

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
SETOR DE TECNOLOGIA

GUILHERME POLAK TABOR

ESTRATÉGIAS PARA A UTILIZAÇÃO DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO NA
REMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

CURITIBA
2015

GUILHERME POLAK TABOR

ESTRATÉGIAS PARA A UTILIZAÇÃO DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO NA
REMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Engenharia
Ambiental, no Curso de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, Setor de Tecnologia, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Froehner

CURITIBA
2015

ATA DE APROVAÇÃO

GUILHERME POLAK TABOR

ESTRATÉGIAS PARA A UTILIZAÇÃO DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO NA REMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

2 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL (PPGEA)

3 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

4 ATA DA DEFESA DA n^o DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: GUILHERME POLAK TABOR

5 LOCAL: AUDITÓRIO 1 DO PRÉDIO DA ENGENHARIA QUÍMICA - UFPR

6 DATA: 04/05/2015

7 HORÁRIO: 13h35

8 -----

9 -

10 As atas do PPGEA são elaboradas em página A4 com 2,5 cm de margem
11 superior, inferior, direita e esquerda e datilografadas em tipo Courier
12 New 10,5 pt monoespaçado, sem tabulação de margem à direita, e com
13 numeração contínua na margem esquerda.

14 -----

15 -

16 O aluno Guilherme Polak Tabor apresentou a defesa de sua dissertação de
17 mestrado, intitulada "Estratégias para a utilização de peróxido de
18 magnésio na remediação de solo contaminado por hidrocarbonetos
19 policíclicos aromáticos" à banca examinadora composta por: Prof. Dr.
20 Sandro Froehner (UFPR-orientador, CPF 612555729-49), Dr. Juan Sanéz
21 (Co-orientador - UFPR, CPF 011977269-85, Prof. Marcelo Errera (UFPR,
22 CPF 904603087-34), Dr. Edson Cordova da Rosa (Instituto Senai de
23 Tecnologia Ambiental/SC, CPF 681759579-72), sob a presidência do
24 primeiro.

25

26 Concluída a apresentação, o candidato foi arguido. Após a arguição do
27 candidato, o trabalho foi considerado adequado e aprovado, sujeito às
28 correções apontadas pela banca, e que devem ser realizadas pelo
29 candidato no prazo de 60 dias.

30

31

32

33

34 Prof. Dr. Sandro Froehner (Orientador)

35

36

37

38 Dr. Juan Sanéz (Co-orientador)

39

40

41

42 Prof. Dr. Marcelo Errera

43

44

45

46 Dr. Edson Cordova

RESUMO

O presente trabalho apresenta um estudo de um processo de biorremediação de solo contaminado por HPA's utilizando peróxido de magnésio (MgO_2) como fonte de liberação de oxigênio. Deste modo, com a sucessiva liberação do O_2 , a população de microrganismos aeróbios tende a crescer promovendo a degradação dos compostos orgânicos indesejados. Foi estudada a degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizando quatro tipos diferentes de compostos. São eles: ORC® - Oxygen Release Compound (produto comercial de peróxido de magnésio), Peróxido de Magnésio preparado, Peróxido de Magnésio preparado com adição de fosfato e Peróxido de Magnésio em conjunto com reação modificada de Fenton. A efetividade do processo foi comparada com uma sequência de amostras "Branco", contendo apenas o solo contaminado, garantindo a validação do estudo. Cada recipiente continha a mesma concentração de poluente e mesma massa de MgO_2 , variando apenas o tipo de composto utilizado. O nível de contaminação do solo estudado seguiu valores orientados pela CONAMA 420 para intervenção do solo e prevenção. Durante o período de degradação as amostras foram mantidas em recipientes fechados dentro de incubadora, de modo a obter-se na final valores de constante de degradação referente a cada tipo de peróxido de magnésio utilizado. Foi realizado também, paralelo aos experimentos de degradação de HPAs, contagem de bactérias heterotróficas aeróbias, com o intuito de avaliar o crescimento da população microbiana e os tipos de microrganismos desenvolvidos. O período de degradação estudado foi de 60 dias.

Palavras-Chave: Remediação, Solo, HPA's, Peróxido de Magnésio

ABSTRACT

This work presents a study of a remediation process of soil contaminated with PAH's using magnesium peroxide (MgO_2) as a source of oxygen. Thus, with the subsequent release of O_2 , the population of aerobic microorganisms tends to grow, promoting the degradation of unwanted organic compounds. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons was studied using four different types of compounds, which are: ORC® - Oxygen Release Compound (commercial product of Magnesium Peroxide), laboratory Magnesium Peroxide produced by Federal University of Paraná, Magnesium Peroxide laboratory with added Phosphate and Magnesium Peroxide with modified Fenton reaction. The effectiveness of the process was compared to a sequence of samples "Blank", containing only the contaminated soil, ensuring the validation study. Each vial contained the same concentration of pollutant and mass of MgO_2 , varying only the type of compound used. The level of soil contamination studied was followed by normative instruction of CETESB 195-2005 for intervention and prevention of soil. During the period of degradation the samples were kept in an incubator and sealed containers, which is important for preventing the changes of the properties in soil. In order to evaluate the growth of the microbial population another study was also conducted along with the experiments of degradation of PAHs. The count of aerobic heterotrophic bacteria was conducted and the type of microorganism developed was identified. The degradation time was studied in 60 days.

