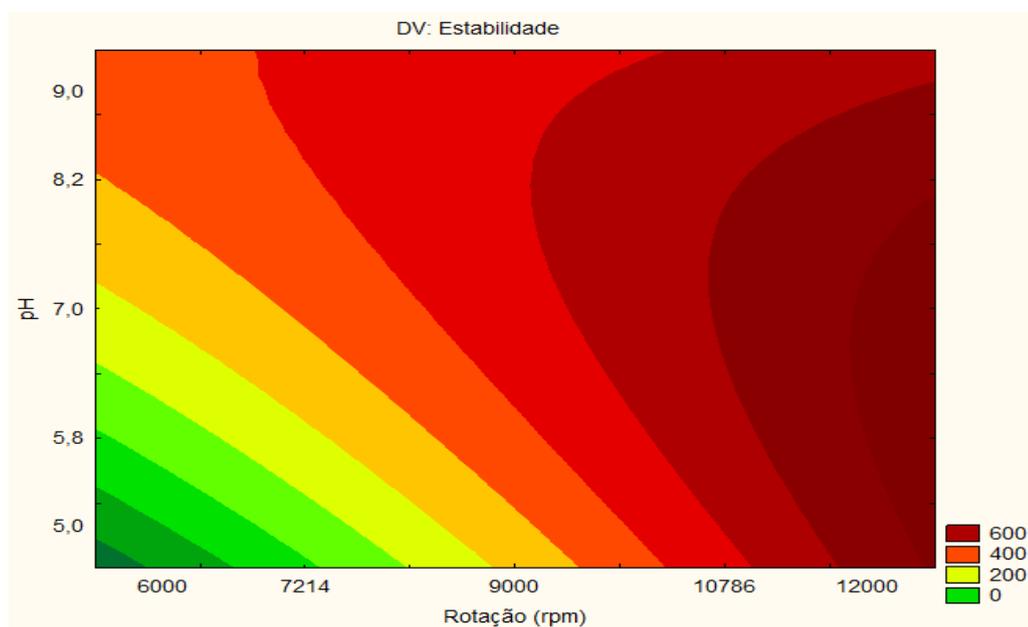


Figura 26 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 1%: Rotação por minuto versus pH.

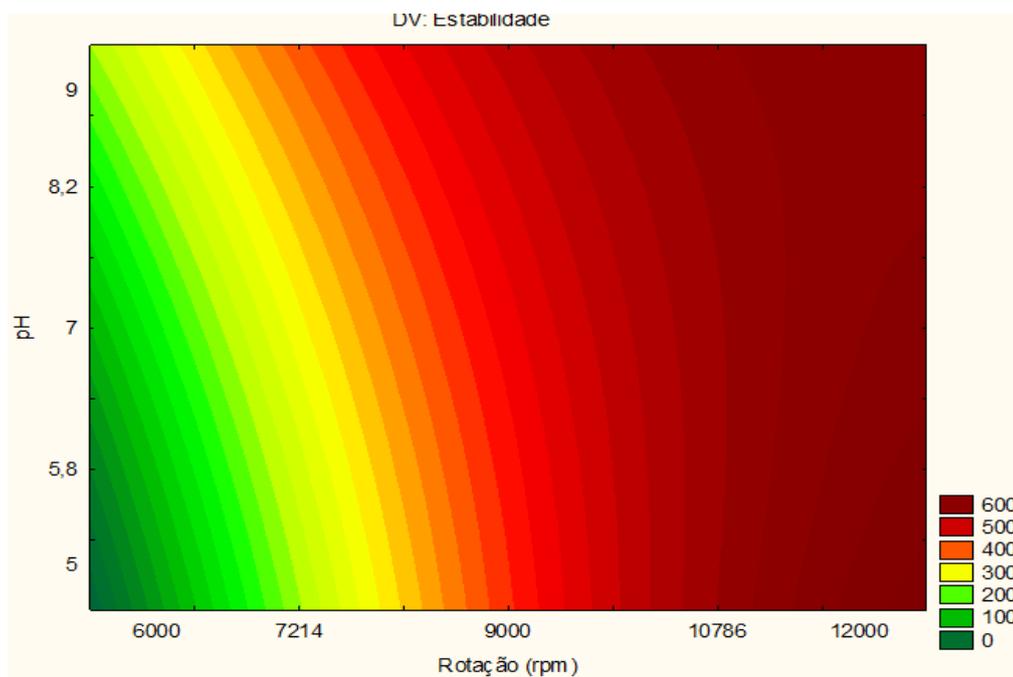


Figura 27 - Superfície de resposta para estabilidade de microespuma a uma concentração de 0,5%: Rotação por minuto versus pH.

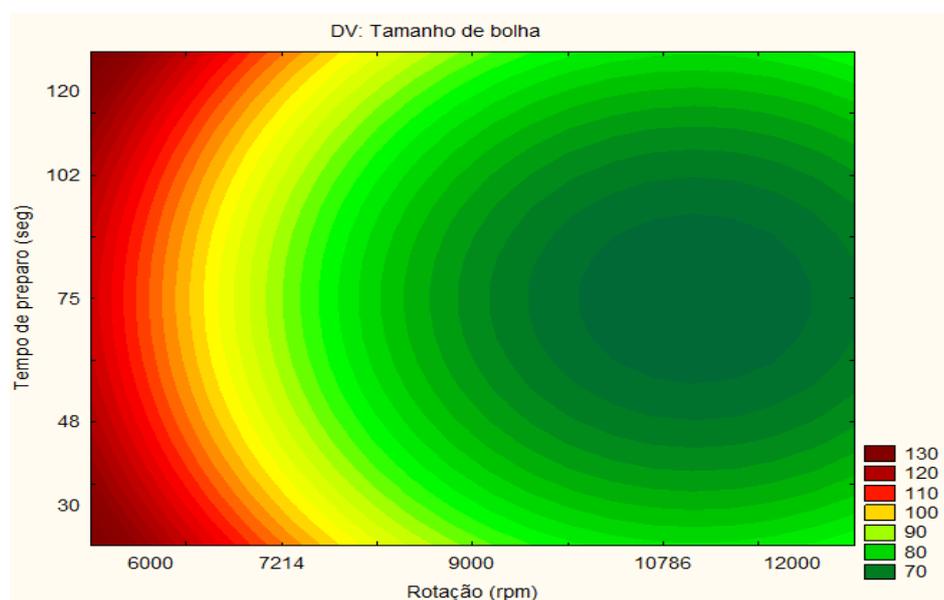


Figura 28 - Superfície de resposta para diâmetro de bolha de microespuma a uma concentração de 1%: Rotação por minuto versus tempo de preparo.

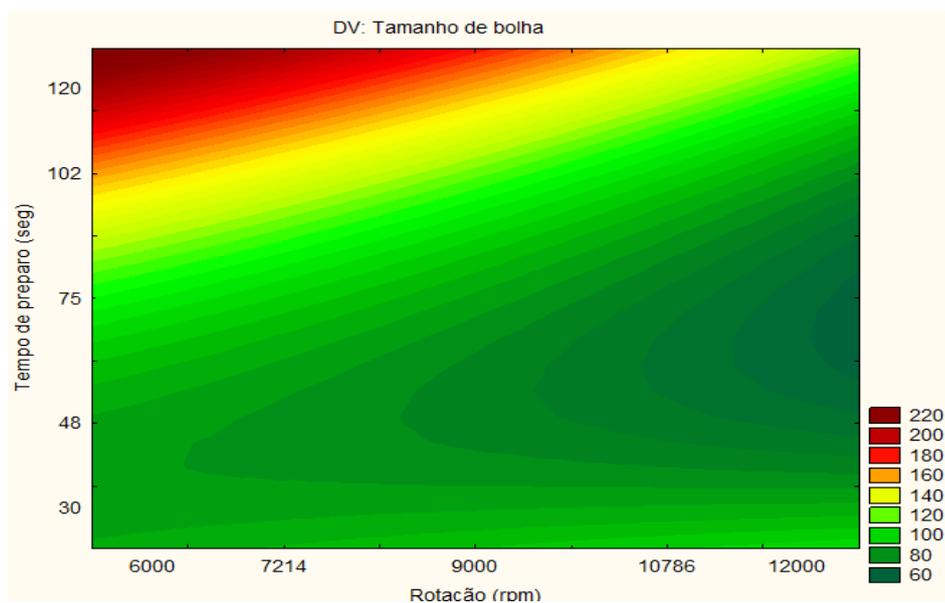


Figura 29 - Superfície de resposta para diâmetro de bolha de microespuma a uma concentração de 0,5%: Rotação por minuto versus tempo de preparo.

### 5.10. Ensaios para determinação da vazão de trabalho

Foram realizados vários ensaios de percolação de microespumas de ramnolipídios, assim como de extrato líquido de RL, para avaliar a vazão de trabalho ideal para a realização de ensaios de remediação em coluna. Após a seleção das melhores condições para a estabilidade das microespumas de RL e o diâmetro médio da bolha (tempo de preparo 120 s; 12.000 rpm; pH 9), foi realizada uma série de experimentos de percolação utilizando uma coluna de remediação preenchida com solo arenoso. Entre as vazões de 30 e 130 mL/min foi sempre observada uma queda de pressão significativa entre o extrato líquido de RL e as microespumas (Figura 30). Porém, isto não foi observado quando aplicado uma vazão entre 10-12 mL/min e, portanto, esta foi a vazão de trabalho escolhida para os experimentos de remediação em coluna. Os experimentos de percolação de extrato de RL aplicando uma vazão de 20-30 mL/min resultaram em um aumento significativo de pressão interna na coluna de remediação, e a formação de canais preferenciais visíveis e pontos de obstrução dentro da coluna de remediação, o que prejudicava os experimentos de remediação em coluna.

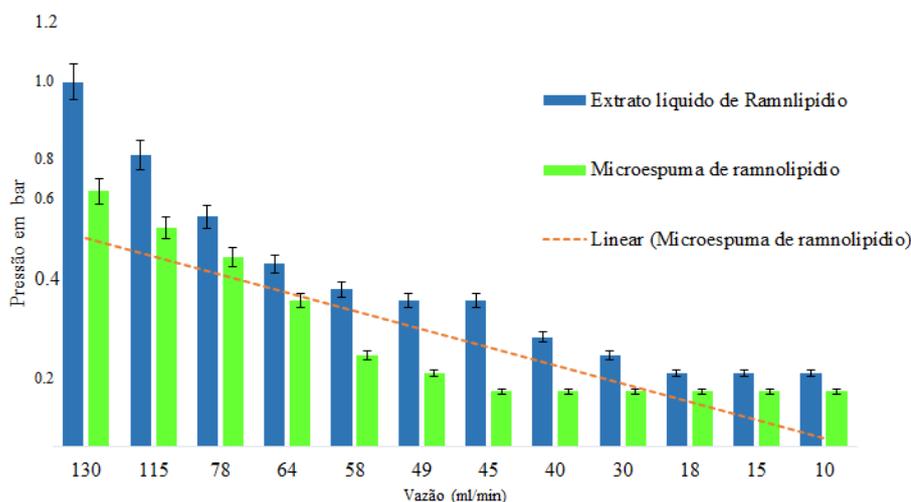


Figura 30 - Queda de pressão em função da percolação de diferentes vazões do extrato líquido de RL e microespuma de RL.

### 5.11. Eficiência de remediação das microespumas de RL

Uma amostra de solo arenoso foi artificialmente contaminada para simular uma contaminação recente e percolada por chuva artificial para simular as condições do campo. As concentrações finais de arsênio, cádmio e zinco foram de: 160, 39 e 511 mg/kg, respectivamente. Após a percolação por 4 e 10  $V_p$  de microespuma de RL, não houve uma remediação significativa para As (Figura 30). A percolação do solo arenoso contaminado por 4  $V_p$  de extrato líquido de RL também não resultou em uma remediação satisfatória de As; porém, quando 10  $V_p$  do extrato foram percolados, houve uma remediação de 37% de As (Figura 31). Em relação à taxa de remediação de Cd, não houve uma remediação significativa quando o solo contaminado foi percolado por 4  $V_p$  de microespuma de RL. Entretanto, quando o solo arenoso contaminado foi percolado por 10  $V_p$  de microespuma de RL houve uma taxa de remediação de 38% (Figura 31). A taxa de remoção de Zn foi de 42 e 53%, para 4 e 10  $V_p$  respectivamente (Figura 32).

Após a percolação (4 e 10  $V_p$ ), o extrato de RL apresentou uma taxa de remediação de Cd de 39 e 46% e de Zn de 62 e 67%, respectivamente (Figura 31). Após a percolação de 10  $V_p$  através da coluna de remediação, os resultados demonstraram uma correlação positiva entre o aumento do número de  $V_p$  percolado do extrato líquido e a quantidade de cádmio e zinco que foi removida dos solos contaminados. Esta

tendência não foi evidenciada em relação ao contaminante arsênio (Figuras 31 e 32). Ao longo dos experimentos, o tempo médio para percolar 4 volumes de poros de microespuma de ramnolipídios ou extrato de ramnolipídios foi de 3 a 4 horas, e o tempo de percolação de 10 volumes de poros levaram em média de 6-8 horas.

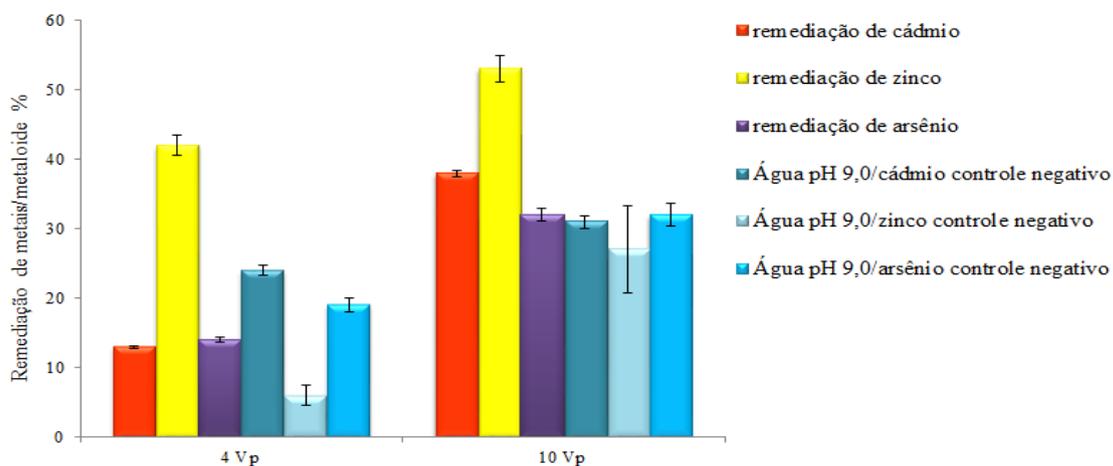


Figura 31 - Valores percentuais de remediação de metais/metalóide por microespumas de RL. Concentração 0,5% e pH 9; V<sub>p</sub>: Volume de poro.

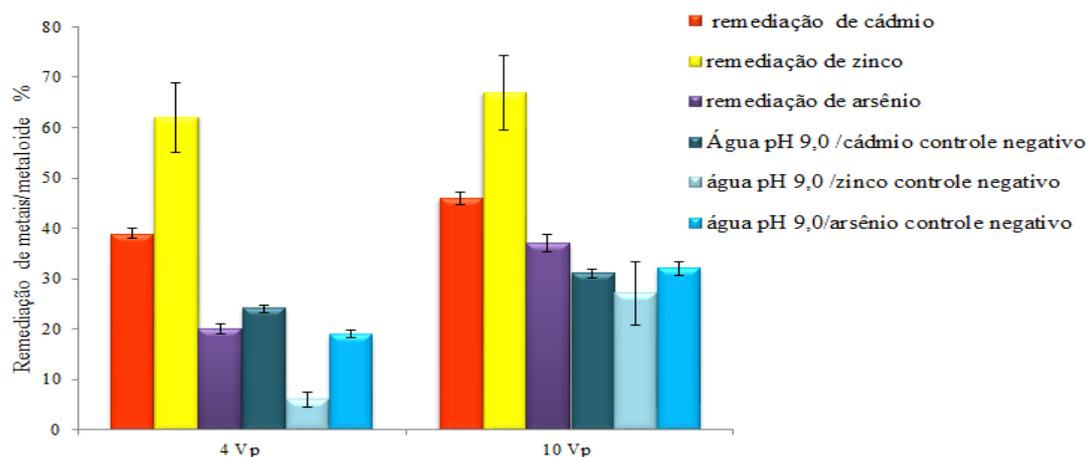


Figura 32- Valores percentuais de remediação de metais/metalóide por extrato de ramnolipídios. Concentração 0,5% e pH 9; V<sub>p</sub>: Volume de poro.

## 6. Discussão

### 6.1. Quantificação e caracterização de RL no extrato bruto e eficiência de remediação

De acordo com Abdel-Mawgoud, Lepine, Déziel (2010), já foram relatados mais de 60 congêneres diferentes de RL além do precursor típico deste biotensioativo, o 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) ácido alcanóico (HAAs) Técnicas de espectrometria de massa (EM) são frequentemente empregadas para a determinação da estrutura química dos ramnolipídios.

Nas últimas décadas, diversos grupos de pesquisa dedicaram o seu trabalho à identificação de genes relacionados à produção de ramnolipídios (ZHAO *et al.*, 2021), enquanto outros pesquisadores aos fatores metabólicos relacionados à superexpressão de genes relacionados à produção de RL (ROCHA *et al.*, 2021). De acordo com Costa *et al.* (2009), a produção de RL pode variar de acordo com a cepa bacteriana utilizada e a fonte de carbono usada para o seu crescimento. Conforme demonstrado no presente estudo, a cepa bacteriana geneticamente modificada *P. aeruginosa* 1201 apresentou uma produção total de ramnolipídios de 5,9 g/L utilizando glicerol como fonte de carbono. Um dos fatores-chave para o estabelecimento de processos industriais envolvendo a produção de ramnolipídios é a utilização de matérias-primas de baixo custo, como o glicerol, um coproduto da produção de biodiesel (AGUIEIRAS *et al.*, 2021).

Recentemente, Baskaran *et al.* (2021) relataram uma produção máxima de 2,73 g/L de RL quando a cepa de *P. aeruginosa* RS6 foi cultivada em um meio mínimo suplementado com 1% de glicerol residual e 0,2 mol/ L de nitrato de sódio a 35°C e pH 6,5. De fato, é possível mencionar fatores relacionados à composição de nutrientes presentes nos meios de cultura específicos para a produção de biosurfactantes. O tipo de fonte de carbono tem um papel importante tanto na cinética quanto na conversão do produto desejado, como na proporção de RL produzidos (mono ou di-ramnolipídio) (SANTOS *et al.*, 2002). Poucos estudos, no entanto, investigaram as propriedades de remediação de solos utilizando extratos de RL previamente caracterizados quanto à quantidade relativa de congêneres. Contudo, já existem relatos sobre a aplicação de ramnolipídios caracterizados quanto à proporção de mono e di-ramnolipídio e sua

aplicação na remediação de contaminantes orgânicos (ROCHA *et al.*, 2020; ZHEN *et al.*, 2021).

Até hoje, não existe um consenso a respeito da eficiência de remediação dos extratos de RL apresentando diferentes congêneres. Em relação à remediação de contaminantes metálicos e metaloídico, existe uma quantidade ainda menor de dados a respeito da caracterização dos congêneres de RL e a influência na extração destes poluentes inorgânicos do solo. Wu *et al.* (2017) relataram a produção de um extrato de RL, com uma concentração de 18,7 g/L por fermentação em estado sólido. O extrato apresentava uma abundância relativa de di-ramnolipídios de 43% e atividade extratora de metais.

No presente estudo, o extrato de RL - apresentando 85% de di-ramnolipídio e 15% de mono-ramnolipídio - também apresentou propriedades extradoras para As, Cd e Zn. Trabalhos mais antigos reportam a remoção de arsênio de resíduos de minérios de ferro (WANG & MULLIGAN, 2009), onde foi utilizado um extrato purificado de RL a uma concentração de 1% e uma composição de congêneres de 90% de mono-ramnolipídio e 10% de di-ramnolipídio, produzido pela cepa JBR425 de *P. aeruginosa* (JENEIL Biosurfactant Co<sup>®</sup>).

Mais recentemente, Yang *et al.* (2020) demonstraram a extração de chumbo e cádmio de minerais de argila e minerais de hidróxidos de ferro utilizando um extrato de RL. Entretanto, os autores não observaram a remoção de arsênio ou cromo dos respectivos minerais estudados, e nem relataram a composição de congêneres do RL utilizado. Embora exista a possibilidade da composição de ramnolipídios nos extratos influenciar a remediação de metaloides, como o arsênio, é necessário que mais trabalhos apresentem a caracterização dos extratos de ramnolipídios empregados nos respectivos estudos de remediação, especialmente em relação à quantidade relativa dos congêneres de ramnolipídios.

## 6.2. Efeito da concentração e do pH do extratos de RL na remediação de metais/metaloídico

De acordo com Chen *et al.* (2017), o aumento da concentração de um extrato de RL de 0,5 para 3% resultou no aumento da extração de contaminantes metálicos de sedimentos de rios. No presente estudo, o extrato de RL também apresentou uma remoção progressiva de arsênio e zinco do solo contaminado com o aumento da concentração de ramnolipídios.

Outro fator importante a se destacar é a estrutura micelar do biossurfactante, quando em concentrações acima da sua CMC. De acordo com Aşçi *et al.* (2008), quando em concentrações superiores à concentração micelar crítica (CMC), as micelas de RL desempenham um papel importante na mobilização de metais/metaloídico, devido ao seu pequeno tamanho (cerca de 5 nm) e à conformação típica de um agregado micelar com porções hidrofílicas orientadas para o meio líquido, resultando em uma maior interação com metais presentes na estrutura microporosa do solo.

O pH do meio e a presença de eletrólitos também exercem influência sobre o caráter hidrofílico dos biossurfactantes. Wang e Mulligan (2009) demonstraram a remoção de zinco e arsênio simultaneamente de matrizes sólidas, quando foram feitas lavagens sucessivas empregando RL sob condições alcalinas. Nestas condições alcalinas, o grupamento carboxila da molécula de ramnolipídios torna-se ionizada (RCOO<sup>-</sup>), o que aumenta a solubilidade da molécula em meio aquoso e ao mesmo tempo proporciona mais sítios de ligação para a interação química com cátions metálicos (WANG & MULLIGAN, 2004). Contudo existem trabalhos mais recentes demonstrando que extratos de RL ajustados a uma faixa de pH entre 6 e 7 apresentam uma eficiência de remediação satisfatória (CHEN *et al.*, 2021). Adicionalmente, Ishigami *et al.* (1993) apresentaram em seu trabalho que uma solução de RL em pH 6 permanecia em seu estado aniônico entre os pH 7,8 e 5,6 e, portanto, o ajuste do pH do biossurfactante para 6 pode ter contribuído para aumentar a mobilidade dos contaminantes metálicos, e ao mesmo tempo mantendo as propriedades tensoativas do biossurfactante e as propriedades de ligação a contaminantes metálicos.

Em relação à interação dos RL com metais, um estudo realizado por Ochoa-Loza, Artiola e Maier (2001) demonstrou uma constante de estabilidade condicional

(log K) de moléculas de mono-ramnolipídios para uma série de metais de transição e alcalinos utilizando uma técnica de resina de troca-iônica. Os autores relataram que é possível estabelecer uma constante de afinidade a qual obedece a seguinte ordem decrescente:  $Al^{3+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Fe^{3+} > Hg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > K^+$ . Com base nestas constantes, os ramnolipídios têm maior afinidade aos metais de transição do que com os metais alcalinos, o que também é desejável para processos de remediação que envolvam este biossurfactante.

### **6.3. Influência dos fatores físico-químicos dos solos na adsorção de As, Cd e Zn nas frações geoquímicas do solo**

Diversos fatores físico-químicos influenciam o grau de mobilidade de contaminantes metálicos nas frações geoquímicas do solo e desse modo determinar a eficiência de remediação de solos contaminados por metais e metaloides. Conforme o passar do tempo tais fatores podem gerar condições para que os contaminantes metálicos estabelecem ligações química mais estáveis entre substâncias inorgânicas e orgânicas presentes no solo. Outra possibilidade seria a alteração da mobilidade destes contaminantes metálicos e metaloídico entre as frações geoquímicas do solo (CAMPOS, 2010). Em relação ao processo de adsorção de metais/metaloídico a solos e sedimentos, é importante mencionar o tempo de exposição que cada matriz sólida é exposta ao contaminante. Hubbard (2002) observou que, conforme o depósito de metais em processos contínuos e acumulativos ocorre no solo, são formadas ligações mais estáveis e o contaminante pode atingir frações geológicas mais profundas, que com o passar do tempo podem tornar irreversível a remoção deste contaminante do solo. No presente estudo, o solo arenoso foi exposto a soluções de sais metálicos/metaloídico durante um curto período (3 meses), enquanto o solo proveniente de uma zona de mineração foi contaminado por uma quantidade significativamente maior de resíduos metálicos, durante um longo período.

Também é possível mencionar as diferenças na composição dos dois solos utilizados neste estudo: o solo arenoso apresenta uma menor capacidade de adsorção dos elementos químicos selecionados no nosso trabalho, favorecendo assim a formação de compostos mais solúveis. De acordo com Crawford *et al.* (1993), solos apresentando

diâmetros de partículas maiores apresentam uma menor tendência de reter contaminantes metálicos quando comparados com solos apresentando diâmetro de partícula menor, devido à grande diferença de superfície de reatividade química.

Podemos citar, como por exemplo, as amostras de solo arenoso aqui utilizadas apresentando 0,25 mm de diâmetro de partícula e o solo proveniente de área de mineração com 0,027 mm de diâmetro de partícula, sendo que o solo proveniente de zonas de mineração teria um maior poder de adsorção de contaminantes metálicos e metaloídico. Rassaei, Hoodaji e Ali abtahi (2020) também demonstraram que o elemento químico Cd foi considerado mais lábil quando em contato com solos arenosos, em comparação a solos argilosos. Baseado nos resultados do presente estudo é possível observar que houve diferenças na retenção de metais em função do gradiente textural de solos.

O pH do solo também pode influenciar significativamente a mobilidade de metais entre as fases geoquímicas do solo. Sun *et al.* (2007) analisaram a influência do aumento do pH do solo na especiação de cádmio e do chumbo em amostras de solo provenientes de áreas agrícolas quando submetidas a condições de saturação por água. As amostras de solo contaminadas artificialmente e amostras de solo proveniente de áreas agrícolas possuíam pH de 6,5 e 6,7, respectivamente. Os autores relataram que, após 5 dias de ensaios e realização de extração sequencial, o teor de cádmio estava concentrado principalmente na fração (1), (36,6–63,6%). Também foi quantificado cádmio na fração (2) (17,6–29,9%), com apenas uma pequena porcentagem de cádmio sendo mensurado na fração (3) (0,8–2,4%). Ao final dos 60 dias de saturação, houve um aumento do pH de ambos os solos o que resultou em uma redução de cádmio e chumbo na fração (1) e, conseqüentemente, um aumento no teor de cádmio e chumbo nas frações (2) e (3), os quais são frações geoquímicas apresentando ligações químicas mais estáveis e conseqüentemente menos biodisponíveis ao meio ambiente.

Elbana *et al.* (2018) realizaram um estudo sobre a adsorção de cádmio e zinco utilizando amostras de solos apresentando pHs ácidos (4-5,5) e alcalinos (7,8-8,1) e teores variados de silt (4-77%) e argila (4,9-49%). Aplicando a isoterma de adsorção de Freundlich como modelo para descrever o perfil de retenção destes metais em solos apresentando características físico-químicas distintas, foi possível observar uma menor retenção de zinco em solos ácidos e apresentando um alto teor de areia, ao passo que solos apresentando pHs ligeiramente alcalino (pH~7) ou alcalino (>7,5) e maior concentração de silt e argila apresentaram uma retenção maior destes metais,

evidenciando a influência não somente do pH como também a interação entre uma maior superfície de contato e carga elétrica em função do diâmetro de partícula presente nos tipos de solos distintos.

Ren *et al.* (2017) estudaram as diferenças na especiação e mobilidade de zinco em nove amostras de solo contendo baixas e altas concentrações do elemento químico metálico. De acordo com os autores, em amostras altamente contaminadas apresentando pH ácido (pH 5,6 e 5,4), foram detectadas concentrações mais elevadas de zinco na fração (1) (6-39%) e fração (2) (7-30%), enquanto a especiação de zinco entre amostras de solo com pH neutro e alcalino revelou quantidades mais elevadas deste metal na fração (3), indicando uma maior retenção de zinco e, conseqüentemente, sua maior imobilização.

Por fim, Rassaei, Hoodaji e Ali abtahi (2020) demonstraram que amostras de solos arenoso e argiloso, com pH inicial de 7,9 e 7,3 respectivamente, e contendo concentrações elevadas de cádmio, tiveram uma diminuição na concentração de cádmio na fração (1) e um aumento nas frações (2) e (3) após um período de 15 a 28 semanas quando mantidos em beakers saturados por água deionizada e vedados. Esses resultados evidenciam como fatores externos (como a submersão em meio aquoso) são capazes de alterar a mobilidade de cádmio nas frações geoquímicas do solo.

#### **6.4. Extração sequencial das amostras de solo após a remediação por extrato de RL**

No presente estudo, foi observado que amostras de solo arenoso apresentando altas concentrações de As, Cd e Zn nas frações geoquímicas mais lábeis do solo (fração 1 e 2), quando submetidas a processos de remediação com o extrato de ramnolipídios em uma faixa de pH entre 8 e 10, apresentaram uma remediação eficiente de metais/metaloídico. O caráter aniônico da molécula nesta faixa de pH foi determinante para a extração destes contaminantes metálicos/metaloídico das amostras de solo arenoso. A extração de contaminantes metálicos por ramnolipídios nesta faixa de pH é uma propriedade já descrita em trabalhos anteriores (WANG & MULLIGAN, 2009; WU *et al.*, 2017).

Além disso, existem amostras de solo cujas características físico-químicas podem limitar a eficiência de uma extração de metais. As amostras de solo provenientes de uma antiga zona de mineração, utilizadas neste estudo, apresentam alguns fatores que podem limitar sua remediação eficiente. Este solo, além de estar exposto por um longo período a contaminantes metálicos e metaloídico, apresenta um pH alcalino ( $\text{pH} > 7,8$ ) e uma granulometria favorável à retenção de metais (como uma grande concentração de silte - 55%).

Considerando o papel do pH do solo na cinética de adsorção de metais e o pH inicial da amostra de solo proveniente de zona de mineração, o pH do extrato de RL foi ajustado para 6. Com isso, foi observado um aumento da mobilidade de cádmio e zinco nas frações (1) e (2) das amostras de solo e melhorando, assim, a remoção de ambos os contaminantes metálicos pelo biossurfactante. Por outro lado, a extração de arsênio não foi alterada significativamente quando o pH do extrato de RL foi modificado para 6.

As propriedades tensoativas da molécula de RL em uma ampla faixa de pH ( $\text{pH} > 6$ ) já haviam sido descritas previamente na literatura (SÁNCHEZ *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2013), o que possibilitou a aplicação do extrato de RL em condições ligeiramente ácidas para melhorar a remediação de solos contaminados por metais.

Appel e Ma (2002) demonstraram que a adsorção de cádmio em solos tropicais aumenta 36% por 1 unidade de aumento do pH e, portanto, é altamente dependente do pH. Já Papadopoulos e Rowell (1989), utilizando solos alcalinos, demonstraram que é comum a adsorção do zinco a carbonatos presentes nestes tipos de solos ou a precipitação como hidróxidos de zinco (também relacionada com níveis elevados de pH do solo). Luna, Rufino e Sarubbo (2016) demonstraram que um extrato de biossurfactante com um pH inicial de 7 ajustado com ácido clorídrico (HCl 0,7%) poderia remover o zinco, chumbo e ferro da fração permutável de amostras de solo de uma antiga fábrica de baterias de automóveis.

Dados prévios da literatura relatam que o metal Cd apresenta uma maior mobilidade na faixa de pH entre 4,5 e 5,5, e acima de pH 7,5 a sua mobilidade é significativamente reduzida (MULLIGAN *et al.*, 2001), conforme observado nos ensaios de lavagem de amostras de solo provenientes de uma área de mineração utilizando o extrato de RL em pH 6. Martínez e Motto (2000) monitoraram a mobilidade do zinco em solos minerais e calcários durante 40 dias. Durante o experimento, o pH inicial das amostras de solo foi reduzido para pH 6,2, o que resultou no aumento significativo da mobilidade do elemento estudado.

Yang *et al.* (2020) demonstraram que o cádmio e o zinco podem ser dessorvidos de argilominerais do tipo montmorilonita quando em contato com extratos de ramnolipídios a partir de pH 6,5. Embora no presente estudo não tenha sido determinada a constituição mineralógica da amostra de solo proveniente de área de mineração, em um estudo realizado sobre amostras de solo provenientes da mesma zona de mineração, dos Santos (2015) relatou que estas amostras apresentavam um pH inicial de 7,8 e o argilomineral montmorilonita como constituição mineralógica predominante. Baseado nestes dois dados relatados pela autora é possível observar que no presente estudo a aplicação do extrato de RL, ajustado previamente para pH 6 antes dos ensaios de remediação em frascos, possibilitou um aumento na mobilização de contaminantes metálicos presentes na amostra de solo proveniente desta zona de mineração.

### **6.5. Ensaio de toxicidade aguda**

Atualmente existe uma demanda crescente por novas substâncias que possam ser aplicadas em métodos de lavagem do solo para remoção de resíduos metálicos, sem causar efeitos negativos ao meio ambiente (MAO *et al.*, 2015). Embora a molécula de RL seja considerada um tensoativo com alta biodegradabilidade, quando um extrato bruto é submetido a processos de remediação em concentrações que podem ser até 10 vezes superiores aos valores de CMC, é importante avaliar a sua toxicidade no ambiente. O mecanismo mais amplamente aceito para explicar os efeitos nocivos dos tensoativos em organismos aquáticos inferiores é a acumulação de substâncias hidrofóbicas na parede celular ou membranas plasmáticas destes seres vivos, provocando alterações nos respectivos envoltórios celulares, o aumento da permeabilidade iônica e, por fim, levando à alteração na função de membranas de organismos procariotos (VAN WEZEL & OPPERHUIZEN, 1995).

Em um estudo sobre toxicidade aguda de tensoativos sintéticos, Liwarska-Bizukojc *et al.* (2005) relataram que os tensoativos comerciais aniônicos foram considerados nocivos (CL50 entre 10 e 100 mg/L), enquanto os tensoativos não-iônicos foram considerados tóxicos (CL50 entre 1 e 10 mg/L) e altamente tóxicos (CL50 abaixo de 1 mg/L) para os organismos aquáticos *Physa acuta* Draparnaud, *Artemia salina* e *Raphidoceli ssubcapitata* (syn. *Selenastrum capricornum*). Cotou *et al.* (2001) testaram uma série de dispersantes de óleo contendo em suas formulações tensoativos aniônicos

e não-iônicos sintéticos e relataram que estes dispersantes foram considerados como nocivos (CL50 igual a 51 mg/L).

Biossurfactantes são considerados menos tóxicos do que os tensoativos químicos comerciais, o que é uma das principais razões para a sua maior aceitabilidade para aplicações ambientais. Contudo, poucos estudos avaliaram a toxicidade aguda dos biossurfactantes em concentrações elevadas quando aplicados em etapas de remediação do solo. Um biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 mostrou-se seguro para o ambiente, com uma (CL50) de 300 mg /L (intervalo de confiança de 95%) (SANTOS *et al.*, 2018). Do mesmo modo, Da Rocha Junior *et al.* (2019) relataram que um biossurfactante produzido por *Candida tropicalis* UCP 0996 não inibiu o crescimento do bioindicador ambiental *A. salina* quando entre as faixas de concentração de 0,25 a 0,5%.

#### **6.6. Ensaio de inibição de crescimento de bactérias típicos do solo**

O método de difusão em placa pela técnica de poço é considerado um método simples e direto, tendo sido utilizado extensivamente para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ou microbianos (VALGAS *et al.*, 2007). Baseado nos resultados aqui apresentados, não foi possível observar inibição das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, sugerindo que o RL não interfere na multiplicação destas bactérias típicas de solos.

De acordo com Johann *et al.* (2016), bactérias Gram-negativas da espécie *S. typhimurium* TA 98 conseguiam multiplicar-se e formar colônias em placas contendo ágar quando na presença de mono-ramnolipídios em concentrações de 8,5, 0,85, 0,085 g/L, evidenciando a baixa capacidade de inibição de microrganismos deste glicolipídio em ensaios *in vitro*. Apesar de muitos estudos terem investigado o padrão antibacteriano de mono-ramnolipídios, poucos estudos demonstraram a possível capacidade de inibição dos extratos de ramnolipídios com diferentes tipos de congêneres.

No nosso estudo foi também demonstrado que o extrato de RL não inibiu a cepa de *C. albicans* testada. Através de ensaios de inibição de crescimento fúngico realizados por Habba *et al.* (2003), foi relatado que não foi observada a formação de halos de inibição de crescimento quando o fungo *Aspergillus niger* foi cultivado em meio sólido por 72 horas na presença de um extrato de ramnolipídios a uma concentração de

0,025%. Contudo, de acordo com dados apresentados por Johann *et al.* (2016), foi observada a inibição de *C. albicans* ATCC 10231 quando concentrações crescentes (1,7-5,1%) do extrato de mono-ramnolipídios eram utilizadas nos testes de inibição.

### **6.7. Precipitação química de As, Cd e Zn**

Após a remoção de concentrações elevadas de elementos químicos de solos contaminados é desejável que estes contaminantes inorgânicos sejam removidos do biossurfactante, para promover uma destinação mais adequada ou, até mesmo, a reciclagem destes contaminantes. De acordo com Kaya (2016), tecnologias de reciclagem de elementos químicos inorgânicos devem assegurar que resíduos metálicos/metalóidico sejam processados de uma forma mais ecologicamente amigável, porém também levando em conta os custos operacionais em indústrias de mineração. A aplicação de métodos de precipitação química pode ser uma forma rápida e prática para remover contaminantes inorgânicos de biossurfactantes após processos de remediação.

De acordo com Park *et al.* (2010), a precipitação de arsênio (V) na presença de magnésio formando o arseniato de magnésio  $Mg_3(AsO_4)_2$  ocorre dentro de uma faixa de pH entre 7-10. Adicionalmente, os metais zinco e cádmio podem ser precipitados como  $Zn(OH)_2$  e  $Cd(OH)_2$  na presença do grupamento hidroxila entre uma faixa de pH de 9,5-10,5 (LENZI *et al.*, 2011). Em um estudo sobre a remediação de solos contaminados por metais, Luna *et al.* (2016) demonstraram a recuperação de um extrato de biossurfactante após a precipitação de zinco, chumbo e ferro utilizando hidróxido de sódio (NaOH). O pH ótimo de precipitação destes contaminantes metálicos foi 10,5.

### **6.8. Determinação da estabilidade e diâmetro médio de bolha das microespumas de ramnolipídios**

Diversos parâmetros podem influenciar a estabilidade e o diâmetro médio de bolha de microespumas, e afetar a sua aplicação no campo. Trabalhos anteriores centraram-se em observações baseadas em condições fixas de velocidade de rotação, tempo de preparo e pH. Contudo, a aplicação de um desenho rotacional composto torna-se útil para compreender como diferentes variáveis podem afetar simultaneamente

propriedades importantes das microespumas. Até o momento, existem poucas informações sobre o comportamento das microespumas de RL quando submetidas ao binômio: tempo de preparo e velocidade de agitação. Ambos os parâmetros são de especial interesse no sentido de reduzir o tempo e a energia cinética para gerar microespumas, apresentando uma estabilidade satisfatória no menor tempo possível.