Key-words: Biorremediation, PAH, Magnesium Peroxide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – DIFERENÇAS ENTRE ESTRUTURAS DE HPAS ALTERNANTES E NÃO-ALTERNANTES	17
FIGURA 2 - OS 16 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS MAIS IMPORTANTES E RESPECTIVAS CADEIAS ESTRUTURASIS	18
Figura 3 - TRANSFORMAÇÃO DE DIVERSOS COMPOSTOS AROMÁTICOS EM CATECOL.	31
Figura 4 – DEGRADAÇÃO AERÓBIA DE HPAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS.....	33
Figura 5 – CURVAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO PARA BIOMASSA, TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO, TAXA DE DISSOLUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DISSOLVIDA DE HPAs EM FUNÇÃO DO TEMPO ..	34
Figura 6 – VARIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA DEVIDO A MUDANÇAS DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO DO SOLO.	38
Figura 7 – RESPOSTA TÍPICA DE POPULAÇÃO DE BACTÉRIA MESÓFILA À VARIAÇÃO DE TEMPERATURA	39
Figura 8 – VARIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA EM SOLO EM RELAÇÃO A UMIDADE.	40
Figura 9 – REPRESENTAÇÃO DO OXIGÊNIO SENDO LIBERADO PELA INTERCALAÇÃO DO PERÓXIDO DE MAGNÉSIO E FOSFATO.	44
Figura 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 9,10-DIHIIDROANTRACENO.....	56
Figura 11 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA ENSAIOS DE HPAs	56
Figura 12 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA DOS 16 HPAS QUANTIFICADOS E RESPECTIVOS TEMPOS DE SAÍDA.	61
Figura 13 - EXEMPLO DE CROMATOGRAMA APRESENTANDO OS TEMPOS DE SAÍDA DO SURROGATE (MAIOR PICO) E OUTROS COMPOSTOS. ...	63
Figura 14 – EXEMPLO DO PROCEDIMENTO DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS E DILUIÇÕES.	71
Figura 15 – RESULTADOS DE DECAIMENTO DE NAFTALENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	77
Figura 16 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE ACENAFTILENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	78

Figura 17 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE ACENAFTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	78
Figura 18 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE FLUORENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	79
Figura 19 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE FENANTRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	79
Figura 20 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	80
Figura 21 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE Fluoranteno EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	80
Figura 22 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	81
Figura 23 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[a]ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	82
Figura 24 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE CRISENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	82
Figura 25 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[b]FLUORANTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	83
Figura 26 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[k]FLUORANTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	83
Figura 27 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[a]PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	84
Figura 28 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE INDENO[1,2,3-c,d]PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	84
Figura 29 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[g,h,i]PERILENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	85
Figura 30 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE DIBENZO[a,h]ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	85
Figura 31 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DA SOMA DE HPAs EM FUNÇÃO DO TEMPO	87
Figura 32 – CURVA AJUSTADA PARA O NAFTALENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	95
Figura 33 – CURVA AJUSTADA PARA O ACENAFTILENO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	95

Figura 34 - CURVA AJUSTADA PARA O ACENAFTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	96
Figura 35 - CURVA AJUSTADA PARA O FLUORENO EM FUNÇÃO DO TEMPO ..	96
Figura 36 - CURVA AJUSTADA PARA O FENANTRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	97
Figura 37 - CURVA AJUSTADA PARA O ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	97
Figura 38 - CURVA AJUSTADA PARA O Fluoranteno EM FUNÇÃO DO TEMPO ...	98
Figura 39 – CURVA AJUSTADA PARA O PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO	98
Figura 40 - CURVA AJUSTADA PARA O SOMA DE HPAs EM FUNÇÃO DO TEMPO	100
Figura 41 – RESULTADO DO ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NO SOLO DEPOIS DE 30 DIAS. ESQUERDA(A): DIPLOBACILOS. DIREITA(b): ESTREPTOBACILOS.....	102
Figura 42 – RESULTADO DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS NO SOLO CONTAMINADO UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE COMPOSTOS AUXILIARES DE BIORREMEDIAÇÃO.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – OS 16 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS MAIS IMPORTANTES E RESPECTIVAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	21
Tabela 2 – LISTA DE VALORES ORIENTADOS PELO CONAMA Nº420/2009 PARA HPAS MATRIZ SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA.	25
Tabela 3 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	58
Tabela 4 – CURVAS ANALÍTICAS, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PARA OS HPAS INVESTIGADOS.	59
Tabela 5 – VALORES DO TEMPO DE SAÍDA PARA OS 16 HPAS QUANTIFICADOS.	60
Tabela 6 – VALORES DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE HPAS EM SOLO SEM CORREÇÃO POR SURROGATE.	64
Tabela 7 – VALORES DO TESTE DE EXTRAÇÃO DE HPAS NO SOLO COM CORREÇÃO POR SURROGATE.	65
Tabela 8 – RESULTADOS DE UMIDADE INICIAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DO SOLO UTILIZADO.....	72
Tabela 9 - RESULTADOS DE pH INICIAL PARA CARACTERIZAÇÃO DO SOLO UTILIZADO.....	73
Tabela 10 – RESULTADOS DE HPAS INICIAIS NO SOLO	74
Tabela 11 – RESULTADO DO TEOR DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO PARA CADA COMPOSTO UTILIZADO	76
Tabela 12 - VALORES FINAIS DE pH PARA OS ENSAIOS REALIZADOS	90
Tabela 13 – RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “BRANCO”	90
Tabela 14 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “ORC”	91
Tabela 15 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “ORC 5%”	91
Tabela 16 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “MgO ₂ ”	92

Tabela 17 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “FÓSFORO”	92
Tabela 18 – TEMPOS DE MEIA-VIDA E MEIA-DEGRADAÇÃO CALCULADOS PARA OS HPAS DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO DIFERENTES COMPOSTOS AUXILIARES DE BIOREMEDIAÇÃO.	94

LISTA DE SIGLAS

- HPA(s) – Hidrocarboneto(s) Policíclico(s) Aromático(s)
- ORC® – “*Oxygen Release Compound*”; Composto industrial de Peróxido de Magnésio.
- PMg Prep. – Peróxido de Magnésio preparado em laboratório
- PMg Fosf. – Peróxido de Magnésio preparado em laboratório com adição de fosfato
- PMg+Fenton – Peróxido de Magnésio aliado à reação de Fenton Modificada
- ORC 5% – Composto industrial de Peróxido de Magnésio utilizado no solo com porcentagem de 5% em massa
- BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo
- POAs – Processos Oxidativos Avançados
- USEPA – *United States Environment Protect Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)
- LQ – Limite de Quantificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	16
3.1.1	Descrições Gerais	16
3.1.2	Estrutura	17
3.1.3	Fontes.....	18
3.1.4	Distribuição no Meio Ambiente e Propriedades Físico-Químicas	20
3.1.5	HPAs no Solo e Sedimento	23
3.1.6	Legislação Brasileira Específica para HPAs no Solo.....	24
3.2	BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS	26
3.2.1	Viabilidade da biodegradação dos HPAs.....	28
3.2.2	Fatores que influenciam a biodegradabilidade dos contaminantes orgânicos.....	36
3.2.3	Utilização de Peróxido na bioestimulação de bactérias.....	42
3.2.4	Reação Clássica de Fenton.....	44
3.2.5	Reação Modificada de Fenton	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	PREPARAÇÃO DO SOLO	51
4.1.1	Contaminação do Solo	51
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	52
4.2.1	Medida do pH	52
4.2.2	Teor de Umidade	52
4.3	COMPOSTOS A BASE DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO	53