De acordo com resultados referentes à estabilidade de microespumas de ramnolipídios demonstrados por Feng, Singhal e Swift (2009), quando uma microespuma de RL é gerada sob condições fixas de 8.000 rpm por 180s e uma concentração inicial de 0,4% é possível atingir um tempo de meia vida de 400-500 segundos. Estes valores de estabilidade estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Contudo, baseado nos resultados do presente estudo, é possível obter microespumas com um tempo de meia vida satisfatório mesmo com um tempo de preparo inferior a 180 segundos. Este fato demonstra a possibilidade de gerar microespumas apresentando tempos de meia vida consideráveis, mesmo quando são aplicados intervalos de tempos menores.

A molécula de RL apresenta fortes propriedades tensoativas, a qual possui um valor de CMC baixo, especialmente quando comparado a surfactantes sintéticos (SEKHON RANDHAWA & RAHMAN, 2014). Deste modo, é possível a geração de microespumas mais rapidamente e com maior tempo de estabilidade quando comparado aos surfactantes químicos, o que é desejável para processos de remediação.

De acordo com Matsuthita *et al.* (1992), o tempo de preparo não tem influência na meia-vida das dispersões de microespumas. Contudo, os autores relataram que, durante os ensaios de estabilidade utilizando o surfactante sintético brometo de cetrimônio (CTAB; C<sub>19</sub> H<sub>42</sub>BrN) a uma concentração de 0,4%, houve um aumento significativo na estabilidade das microespumas, quando a velocidade de agitação foi elevada de 5.000 para 5.500 rpm. Contudo, os autores não testaram velocidades de rotações acima de 5.500 rpm e maiores tempos de preparo. No presente estudo, a partir de uma avaliação em conjunto do binômio velocidade de agitação e tempo de preparo, foi possível observar mais claramente a contribuição de ambas as variáveis na estabilidade das microespumas de ramnolipídios, especialmente em velocidades de agitação mais elevadas e tempo de preparo entre 30-120 s.

Keshavarzi *et al.* (2019) demonstraram a influência da velocidade de agitação na estabilidade de microespumas geradas a partir de surfactantes sintéticos catiônicos e aniônicos. Foi demonstrado que velocidades de rotação entre 11.000 e 12.000 rpm

resultavam em maiores tempos de meia-vida das dispersões de microespumas, ao passo que quando submetido a uma agitação de 13.000 rpm houve uma redução significativa na estabilidade das suspensões de microespumas. Isto também foi evidenciado no presente estudo, onde valores acima das 12.000 rpm podem influenciar na estabilidade dos microespuma, especialmente em condições de agitação acima dos 102 segundos.

Em relação à influência do pH na estabilidade de microespumas de ramnolipídios, no presente estudo não foi observado qualquer influência positiva ou negativa na estabilidade da microespumas de ramnolipídios quando em pH alcalino. Isso foi observado em trabalhos anteriores ao nosso utilizando tensoativos aniônicos sintéticos (SAVE & PANGARKAR, 1994; JAUREGI, GILMOUR & VARLEY 1997). Já Feng, Singhal e Swift (2009), demonstraram que as microespumas de ramnolipídios poderiam apresentar uma redução no tempo de meia-vida quando submetidas a condições alcalinas.

Feng, Singhal e Swift (2009), discutiram a influência negativa do pH alcalino na estabilidade das microespumas de ramnolipídios com base no trabalho anterior de Champion *et al.* (1995), que relataram a dissociação completa da molécula de RL quando em pH 8. Isto levaria a uma repulsão eletrostática entre os grupamentos carboxílicos adjacentes da molécula, uma vez que estariam em um estado ionizado. Feng, Singhal e Swift (2009) então demonstraram que quando microespumas de ramnolipídios são geradas em condições alcalinas, a repulsão eletrostática entre moléculas de ramnolipídios promove uma redução significativa na concentração de biossurfactantes na superfície das microbolhas da dispersão. Desse modo, ocorre uma redução da viscosidade e da elasticidade na superfície da microbolha, facilitando a coalescência destas microbolhas e resultando em uma diminuição da estabilidade das dispersões de microespumas. No entanto, Feng, Singhal e Swift (2009); utilizaram NaOH para preparar as soluções alcalinas de RL, e gerar as microespumas sob condições alcalinas.

Já no presente estudo, o  $\text{NH}_4\text{OH}$  foi utilizado para submeter o extrato de ramnolipídios a estas mesmas condições acima mencionadas. Não foi observado quaisquer mudanças significativas na estabilidade das microespumas de RL. Portanto, é possível que a dissociação parcial de  $\text{NH}_4\text{OH}$  possa ter um efeito menos drástico na estabilidade de microespumas de RL, à medida que a região hidrofílica da molécula de RL possa não estar totalmente dissociada sob as condições alcalinas testadas. Desse modo, uma menor repulsão eletrostática acontece entre as porções hidrofílicas do

biossurfactante, não promovendo assim quaisquer modificações significativas na viscosidade ou elasticidade da superfície das microbolhas.

No presente estudo também foi demonstrado que, embora seja possível a produção de microbolhas com tamanhos variados de acordo com a modificação de parâmetros pré-estabelecidos, parece existir um diâmetro médio de bolha que será determinante para dispersões de microespumas apresentando maior estabilidade e conseqüentemente menos afetadas por fenômenos de coalescência (diâmetro médio de microbolha entre 120-60  $\mu\text{m}$ ). Estes resultados estão de acordo com estudos apresentados por Zhu, Zheng e Li (2020) em relação ao diâmetro médio de microbolhas quando em uma faixa de diâmetro de 100-50  $\mu\text{m}$ . Os autores também observaram a formação de dispersões de microespuma com maior estabilidade.

Em relação à influência do binômio tempo de preparo e rotação por minuto no diâmetro médio de bolha de microespumas, Keshavarzi *et al.* (2019) também relataram que soluções surfactantes quando submetidas a velocidades de rotação acima de 8.000 rpm e tempos de preparo maiores (120 s) poderiam afetar o diâmetro médio da bolha de microespumas, já que mais forças de cisalhamento poderiam influenciar o diâmetro médio da bolha dentro das dispersões de microespuma e proporcionar maiores fenômenos de coalescência. Os autores relataram também que velocidades de rotação de 13.000 rpm resultaram em uma redução do diâmetro médio das microbolhas produzidas, revelando um limite para o aumento do diâmetro de bolha das dispersões de microespumas.

## **6.9. Determinação da vazão de trabalho em colunas de remediação de solos**

Shivhare e Kuru (2014) estudaram o efeito do acúmulo de pressão interna em colunas de remediação quando microespumas produzidas a partir de surfactantes sintéticos apolares foram percoladas sob diversas vazões. Os autores relataram que à medida que aumentava a vazão de dispersão de microespumas injetada na coluna de remediação preenchida por solo arenoso, também aumentava a queda de pressão no respectivo meio poroso, conforme relatado anteriormente pelo presente estudo.

Em um estudo sobre lavagem de solos utilizando colunas de remediação, Mukhopady *et al.* (2015) também relataram a formação de canais preferenciais e

aumento da pressão interna da coluna quando vazões superiores 18 ml/min foram empregadas em ensaio de remediação para solos contaminados por arsênio.

### **6.10. Eficiência de remediação de microespumas de RL**

Nos ensaios de remediação em larga escala, foi observado que as microespumas de ramnolipídios apresentaram propriedades extratoras dos metais Cd e Zn, o que é desejável para a implementação de um novo método de descontaminação de solos. Além disso, as microespumas podem proporcionar uma abordagem mais rápida e eficiente quando comparada com os métodos de lavagem do solo que utilizam espumas regulares.

As microespumas possuem uma concentração de gás em torno de 40 a 70%, além de apresentarem uma alta estabilidade e resistência a forças de cisalhamento (FENG, SINGHAL & SWIFT 2009). Espumas regulares são formadas pelo encapsulamento de uma determinada quantidade de gás o qual encontra-se envolvido numa fase líquida fina e contínua de substâncias surfactantes, e estudos anteriores demonstraram a possibilidade de aplicar espumas regulares em processo de remediação do solo (MULLIGAN & WANG, 2006).

No entanto, a baixa estabilidade das espumas regulares é considerada uma desvantagem para as aplicações em campo, uma vez que são sistemas termodinamicamente metaestáveis (VIGNES-ADLER & WEAIRE, 2008). Microespumas têm sido relatadas como uma dispersão coloidal mais estável devido à estrutura esférica de suas microbolhas composta por uma tripla camada de moléculas com propriedades tensoativas (TAO, MEI & HAMZAH, 2020). No presente estudo, os ensaios de remediação em colunas de solo demonstraram que a eficiência de remediação de microespumas de ramnolipídios foram superiores à remediação por espuma regular em estudos anteriores.

Comparando os resultados apresentados com dados anteriores da literatura é possível destacar algumas vantagens entre as microespumas e espumas regulares como agentes de remediação de contaminantes metálicos. Após a realização de experimentos de lavagem de areia contaminada, Haryanto e Chang, (2014) demonstraram a eficiência de espumas regulares produzidas a partir de biossurfactantes para remover Cd. Os autores relataram uma porcentagem de remoção de 40% de Cd de amostras de areia

contaminada após percolação de  $24 V_p$  ao passo que no presente estudo as microespumas de RL removeram 38% de Cd de amostras de solo arenoso após a percolação de somente  $10 V_p$ , revelando uma eficiência de remediação semelhante, porém utilizando uma quantidade de biossurfactantes consideravelmente inferior, o que é desejável sob aspectos econômicos em métodos de remediação em larga escala.

Baseado em dados da literatura, também é possível observar que devido às suas características instáveis e maior tendência a coalescência, as espumas regulares demandam um tempo maior para promover uma remediação eficiente de solos contaminados por metais quando comparado as microespumas. Maity *et al.* (2013) relataram uma eficiência de remediação de 56% de Zn após 48 horas de contato de espumas de saponinas com amostras de solo contaminado por metais. No presente estudo, com a percolação de apenas  $10 V_p$  de microespumas por uma coluna de remediação preenchida com solo arenoso contaminado foi gasto um tempo de aproximadamente 6-8 horas, com a remoção de 53% da concentração inicial de zinco presente nas amostras de solos. Deste modo, embora ambos os métodos apresentem uma eficiência de remediação semelhante, o tempo de percolação das dispersões de microespumas de RL foi consideravelmente menor e, portanto, implicando em uma abordagem mais prática para a remoção de metais em ensaios de remediação em larga escala.

Mukhopady *et al.* (2015) compararam a eficiência de remediação de microespumas e extrato de saponinas para remover As de amostras de solo quando percoladas em sentido descendente. De acordo com os autores, a percolação a favor da gravidade favoreceu a remediação tanto do biossurfactante na forma líquida como na forma de microespuma. No presente estudo, também foi observado que tanto o extrato quanto as microespumas de RL percoladas em sentido descendente resultaram em remediações semelhantes de Cd e Zn, especialmente após a percolação de  $10 V_p$ .

Outro fator que pode ter contribuído para um desempenho semelhante entre o extrato e as microespumas de RL é o fato que as propriedades de percolação das microespumas em meio poroso são semelhantes às da água. Pasdar *et al.* (2019) utilizaram micromodelos de percolação em meio poroso para estudar a percolação de SDS e de dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS) no controle da invasão de fluidos, quando estas colunas são preenchidas por água ou óleo. Os autores demonstraram que as microespumas geradas a partir dos dois surfactantes sintéticos aniônicos possuem uma melhor percolação quando o meio poroso se encontra saturado por óleo em

comparação com a água, revelando uma melhor eficiência para remediação de solos contaminados por poluentes orgânicos (ROY *et al.*, 1994; COUTO *et al.*, 2009).

### **6.11. Influência do número de volumes de poro de extrato de RL**

Os impactos socioambientais resultantes da atividade mineradora devem ser sempre avaliados e minimizados através de tecnologias mais eficientes e de baixo custo. Alguns incidentes envolvendo atividades de mineração em território nacional revelaram a necessidade de novos métodos de remediação para áreas que foram afetadas por contaminantes metálicos (DO CARMO *et al.*, 2017). Portanto, uma das formas para avaliar os processos de remediação de solos contaminados recentemente seria a simulação de contaminações artificiais e, posteriormente, testar a eficiência de novos métodos em remover contaminantes metálicos dos solos.

Baseado nos resultados apresentados no presente estudo é possível observar uma correlação positiva entre o aumento do número de volumes de poros percolados de extrato RL e a quantidade de zinco e cádmio que foi removida dos solos contaminados. Recentemente, esta influência também foi observada por Ugwu *et al.* (2021) que demonstraram a remoção de 63% de Cd após a percolação de 10  $V_p$  de extrato de RL em amostras de solo franco-arenoso.

É possível citar, ainda, como estes tensoativos biológicos podem ser aplicados na remoção de contaminantes metálicos e metaloídico em matrizes sólidas apresentando alto grau de dificuldade para a obtenção de uma remediação satisfatória (como por exemplo, a presença de lodo). Tang *et al.* (2019) demonstraram que após múltiplas lavagens por dois biossurfactantes concomitantemente (RL e saponinas) foi possível remover quantidades consideráveis de cobre (62%), zinco (74%), cromo (60%), chumbo (15%), níquel (68%) e manganês (64%) em amostras de lodo ativado coletadas de uma estação de tratamento de água. Além disso, em um experimento de lavagem de solos em coluna, Wang e Mulligan (2009) reportaram a remoção de arsênio (97 mg/kg) (4%), cobre (35 mg/kg) (3%), chumbo (838 mg/kg) (7%) e zinco (224 mg/kg) (4%) de amostras de rejeito sólido de minério após a percolação de 70 volumes de poro de uma solução de RL 0,1% com um pH inicial de 11.

## 7. Conclusões

- Um extrato bruto de RL, contendo predominantemente congêneres di-ramnolipídio (84,7%), apresentou uma forte capacidade de extração de metais (Cd e Zn) e metaloide (As) de solos contaminados recentemente e de solos contaminados provenientes de uma área de mineração.

- A extração sequencial de ambos os solos (após a aplicação do processo de remediação em microescala) removeu de forma significativa Cd, Zn e As das frações (1) e (2) de ambas as matrizes sólidas, sendo essa remoção mais eficiente no solo contaminado recentemente.

- O extrato de RL não foi tóxico para o organismo indicador de contaminação ambiental *A. salina*. Além disso, não apresentou atividade inibitória contra microrganismos típicos do solo.

- Ensaio de precipitação química resultaram na remoção satisfatória de As, Cd and Zn do extrato de RL.

- O extrato líquido de RL foi submetido a modificações do seu estado físico para uma dispersão de microespumas. Foi demonstrado que o binômio velocidade de rotação e tempo de preparo influenciou significativamente a estabilidade das dispersões de microespuma. Além disso, acarretou um aumento significativo do diâmetro de bolhas das microespumas de RL, até o ponto em que ocorreu uma redução do diâmetro médio das microbolhas.

- Condições de alcalinidade parecem não influenciar a estabilidade e o diâmetro das microbolhas de microespumas.

- Experimentos de percolação utilizando colunas de remediação de solo demonstraram uma significativa queda de pressão interna entre o extrato líquido e as microespumas de RL, principalmente entres as vazões de 30 e 130 ml/min.

- As microespumas de RL exibiram uma eficiência de remediação de contaminantes metálicos (cádmio e zinco) superior quando comparadas com estudos anteriores onde foram utilizadas espumas regulares em processos de lavagens de solo.

- O extrato de RL também se mostrou eficiente na remoção de cádmio e zinco de amostras de solo arenosos contaminados recentemente.

## 8. Perspectivas futuras

Poucos trabalhos demonstraram até hoje a caracterização química de extratos de RL com capacidade de remover contaminantes metálicos e metaloídico de amostras de solo. Isto abre a perspectiva para novos trabalhos relacionados à remediação de ambientes terrestres quando impactados por resíduos metálicos.

Os resultados aqui apresentados contribuem para a expansão da aplicação de métodos mais ecologicamente corretos para recuperar ambientes terrestres, quando contaminados por resíduos metálicos resultantes de ações antropogênicas. Além disso, fornecem dados para uma possível implementação de métodos de reciclagem de contaminantes metálicos, que poderá reduzir de maneira substancial os custos da atividade mineradora.

## 9. Bibliografia

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 1323-1336, 2010.

AGUIEIRAS, E. C.; CIPOLATTI, E. P.; PINTO, M. C.; DUARTE, J. G.; MANOEL, E. A.; FREIRE, D. M. Enzymatic biodiesel production: Challenges and future perspectives. In **Biodiesel Fuels.** Reino Unido: CRC Press, 1ed, pp. 265-282, 2021.

AHN, C.K.; KIM, Y.M.; WOO, S.H.; PARK, J.M. **Removal of cadmium using acid-treated activated carbon in the presence of nonionic and/or anionic surfactants.** Hydrometall. 99: 209-213, 2009.

ALVES-NETO, J.L.; BARBOSA, A.V.L.; MEDEIROS, M.A.; CASARTELLI, E.A.; GUARINO, A.W.S., MERÇON, F. **Transposição de Cádmio e Zinco da Baía de Sepetiba, e sua Deposição em Sedimentos do Estuário do Rio Cabuçu-Piraquê (Rio de Janeiro, Brasil).** Rev. Virtual. Quím. 6: 1295-1315, 2014.

AMIRI, M.C.; SADEGHIALIABADI, H. **Evaluating the stability of colloidal gas aphanes in the presence of montmorillonite nanoparticles.** *Colloids Surf. Physicochem. Engineer. Asp.* 457: 212-219, 2014.

APPEL, C.; MA, L. **Concentration, pH, and surface charge effects on cadmium and lead sorption in three tropical soils.** *J. Environ. Qual.* 31: 581-589, 2002.

AŞCI, Y.; NURBAŞ, M.A.C.İ.D.; AÇIKEL, Y.S. **A comparative study for the sorption of Cd (II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd (II) using rhamnolipid biosurfactant.** *J. Hazard. Mat.*154: 663-673, 2008.

BACHATE, S.P.; KHAPARE, R.M.; KODAM, K.M. **Oxidation of arsenite by two  $\beta$ -proteobacteria isolated from soil.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 2135-2145, 2012.

BASKARAN, S.M.; ZAKARIA, M.R.; AHMAD SABRI, A.S.M.; MOHAMED, M.S.; WASOH, H.; TOSHINARI, M.; ALI-HASSAN, M.; BANAT, I.M. **Valorization of biodiesel side stream waste glycerol for rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* RS6.** *Environ. Pollut.* 276: 116742, 2021.

BASU, S.; MALPANI, P.R. **Removal of methyl orange and methylene blue dye from water using colloidal gas aphan—effect of processes parameters.** *Sep. Sci. Technol.* 36: 2997-3013, 2001. doi: 10.1081/SS-100107642.

BEHRENS, B.; BAUNE, M.; JUNGKEIT, J.; TISO, T.; BLANK, L.M.; HAYEN, H. **High performance liquid chromatography-charged aerosol detection applying an inverse gradient for quantification of rhamnolipid biosurfactants.** *J. Chromatogr.* 1455: 125–132, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.079>

BELKIN, A.; IRVING, M.; O'CONNOR, B.; FOSDICK, M.; HOFF, T. L.; GROWCOCK, F.B. **How aphan drilling fluids work.** In: **SOCIETY OF**

**PETROLEUM ENGINEERS ANNUAL TECHNICAL CONFERENCE AND EXHIBITION.** 2005, Dallas, Anais do Seminário...Dallas: Society of Petroleum Engineers, 2005. Disponível em:< <https://www.onepetro.org/conference-paper/SPE-96145-MS>> Acesso em: 03 de mar. de 2016.

BHAKTA, A.; RUCKENSTEIN, E. **Decay of standing foams: drainage, coalescence and collapse.** Adv. Colloid Interface Sci. 70: 1-124, 1997.