4.3.1	ORC® (Oxygen Release Compound).....	53
4.3.2	Peróxido de Magnésio Preparado em Laboratório	53
4.4	PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE HPAs NA MATRIZ SOLO.....	54
4.4.1	Materiais e Equipamentos	54
4.4.2	Extração dos Hidrocarbonetos.....	55
4.4.3	Cleanup das amostras.....	57
4.4.4	Condições cromatográficas do GC-FID	57
4.4.5	Calibração e Ajuste do Método de Análise Cromatográfica.....	59
4.4.6	Teste de Extração de HPAs em Solo	62
4.5	PREPARAÇÃO DO PERÓXIDO DE MAGNÉSIO	66
4.5.1	Procedimento.....	67
4.5.2	Determinação do teor de peróxido de magnésio	68
4.6	PROCEDIMENTO DE CONTAGEM PADRÃO DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS ESTRITOS E FACULTATIVOS VIÁVEIS.	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO SOLO.....	72
5.1.1	pH e Percentual de Umidade iniciais.....	72
5.1.2	Quantidade Inicial de HPAs no solo	74
5.2	RESULTADOS DOS ENSAIOS EM AMBIENTE FECHADO	76
5.2.1	Teor de Peróxido de Magnésio nos compostos utilizados.....	76
5.2.2	Degradação dos compostos de HPAs via Biorremediação	77
5.2.3	Degradação dos compostos de HPAs via transformação química	101
5.2.4	Caracterização microbiológica do solo	102
5.2.5	Contagem de Microrganismos Totais	104
6	CONCLUSÃO	107

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de solos e águas subterrâneas por derivados de petróleo tem sido objeto de muitas investigações e preocupações por parte das organizações ambientais. A remediação e recuperação de solos contaminados com materiais perigosos tem recebido cada vez mais a atenção nos últimos anos, com maior consciência dos potenciais efeitos adversos à saúde humana e ao ecossistema. Técnicas de remediação biológica já vêm sendo utilizadas em áreas contaminadas com compostos orgânicos como, por exemplo, na área contaminada com o vazamento de petróleo pelo navio “Exxon Valdez” ocorrido em Prince William Sound, Alasca, em 1989. (Claxton et al., 1991).

Devido ao seu poder oxidante e capacidade de liberação de oxigênio, o uso de peróxidos para redução quantitativa de derivados de petróleo tem aumentado nos processos de remediação. Estes compostos são classificados como oxidantes químicos, assim como o peróxido de hidrogênio. As soluções destes compostos em ambiente alcalino liberam oxigênio ativo gradativamente, podendo ocorrer a oxidação dos poluentes. Assim, é possível encontrar diversas aplicações destes compostos, tanto como oxidantes que eliminam rapidamente os compostos indesejáveis como liberadores de oxigênio. Estes são utilizados como inibidores dos microrganismos produtores de H_2S , evitando a corrosão em tubulações. Atualmente diferentes tecnologias estão sendo estudadas com o propósito de, com a gradativa liberação de oxigênio, aumentar a capacidade de biodegradação de solos e águas residuais por parte do microorganismos aeróbios.

Diante deste cenário, muitas pesquisas e vários métodos estão sendo testados e aplicados na intenção de promover a remediação destas áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo. Existem diversas tecnologias de remediação para a remoção direta dos contaminantes, assim como para o aumento do potencial de biodegradação destes poluentes em áreas contaminadas. Os processos oxidativos avançados (POAs) surgiram como uma alternativa para este tratamento. O processo está fundamentado na geração do radical hidroxila ($\bullet OH$), o qual permite a rápida degradação de uma grande variedade de compostos orgânicos, muitas vezes permitindo a sua completa mineralização. O grande

problema é o custo associado deste processo, que demanda grande quantidade de reagentes para o tratamento de pequenas áreas.

O uso de peróxidos no tratamento de áreas contaminadas é uma excelente alternativa visando grandes e médias áreas, e possui vantagens em relação a algumas técnicas térmicas e físico-químicas em termos de custo. Isso porque os custos associados à escavação e descarte de material contaminado não são incluídos, sendo estes os fatores com maior peso no orçamento. Além disso, o contaminante não é transferido para outro local, tal como deposição em aterro. No entanto, apesar do grande interesse do governo e da indústria privada na biorremediação, incertezas permanecem sobre a sua eficácia para certos compostos, incluindo os HPAs, e também a sua aplicabilidade em certos ambientes. Diferentes tecnologias de remediação têm sido testadas nos últimos 30 anos em esforço para remover estes contaminantes, porém a tecnologia da biorremediação é considerada uma grande alternativa prenunciando um tratamento seguro e economicamente atrativo (ULRIC, W., 2000).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho é analisar a eficácia do uso do peróxido de magnésio em suspensão como fonte de oxigênio para promover a biodegradação e consequente redução da quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no solo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Alcançar níveis mínimos de contaminação no solo por HPAs aceitos pelo CONAMA, conforme resolução N^o420 de 28 de dezembro de 2009.
- b) Propor um modelo cinético para a biodegradação dos HPAs.
- c) Avaliar, entre os diferentes compostos utilizados (ORC®, Peróxido de Magnésio preparado (“PMg Prep.”), Peróxido de Magnésio com adição de fosfato (“PMg Fosf.”) e Peróxido de Magnésio aliado a reação de Fenton Modificada (“PMg+Fenton”) o que apresenta a maior eficácia de degradação, levando em conta a concentração final de contaminantes, o tempo necessário para degradação e o tipo dos elementos biodegradáveis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

3.1.1 Descrições Gerais

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) pertencem a um grande grupo de compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura dois ou mais anéis aromáticos, característico por sua alta hidrofobicidade. A maior parte dos HPAs com baixa pressão de vapor é adsorvido em partículas ainda na atmosfera. Quando dissolvido em água ou adsorvido em partículas, os HPA's podem sofrer fotodecomposição. Na atmosfera os HPAs podem reagir com diversos elementos, tais como o ozônio, óxidos de nitrogênio e dióxido de enxofre, produzindo dionas, nitro e dinitro-HPAs, e ácido sulfônico, respectivamente (SUESS, Michael J, 1976).

Determinados HPAs são tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos e em virtude do risco à saúde humana, alguns compostos desta classe estão inclusos na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental (USEPA) americana. A capacidade de alguns HPAs de serem metabolizados ou agir diretamente sobre a estrutura do DNA humano torna elevado o potencial carcinogênico e mutagênico destes compostos (MOREIRA e BAREK,1995). HPAs de elevado peso molecular, que possuem de quatro a seis anéis benzênicos, apresentam alto risco de causar câncer, enquanto os compostos de baixo peso molecular, com dois ou três anéis aromático, exibem potencial de causar toxicidade aguda em humanos (NETTO *et al.*, 2000).

HPAs são encontrados praticamente na maioria dos solos superficiais, com concentrações típicas na faixa solo de floresta de 5 ug a 100 ug/kg. Solos rurais contém HPAs em níveis de 10-100 ug/kg originários principalmente de precipitação atmosférica. Para tanto, valores altos como 1000 mg/kg podem ser ocasionalmente encontrados (NETTO *et al.*, 2000).

As áreas metropolitanas apresentam concentrações de HPAs mais elevadas comparado às florestas e áreas agrícolas devido a fontes de queima de combustíveis fósseis. A maioria das concentrações em áreas urbanas encontra-se

próximo da faixa de 600 - 3000 mg/kg. Valores mais altos são encontrados nas áreas de transporte pesado e industrialização, na ordem de 1000-3000 ug/kg. No entanto, os níveis de 8.000 – 336.000 ug/kg, têm sido encontrados na poeira da estrada (MENZIE, C.A. et al., 1992).

3.1.2 Estrutura

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são classificados em dois grupos com base na estrutura do anel: Alternante e Não-Alternante. HPAs Alternantes como Antraceno, Fenantreno, e Criseno são derivados do Benzeno por fusão de seis adicionais anéis benzênicos, e contem menos que oito anéis benzênicos (Harvey, 1991). HPAs Não-Alternantes podem conter anéis com menos do que seis átomos de carbono, além de seis anéis benzênicos. Este grupo é extremamente amplo em estrutura, elevando a diversidade dos HPAs (Harvey, 1991). Exemplos de quatro, cinco, e seis anéis são Fluoreno e Fluoranteno (Dabestani e Ivanov, 1999). É possível observar a diferença entre as duas estruturas na Figura 1. O Criseno consiste na fusão de quatro anéis benzênicos, cada anel contendo seis carbonos. O Fluoranteno, por outro lado, contém Naftaleno e uma unidade de Benzeno ligadas por um anel de cinco membros (no centro da estrutura), sendo indicativo de baixa temperatura de combustão e baixa eficiência. Na FIGURA 2 estão representados os 16 HPAs mais importantes e suas respectivas cadeias. As propriedades físico-químicas mais relevantes são mostradas na Tabela 1.

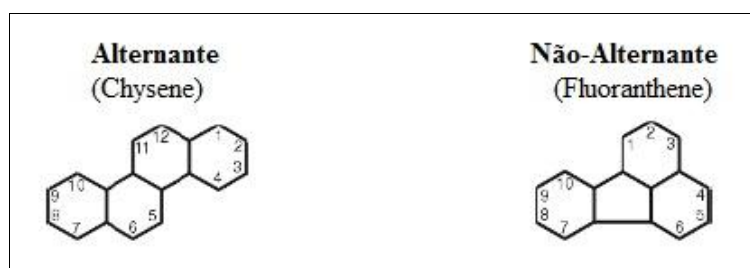


FIGURA 1 – DIFERENÇAS ENTRE ESTRUTURAS DE HPAS ALTERNANTES E NÃO-ALTERNANTES
 FONTE: O autor.