BISSEN, M.; FRIMMEL, F.H. **Arsenic—a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility.** Acta Hydrochim. Hydrobiol. 31: 9–18, 2003

BOONAMNUAYVITAYA, V.; JUTAPORN, P.; SAE-UNG, S.; JARUDILOKKUL, S. **Removal of pyrene by colloidal gas aphrons of a biodegradable surfactant.** Sep. Purif. Technol. 68: 411-416, 2009.

BREWER, R.; SLEEMAN, J.R. **Soil structure and fabric: their definition and description.** J. Soil Sci. 11: 172-185, 1960.

CAMPOS, M. C. C. **Atributos dos solos e riscos de lixiviação de metais pesados em solos tropicais Soil attributes and risk of leaching of heavy metals in tropical soils.** Ambiência. 6: 547-565, 2010.

CAO, X.; GAO, X.; ZENG, X.; MA, Y.; GAO, Y.; BAEYENS, W.; JIA, W.; LIU, J.; WU, C.; SU, S. **Seeking for an optimal strategy to avoid arsenic and cadmium over-accumulation in crops: soil management vs cultivar selection in a case study with maize.** Chemosphere.129891, 2021.

CASLA, D.; REQUENA, T.; GÓMEZ, R. **Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105.** J. Appl. Bacteriol. 81: 35–41, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03279.x>

CASTILLO, S.; JESÚS, D.; DE LA CAMPA, A.M.S.; GONZÁLEZ-CASTANEDO, Y.; FERNÁNDEZ-CALIANI, J.C.; GONZALEZ, I.; ROMERO, A. **Contribution of mine wastes to atmospheric metal deposition in the surrounding area of an abandoned heavily polluted mining district (Rio Tinto mines, Spain).** *Sci. Total Environ.* 449: 363-372, 2013.

CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R.M. **Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane.** *J. Colloid. Interface Sci.* 170: 569-574, 1995.

CHEBBI, A.; FRANZETTI, A.; CASTRO, F.D.; TOVAR, F.H.G.; TAZZARI, M.; SBAFFONI, S.; VACCARI, M. **Potentials of winery and olive oil residues for the production of rhamnolipids and other biosurfactants: a step towards achieving a circular economy model.** *Waste Biomass Valoriz.* 1-11, 2021.

CHEN, M.; DONG, C.; PENFOLD, J.; THOMAS, R.K.; SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A., MARCHANT, R. **Influence of calcium ions on rhamnolipid and rhamnolipid/anionic surfactant adsorption and self-assembly.** *Langmuir* 29: 3912–3923, 2013. <<https://doi.org/10.1021/la400432v>>

CHEN, W.; QU, Y.; XU, Z.; HE, F.; CHEN, Z.; HUANG, S.; LI, Y. **Heavy metal (Cu, Cd, Pb, Cr) washing from river sediment using biosurfactant rhamnolipid.** *Environ. Sci Pollut. Res.* 24: 16344–16350, 2017.

CHEN, Q.; LI, Y.; LIU, M.; ZHU, B.; MU, J.; CHEN, Z. **Removal of Pb and Hg from marine intertidal sediment by using rhamnolipid biosurfactant produced by a *Pseudomonas aeruginosa* strain.** *Environ. Technol. Innov.* 22, 101456, 2021. ISSN 2352-1864,

CIONEK, V.M.; ALVES, G.H.Z.; TÓFOLI, R.M.; RODRIGUES-FILHO, J.L.; DIAS, R.M. **Brazil in the mud again: lessons not learned from Mariana dam collapse.** *Biodivers. Conserv.* 28: 1935-1938, 2019

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M23-A4. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters, 4ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2016.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário Oficial [República Federativa do Brasil], Brasília, DF, no. 249, de 30/12/2009, p. 81–84

CORPUZ, A.G.; PAL, P.; BANAT, F. **Effect of temperature and use of regenerated surfactants on the removal of oil from water using colloidal gas aphrons.** Sep. Purif. Technol. 227: 115678, 2019.

COSTA, S.G.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. **Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 1063-1072, 2009.

COTOU, E.; CASTRITSI-CATHARIOS, I.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. **Surfactant-based oil dispersant toxicity to developing nauplii of *Artemia*: effects on ATPase enzymatic system.** Chemosphere 42:959–964, 2001.

COUTO, H.J.B. **Remediação de solos arenosos contaminados por óleo diesel com soluções surfactantes e espumas.** 149f. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE), Rio de Janeiro, 2007.

COUTO, H.J.B.; MASSARANI, G.; BISCAIA, E.C.; SANT'ANNA, G.L. **Remediation of sandy soils using surfactant solutions and foams.** J. Harzad. Mater. 164: 1325-1334, 2009.

CRAWFORD, R.J.; HARDING, I.H.; MAINWARING, D.E. **Adsorption and coprecipitation of single heavy metal ions onto the hydrated oxides of iron and chromium.** Langmuir. 9:3050–3056, 1993

DA ROCHA JUNIOR, R. B.; MEIRA, H. M.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. **Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes.** Biodegradation.30: 215-233, 2019.

DA SILVA, E.B.; DE OLIVEIRA, L.M.; WILKIE, A.C.; LIU, Y.; MA, L.Q. **Arsenic removal from As-hyperaccumulator *Pteris vittata* biomass: Coupling extraction with precipitation.** Chemosphere.193:288–294, 2018.

DA SILVA CÉSAR, A.; CONEJERO, M.A.; RIBEIRO, E.C.B.; BATALHA, M.O. **Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil.** Renew. Energy 133: 1147-1157, 2019.

DAMIAN, G.E.; MICLE, V.; SUR, I.M. **Mobilization of Cu and Pb from multi-metal contaminated soils by dissolved humic substances extracted from leonardite and factors affecting the process.** J. Soils Sed. 19: 2869–2881, 2019.

DANA, J.D.; HULBURT, C.S. **Manual de Mineralogia.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S/A, 1974, vol. 1. 655p.

DASHTBOZORG, S.S.; KOHL, J.; JU, L.K. **Rhamnolipid Adsorption in Soil: Factors, unique features, and considerations for use as green antizooptic agents.** J. Agric. Food Chem. 64: 3330-3337, 2016.

DE MATTOS, A.S.L. **Exigências ambientais europeias: novos desafios competitivos para o complexo eletrônico brasileiro.** Rev. Bras. Inov. 10: 129-160, 2011.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. **Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP**. *Biochim. Biophys. Acta.* 1485: 145-152, 2000.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. ***rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids**. *Microbiol.* 149: 2005–2013, 2003.

DING, Y.; LIU, B.; SHEN, X.; ZHONG, L.; LI, X. **Foam-assisted delivery of nanoscale zero valent iron in porous media**. *J. Environ. Eng.* 139: 1206-1212, 2013.

DIPU, S.; KUMAR, A.A.; THANGA, S.G. **Effect of chelating agents in phytoremediation of heavy metals**. *Remediat. J.* 22: 133-146, 2012.

DO CARMO, F.F.; KAMINO, L.H.Y.; TOBIAS JUNIOR, R.; DE CAMPOS, I.C.; DO CARMO, F.F.; SILVINO, G.; DE CASTRO, K.J.D.X.; MAURO, M.L.; RODRIGUES, N.U.A.; MIRANDA, M.P.; DE SOUZA, P.C.E.F. **Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context**. *Perspect. Ecol. Conserv.* 15: 145–151, 2017.

DONAGEMA, G.K. *et al.* (coord.). **Manual de métodos de análise de solo**. São Paulo: Embrapa solos. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, 2ed., 230p., 1997.

DOS SANTOS, L.N. **"O impacto ambiental decorrente do processo industrial na área e nos arredores da companhia mercantil e industrial ingá-bairro da ilha da madeira (município de Itaguaí, RJ)"**. *Khóra: Rev. Transdiscipl.* 2: 1-25, 2015.

DOS SANTOS, L.M.G.; BARATA-SILVA, C.; NETO, S.A.V.; MAGALHÃES, C.D.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C. **Analysis, and risk assessment of arsenic in rice from different regions of Brazil**. *J. Food Compos. Anal.*, 103853, 2021.

DUFFUS, J.H. **“Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report)**. Pure Appl. Chem.74: 793-807, 2002.

DUMKOVA, J.; VRLIKOVA, L.; VECERA, Z.; PUTNOVA, B.; DOCEKAL, B.; MIKUSKA, P.; FICTUM, P.; HAMPL, A.; BUCHTOVA, M. **Inhaled cadmium oxide nanoparticles: Their in vivo fate and effect on target organs**. Int. J. Mol. Sci. 17: 874, 2016.

ELBANA, T.A.; SELIM, H.M., AKRAMI, N.; NEWMAN, A., SHAHEEN, S. M.; RINKLEBE, J. **Freundlich sorption parameters for cadmium, copper, nickel, lead, and zinc for different soils: Influence of kinetics**. Geoderma. 324: 80-88, 2018.

ELLIOT, H.A.; LIBERATI, M.R.; HUANG, C.P. **Competitive adsorption of heavy metals by soils**. J. Environ. Qual. 15: 214–219, 1986.

FADIGAS, F.D.S.; AMARAL SOBRINHO, N.D.; MAZUR, N.; ANJOS, L.D., FREIXO, A.A. **Proposição de valores de referência para a concentração natural de metais pesados em solos brasileiros**. Rev. Brasil. Eng. Agric. Ambient. 10: 699-705, 2006.

FENG, W.; SINGHAL, N. & SWIFT, S. **Drainage mechanism of microbubble dispersion and factors influencing its stability**. J. Colloid Interface. Sci. 337: 548-554,2009.

FINNEY, D. J. **The adjustment for a natural response rate in probit analysis**. Ann. Appl. Biol. 36:187–195, 1949.

GONG, Y.; ZHAO, D.; WANG, Q. **An overview of field-scale studies on remediation of soil contaminated with heavy metals and metalloids: Technical progress over the last decade**. Water Res. 147: 440-460, 2018.

GUDIÑA, E.J.; RODRIGUES, A.I.; DE FREITAS, V.; AZEVEDO, Z.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. **Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids.** *Bioresour. Technol.* 212: 144-150, 2016.

GUNTHER, I.V. N. W.; NUÑEZ, A.; FORTIS, L.; SOLAIMAN, D. K. **Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 914-920, 2006.

GUO, X.; WEI, Z.; WU, Q.; LI, C.; QIAN, T.; ZHENG, W. **Effect of soil washing with only chelators or combining with ferric chloride on soil heavy metal removal and phytoavailability: field experiments.** *Chemosphere.*147: 412-419, 2016.

GUO, X.; ZHAO, G.; ZHANG, G.; HE, Q.; WEI, Z.; ZHENG, W.; QIAN, T.; WU, Q. **Effect of mixed chelators of EDTA, GLDA, and citric acid on bioavailability of residual heavy metals in soils and soil properties.** *Chemosphere.* 209: 776-782, 2018.

HABBA, E.; PINAZO, A.; JÁUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; INFANTE, M.R. MANRESA. **Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044.** *Biotech. Bioeng.* 81: 316–322, 2003.

HAJNOS, M.; CIESLA, J. Eletrokinetics (zeta) potential of soils. In: **Encyclopedia of agrophysics.** Gliński, J.; Horabik, J.; Lipiec, J. Alemanha: Springer Science & Business Media, 3ed, pp 264-267, 2011.

HARYANTO, B.; CHANG, C.H. **Foam-enhanced removal of adsorbed metal ions from packed sands with biosurfactant solution flushing.** *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45:2170-2175, 2014.

HASHIM, M.A.; MUKHOPADHYAY, S.; SENGUPTA, B.; SAHU, J.N. **Applications of colloidal gas aphrons for pollution remediation.** J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 87: 305-324, 2012.

HENKEL, M.; MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production.** Process. Biochem 47: 1207–1219, 2012

HOFFMAN, U.; ENDELL, K.; BLIKE, W. **Kristall struktur und quellung von montmorillonite.** Z. Krist. 86: 340, 1933.

HONNA, C.Y. **Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de rhamnolipídio.** Dissertação. Universidade de São Paulo, 2013.

HUBBARD A T. **Encyclopaedia of Surface Colloid Science.** CRC Press, Boca Raton, 2002

IBAMA, 2015. Laudo técnico preliminar. Impactos sociais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, Disponível em:<[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/ambientais/laudotecnico\\_preliminar.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/ambientais/laudotecnico_preliminar.pdf)>

IEA- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY: **Renewables reports 2020**, IEA, Paris, 2020. Disponível:<<https://www.iea.org/reports/renewables2020/transport-biofuels>>. Acessado em 06 de março de 2021

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; ISHII, F.; CHOI, Y.K. **Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfactant.** Langmuir 9:1634–1636, 1993

IVAN, C.D.; QUINTANA, J.L.; BLAKE, L.D. **Aphron-base drilling fluid: evolving technologies for lost circulation control.** In: SPE Annual Technical Conference and Exhibition. Society of Petroleum Engineers, 2001.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J.; GUDEL, J.I. **Toxicity of commercial surfactants to phosphate-accumulating bacterium.** Acta Chim. Slov. 56: 1003-1009, 2009.

JAUREGI, P., GILMOUR, S., VARLEY, J. **Characterization of colloidal gas aphrons for subsequent use for protein recovery.** Chem. Eng. J. 65: 1-11, 1997.

JAUREGI, P.; MITCHELL, G. R.; VARLEY, J. **Colloidal gas aphrons (CGA): dispersion and structural features.** AIChE J. 46: 24-36, 2000.

JI, K.; KIM, J.; LEE, M.; PARK, S.; KWON, H.J.; CHEONG, H.K.; LEE, K.Y. **Assessment of exposure to heavy metals and health risks among residents near abandoned metal mines in Goseong, Korea.** Environ. Pollut. 178: 322-328, 2013.

JOHANN, S.; SEILER, T.B.; TISO, T.; BLUHM, K.; BLANK, L.M.; HOLLERT, H. **Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono- rhamnolipids.** Sci; Tot; Environ; 548: 155–163, 2016.

JOVANIC, B.R.; BOJOVIC, S.; PANIC, B.; RADENKOVIC, B.; DESPOTOVIC, M. **The effect of detergent as polluting agent on the photosynthetic activity and chlorophyll content in bean leaves.** Health 2: 395-399, 2010.

JULIÁN, P.L.; COLLADO, J.M. **Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicacion en ciencias geológicas.** Estud. Geol. 58: 133-144, 2002.

KAYA, M. **Recovery of metals and nonmetals from electronic waste by physical and chemical recycling processes.** Waste Manag. 57: 64–90, 2016.

KESHAVARZI, B.; JAVADI, A.; BAHRAMIAN, A.; MILLER, R. **Formation and stability of colloidal gas aphron based drilling fluid considering dynamic surface properties.** J. Petrol. Sci. Eng. 174: 468-475, 2019.

KHALID, N.; KOBAYASHI, I.; NEVES, M. A.; UEMURA, K.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H. **Encapsulation of cholecalciferol and ergocalciferol in oil-in-water emulsions by different homogenization techniques.** Eur. J. Lipid Sci. Technol. 119:1-10, 2017.

KOMMALAPATI, R.R.; ROY, D.; VALSARAJ, K.T.; CONSTANT, W.D. **Characterization of colloidal gas aphron suspensions generated from plant-based natural surfactant solutions.** Sep. Sci. Technol. 31: 2317-2333, 1996.

KPOMBLEKOU-A, K.; TABATABAI, M. A. **Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils.** Agric. Ecosyst. Environ. 100: 275-284, 2003.

KRONEMBERG, F.A. **Produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas.** Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

LENZI, E.; DE CINQUE ALMEIDA, V.; BORTOTTI FAVERO, L.O.; JULIATO BECKER, F. **Detalhes da utilização do íon hidróxido, HO<sup>-</sup>, no tratamento de efluentes contaminados com metal pesado zinco.** Acta Sci Technol. 33: 313-322, 2011.

LEPSCH, I. F. Os sólidos ativos do solo: argila e húmus. In: **19 lições de pedologia.** São Paulo: Oficina de textos, 1 ed, pp. 85-94, 2011.

LI, Z.; ALESSI, D.; ALLEN, L. **Influence of quaternary ammonium on sorption of selected metal cations onto clinoptilolite zeolite.** J. Environ. Qual. 31: 1106-1114, 2002.

LIANG, X.; GUO, C.; LIAO, C.; LIU, S.; WICK, L.Y.; PENG, D.; YI, X.; LU, G.; YIN, H.; LIN, Z.; DANG, Z. **Drivers and applications of integrated clean-up technologies for surfactant-enhanced remediation of environments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).** Environ. Pollut. 225: 129-140, 2017.

LIAO, Q.; HE, L.; TU, G.; YANG, Z.; YANG, W.; TANG, J.; CAO, W.; WANG, H. **Simultaneous immobilization of Pb, Cd and As in soil by hybrid iron-sulfate- and phosphate-based bio-nanocomposite: Effectiveness, long-term stability and bioavailability/bioaccessibility evaluation.** Chemosphere, 266: 128960, 2021.

LIMA, T. M., PROCÓPIO, L. C., BRANDÃO, F. D., LEÃO, B. A., TÓTOLA, M. R., BORGES, A. C. **Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms.** Bioresour. Technol. 102: 2957-2964, 2011.

LIU, G.; ZHONG, H.; YANG, X.; LIU, Y.; SHAO, B.; LIU, Z. **Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review.** Biotechnol. Bioeng. 115: 796-814, 2018.

LIWARSKA-BIZUKOJC, E.; MIKSCH, K.; MALACHOWSKA-JUTSZ, A.; KALKA, J. **Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and non-ionic surfactants.** Chemosphere 58: 1249–1253, 2005.

LUNA, J.M.; RUFINO, L.A.; SARUBBO, R.D. **Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties.** Proc. Saf. Environ. Prot. 102:558–566, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010>

MAGALDI, S.; MATA-ESSAYAG, S.; DE CAPRILES, H.C.; PEREZ, C., COLELLA, M.T., OLAIZOLA, C., ONTIVEROS, Y. **Well diffusion for antifungal susceptibility testing.** Int. J. Infect. Dis. 8: 39–45, 2004.

MAITY, J.P.; HUANG, Y.M.; HSU, C.M.; WU, C.I.; CHEN, C.C.; LI, C.Y.; JEAN, J.; CHANG, Y.; CHEN, C.Y. **Removal of Cu, Pb and Zn by foam fractionation and a soil washing process from contaminated industrial soils using**

**soapberry-derived saponin: a comparative effectiveness assessment.** *Chemosphere*. 92: 1286-1293, 2013.

MAKSIMOV, V.N.; PARSHIKOVA, T.V. **Influence of surfactants on the photosynthetic activity of algae.** *Hydrobiol. J.* 42: 67-76, 2006.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. **Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review.** *J. Hazard. Mater.* 285:419–435, 2015.

MARTÍNEZ, C.E.; MOTTO, H.L. **Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils.** *Environ. Pollut.* 107:153–158, 2000.

MARTINS, J.; FIGUEIREDO, B.R. **Testes de mobilidade de chumbo e arsênio em solo contaminado de Apiaí (SP).** *Geoch. Brasil.*, 28: 89-200, 2015.

MATSUSHITA, K.; MOLLAH, A.H.; STUCKEY, D.C.; DEL CERRO, C., BAILEY, A.I. **Predispersed solvent extraction of dilute products using colloidal gas aphrons and colloidal liquid aphrons: aphron preparation, stability and size.** *Colloids Surf.* 69: 65–72, 1992

MILLS, W.B.; LIU, S.; FONG, F.K. **Literature review and model (COMET) for colloid/metals transport in porous media.** *Ground Water.* 29: 199-208, 1991.

MOUTA, E. R.; SOARES, M. R.; CASAGRANDE, J. C. **Copper adsorption as a function of solution parameters of variable charge soils.** *J. Braz. Chem. Soc.* 19: 996-1009; 2008

MUKHERJEE, A.; BHATTACHARYA, P.; SHI, F.; FRYAR, E.A.; MUKHERJEE, A.B.; ZHENG, M.X.; JACKS, G.; BUNDSCHUH, J. **Chemical evolution in the high arsenic groundwater of the Huhhot basin (Inner Mongolia, PR China) and its difference from the western Bengal basin (India).** *Applied Geochemistry*, 24(10): 1835-1851, 2009.