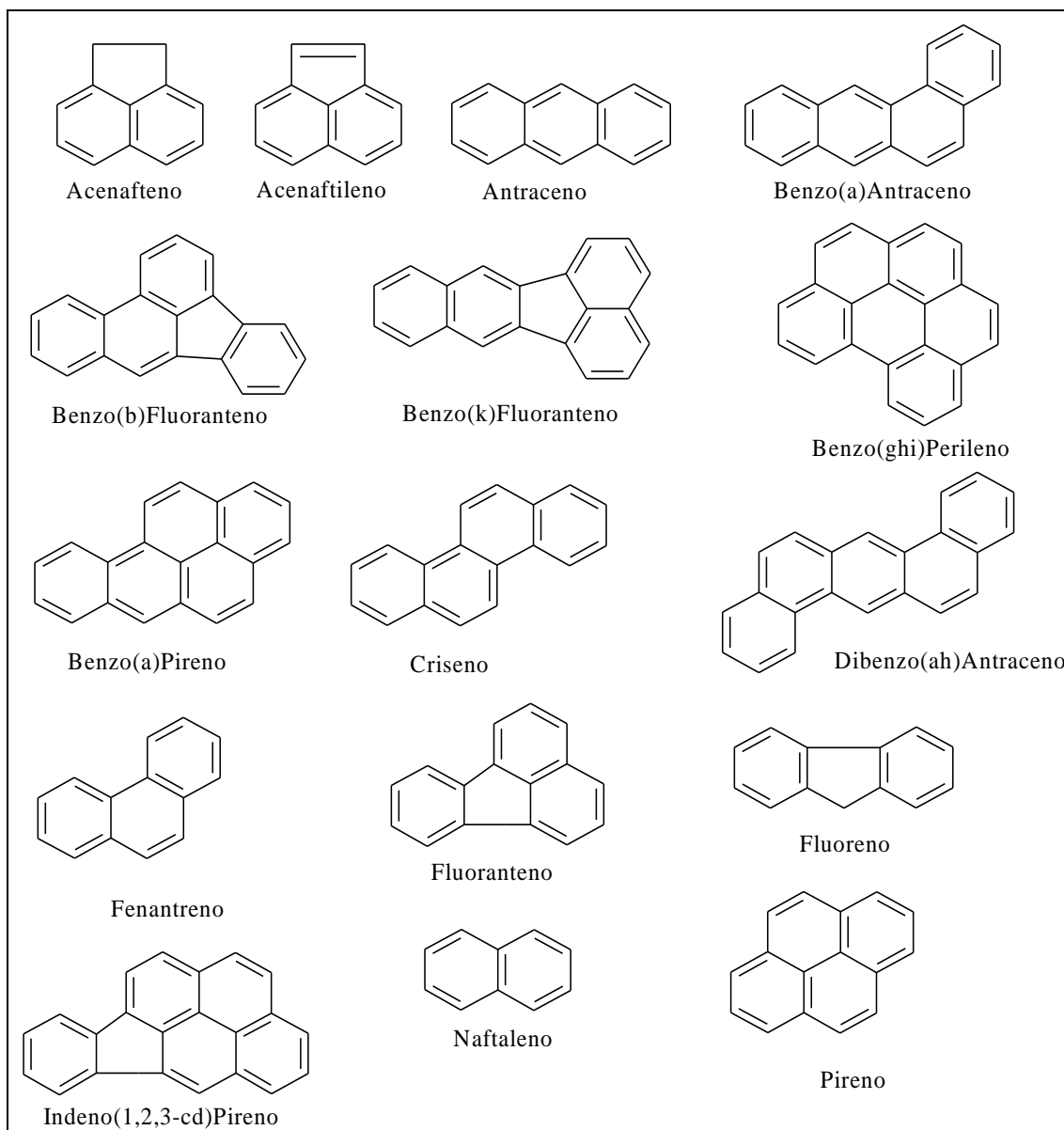


FIGURA 2 - OS 16 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS MAIS IMPORTANTES E RESPECTIVAS CADEIAS ESTRUTURAIS
 FONTE: USEPA 1985

3.1.3 Fontes

Os HPAs são formados principalmente pelo processo de pirólise, em particular, da combustão incompleta de materiais orgânicos durante as atividades humanas industriais, tais como processamento de carvão e petróleo, queima de gás natural, combustão de lixo, tráfego de veículos, fumo de tabaco e processos naturais como a carbonização. Além disso, uma série de compostos heterocíclicos

aromáticos (por exemplo, Acridina e Carbazole), bem como nitro-HPAs, também podem ser gerados pela combustão incompleta (World Health Organization Regional Office for Europe, 1987).

Existe uma quantidade enorme de HPAs, o mais conhecido sendo o Benzo [a] Pireno (BaP). As emissões de BaP no ar a partir de várias fontes na Alemanha, em 1981, foram estimadas em 18 toneladas, aproximadamente 30% causado pela produção de coque, 56% por aquecimento com carvão, 13%, em veículos a motor e menos de 0,5% por combustão de óleo de aquecimento e geração de energia a carvão. Outras fontes BaP não foram tidos em consideração (World Health Organization Regional Office for Europe, 1987). No entanto, as atuais contribuições das diferentes fontes importantes, tais como o aquecimento residencial (carvão, madeira, óleo), escapamentos de veículos, geração de energia industrial, incineradores, a produção de alcatrão de carvão, coque e asfalto, e craqueamento catalítico de petróleo, são difíceis de estimar. Estes números podem também variar consideravelmente de país para país. Nos EUA, a queima residencial de madeira é agora considerada como a maior fonte de HPAs (Agency For Toxic Substances And Disease Registry - USA, 1994). Fontes estacionárias são responsáveis por uma elevada percentagem de emissões totais de HPAs anuais. No entanto, em áreas urbanas ou suburbanas, as fontes móveis são as maiores responsáveis pela liberação de HPAs para a atmosfera (BAEK, et al., 1991).

As tecnologias que apresentam como subprodutos HPAs podem ser móveis ou estacionárias (LOPES *et al.*, 1996). As primeiras envolvem motores de combustão interna de veículos de transporte de carga e passageiros, enquanto as fontes estacionárias compreendem sistemas de aquecimento doméstico com o emprego de combustão de madeira ou carvão, fumaça de cigarro, fotocopiadoras, exaustão de processo de incineração, produção de energia baseada em petróleo e carvão, atividades industriais como fundição de alumínio, produção de coque, manufatura de asfalto ou produtos de borracha (BOSTRÖM *et al.*, 2002; NETTO *et al.*, 2000). Quando lançados no ambiente, os HPAs se redistribuem entre as fases gasosa e particulada e são removidos da atmosfera por meio da deposição (LI *et al.*, 2009).

A produção de HPAs com finalidades comerciais é incomum devido a não aplicabilidade destes compostos (BAIRD, 2005), no entanto, são encontrados em derivados comerciais do alcatrão de hulha, naftalina, além de serem utilizados na

síntese de diferentes compostos orgânicos em pesticidas e fungicidas, detergentes e corantes (SAMANTA *et al.*, 2002).

3.1.4 Distribuição no Meio Ambiente e Propriedades Físico-Químicas

Os HPAs ocorrem no ambiente devido a fenômenos naturais ou a atividades antrópicas (MAGALHÃES *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 1996), sendo a maior parcela de HPAs emitidos para o ambiente de natureza humana (WITT, 1995; BAUMARD *et al.*, 1998). Atividades vulcânicas, queima espontânea de florestas e a biossíntese realizada por algas, bactérias e fungos são exemplos de fontes naturais de HPAs (WITT, 1995; BETTIN *et al.*, 2005). A produção antropogênica destes compostos e lançamento no ambiente ocorre principalmente por meio de pirólise a altas temperaturas de combustíveis fósseis ou biomassa e catálise a baixas temperaturas (MURI e WAKEHAM, 2009).

O comportamento ambiental e bioquímico dos HPAs está ligado diretamente às suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade em água, pressão de vapor, constante de Henry, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e constante de partição com carbono (K_{oc}) (SCHWARZENBACH *et al.*, 2005; LOPES e ANDRADE, 1996; NETTO *et al.*, 2000). A volatilidade dos HPAs diminui com o aumento da massa molecular. Desta forma, aqueles de baixa massa molecular, além de mais voláteis, apresentam maiores pressões de vapor e constante de Henry que os de alta massa molecular. Deste modo os compostos de baixa massa molecular se distribuem através da atmosfera na fração gasosa, enquanto os de alta massa são adsorvidos ao material particulado atmosférico (SCHWARZENBACH *et al.*, 2005). Assim, a pressão de vapor e constante de Henry são as propriedades governantes no transporte e distribuição dos HPAs atmosfera, sendo considerados por diversos autores, as responsáveis pelo fato dos mesmos se encontrarem em níveis consideráveis em regiões remotas e distantes de centros urbanos e industriais (PAGE *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; MACDONALD *et al.*, 2005).

A constante de partição com carbono (K_{oc}) consiste na razão entre a concentração da substância adsorvida ao carbono orgânico e a fase aquosa, indicando o potencial do composto para se ligar ao carbono orgânico em solos e

sedimentos (SCHWARZENBACH *et al.*, 2005). Os HPAs com 2 ou 3 anéis aromáticos apresentam valores de K_{oc} variando de 10^3 a 10^4 , indicando um potencial moderado na adsorção ao carbono orgânico nos solos e sedimentos (LOPES e ANDRADE, 1996; NETTO *et al.*, 2000). Os compostos com 4 a 6 anéis aromáticos têm valores de K_{oc} entre 10^4 e 10^6 , indicando maior tendência à adsorção ao carbono orgânico no ambiente. Deste modo, diferentes ecossistemas podem adsorver HPAs em diferentes níveis em função do conteúdo de carbono orgânico.

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) representa a razão entre as concentrações dos HPAs em octanol e água, sendo muito útil na avaliação da disponibilidade e bioacumulação dos compostos orgânicos entre a biota e sua respectiva fração aquosa (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993; LOPES e ANDRADE, 1996).

TABELA 1 – OS 16 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS MAIS IMPORTANTES E RESPECTIVAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

HPA	Número de anéis aromáticos	Massa Molecular [g/mo]	Solubilidade em água 25°C [mg/L]	Pressão de Vapor (Pa) 25°C	Log K_{ow} 25°C
Naftaleno	2	128,17	31,1	11,866	3,37
Acenaftileno	3	152,2	3,9	3,866	4,00
Acenafteno	3	154,21	3,8	0,500	3,92
Fluoreno	3	166,22	1,9	0,432	4,18
Fenantreno	3	178,23	1,1	$9,07 \times 10^{-2}$	4,57
Antraceno	3	178,23	0,045	$3,40 \times 10^{-3}$	4,54
Fluoranteno	4	202,26	0,26	$1,08 \times 10^{-3}$	5,22
Pireno	4	202,26	0,132	$5,67 \times 10^{-3}$	5,18
Benzo[a]Antraceno	4	228,29	0,011	$2,05 \times 10^{-5}$	5,91
Criseno	4	228,29	0,0015	$1,04 \times 10^{-6}$	5,91
Benzo[b]Fluoranteno	5	252,32	0,0015	$1,07 \times 10^{-5}$	5,80
Benzo[k]Fluoranteno	5	252,32	0,0008	$1,28 \times 10^{-8}$	6,00
Benzo[a]Pireno	5	252,32	0,0038	$6,52 \times 10^{-7}$	5,91
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	6	276,34	0,062	$1,87 \times 10^{-8}$	6,50
Benzo[g,h,i]Perileno	6	276,34	0,00026	$1,33 \times 10^{-8}$	6,50
Dibenzo[a,h]Antraceno	6	278,35	0,0005	$2,80 \times 10^{-9}$	6,75

FONTE: Adaptado de Lundstedt (2003), Bojes e Pope (2007)

3.1.4.1 Solubilidade

A solubilidade dos HPAs em água é dependente da temperatura, pH, força iônica entre outras. A solubilidade pode ser estimada pela estrutura química e pelo coeficiente de partição octanol-água. De um modo geral, como o aumento do número de anéis de benzeno em um HPAs, diminui a sua solubilidade (WILSON e JONES, 1993). Existem, naturalmente, exceções à regra. Simetria, planaridade e a presença de substituintes afetam a solubilidade dos HPAs em solventes orgânicos. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos planares são menos solúveis e biologicamente menos tóxicos (DABESTANI e IVANOV, 1999). HPAs alternantes, planares e simétrico requerem, relativamente, uma alta energia de solubilização por causa da sua capacidade para se entrelaçar. Assim, eles tendem a ser menos solúveis (HARVEY, 1991). Quanto menor a simetria, os compostos tendem a ser mais solúveis em solventes orgânicos. A presença de grupamentos metila e substituição polar também pode aumentar a solubilidade de HPAs em certos solventes (HARVEY, 1991). A maior parte dos subprodutos de degradação biológica e química dos HPAs tendem a ser mais polares e com maior solubilidade no meio ambiente do que o compostos parentais.

3.1.4.2 Coeficiente de partição Octanol-Água

Existe relativa quantidade de dados sobre a relação solubilidade em água e o coeficiente de partição octanol-água para o particionamento de HPAs entre água e matéria orgânica em solos (MACKAY e CALLCOTT, 1998). Existe uma relação inversa entre K_{ow} e solubilidade, que é determinado com a seguinte equação:

$$K_{ow} = \frac{\text{quantidade de orgânicos no octanol (mg/L)}}{\text{quantidade de orgânicos na água (mg/L)}} \quad (3.1.4.2.1)$$

O coeficiente octanol-água é muitas vezes expresso como o log K_{ow} . O Naftaleno apresenta “log K_{ow} ” de 3,37, enquanto o Indeno[1,2,3-cd]Pireno apresenta “log K_{ow} ” de 6,50. Neste caso, o Naftaleno é mais solúvel. Isso também está de acordo com a influência da estrutura química na solubilidade. Diferentes valores de solubilidade e K_{ow} de alguns HPAs são fornecidos na Tabela 1.

3.1.4.3 Pressão de Vapor

A Pressão de vapor define o ponto em que os HPAs irão evaporar para a forma gasosa ou condensar de volta ao estado inicial. Quanto maior a pressão de vapor (a temperaturas normais) mais volátil é o composto. O Naftaleno ($P_V=11.866$ Pa) é o mais volátil e o que evapora mais rapidamente dentre os HPAs a temperaturas normais (MACKAY e CALLCOTT, 1998). Pressões de vapor de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são também importantes para determinar o risco associado com os sedimentos de dragagem, transferência entre dois recursos (solo e ar), bem como amostragem de campo e de laboratório de segurança. As Pressões de Vapor dos 16 HPAs mais conhecidos são apresentadas na Tabela 1.