MUKHOPADHYAY, S.; HASHIM, M.A.; SAHU, J.N.; YUSOFF, I.; GUPTA, B.S. **Comparison of a plant based natural surfactant with SDS for washing of As (V) from Fe rich soil.** J. Environ. Sci. 25: 2247-2256, 2013.

MUKHOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, S.; HASHIM, M.A. ; GUPTA, B.S. **Application of colloidal gas aphon suspensions produced from *Sapindus mukorossi* for arsenic removal from contaminated soil.** Chemosphere, 119: 355-362, 2015.

MÜLLER, M.M.; HÖRMANN, B.; KUGEL, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 89: 585-592, 2011.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. **Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation.** Eng. Geol. 60:193–207, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00101-0)

MULLIGAN, C.N.; WANG, S. **Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam.** Eng. Geol. 85: 75-81, 2006.

NAREH'EI, M. A.; SHAHRI, M. P.; ZAMANI, M. **Preparation and characterization of colloidal gas aphon based drilling fluids using a plant-based surfactant.** In: SPE Saudi Arabia Section Technical Symposium and Exhibition. Society of Petroleum Engineers. 2012.

NRIAGU, JO.; BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, A.B.; BUNDSCHUH, J.; ZEVENHOVEN, R.; LOEPPERT, R.H. **Arsenic in soil and groundwater: an overview.** Trace Met. Contam. Environ. 9: 3–60, 2007.

OCHOA-LOZA, F.J.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. **Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant.** J. Environ. Qual. 30: 479–485, 2001. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.302479x>

OCHSNER, U.A.; KOCH, A.K.; FIECHTER, A.; REISER, J. **Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa***. J. Bacteriol. 176: 2044-2054, 1994.

OORTS, K. ; GHESQUIERE, U.; SMOLDERS, E. **Leaching and aging decrease nickel toxicity to soil microbial processes in soils freshly spiked with nickel chloride**. Environ. Toxicol. Chem. 26: 1130–1138, 2007.

OSMOND, D.A. **The Colloidal Chemistry of Inorganic Soil Constituents**. In **Principles of Soil Chemistry**. 4ed. Reino Unido: CRC Press, pp. 75-130, 2010.

PAL, P.; LIU, C.; HAJA, M.A.; ALHSEINAT, E., BANAT, F. **Separation and enrichment of micro and nano sized particles from aqueous solutions by flotation using colloidal gas aphanes**. J. Water Process Eng. 28: 123-128, 2019.

PAPADOPOULOS, P.; ROWELL, D.L. **The reaction of copper and zinc with calcium carbonate surfaces**. J. Soil Sci. 40: 39–48, 1989

PARK, Y.Y.; TRAN, T.; LEE, Y.H.; NAM, Y.I.; SENANAYAKE, G.; KIM, M.J. **Selective removal of arsenic (V) from a molybdate plant liquor by precipitation of magnesium arsenate**. Hydrometall. 104: 290-297, 2010.

PASDAR, M.; KAZEMZADEH, E.; KAMARI, E.; GHAZANFARI, M.H.; SOLEYMANI, M. **Insight into the behavior of colloidal gas aphan (CGA) fluids at elevated pressures: An experimental study**. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 537: 250-258, 2018.

PASDAR, M.; KAMARI, E.; KAZEMZADEH, E.; GHAZANFARI, M.H.; SOLEYMANI, M. **Investigating fluid invasion control by Colloidal Gas Aphan (CGA) based fluids in micromodel systems**. J. Nat. Gas Sci. Eng: 66: 1-10, 2019.

PIMENTEL, M.P.; SILVA-JÚNIOR, F.C.G.; SANTAELLA, S.T.; LOTUFO, L.V.C. **O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade**

**das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental.** J. Braz. Soc. Ecol. 6:15–22, 2011.

RAMAMURTHY, A.S.; VO, D.; LI, X.J.; QU, J. **Surfactant-enhanced removal of Cu (II) and Zn (II) from a contaminated sandy soil.** Water. Air. Soil Pollut. 190: 197-207, 2008.

RASSAEI, F.; HOODAJI, M.; ALI ABTAHI, S. **Cadmium fractions in two calcareous soils affected by incubation time, zinc and moisture regime.** Commun. Soil Sci. Plant Anal. 51: 456–467, 2020.

RAURET, G.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F.; SAHUQUILLO, A.; BARAHONA, E.; LACHICA, M.; URE, A.M.; DAVIDSON, C.M.; GOMEZ, A.; LUCK, D.; BACON, J.; YLI-HALLA, M.; MUNTAU, H.; QUEVAUVILLER, P. **Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content.** J. Environ. Monit. 2: 228-233, 2000.

REBELLO, S.; ASOK, A.K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M.S. **Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants** Environ. Chem. Let., 12: 275-287, 2014.

REN, Z. L.; SIVRY, Y.; THARAUD, M.; CORDIER, L.; LI, Y.; DAI, J.; BENEDETTI, M.F. **Speciation and reactivity of lead and zinc in heavily and poorly contaminated soils: Stable isotope dilution, chemical extraction and model views.** Environ. Pollut. 225: 654–662, 2017.

RICE, C.W. **Organic Matter and Nutrients Dynamics.** In: LAL, R. Encyclopedia of Soil Science. Nova Iorque: Taylor & Francis, 72p. ed 2. 2006.

ROBSON, T.C.; BRAUNGARDT, C.B.; RIEUWERTS, J.; WORSFOLD, P. **Cadmium contamination of agricultural soils and crops resulting from sphalerite weathering.** Environ. Pollut. 184: 283-289, 2014.

ROCHA, V.A.; DE CASTILHO, L.V.; DE CASTRO, R.P.; TEIXEIRA, D.B.; MAGALHÃES, A.V.; GOMEZ, J. G.; FREIRE, D. M. **Comparison of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids on microbial enhanced oil recovery (MEOR) applications.** Biotech. Progr. 36: e2981, 2020.

ROCHA, V. A. L.; DE CASTILHO, L.V.A.; CASTRO, R.D.P.V.; TEIXEIRA, D.B.; MAGALHÃES, A.V.; ABREU, F.D.A.; CYPRIANO, J.B.S.; GOMEZ, J.G.C.; FREIRE, D.M.G. **Antibiofilm effect of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids on carbon steel submitted to oil produced water.** Biotechnol. Prog. e3131, 2021.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. **Biosurfactants: potential applications in medicine.** J. Antimicrob. Chemoth. 57: 609-618, 2006.

ROSEN, M.J.; KUNJAPPU, J.T. **Surfactants and interfacial phenomena.** Nova Iorque: John Wiley & Sons, 600p. 4 ed. 2012. ISBN 1-118-22902-9.

ROSETY, M.; ORDONEZ, F.J.; RODRÍGUEZ, M.R.; ROSETY, J.M.; CARRASCO, C.; RIBELLES, A. **Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm.** Histology and histopathology, 16: 839-843, 2001.

ROY, D.; VALSARAJ, K. T.; CONSTANT, W. D.; DARJI, M. **Removal of hazardous oily waste from a soil matrix using surfactants and colloidal gas aphron suspensions under different flow conditions.** J. Hazard. Mater. 38: 127-144, 1994.

SACHDEV, D.P.; CAMEOTRA, S.S. **Biosurfactants in agriculture.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 1005-1016, 2013.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F.J.; ESPUNY, M.J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J.A., MANRESA, Á., ORTIZ, A. **Aggregation behaviour of a dirhamnolipid**

**biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media.** J. Colloid Interface Sci. 307: 246-253, 2007.

SANTOS, A.S.; SAMPAIO, A.P.W.; VASQUEZ, G.S.; SANTA ANNA, L. M.; PEREIRA, N.; FREIRE, D.M. **Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*.** Biotechnol. Fuels Chem. 98: 1025-1035, 2002.

SANTOS, A.P.P.; SILVA, M.D.S.; COSTA, E.V.L.; RUFINO R.D.; SANTOS, V.A., RAMOS CS, SARUBBO, L.A., PORTO, A.L.F. **Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region.** Braz. J. Med. Biol. Res. 51:e6657, 2018.

SAVE, S.V.; PANGARKAR, V.G. **Characterization of colloidal gas aphrons.** Chem. Eng. Commun. 127: 35-54, 1994

SCRIVEN, L.E.; STERNLING, C.V. **The marangoni effects.** Nature, 187: 186-188, 1960.

SEBBA, F. **A surface-chemical basis for cell motility.** J. Theor. Biol. 78: 375-388, 1979.

SEBBA, F. **Improved generator for micron-sized bubbles.** Chem. Ind. 91: 2, 1985.

SEBBA, F. **Foams and Biliquid Foams—Aphrons,** New York: John Wiley & Sons, 1987.

SEKHON RANDHAWA, K.K.; RAHMAN, P. K. **Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market.** Front. Microbiol. 5: 454, 2014.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. **The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 110–116, 1987. doi:10.1007/BF0025193

SHIVHARE, S.; KURU, E. **A study of the pore-blocking ability and formation damage characteristics of oil-based colloidal gas aphron drilling fluids.** J. Pet. Sci. Eng. 122: 257-265, 2014.

SILVA, M.A.D.; FREITAS, C.M.D.; XAVIER, D.R.; ROMÃO, A.R. **Sobreposição de riscos e impactos no desastre da Vale em Brumadinho.** Ciênc. Cult. 72: 21-28, 2020.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D.G. **A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters.** Appl. Geochem. 17:517-568, 2002.

SMOLDERS, E.; DEGRYSE, F. Fixation of cadmium and zinc in soil: implications for risk assessment. In: **Natural Attenuation of Trace Element Availability in Soils.** 1 ed. Reino Unido: CRC Press, pp.157-169, 2006.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J.N. **Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters.** Environ. Int. 34: 1033-1049, 2008.

SOARES, M.R.; DE SOUZA, S.J.E.; ALLEONI, L.R.F. **Proposal of new distribution coefficients (K<sub>d</sub>) of potentially toxic elements in soils for improving environmental risk assessment in the State of São Paulo, southeastern Brazil.** J. Environ. Manag. 285: 112044, 2021.

SONG, B.; SPRINGER, J. **Determination of interfacial tension from the profile of a pendant drop using computer-aided image processing.** J. Colloid Interface Sci. 184: 77–91, 1996.

STROHALM, M.; HASSMAN, M.; KOŠATA, B.; KODÍČEK, M. **Mass data miner: an open-source alternative for mass spectrometric data analysis**. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22: 905-908, 2008.

SUN, B.; ZHAO, F. J.; LOMBI, E.; MCGRATH, S. P. **Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA**. Environ. Pollut. 113: 111-120, 2001.

SUN, L.; CHEN, S.; CHAO, L.; SUN, T. **Effects of flooding on changes in Eh, pH and speciation of cadmium and lead in contaminated soil**. Bull. Environ Contam. Toxicol. 79: 514–518, 2007.

TAO, W.; MEI, C.; HAMZAH, N. **The application of surfactant colloidal gas aphrons to remediate contaminated soil: A review**. J. Contamin. Hydrol. 231: 103620, 2020.

TAN, K.H. The Colloidal Chemistry of inorganic soil constituents In: **Principles of soil chemistry**. Reino Unido: CRC Press, 4ed, pp.133-182; 2011.

TANG, J.; HE, J.; QIU, Z.; XIN, X. **Metal removal effectiveness, fractions, and binding intensity in the sludge during the multiple washing steps using the combined rhamnolipid and saponin**. J. Soils Sediments. 19: 1286-1296, 2019.

UGWU, E.C.; GUPTA, B.S.; ADEBAYO, A.; MARTÍNEZ-VILLEGAS, N. **Column Experiment for the Removal of Cadmium, Copper, Lead and Zinc from Artificially Contaminated Soil using EDTA, Rhamnolipids, and Soapnut**. Eur. J. Environ. Earth Sci. 2: 1-7, 2021.

UE. UNIÃO EUROPÉIA - **Regulamento da comissão que altera o anexo XVII do Regulamento n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH) no que tange aos etoxilatos de nonilfenol**. Bruxelas: Jornal Oficial da União Européia, 278p. 2006. Disponível em: <https://eur->

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:en:PDF](http://lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:en:PDF).

Acessado em: 12 de janeiro de 2018.

UE. UNIÃO EUROPÉIA -. Instrução Normativa Nº. 67/548/EEC, 1967. Disponível: <http://aei.pitt.edu/3331/1/3331.pdf>. Acesso em 12 Jul. 2019.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE -. **Soil Survey Staff. Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys.** Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 2 ed. U. S. Government Printing Office, Washington, DC. 436p. 1999.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE-: **Global Agriculture Information Network number :BR18017.** Brazil. Biofuels Annual. 2019 Disponível em: <[https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Biofuels%20Annual\\_Sao%20Paulo%20ATO\\_Brazil\\_8-9-2019.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Biofuels%20Annual_Sao%20Paulo%20ATO_Brazil_8-9-2019.pdf)> Acesso em 8/10/2018.

USEPA (a) UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- **Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments; sludges; soils and oils.** 30 p.2007. Disponível em:< <https://www.jonesenv.com/PDF/3051a.pdf>>. Acessado em 15 de julho de 2018.

USEPA (b). UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Treatment technologies for site cleanup: annual status report.** Washington-DC, USA. Ed: EPA Office of Superfund Remediation and Technology Innovation (OSRTI). 12ed. 5203p. 2007.

VALGAS, C.; SOUZA S.M.D.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA, A. J.R. **Screening methods to determine antibacterial activity of natural products.** Braz. J. Microbiol 38:369–380, 2007.

VAN HAESENDONCK, I.P.H.; VANZEVEREN, E.C.A. **Rhamnolipids in bakery products**. USPTO n. PI 20060233935, 19 out. 2006,

VAN, T.G.; RAEMDONCK, K.; DEMEESTER, J.; SMEDT, S.C. **Protein release from biodegradable dextran nanogels**. *Langmuir*. 23: 9794-9801, 2007.

VAN WEZEL, A.P.; OPPERHUIZEN, A. **Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens**. *Crit. Rev. Toxicol.* 25: 255–279, 1995

VIGNES-ADLER, M.; WEAIRE, D. New foams: **Fresh challenges and opportunities**. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13, 141-149, 2008.

VIRCIKOVA, E.; MACALA, J. Air-pollutant emissions and emissions from metallurgical industry. In: **Mineral processing and the environment**. Dordrecht: Springer, pp. 85-110, 1998.

VORONEY, R.P.; HECK, R. J. The Soil Habitat. In: **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. Massachusetts: Academic Press, 3ed. pp.15-40, 2015.

WADGAONKAR, S.L.; FERRARO, A.; NANCHARAI AH, Y. V.; DHILLON, K. S.; FABBRICINO, M.; ESPOSITO, G.; LENS, P. N. **In situ and ex situ bioremediation of seleniferous soils from northwestern India**. *J. Soils Sediments*. 19: 762-773, 2019.

WANG, S.; MULLIGAN, C.N. **Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil**. *Water, Air, Soil Pollut.* 157: 315-330, 2004.

WANG, S.; MULLIGAN, C.N. **Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings**. *Process. Biochem.* 44: 296-301, 2009.

WU, J.; ZHANG, J.; WANG, P.; ZHU, L.; GAO, M.; ZHENG, Z.; ZHAN, X. **Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption.** *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40: 1611-1619, 2017.

YANG, R.; WANG, H.; SHI, M.; JIANG, Y.; DONG, Y.; SHI, L. **The biosurfactant rhamnolipid affects the desorption of sorbed As(III), As(V), Cr(VI), Cd(II) and Pb(II) on iron (oxyhydr)oxides and clay minerals.** *Int. Biodet. Biodegrad.* 153: 105019, 2020.

ZENTENO, M.C.; DE FREITAS, R.C.A.; FERNANDES, R.B.A.; FONTES, M.P.F.; JORDÃO, C.P. **Sorption of cadmium in some soil amendments for in situ recovery of contaminated soils.** *Water. Air. Soil Pollut.* 224:1418-1426, 2013.

ZHANG, Y.; MILLER, R.M. **Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant).** *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3276-3282, 1992.

ZHANG, M.K.; LIU, Z.Y.; WANG, H. **Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice.** *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41: 820-831, 2010.

ZHANG, C.; YU, Z. G.; ZENG, G.M.; JIANG, M.; YANG, Z.Z.; CUI, F.; HU, L. **Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability.** *Environ. Inter.* 73:270-281, 2014.

ZHANG, M.; FENG, Y.; ZHANG, D.; DONG, L.; PAN, X. **Ozone-encapsulated colloidal gas aphanes for in situ and targeting remediation of phenanthrene-contaminated sediment-aquifer.** *Water Res.* 160: 29-38, 2019.

ZHAO, F.; YUAN, M.; LEI, L.; LI, C.; XU, X. **Enhanced production of mono-rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* and application potential in agriculture and petroleum industry.** *Biores. Technol.* 323: 124605, 2021.

ZHEN, M.; TANG, J.; LI, C., SUN, H. **Rhamnolipid-modified biochar-enhanced bioremediation of crude oil-contaminated soil and mediated regulation of greenhouse gas emission in soil.** *J. Soils Sedim.* 21: 123-133, 2021.

ZHENG, S. A.; ZHENG, X.; CHEN, C. **Leaching behavior of heavy metals and transformation of their speciation in polluted soil receiving simulated acid rain.** *PLoS One* 7:1-7, 2012.

ZHU, W.; ZHENG, X.; LI, G. **Micro-bubbles size, rheological and filtration characteristics of Colloidal Gas Aphron (CGA) drilling fluids for high temperature well: Role of attapulgite.** *J. Petrol. Sci. Eng.*186: 106683, 2020.

## ANEXOS

## Anexo 1: Artigo 1

International Journal of Environmental Science and Technology (2021) 18:575–588  
<https://doi.org/10.1007/s13762-020-02889-5>

ORIGINAL PAPER



## Application of rhamnolipid surfactant for remediation of toxic metals of long- and short-term contamination sites

C. S. C. Lopes<sup>1</sup> · D. B. Teixeira<sup>1</sup> · B. F. Braz<sup>2</sup> · R. E. Santelli<sup>2</sup> · L. V. A. de Castilho<sup>3</sup> · J. G. C. Gomez<sup>4</sup> · R. P. V. Castro<sup>1</sup> · L. Seldin<sup>5</sup> · D. M. G. Freire<sup>1</sup>

Received: 9 August 2019 / Revised: 27 June 2020 / Accepted: 6 August 2020 / Published online: 25 August 2020  
 © Islamic Azad University (IAU) 2020

### Abstract

A rhamnolipid extract from *Pseudomonas aeruginosa* was tested on soils from short- and long-term contamination sites. Mass spectrometry analysis revealed a predominance of di-rhamnolipid congeners (85%), of which hydroxydecanoyl-hydroxydecanoate was the most abundant. Artificial contamination of a sandy soil resulted in final concentrations of arsenic, cadmium and zinc of 182, 20 and 983 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. The rhamnolipid showed a high extractive capacity for transition metals and metalloids, removing 53% of the arsenic, 90% of the cadmium and 80% of the zinc from the artificially contaminated soil. When tested against soil samples from a deactivated mining site, the rhamnolipid removed 59% of the arsenic, 57% of cadmium and 9% of zinc. The biosurfactant showed excellent biocompatibility with *Artemia salina*. Well diffusion tests demonstrated that the rhamnolipid was innocuous for commensal soil bacteria and yeast. A method for precipitation of As, Cd and Zn was tested to allow eco-friendly disposal of these metal(loid) contaminants. The precipitation method was able to remove all the arsenic and cadmium, while removing 84.5% of zinc in the biosurfactant solution. The possibility of applying this biosurfactant to soil remediation processes without purification steps and the development of new and rapid methods for metal precipitation are strategically important for the mining industry, to properly dispose or recycle metal contaminants and thus reduce the demand for new raw materials.

**Keywords** Rhamnolipid extract · Metal(loid) · Ecotoxicity · Chemical precipitation

### Introduction

Brazil maintains a strong mining industry. The country's prominent position in the international mineral market is due to its continental extent and wide range of geological environments, since half of the region has Precambrian terranes and high geodiversity (Alves et al. 2017).

Despite the wealth generated by the mining sector across the country, there is also great concern about environmental,

Editorial responsibility: Abhishek RoyChowdhury.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13762-020-02889-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ D. M. G. Freire  
[freire@iq.ufrj.br](mailto:freire@iq.ufrj.br)

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

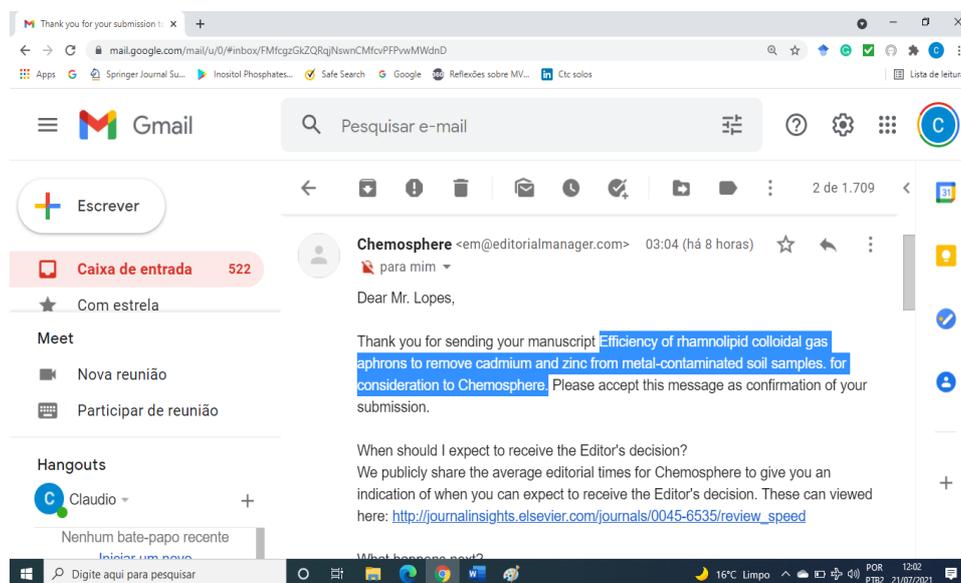
<sup>2</sup> Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup> Laboratório de Bioprodutos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Genética Microbiana, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Anexo 2: Artigo 2  
(submetido para a Chemosphere)



**Efficiency of rhamnolipid colloidal gas aphotons to remove cadmium and zinc from metal-contaminated soil samples.**

Claudio Sabbatini Capella Lopes<sup>a,b\*</sup>, Douglas Braga Teixeira<sup>a</sup>, Bernardo Ferreira Braz<sup>a</sup>, Ricardo Erthal Santelli<sup>a</sup>, Livia Vieira Araújo de Castilho<sup>a,c</sup>, José Gregório Cabrera Gomez<sup>d</sup>, Rui de Paula Vieira de Castro<sup>a</sup>, Lucy Seldin<sup>b</sup>, Denise Maria Guimarães Freire<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Engenharia Oceânica, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

<sup>d</sup> Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

\*Corresponding authors: Freire, D.M.G. & Lopes, C. S. C. Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biotecnologia Microbiana – 549-1 & 2, Instituto de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco A, Rio de Janeiro, RJ CEP 21941-909, Brazil  
e-mail: freire@iq.ufrj.br; claudioc.capella@gmail.com

### **Abstract**

Soil contamination by metal wastes represents a threat to the environment and to human health. Rhamnolipids have been recognized for its metal removal properties and presenting high biodegradability, however their application is sometimes hampered due to downstream cost production. In contrast, colloidal gas aphrons (CGAs) can serve as a cost-effective alternative to reduce the consumption of biosurfactants while also being significantly efficient in flushing off heavy metals in remediation processes. However, data concerning rhamnolipid CGAs, such as bubble diameter, stability, and percolation through porous media under water-wet conditions, are scarce. Until now, only a few studies have demonstrated the possibility of using biosurfactant CGAs to remediate metal-contaminated soils, and even fewer studies have compared its efficiency to previous methods where regular foam is applied. Therefore, a rotational central composite design was developed considering several variables and stability and bubble diameter as response parameters. Rotation speed and agitation time had a significant effect on the stability of aphrons, reaching over 600 s of stable CGA. Flow rate experiments showed a significant pressure drop when rhamnolipid CGAs were pumped through the remediation column. Soil column experiments demonstrated that rhamnolipid CGA exhibited a 38 % removal rate for cadmium and a 53 % removal rate for zinc after a percolation of 10 pore volumes at pH 9.0. Extraction of cadmium and

zinc was highly influenced by the number of pore volumes percolated. The application of rhamnolipid CGAs in metal-contaminated soils is imperative for a more efficient and environmentally friendly metal remediation process.

**Keywords:** Colloidal gas aphrons, rhamnolipid, soil washing, metal contaminants

## 1. Introduction

Soil contamination by metal wastes represents a threat not only to the environment but also to human health, especially through accumulation in food chains or contamination of water bodies (Sall et al., 2020). As a result, metal contaminants have raised several concerns worldwide while also increasing the demand for new methods to remove toxic metals from contaminated soils in an environmentally friendly way while also diminishing time operation and financial resources to promote a satisfactory remediation of a metal-contaminated terrain (Azevedo et al., 2020).

Soil washing is an *ex-situ* remediation method frequently used to address this type of contamination, and it is best suited to completely remove heavy metals from solid matrices while also allowing the return of socioeconomic activities of the terrain (Hou et al., 2015). However, many metal extraction agents are considered harmful to the soil microbiota or affect its chemical properties (Udovic and Lestan, 2012).

Under economic aspects some soil remediation methods use synthetic surfactants with metal extracting properties in certain contaminated areas, but most synthetic surfactants have a low biodegradability (Tiehm, 1994), which represents a drawback considering the socio-environmental context of the remediation process.

Biosurfactants are natural compounds derived from bacteria, yeast, and plants, and these natural substances have been recognized to be more biodegradable than synthetic surfactants while also presenting a lower critical micellar concentration (Sobrinho et al., 2013). Rhamnolipids are one of the most promising biosurfactants for

application in metal remediation steps due to several reports regarding their powerful tensioactive properties and interesting metal extraction properties (; Liu et al., 2018).

However, the high costs related to its large-scale production represent a major downside for its application in field remediation steps. One way to increase the economic viability of a soil washing procedure with rhamnolipids is to test the efficiency of rhamnolipid extracts produced with agro-industrial wastes as raw materials and without any purification steps. Considering the strong tensioactive properties of biosurfactants, it is possible to physically modify the composition of rhamnolipid micelles into a temporally colloidal state to increase their metal remediation properties.

Colloidal gas aphrons (CGAs) or microfoams are composed of highly stable microbubble dispersions, and the current literature has reported their effectiveness in remediating or mitigating oil spills in soils and sediments (Zhang et al., 2020). The application of CGAs in remediation methods is desirable due to their higher efficiency in removing contaminants from solid matrices while using less surfactant solution (Boonamnuyvitaya et al., 2009). However, there are only a few studies regarding the stability and bubble diameter of rhamnolipid CGA and even fewer reports about percolation of rhamnolipid CGA through porous media under water-wet conditions.

In the present study, several parameters were evaluated to test the best stability and bubble size diameter for the generation of CGAs using a rhamnolipid extract solution produced with agro-industrial substrates. Afterwards, a series of soil column experiments were performed to better understand the percolation of rhamnolipid colloidal gas aphrons and extract solutions through porous media and the efficiency of rhamnolipid CGA to extract metal contaminants from soil samples.

## **2. Materials and Methods**

## 2.1. Rhamnolipid production

A genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* strain LFM 634 (Honna, 2013) was used for rhamnolipid production. This modified strain, denoted 1201, was inoculated on Luria Bertani medium (HiMedia, Mumbai<sup>®</sup>) and incubated at 30 °C under agitation (180 rpm) for 24 h. Afterwards 5 mL of the bacterial growth was inoculated into a 1-L Erlenmeyer flask containing 300 mL of a pre-inoculum medium with the following composition (per liter): 1 g NaNO<sub>3</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g of yeast extract, 5 g of peptone, and 30 g of glycerol. Growth conditions consisted of incubation at 30 °C in a rotatory shaker at 180 rpm for 40 h. The absorbance of the bacterial growth was measured at 600 nm (Spectrophotometer MultiSpec – 1501; Shimadzu Corporation<sup>®</sup>, Japan), and the absorbance value was converted in cell concentrations (g/L) (Kronenberg, 2007). Subsequently, 30 mL of the pre-inoculum was added to a 1-L conical flask containing 270 mL of a minimal medium for rhamnolipid production. The minimal medium for the rhamnolipid production displayed the following composition (per liter): 30 g glycerol and 5.5 g NaNO<sub>3</sub>, respectively (C/N ratio of 15). The medium was also supplemented with the following composition (per liter): 7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The fermentation was carried out for 168 h at 180 rpm and 30 °C. The crude broth was stored at -22 °C prior to use in the remediation tests.

## 2.2. Rhamnolipid characterization

### 2.2.1. Rhamnolipid quantification by High-Performance Liquid Chromatography

Rhamnolipid (RL) in the crude extract was quantified indirectly by HPLC using rhamnose as the reference. The RL molecules were hydrolyzed with 10 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated at 100 °C for 4 h to release the rhamnose molecules; the reaction was

stopped by adding NaOH (10 mmol L<sup>-1</sup>). The samples were filtered with 0.22 µm syringe filters and analyzed by HPLC. L-rhamnose standards (Sigma-Aldrich) were also filtered and injected at concentrations of 100 to 5000 mg L<sup>-1</sup> to prepare a standard curve. The rhamnose concentration was converted to RL using a factor calculated from the data for RL congeners quantified by means of mass spectrometry (MS). Rhamnose was analyzed via HPLC using an Agilent Technologies 1260 Infinity system with a Bio-Rad HPX-87H Ion Exclusion Column, 300 mm × 7.8 mm at 45 °C, with the mobile phase consisting of an aqueous solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mmol L<sup>-1</sup>) at a flow rate of 6 mL/min and a refractive index detector (RID).

### *2.2.2. Determination of rhamnolipid congeners by mass spectrometry*

Total RLs were extracted as described previously (Déziel et al. 2003), with minor modifications. Briefly, cells were removed from the medium by centrifugation (10,000 rpm/10 min), and the supernatant was acidified to pH 3–4 with concentrated HCl. The RLs were extracted with a 1/3 volume of ethyl acetate. The organic extract was dried with anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and evaporated using a rotatory evaporator. The evaporation residue was dissolved in methanol/chloroform/2-propanol at a ratio of 1:2:4 containing 7.5 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>). Finally, the mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min to separate the impurities, and the supernatant was filtered through 0.22-µm syringe filters and stored. The extracted biosurfactant samples were analyzed by direct injection in a Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nanoelectrospray ion source using capillaries of a PicoTip Emitter (Glass Tip, 1P-4P, New Objective), with an ionization voltage of 3.5 kV and capillary transfer temperature of 180 °C. Each independent data-acquisition cycle consisted of a scan in Orbitrap under a mass-energy resolution of 60,000 (FWHM, m/z 400) with an m/z range of 100–

2000 Da, followed by fragmentation by tandem mass spectrometry (MS–MS) of the most abundant precursor ions by induced collision dissociation (ICD) in the linear trap or in the high-energy collision-induced dissociation cell (HCD). All samples were prepared in methanol at a ratio of 1:1 (v/v) containing 0.1 % glacial acetic acid. The chemical formula calculation from the measured values of  $m/z$  and extracted ion current data (EIC) was performed using Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). High-resolution EIC was obtained by processing the MS complete scanning data using potential rhamnolipid ions with 10 ppm mass tolerance (Strohalm et al. 2008)

### *2.2.3. Surface tension and critical micellar concentration determination*

The following parameters were analyzed to compare the respective tensioactive properties of the products: surface tension (ST) and critical micellar concentration (CMC). The ST was determined using the pendant-drop technique (DSA 100S Goniometer model OF 3210) according to Song and Springer (1996). The results were expressed as the mean value of at least ten pendant drops at 23 °C and 55 % relative humidity. Based on the ST values of serially diluted crude rhamnolipid extract solutions, the CMC was determined by plotting the surface tension versus the concentration of RL in the solution, according to Sheppard and Mulligan (1987).

## *2.3. Production of rhamnolipid CGA*

### *2.3.1. Statistical Experimental Design (DOE) of the CGA parameters*

Based on previous studies regarding the stability and average bubble size diameter (Bd) of CGAs (Feng et al., 2009), with rhamnolipid CGAs, a rotational central composite design (RCCD) with five central points (c) was established based on the following variables: rotation (6000-12000 rpm), pH (6-9), and agitation time (30-120 s). The

response parameters were stability and average bubble size diameter (table 1). Statistica software, version 7.0 (StatSoft, USA), was used to develop and analyse the experimental designs.

### *2.3.2. Generation of rhamnolipid CGAs*

The rhamnolipid CGAs were produced according to the methodology described by Sebba (1985). The initial volume of the rhamnolipid extract was 150 mL. All experiments were conducted at room temperature ( $25 \pm 0.2$  °C). An automatic high-speed disperser was used to generate the microbubble dispersion (Ultra Turrax IKA T25 Digital Staufen, Germany) with a maximum speed of 24000 rpm. The disperser was maintained at a fixed height based on the lab shelf during all the CGA experiments.

### *2.3.3. Stability and bubble size measurements*

Stability was measured following the methodology proposed by Sebba (1987). After the rhamnolipid was stirred for a specific amount of time, the dispersion was transferred to a 150 mL graduated cylinder for measurement of the drainage liquid of the CGA. The stability of the microbubble system was quantified as the time taken for half of the liquid to drain from the dispersion, i.e., the half-life ( $L1/2$ ). For stability measurements each RCCD assay was performed six times.

Bubble size measurements were performed according to Feng et al. (2009). After generation of a microbubble dispersion, a 3 mL aliquot was placed in a cavity glass slide under a light microscope (Axioscopic, model-40, Zeiss, Germany) operating under standard mode with 4 X magnification and coupled to a photographic camera (Axiocam ICC-1, Zeiss). A total of 5 photographs were taken for each RCCD assay and a total of

300 bubbles were counted per assays. The respective diameter was measured using Microscope software axiovision<sup>®</sup> version 4.6.3 (Zeiss). Afterwards, the average bubble size diameter was recorded for later analysis.

#### *2.4. Physicochemical properties of the soil samples*

To establish an artificial contamination protocol simulating a short-term contamination site, a sandy soil sample, classified according to the USDA soil classification (USDA Soil Survey Staff 1999), was kindly provided by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA AGROBIOLOGIA). The sample was air-dried for 24 h and sieved with a 2 mm-mesh sieve to separate the coarse sand and stone. Additionally, the physicochemical properties of the soil sample were characterized using standard methods (EMBRAPA, 1997) and are listed in Table 2. The amount of Cd and Zn in the sandy soil was extracted following the United States Environmental Protection Agency method 3051A (USEPA, 2007) and analysed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) (Table 2).

##### *2.4.1. Soil artificial contamination*

To establish a contamination protocol simulating a short-term contamination site, salts of Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O and Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O were used to prepare two separate solutions of cadmium (40 mg L<sup>-1</sup>) and zinc (1000 mg L<sup>-1</sup>). Then, 4 kg of sandy soil was weighed in a plastic container and mixed with all three metal solutions. The mixture was stirred for 3 weeks and then allowed to stand for 3 months.

To simulate field conditions, the contaminated soil was percolated by artificial rain in a column washing system, according to Zhen et al. (2012), with modifications.

The artificial rain was based on a variety of inorganic salts as described by Oorts et al. (2007). The contaminated soil was packed in a 20-cm plexiglass cylinder. For every 3 cm of sandy soil that was loaded into the column, nylon nets 5 cm in diameter with a pore size of 3 mm were inserted to prevent flow channelling when the artificial rain was percolated through the column. Based on previous assays, the contaminated soil was percolated with exactly four times its pore volume (4 PV) with artificial rain to mimic natural soil leaching conditions.

The calculated pore volume was 135 mL for every 574 g of soil. After percolation by artificial rain, the contaminated soil was mixed once again and allowed to stand for 96 h at 25 °C. The soil samples were then dried at 40 °C for 24 h and extracted following the USEPA 3051A method. The concentrations of Cd and Zn in the contaminated soil samples were analysed by ICP OES.

## *2.5. Percolation assays*

### *2.5.1. Flow rate assays*

Percolation assays were performed by packing another remediation column with sandy soil (soil mass: 125 g/L PV=38 mL) and then percolating it with either rhamnolipid CGA or rhamnolipid extract solution at different flow rates (10, 15, 18, 30, 40, 45, 49, 58, 64, 78, 115 and 130 mL min<sup>-1</sup>). A pressure gauge was installed at the entry of the soil column, and once the desired flow rate was selected, the peristaltic pump was turned on. After the pressure inside the column was stabilized (3-5 s), the pressure build-up was recorded. Each flow rate was tested in triplicate.

### *2.5.2. Soil remediation assays*

Two separate soil column experiments were performed to evaluate the metal remediation efficiency of rhamnolipid CGA and rhamnolipid solution in its liquid state, considering the starting pH 9.0 and number of pore volumes (PV: 4-10). In the first set of experiments based on previous experiments regarding the stability and bubble size diameter of rhamnolipid CGAs, the rotation speed and agitation time were maintained constant (12000 rpm/120 s).

In the second set of experiments, the rhamnolipid extract in its liquid state was tested for its efficiency in removing metal contaminants from short-term contaminated sites. Finally, the contaminated soil was percolated by deionized water adjusted to pH 9.0 at the exact corresponding number of pore volumes of the rhamnolipid solution and CGA (negative control). The amount of contaminated soil submitted to remediation assays was 125 grams, the column height was 5 cm, and the calculated pore volume was 38 mL.

Then, all remediated soil samples were homogenized separately and dried at 40 °C for 24 hours. All remediated soil samples were submitted to extraction procedures according to the USEPA 3051A method. The concentrations of Cd and Zn in the soil samples were analysed by ICP OES. The results and standard deviation are expressed as the mean average of triplicate assays. The following data were statistically analysed using ANOVA and averages *post hoc* compared using HSD-Tukey test (5 % of probability), using *Statistica7.0* software. Finally, the results were converted to percentage values, and removal rates were defined as the percentage of metal removal from the rhamnolipid CGA or rhamnolipid solution and deduced from the removal rate of water at pH 9.0 (negative control).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Characterization of the rhamnolipid extract

Quantification of rhamnolipid in the crude extract by HPLC demonstrated a concentration of  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  (0.5 %) of the biosurfactant and a CMC of  $72 \text{ mg L}^{-1}$ . MS analysis revealed the presence of several congeners within the rhamnolipid extract, with fatty acid chain lengths ranging from  $\text{C}_8\text{-C}_{10}$  to  $\text{C}_{12}\text{-C}_{10}$ . The most abundant di-rhamnolipid congener was Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ , while the most abundant mono-rhamnolipid congener was Rha $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ . The proportions of mono- and di-rhamnolipid congeners were 15 and 85%, respectively (Table 3). There have been reports of different rhamnolipid congeners with application in the remediation of metal contaminants. Wu et al. (2017) described a rhamnolipid extract produced by solid-state fermentation, which showed metal binding properties. Nevertheless, until now, few works have demonstrated the characterization of rhamnolipid extracts with metal binding properties, which opens the perspective for new insights regarding the remediation of metal wastes from soil samples. In a previous study by our group, several microscale assays demonstrated that a rhamnolipid extract produced using agro-industrial wastes without any purification steps, presenting 85% di-rhamnolipid congener and 15% mono-rhamnolipid congener exhibited metal binding activity towards cadmium and zinc (Lopes et al., 2020).