3.1.5 HPAs no Solo e Sedimento

Compostos de HPAs tendem a se acumularem nos sedimentos ao invés da água (Meador et al, 1995; Juhasz e Naidu, 2000). Concentrações de HPAs em sedimentos podem variar de $\mu\text{g}/\text{kg}$ para g/kg , dependendo da proximidade da fonte, tais como indústrias, municípios e correntes de água contaminada. Na América do Norte as concentrações totais de HPAs em sedimentos marinhos geralmente variam de 2,17 – 170.000 ng/g (Latimer e Zheng, 2003). Estudos do núcleo de sedimentos mostraram um aumento na concentração de HPAs nos últimos 100-150 anos (Meador et al., 1995).

O acúmulo de HPAs em solos sem a ocorrência de contaminação industrial é resultado de deposição atmosférica, depois de longo período transporte

(Greenberg et al., 1985). Incêndios florestais e a deposição da poluição do ar são algumas das principais fontes de HPAs no solo em áreas remotas. Níveis de HPAs no solo resultantes de deposição natural são estimados entre 1-10 µg/kg (Edwards, 1983). Jones et al. (1989) relataram uma concentração total de HPAs de 0,1-55 mg/kg em solos galeses que resultou estritamente a partir da deposição atmosférica, sem poluição industrial.

Os níveis de HPAs em solos apresentam um aumento nos últimos anos devido a crescente atividade industrial. Concentrações destes elementos em solos industriais urbanos pode atingir cerca de 10-100 vezes mais do que em solos remotos (Wild e Jones, 1995). Solos em instalações industriais apresentam concentrações dependendo do tipo de indústria. Por exemplo, Juhasz e Naidu (2000) em uma revisão da literatura, relataram concentrações totais de HPAs de 5.863 mg/kg em um local de produção de creosoto, 18.704 mg/kg em um local de preservação de madeira, 821 mg/kg em um local de petroquímica e 451 mg/kg em uma fábrica de produção de gás.

A principal via de perda de HPAs no solo é a degradação pelo metabolismo microbiano. As propriedades físicas e químicas do composto a ser degradado afetaram este processo, bem como fatores ambientais tais como temperatura, humidade, pH e concentração de oxigênio (Manilal e Alexander, 1991; Weissenfels et al., 1992). Sims e Overcash (1983) concluíram que fotólise, hidrólise e os processos de oxidação química não contribuem significativamente para a perda de HPAs do solo. Contudo, WILD e JONES (1993) relataram perda abiótica de HPAs de baixa massa molecular no solo por volatilização.

3.1.6 Legislação Brasileira Específica para HPAs no Solo

Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre HPAs encontra-se, principalmente, nos Estados Unidos, sob a competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA). Na União Européia encontra-se vinculada à Comissão das Comunidades Européias e à Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, a qual ainda é utilizada por alguns órgãos ambientais brasileiros como referência (JACQUES, *et al.*, 2007).

No Brasil a legislação atualmente vigente é a resolução CONAMA Nº420 de 28 de dezembro de 2009, dispondo sobre critérios e valores de orientação para solos e águas subterrâneas e diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas. São listados dez HPAs para solos e águas contaminadas. Para solos são estipulados valores de prevenção e investigação, sendo este último dividido entre três níveis: Agrícola APM_{ax}, residencial e industrial. Para águas subterrâneas são estipulados apenas valores de investigação. Estes valores e respectivos elementos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – LISTA DE VALORES ORIENTADOS PELO CONAMA Nº420/2009 PARA HPAS MATRIZ SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA.

Substância	CAS Nº	Solo [mg/kg solo seco]				Água Subterrânea [ug/L]
		Prevenção	Investigação			Investigação
			Agrícola APMax*	Residencial	Industrial	
Antraceno	07/12/20	0,039	-	-	-	-
Benzo(a)antraceno	56-55-3	0,025	9	20	65	1,75
Benzo(k)fluoranteno	207-06-9	0,38	-	-	-	-
Benzo(ghi)perileno	191-24-2	0,57	-	-	-	--
Benzo(a)pireno	50-32-8	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Criseno	218-01-9	8,1	-	-	-	-
Dibenzo(ah)antraceno	53-70-3	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Fenantreno	85-01-8	3,3	15	40	95	140
Indeno(123cd)pireno	193-39-5	0,031	2	25	130	0,17
Naftaleno	91-20-3	0,12	30	60	90	140

FONTE: Resolução CONAMA Nº 420 de 28 de dezembro de 2009. *APMax=Área de proteção máxima

A mesma relação de HPAs pode ser encontrada na DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005 da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), válida para o estado de São Paulo.

3.2 BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS

A biorremediação envolve a utilização de microrganismos, de ocorrência natural (nativos) ou cultivados, para degradar ou imobilizar contaminantes em águas subterrâneas e em solos. Geralmente, os microrganismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Destes, as bactérias são as mais empregadas e, portanto, são consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. São definidas como qualquer classe de microrganismos unicelulares, geralmente agregados em colônias, que vivem em compartimentos ambientais diversos. São importantes, em função de seus efeitos bioquímicos e por destruírem ou transformarem os contaminantes potencialmente perigosos em compostos menos danosos ao ser humano e ao meio ambiente (NRC, 1993).

No que diz respeito aos tipos de utilização da técnica, quanto ao local de tratamento, a biorremediação *in-situ* é a mais empregada no mundo. Porém, independente do local de aplicação, a biorremediação, assim como as demais técnicas químicas de degradação, tem como objetivo principal a mineralização completa dos contaminantes, ou seja, transformá-los em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade (inócuos), como CO₂ e água. Em suma, os microrganismos metabolizam as substâncias orgânicas, das quais se obtêm nutrientes e energia. Sendo que, para que isso ocorra, os microrganismos devem estar ativos para desempenharem a sua tarefa de biodegradação.