#### 3.2 Stability and bubble size diameter of rhamnolipid CGAs

Colloidal gas aphrons are influenced by several parameters, and even a subtle change in certain conditions can promote different outcomes regarding the stability and bubble size diameter of the macrofoam dispersion. In the present study, an RCCD was developed considering the parameters that could play a role in CGA stability and bubble size diameter. Rotation speed had a significant effect on the stability of aphrons, as well

as agitation time . Rhamnolipid CGAs reached its maximum half-life (600 s) when 10786-12000 rpm was applied over a period of 102-120 s. Increasing the rotation speed and agitation time specially between 75 and 120 seconds, resulted in higher stability values (fig. 1A). Additionally, between 5000 and 8500 rpm within a stirring time of 30-120 s, an increase in the half-life of rhamnolipid CGA was observed with an average half-life of 400 s (Fig. 1A).

Several parameters may influence the stability and average bubble size of microfoams and ultimately affect their field applications. Previous studies have focused on observations based on fixed conditions of rotation speed, stirring time and pH. However, the application of an RCCD is useful to understand how different variables may simultaneously affect important CGA properties. To date, there has been scarce information regarding the behaviour of rhamnolipid CGA when submitted to binominal stirring time and stirring speed. Both parameters are of special interest to reduce time and energy to promote microfoams with satisfactory stability. According to the stability results presented by Feng et al. (2009), a rhamnolipid CGA generated under fixed conditions of 8000 rpm for 180 s at an initial concentration of 0.4 % reported an average stability of 400-500 s. These stability values are in accordance with the present results; however, based on the data presented, it is also possible to obtain microfoams with a satisfactory half-life even under stirring times of less than 180 seconds, evidencing the possibility of optimizing the generation of stable colloidal dispersions using shorter time intervals, which is desirable for field applications.

According to Matsuthita et al. (1992), stirring time does not have an influence on the half-life of aphon dispersions. However, based on stability assays performed with a synthetic surfactant (cetyltrimetyl ammonium bromide 0.4 %), the authors reported a

significant increase in the stability of the CGA as the stirring speed was elevated from 5000 to 5500 rpm, within the same time stirring of the present study (30-120s).

In the present study, considering the higher stirring speed range tested in the present study (5000-8500 rpm) and the same stirring time tested, the stability of the CGA dispersions was similar (~300 s); however, when the biosurfactant was submitted to higher velocities under 30-120 s, a significant improvement in the half-life of the CGAs was observed (Fig. 1A). Thus, it can be inferred that stirring time influences the half-life of CGAs under stirring velocities between 9000 and 12000 rpm. Moreover, the binomial stirring speed and stirring time may play a role in the stability of a rhamnolipid CGA, especially under higher stirring velocities and stirring times between 30-120 s.

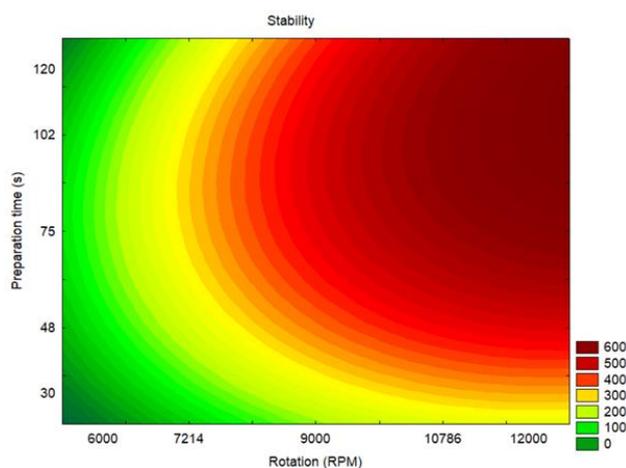
Recently, Keshavarzi et al. (2019) reported the influence of stirring speed on the stability of CGAs generated from synthetic cationic and anionic surfactants. It was demonstrated that optimum half-life values were obtained between 11000 and 12000 rpm, and by further agitation at 13000 rpm, there was a significant reduction in the stability of the CGA suspensions. Until now, there has been scarce information regarding the influence of the maximum stirring speed and rotation time on the half-life of CGAs; however, it can be inferred that rotation speeds above 12000 rpm may play a role in the stability of microfoams, especially under stirring conditions above 102 seconds.

Regarding the influence of pH (5.8-9.0), no positive or negative influence was observed on the stability of the rhamnolipid colloidal gas aphrons (Fig. 1B). This was also observed by previous authors when experimenting with synthetic anionic surfactants (Save and Pangarkar, 1994; Jauregi et al., 1997). Feng et al. (2009) studied the stability of rhamnolipid CGA and reported that alkaline conditions could have a negative influence on the stability of rhamnolipid CGA. The authors discussed the

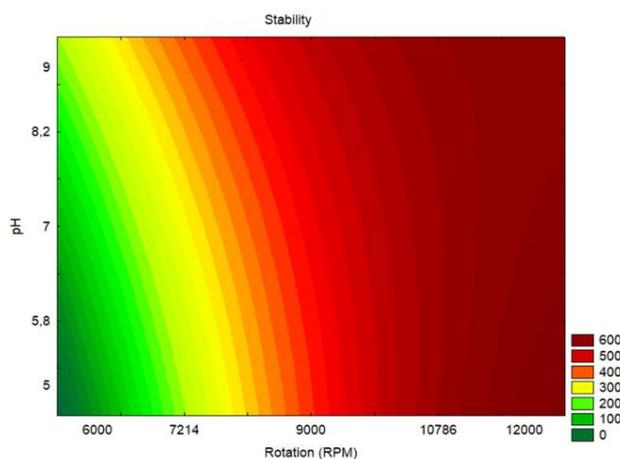
negative influence of alkaline pH on the stability of CGAs based on the previous study of Champion et al. (1995), who reported that the dissociation of rhamnolipid at pH 8.0 promotes electrostatic repulsion between adjacent ionized carboxyl groups of the molecule. The authors further stated that when rhamnolipid CGAs were generated under alkaline conditions, these electrostatic repulsions promoted a significant reduction in the concentration of rhamnolipid at the bubble surface and decreased the viscosity and elasticity of the bubble surface, which ultimately led to bubble coalescence.

However, Feng et al. (2009) used NaOH to prepare alkaline solutions of rhamnolipids and generate rhamnolipid microfoams under alkaline conditions, whereas in the present study, NH<sub>4</sub>OH was used to subject the rhamnolipid extract to these same conditions. Thus, having not observed any significant changes in the stability of the rhamnolipid microfoams, it is possible that the partial dissociation of NH<sub>4</sub>OH may have played a role in the stability of rhamnolipid microfoams, as the hydrophilic region of the rhamnolipid molecule was not fully dissociated under the alkaline conditions tested, resulting in less electrostatic repulsion between the hydrophilic portions and thus not promoting any significant modifications in the viscosity and elasticity of the microbubble surface. Additionally, there has been previous studies demonstrating the influence of sodium chloride (NaCl) upon the micellization process of rhamnolipids at pH 6.8. The presence of electrolytes with a total dissociation property, promotes an increase of size and number of rhamnolipid micelles due to reduction of the electrostatic repulsion between hydrophilic heads of the biosurfactant molecule (Helvacı, Peker and Özdemir, 2004). But again its not confirmed if the same effect is possible to occur under strong alkaline conditions, and if it could imply in a reduction the stability of rhamnolipid CGA.

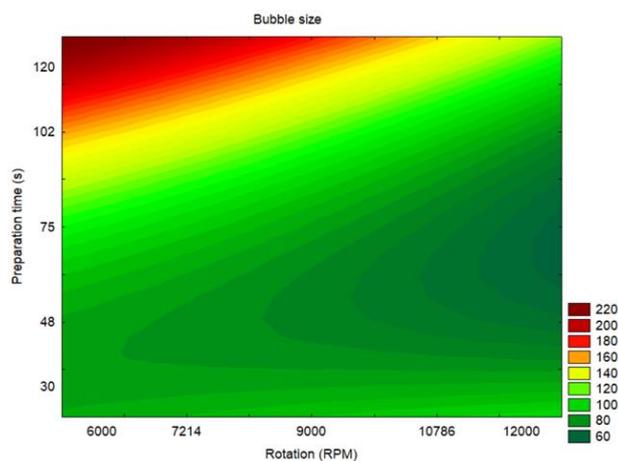
Regarding average bubble size diameter of the rhamnolipid CGA dispersion, it was observed that the higher and lower bubble size of the rhamnolipid CGAs ranged from 60-220  $\mu\text{m}$  (Fig. 1C). The average bubble diameter was affected by the rotation speed and agitation time. The average bubble size diameter of rhamnolipid CGA fluctuated between 100 and 60  $\mu\text{m}$  within an agitation time of 30 to 75 s and rotation speeds of 6000 and 12000 (Fig. 1C). These average sizes for rhamnolipid CGAs are in accordance with results presented by Feng et al. (2009) however, within the agitation time of 102 and 120 s as more rotational kinetic energy was applied towards the rhamnolipid extract bubble size average was affected, producing larger rhamnolipid CGAs, and reaching over 220  $\mu\text{m}$ . However, between 10786 and 12000 rpm, the size of the rhamnolipid CGA decreased by 120  $\mu\text{m}$ , demonstrating a saturation tendency towards the amount of rotation speed, which can influence the average size of rhamnolipid CGAs. Keshavarzi et al. (2019) also reported that higher velocities and agitation time could affect bubble average diameter, as more shear forces could influence the average bubble diameter within the microfoam dispersions. The authors reported that at 13000 rpm, there was a reduction in the bubble size average of the CGAs produced using the synthetic surfactants SDS and Triton-X, which is in accordance with the results in the present study.



**Fig. 1A.** Response surfaces for stability of rhamnolipid CGA. Rotation speed versus rotation time.



**Fig. 1B.** Response surfaces for stability of rhamnolipid CGA. Rotation versus pH.

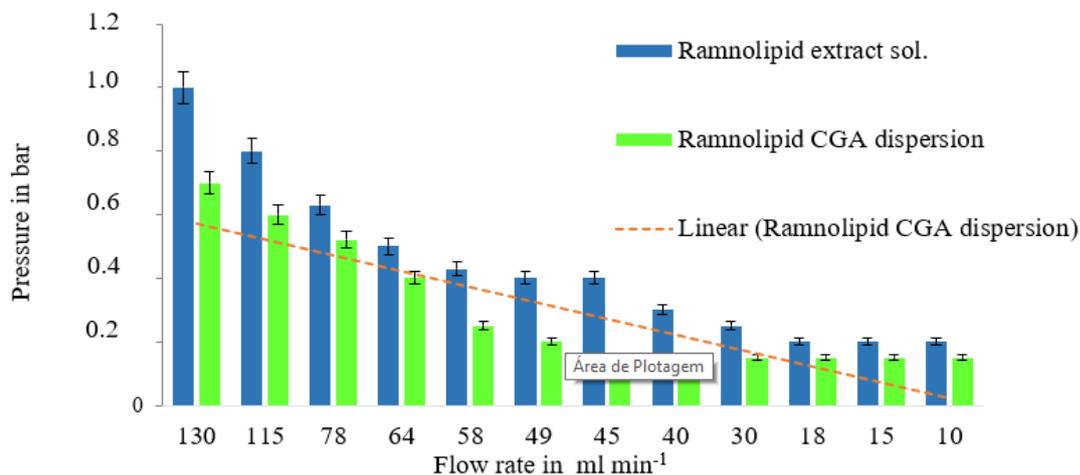


**Fig. 1C.** Response surface for bubble size diameter rhamnolipid CGA dispersion. Rotation versus agitation time

*3.3 Soil washing experiments with the rhamnolipid CGA dispersion and rhamnolipid extract solution.*

### 3.3.1 Flow rate experiments

In the present study, several flow rate assays were conducted to evaluate the performance of a rhamnolipid CGA and a rhamnolipid extract in a liquid state when submitted to metal-contaminated soil. After selecting the best conditions for CGA stability and average bubble diameter, a series of percolation experiments were conducted under different flow rates, and the respective pressure build-up was recorded to better evaluate the suitable flow rate for percolation of the rhamnolipid extract and rhamnolipid CGA through the remediation column. Between the flow rates of 30 and 130 mL min<sup>-1</sup>, a significant pressure drop was always observed when rhamnolipid CGA was pumped through the remediation column (Fig. 2) compared to the rhamnolipid extract solution. However, this was not observed under a flow rate of 10-12 mL min<sup>-1</sup>; thus, this was the flow rate throughout the rest of the remediation assays. Additionally, the remediation assays, when performed under a low flow rate (10-12 mL min<sup>-1</sup>), led to a significant amount of time dispended and were significantly laborious, while increasing the flow rate to 20-30 mL min<sup>-1</sup> generated pressure build-up, channelling, and obstruction points inside the remediation column. Shivhare and Kuru (2014) studied the effect pressure build-up of a nonaqueous GCA when percolated trough porous media, and the authors also reported that as the volume of CGA fluid increased, the pressure drop across the porous media also increased.

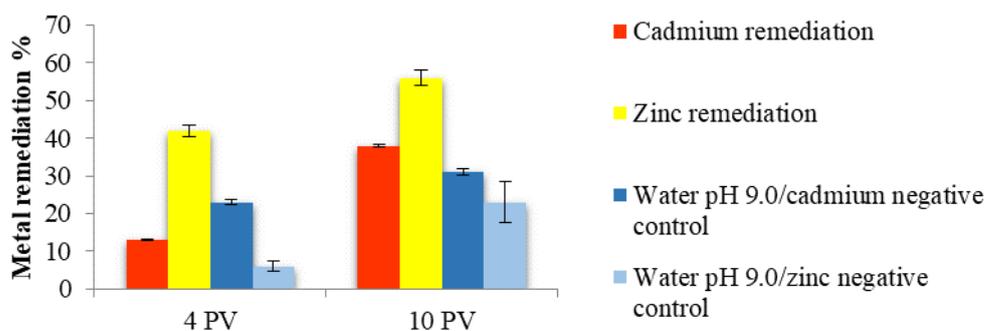


**Fig.2.** Pressure drop of rhamnolipid CGA in comparison to rhamnolipid extract. Down flow mode.

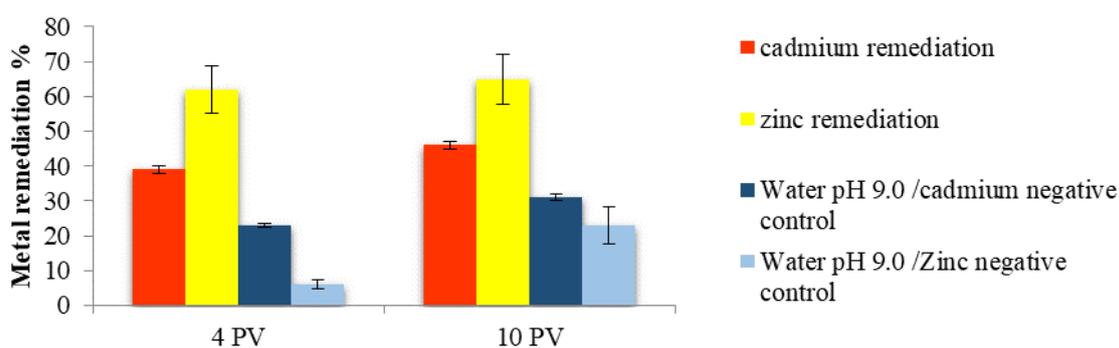
Mukhopady et al. (2015) also reported the influence of channeling and pressure build-up when flow rates above 18 ml min<sup>-1</sup> were applied to a packed remediation column containing a soil sample contaminated by arsenic.

### 3.3.2 Metal remediation efficiency of rhamnolipid CGA dispersions

A sandy soil sample was artificially contaminated to simulate a short-term contamination site and percolated by artificial rain to simulate field conditions. The final concentrations of cadmium and zinc were 39 and 511 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. Percolation of 4 PV of rhamnolipid CGA dispersion resulted in a removal rate of 13 %, which was considered inferior in comparison to the negative control and thus considered a insignificant remediation, however after percolation of 10PV a remediation of 38% was observed (fig. 3A). The removal rate of zinc after 4PV was 42% and after 10PV 53 % (fig. 3A). The rhamnolipid solution at pH 9.0 exhibited the following removal rates for cadmium: 39 and 46 % and for zinc: 62 and 67 % (fig. 3B). Throughout the experiment, the average time to percolate 4 pore volumes of CGA dispersion or rhamnolipid extract solution was 3-4 hours, and percolation assays of 10 pore volumes took an average of 6-8 hours.



**Fig.3A.** Metal remediation percentage of Rhamnolipid CGA (0.5%) pH 9.0; PV:Pore volume



**Fig. 3B.** Metal remediation percentage of Rhamnolipid solution (0.5%) pH 9.0; PV:Pore volume

Colloidal gas aphrons are composed of 40-70 % gas content, high stability, and resistance towards shear forces (Feng et al., 2009). Regular foams, which are formed by the expansion of gas content involved in a thin and continuous surfactant liquid phase, have been successfully applied in the soil remediation process (Mulligan and Wang, 2006). However, their low stability is a drawback for field applications since foams are a thermodynamically metastable system (Vignes-Adler and Weaire, 2008).

CGAs have been reported as a more stable foam structure due to their triple shell conformation, where the internal film containing a surfactant monolayer displays its hydrophobic tail oriented towards the gas phases and the external film consists of a double-layered hydrophilic shell facing the aqueous medium (Jauregi et al., 2000). Until

now, few studies have demonstrated the possibility of using biosurfactant microfoams to remove metal from soil samples, and even fewer studies have compared its efficiency to previous methods in which regular foam was applied.

In a soil flushing experiment with metal-contaminated sand, Haryanto et al. (2014) demonstrated the efficiency of regular foam produced with biosurfactants to remove cadmium from the contaminated site. The authors reported a removal rate of cadmium of 20% when the biosurfactant surfactin was applied, while rhamnolipid foams removed 40% of cadmium from contaminated sand samples after percolation of 24 pore volumes. Based on the present results, it can be demonstrated that colloidal gas aphrons can display a similar soil remediation efficiency when compared to previous studies that applied regular foam as a metal extraction agent, however spending less surfactant solution to achieve almost the same results in terms of soil remediation. This is due to its unstable characteristics and higher tendency towards coalescence of regular foams when compared to colloidal gas aphrons.

Maity et al. (2013) reported a metal remediation efficiency of 56 % towards zinc after 48 hours of contact of saponin foams with metal-contaminated soil samples. In the present study, 10 pore volumes were percolated in approximately 6-8 hours, demonstrating that while both methods could result in significant remediation percentages of Zn, rhamnolipid CGA dispersion are less time-consuming, which can be inferred in a more practical approach for metal removal in large scale remediation methods. Mukhopady et al. (2015) compared the remediation efficiency of colloidal gas aprons and a saponin extract to remove arsenic from soil samples, when percolated in down flow mode. According to the authors in both situations percolation in a descendent mode was favored by gravity and thus the water flow properties of colloidal gas aphrons implicated in a similar remediation between the saponin extract and the

saponin colloidal gas aphrons. This was also demonstrated in the present study. The rhamnolipid extract and the rhamnolipid colloidal gas aphrons when percolated in down flow mode exhibited a similar remediation efficiency for cadmium and zinc after the percolation of 10 PV.

Based on the present results, it can be demonstrated that water flow conditions also played a role in the remediation of rhamnolipid solution and rhamnolipid CGA. Column remediation assays demonstrated a similar percolation pattern; hence, remediation of cadmium and zinc was considered similar. Recently, Pasdar et al. (2019) used schematic micromodel patterns to study the role of sodium dodecyl sulfate and sodium dodecyl benzene sulfonate CGAs in controlling fluid invasion under water and oil-wet conditions. Microscopic observations revealed that CGA dispersions perform better under oil wet conditions than under water wet conditions, which is a condition more suited for metal-contaminated terrains.

### *3.3.3 Influence of number pore-volume*

The number pore volume had a significant influence on the extraction of metal contaminants. The continuous washing procedure by a biosurfactant with metal binding properties such as the rhamnolipid molecule affects metal mobilization by permitting continuous contact of the biosurfactant with the soil samples, which contributes to metal desorption. In the rhamnolipid extract solution experiment and the CGA rhamnolipid experiment, the number of pores progressively increased, and the percentage of cadmium and zinc was removed from the soil (Fig. 3). Recently in a metal contaminated sandy loam sample, Ugwu *et al.*, (2021) demonstrated the extraction of 63% of Cd after percolation of 10 PV of a rhamnolipid solution. In a column flushing experiment, Wang and Mulligan (2009) reported a significant amount of arsenic, copper, lead, and zinc

removal from a mine tail sample after percolation of a 70-pore volume of a 0.1 % rhamnolipid solution with an initial pH of 11.0. Tang et al. (2019) also observed that after multiple washes with two biosurfactants, considerable amounts of copper, zinc, chromium, lead, nickel, and manganese were removed from metal-contaminated sludge.

#### 4. Conclusions

The increasing extraction of metal ores has led to a worldwide demand for new methods to remove or mitigate the hazards of metal contaminants from soils. Such methods need to be in line with future strategies aimed at reforestation or resumption of existing socioeconomic activities. The development of natural substances with significant biodegradability and metal extraction properties has become extremely interesting for these strategies.

In the present study, a rhamnolipid extract produced with agro-industrial waste was submitted to modification of its physical structure into CGA dispersion, and several parameters were evaluated to determine the best condition for application in an *ex-situ* soil washing method. Based on the present results, high rotation speeds during a short period of time can influence the stability and bubble diameter of rhamnolipid CGA. Additionally, alkaline conditions did not play an important role in the stability and bubble diameter of the CGAs. The binomial rotation speed and agitation time increases the average size of the rhamnolipid CGA to a point where afterwards the rhamnolipid microbubbles start to decrease its average size, demonstrating a saturation tendency towards the amount of rotation speed and agitation time which can produce large rhamnolipid CGAs with an the average size of 200  $\mu\text{m}$ .

Soil column experiments regarding the pressure build-up behaviour of the rhamnolipid CGA and the rhamnolipid extract demonstrated that during percolation

under several flow rates, a significant pressure drop was observed when flow rates between 30- and 130-ml min were applied for the rhamnolipid CGA. The rhamnolipid microfoam exhibited a superior efficiency for metal remediation of metallic contaminants (cadmium and zinc) when compared to previous studies regarding metal remediation of regular foams. Likewise, soil column experiments demonstrated that the rhamnolipid extract was also efficient in removing cadmium and zinc from a short-term contaminated site.

Ultimately, this study opens the prospect of applying a rhamnolipid extract as microfoams in remediation processes of metal-contaminated soils. In addition, there is increasing knowledge about parameters related to the remediation efficiency of rhamnolipid microfoams and features related to microfoam percolation through porous media, such as low-pressure accumulation and efficient and rapid remediation of metals from contaminated soils.

### **Acknowledgements**

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES). The authors are also grateful to the laboratories of the Technology Center (CT) and Center of Health Science (CCS) at Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

Grant number:141502/20169.

<http://efomento.cnpq.br/efomento/login.do?metodo=apresentar>

### **References**

- Azevedo, D. C. B. D., Toledo, G. D. A., Cohen, S. C., Kligerman, D. C., Cardoso, T. A. D. O., 2020. Brumadinho disaster: contributions to public policies and sanitation management in emergency periods. *Saúde Debate*. 44, 221-233.
- Boonamnuayvitaya, V., Jutaporn, P., Sae-ung, S., Jarudilokkul, S., 2009. Removal of pyrene by colloidal gas aphrons of a biodegradable surfactant. *Sep. Purif. Technol.* 68,411-416.
- Champion, J. T., Gilkey, J. C., Lamparski, H., Retterer, J., Miller, R. M., 1995. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane. *J. Colloid. Interface Sci.* 170,569-574.
- Déziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanooyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* 149, 2005–2013.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 1997. Manual de métodos de análise de solo, 2nd ed. Centro Nacional de Pesquisas de Solos, Rio de Janeiro, Brazil.
- Feng, W., Singh, N., Swift, S., 2009. Drainage mechanism of microbubble dispersion and factors influencing its stability. *J. Colloid. Interface Sci.* 337,548-554
- Haryanto, B., Chang, C. H., 2014. Foam-enhanced removal of adsorbed metal ions from packed sands with biosurfactant solution flushing. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45, 2170-2175.
- Helvacı, Ş. Ş., Peker, S., Özdemir, G., 2004 Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloid. Surf. Biointerface.* 35, 225-233.
- Honna CY (2013) Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de rhamnolipídeos. Dissertation, Universidade de São Paulo. doi: 10.11606/D.42.2013.tde-26062014-112650.

- Hou, D., Al-Tabbaa, A., Hellings, J., 2015. Sustainable site clean-up from megaprojects: lessons from London 2012. In Proceedings of the Institution of Civil Engineers- engineering sustainability. ICE Virtual Library, London. 168, pp.61-70.
- Jauregi, P., Mitchell, G. R., Varley, J., 2000. Colloidal gas aphanes (CGA): dispersion and structural features. *AIChE J.* 46, 24-36.
- Jauregi, P., Gilmour, S., Varley, J., 1997. Characterization of colloidal gas aphanes for subsequent use for protein recovery. *Chem. Eng. J.* 65, 1-11.
- Keshavarzi, B., Javadi, A., Bahramian, A., Miller, R., 2019. Formation and stability of colloidal gas aphan based drilling fluid considering dynamic surface properties. *J. Petrol. Sci. Eng.* 174, 468-475.
- Kronenberg, F. A., 2007. Produção de rhamnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. Thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Liu, G., Zhong, H., Yang, X., Liu, Y., Shao, B., Liu, Z., 2018. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 796-814.
- Lopes, C. S. C., Teixeira, D. B., Braz, B. F., Santelli, R. E., de Castilho, L. V. A., Gomez, J. G. C., Castro, R.P.V., Seldin, L., Freire, D. M. G., 2020. Application of rhamnolipid surfactant for remediation of toxic metals of long- and short-term contamination sites. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 1-14.
- Matsushita, K., Mollah, A.H., Stuckey, D.C., Del Cerro C., Bailey, A.I, 1992. Predispersed solvent extraction of dilute products using colloidal gas aphanes and colloidal liquid aphanes: aphan preparation, stability and size. *Colloids Surf.* 69, 65-72.
- Maity, J. P., Huang, Y. M., Hsu, C. M., Wu, C. I., Chen, C. C., Li, C. Y., Jean, J., Chang, Y., Chen, C. Y. (2013). Removal of Cu, Pb and Zn by foam fractionation and a soil

- washing process from contaminated industrial soils using soapberry-derived saponin: a comparative effectiveness assessment. *Chemosphere*. 92, 1286-1293.
- Mukhopadhyay, S., Mukherjee, S., Hashim, M. A., Gupta, B. S., 2015. Application of colloidal gas aphon suspensions produced from *Sapindus mukorossi* for arsenic removal from contaminated soil. *Chemosphere*. 119,355-362.
- Mulligan, C. N., Wang, S., 2006. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Eng. Geol.* 85, 75-81.
- Oorts, K., Ghesquiere, U., Smolders, E., 2007. Leaching and aging decrease nickel toxicity to soil microbial processes in soils freshly spiked with nickel chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1130–1138.
- Pasdar, M., Kamari, E., Kazemzadeh, E., Ghazanfari, M. H., Soleymani, M., 2019. Investigating fluid invasion control by Colloidal Gas Aphron (CGA) based fluids in micromodel systems. *J. Nat. Gas Sci. Eng.* 66, 1-10.
- Save, S. V., Pangarkar, V. G., 1994. Characterization of colloidal gas aphon. *Chem. Eng. Commun.* 127, 35-54.
- Sall, M. L., Diaw, A. K. D., Gningue-Sall, D., Efremova Aaron, S., Aaron, J. J., 2020. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 29927-29942.
- Sebba, F., 1987. *Foams and Biliquid Foams*. Chichester, UK Wiley
- Sebba, F., 1985. Improved generator for micron-sized bubbles. *Chem. Ind.* 91-92.
- Sheppard, J.D., Mulligan, C. N., 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 110–116  
doi:10.1007/BF0025193

- Shivhare, S., Kuru, E., 2014. A study of the pore-blocking ability and formation damage characteristics of oil-based colloidal gas aphron drilling fluids. *J. Pet. Sci. Eng.* 122, 257-265.
- Sobrinho, H. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Porto, A. L. F., Sarubbo, L. A., 2013. Biosurfactants: classification, properties and environmental applications. *Recent. Dev. Biotechnol.* 11,1-29.
- Strohalm, M., Hassman, M., Košata, B., Kodíček, M., 2008. Mass data miner: an open-source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 905-908.
- Tang, J., He, J., Qiu, Z., Xin, X., 2019. Metal removal effectiveness, fractions, and binding intensity in the sludge during the multiple washing steps using the combined rhamnolipid and saponin. *J. Soils Sediments.*, 19, 1286-1296.
- Tiehm, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60,258–263
- Udovic, M., Lestan, D., 2012. EDTA and HCl leaching of calcareous and acidic soils polluted with potentially toxic metals: remediation efficiency and soil impact. *Chemosphere*, 88, 718-724.
- United States Department of Agriculture – USDA Soil Survey Staff (1999) Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2nd edition. Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 436. U. S. Government Printing Office, Washington, DC.
- United States Environmental Protection Agency – USEPA (2007) Method 3051A – Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils.
- Vignes-Adler, M., Weaire, D., 2008. New foams: Fresh challenges and opportunities. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13, 141-149.

- Wang, S., Mulligan, C. N., 2009. Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process. Biochem.* 44, 296-301.
- Wu, J., Zhang, J., Wang, P., Zhu, L., Gao, M., Zheng, Z., Zhan, X., 2017. Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40, 1611-1619.
- Zhang, M., Feng, Y., Zhang, K., Wang, Y., Pan, X., 2020. Impact of salinity on colloidal ozone apheresis in removing phenanthrene from sediments. *J. Hazard. Mater.* 384, 121436.
- Zhen, M., Tang, J., Li, C., Sun, H., 2021. Rhamnolipid-modified biochar-enhanced bioremediation of crude oil-contaminated soil and mediated regulation of greenhouse gas emission in soil. *J. Soils Sedim.* 21, 123-133.

**Table 1.**

Rotational central composite design for determination of the optimum stability and bubble size diameter.

Assays	Rotation (rpm)	pH	Agitation time (s)
1	7214	5.8	48
2	7214	5.8	102
3	7214	8.2	48
4	7214	8.2	102
5	10786	5.8	48
6	10786	5.8	102
7	10786	8.2	48

8	10786	8.2	102
9	6000	7.0	75
10	12000	7.0	75
11	9000	5.0	75
12	9000	9.0	75
13	9000	7.0	30
14	9000	7.0	120
15 (c)	9000	7.0	75
16 (c)	9000	7.0	75
17 (c)	9000	7.0	75
18 (c)	9000	7.0	75
19 (c)	9000	7.0	75

---

(c) Central points of the RCCD

---

**Table 2.**

Physicochemical characteristics of the soil samples

Soil type	Sandy
pH	5.1
C (%)	1.2
Porosity (%)	44
CEC (cmolcdm <sup>-3</sup> )	6.3
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	7.3
K (mg kg <sup>-1</sup> )	34
Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	330

Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	106
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	1.2
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	22

---

C<sup>(%)</sup>: Total soil organic carbon content; CEC: Cation exchange capacity

---

**Table 3.**

Identification of rhamnolipid congeners produced by *P. aeruginosa*. 1201 through mass-spectrometry analysis.

Molecular ion m/z [M-H]	Relative quantitative (%) <sup>a</sup>	Rhamnolipid congener		
393.2	14.02	Rha-C <sub>12:2</sub> Cl		
394.2	3.01	Rha-C <sub>12:1</sub> Cl	Rha-C <sub>12:2</sub> K	
475.3	20.17	Rha-C <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>8</sub>	
503.3	90.55	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>8</sub> C <sub>12</sub>	Rha-C <sub>12</sub> C <sub>8</sub>
539.3	67.71	Rha-C <sub>8</sub> C <sub>10</sub> Cl	Rha-C <sub>8</sub> C <sub>12</sub> Cl	Rha-C <sub>12</sub> C <sub>8</sub> Cl
541.3	22.91	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> K	Rha-C <sub>8</sub> C <sub>12</sub> K	Rha-C <sub>12</sub> C <sub>8</sub> K
621.3	18.02	RhaRha-C <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>8</sub>	
649.4	100.00	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>		
685.4	39.74	RhaRha-C <sub>10:1</sub> C <sub>10</sub> K	RhaRha-C <sub>8</sub> C <sub>12:1</sub> K	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> Cl
687.4	14.68	RhaRha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> K		

Rha: Rhamnose. <sup>a</sup>: Calculated by addition of [M-H]<sup>-</sup> and fragments produced by *in-source* fragmentation.

## Anexo 3: Análise estatística dos ensaios de remediação em frasco

The image displays three separate ANOVA tables from a statistical software interface. Each table shows the results for a different variable: As (mg/Kg), Cd (mg/Kg), and Zn (mg/Kg). The tables are structured as follows:

**Table 1: Analysis of Variance (Teste Tukey Claudio.sta) - As (mg/Kg)**

Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
As (mg/Kg)	29221.45	10	2922.145	350.0000	11	31.81818	91.83886	0.000000

**Table 2: Analysis of Variance (Teste Tukey Claudio Cd.sta) - Cd (mg/Kg)**

Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Cd (mg/Kg)	779.0725	10	77.90725	6.328200	11	0.575291	135.4224	0.000000

**Table 3: Analysis of Variance (Teste Tukey Claudio Zn.sta) - Zn (mg/Kg)**

Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Zn (mg/Kg)	847729.8	10	84772.98	3512.000	11	319.2727	265.5190	0.000000

Figura 33- Análise estatística da média dos valores utilizando o teste HSD pós-hoc de Tukey (5% de probabilidade), presente no software Statística 7.0

#### Anexo 4: Análise estatística do DCCR para estabilidade e diâmetro de bolhas das microespumas de RL

A						
Regr. Coefficients; Var.:Estabilidade; R-sqr=.76756; Adj.:.61964 (03 estabilidade e tamanho de bolha 2E3DCCR_25-07-19)						
3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Pure Error=1376,842						
DV: Estabilidade						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(4)	p	-90.% Cnf.Limt	+90.% Cnf.Limt
<b>Mean/Interc.</b>	<b>454.4432</b>	<b>13.69307</b>	<b>33.18826</b>	<b>0.000005</b>	<b>425.2577</b>	<b>483.6408</b>
(1)Rotação (rpm)(L)	132.5111	10.04076	13.19731	0.000190	111.1057	153.9164
Rotação (rpm)(Q)	27.0814	9.93431	-2.72605	0.052657	48.2599	5.9030
(2)pH (L)	23.9844	10.04076	2.38871	0.075273	2.5791	45.3898
(3)Tempo de preparo (seg)(L)	56.6821	10.04076	5.64520	0.004849	35.2768	78.0875
Tempo de preparo (seg)(Q)	-42.5199	9.93431	-4.28011	0.012847	-63.6983	-21.3415
1L by 2L	-19.8542	13.11889	-1.51340	0.204732	-47.8216	8.1133
1L by 3L	21.9732	13.11889	1.67538	0.169169	-5.9883	49.9466

B						
Regr. Coefficients; Var.:Tamanho de bolha; R-sqr= 63331; Adj.:.49228 (03 estabilidade e tamanho de bolha 2E3DCCR_25-07-19)						
3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Residual=529.4511						
DV: Tamanho de bolha						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(13)	p	-90.% Cnf.Limt	+90.% Cnf.Limt
<b>Mean/Interc.</b>	<b>82.3151</b>	<b>6.865682</b>	<b>12.06343</b>	<b>0.000000</b>	<b>70.6547</b>	<b>94.97558</b>
(1)Rotação (rpm)(L)	-12.4362	6.225408	-1.99733	0.067160	-23.4628	-1.40967
(3)Tempo de preparo (seg)(L)	21.8970	6.225408	3.43468	0.004031	10.6705	32.72358
Tempo de preparo (seg)(Q)	13.1751	6.109675	2.15543	0.050362	2.3552	23.99489
1L by 2L	-8.0165	8.135194	-0.98542	0.342406	-22.4234	6.39034
2L by 3L	6.8003	8.135194	0.83592	0.418302	-7.5066	21.20722

Figura 34 – Análise estatística do DCCR para estabilidade e diâmetro de bolha para as microespumas geradas a partir de um extrato de RL a uma concentração de 0,5%.

A						
Regr. Coefficients; Var.:Estabilidade; R-sqr=.89143; Adj.:.80458 (10 estabilidade e tamanho de bolha 2E3DCCR_25-07-19)						
3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Residual=5453,962						
DV: Estabilidade						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(10)	p	-90.% Cnf.Limt	+90.% Cnf.Limt
<b>Mean/Interc.</b>	<b>463.0823</b>	<b>27.25304</b>	<b>16.99195</b>	<b>0.000000</b>	<b>413.6872</b>	<b>512.4774</b>
(1)Rotação (rpm)(L)	146.7446	19.98392	7.34314	0.000025	110.5246	182.9647
(2)pH (L)	59.5245	19.98392	2.97862	0.013840	23.3044	95.7446
pH (Q)	-29.7998	19.77205	-1.50717	0.162689	-65.6359	6.0362
(3)Tempo de preparo (seg)(L)	59.2233	19.98392	2.96355	0.014202	23.0032	95.4433
Tempo de preparo (seg)(Q)	23.8519	19.77205	1.20634	0.255449	-11.9842	59.6880
1L by 2L	-48.0625	26.11025	-1.84075	0.095481	-95.3863	-0.7387
1L by 3L	-32.4375	26.11025	-1.24233	0.242460	-79.7613	14.8863
2L by 3L	-30.1875	26.11025	-1.15616	0.274492	-77.5113	17.1363

B						
Regr. Coefficients; Var.:Tamanho de bolha; R-sqr=.65261; Adj.:.519 (10 estabilidade e tamanho de bolha 2E3DCCR_25-07-19)						
3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Residual=122.4098						
DV: Tamanho de bolha						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(13)	p	-90.% Cnf.Limt	+90.% Cnf.Limt
<b>Mean/Interc.</b>	<b>71.0029</b>	<b>4.942108</b>	<b>14.36692</b>	<b>0.000000</b>	<b>62.2507</b>	<b>79.75503</b>
(1)Rotação (rpm)(L)	-11.9361	2.994596	-3.98686	0.001550	-17.2381	-6.63420
Rotação (rpm)(Q)	5.1142	2.994596	1.70782	0.111422	-0.1890	10.41748
pH (Q)	5.8555	2.994596	1.95536	0.072384	0.5523	11.15875
Tempo de preparo (seg)(Q)	4.0721	2.994596	1.35980	0.197010	-1.2312	9.37529
2L by 3L	5.2724	3.911677	1.34786	0.200722	-1.6549	12.19972

Figura 35 – Análise estatística do DCCR para estabilidade e diâmetro de bolha para as microespumas geradas a partir de um extrato de RL a uma concentração de 1%.

## Anexo 5: Equações dos gráficos dos DCCR

Equações	R=Rotação; P=pH; T=Tempo de preparo
0,5% Estabilidade	$454,5+132,5*R-27,1*R^2+24,0*P+56,7*T-42,5*T^2-19,9*R*P+22,0*R*T$
0,5% Tamanho	$82,8-12,4*R+21,7*T+13,2*T^2-8,0*R*T+6,8*P*T$
1,0% Estabilidade	$463,1+146,8*R+59,5*P-29,8*P^2+59,2*T+23,9*T^2-48,18*R*P-32,4*R*T-30,2*P*T$
1,0% Tamanho	$71,0-11,9*R+5,1*R^2+5,9*P^2+4,1*T^2+5,3*P*T$