Genericamente, os microrganismos nativos da sub-superfície podem desenvolver a capacidade de degradar contaminantes após longo período de exposição. Normalmente, estes seres microscópicos se adaptam em baixas concentrações de contaminantes e se localizam nas regiões externas à pluma de contaminação e, muito dificilmente, estarão presentes na fase livre (fase orgânica concentrada). Os compostos orgânicos são metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo (CETESB, 2004). Portanto, o processo de biorremediação pode ser aeróbico ou anaeróbico, requerendo oxigênio ou hidrogênio, respectivamente. Na maioria dos locais, a sub-superfície é carente dessas espécies (oxigênio ou hidrogênio), o que impede os microrganismos de se reproduzirem e degradarem completamente o contaminante alvo. Além desses dois

processos, a biorremediação também pode ocorrer de forma co-metabólica (VIDALI, 2001).

Na "biorremediação aeróbica", que requer um meio oxidante, o oxigênio atua como receptor de elétrons e os contaminantes são utilizados pelos microrganismos como fontes de carbono (doador de elétrons), necessárias para manter as suas funções metabólicas, incluindo o crescimento e a reprodução. Por exemplo, os compostos BTEX cumprem essa função como doadores de elétrons, caso haja receptores suficientes (oxigênio dissolvido) para que a reação ocorra. Quando o oxigênio é totalmente consumido, os microrganismos passam a utilizar outros receptores naturais de elétrons disponíveis no solo, sendo que esse consumo ocorre na seguinte ordem de preferência: nitrato (reação de desnitrificação), manganês, ferro, sulfato e dióxido de carbono, sendo este, convertido em ácidos orgânicos para gerar o metano (AELION e BRADLEY, 1991). Não obstante, em poucos casos as condições naturais do local contaminado fornecem todas as substâncias essenciais, em quantidades suficientes, para que a biorremediação possa ocorrer sem a intervenção humana. Esse processo natural também é conhecido como "biorremediação intrínseca" e é utilizada, com sucesso, em alguns trabalhos (BOROLE *et al.* 1997; CHEN *et al.*, 2006; TROQUEST *et al.*, 2003). Todavia, mesmo quando o meio é totalmente acondicionado ao cultivo dos microrganismos, a biodegradação pode ser afetada, principalmente, devido à capacidade intrínseca de cada microrganismo de metabolizar uma substância qualquer. Por exemplo, de acordo com EMBAR *et al.* (2006), alguns microrganismos sobrevivem em condições ambientais extremamente adversas. Adicionalmente, pesquisas comprovam que diferentes microrganismos podem degradar diferentes substâncias, dentre estas, substâncias recalcitrantes, como os hidrocarbonetos de petróleo. Em alguns casos, certos microrganismos são mais especializados em degradarem contaminantes específicos. Por exemplo, para uma mesma classe de substâncias, como os compostos organoclorados, alguns microrganismos podem degradar contaminantes como o Dicloroetano e o Cloreto de Vinila, porém, no mesmo local não conseguem degradar o Tricloroetano. Contudo, pesquisas sugerem que devido à elevada diversidade de compostos em solos contaminados por petróleo e derivados, estudos preliminares à biorremediação são de suma importância para o tratamento dessas matrizes ambientais (EMBAR *et al.*, 2006). Salienta-se que, a princípio, o fator crítico para definir se a biorremediação é a técnica mais apropriada para o tratamento do

local contaminado é a biodegradabilidade do contaminante. Por isso, o estudo detalhado de cada parâmetro que afeta a biodegradação deve ser feito cautelosamente pelos responsáveis do projeto de remediação.

3.2.1 Viabilidade da biodegradação dos HPAs

Tanto a biodegradação quanto o transporte dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos dependem da biodisponibilidade no meio. Não existe uma definição universalmente aceita de biodisponibilidade (SEMPLE *et al.*, 2004; STOKES *et al.*, 2005.; HARMSSEN, 2007); no entanto, é reconhecido como sendo relacionada com a possibilidade de uma substância para afetar negativamente ou positivamente um organismo (PIERZYNSKI *et al.*, 2005). Estimativas confiáveis da biodisponibilidade de HPAs são extremamente importantes para a tomada de decisão do tratamento a ser utilizado, porém estas técnicas de avaliação são extremamente escassas. Níveis de HPAs totais, que muitas vezes são utilizados para determinar o sucesso do tratamento de remediação, não são adequados como uma medida da biodisponibilidade (Talley *et al.* de 2002, Harmsen, 2007).

Segundo STOKES *et al.*, 2005; a biodisponibilidade de HPAs é afetada por:

- Propriedades físicas dos compostos químicos (HPAs de alto ou baixo peso molecular)
- Características do solo (teor de argila, matéria orgânica, etc.)
- Organismos receptores (bactérias, minhocas, artrópodes, etc.)

Os compostos HPAs de alto peso molecular são mais recalcitrantes e menos biodisponíveis no ambiente do que os compostos de baixo peso molecular (CERNIGLIA, 1993). HPAs de baixo peso molecular são removidos mais rapidamente devido à sua maior solubilidade, volatilidade e capacidade de diferentes microrganismos de utilizá-los como fonte única de carbono (ALEXANDER, 1999). Propriedades do solo como teor de matéria orgânica, textura e agregação também influenciam na biodisponibilidade. Além disso, a heterogeneidade do solo também influencia a biodisponibilidade dos HPAs (EWEIS *et al.*, 1998). Nam e Alexander (1998) constataram declínio na biodisponibilidade de Fenantreno em solos com

níveis de matéria orgânica acima de 2%. HUNDAL *et al.* (2001) relataram sobre a retenção de grandes quantidades de fenantreno por argilas esmectitas. A estrutura do solo, tal como agregação (compactação), também pode ser apontada como uma das causas da diminuição da disponibilidade de HPAs através da proteção física no interior (WU e GSCHWEND, 1986). No entanto, a disponibilidade de HPAs não é sempre correlacionada com as propriedades do solo, tais como teor de matéria orgânica e/ou teor de argila, tornando-se difícil a previsão (CHUNG e ALEXANDER, 2002).

A biodisponibilidade também varia conforme os organismos receptores (ALEXANDER, 1999). Por exemplo: Em um ambiente dominado pela população microbiana "A" um certo composto pode ser biodisponível e rapidamente degradado. No entanto, nesse mesmo ambiente com um população microbiana "B", o mesmo composto pode não ser biodisponível. Portanto, um grupo específico de microrganismos e determinados compostos não biodegradáveis irão persistirem no solo (ALEXANDER, 1999). Curiosamente, alguns microrganismos têm mecanismos evoluídos para superar a diminuição da biodisponibilidade em solos e sedimentos. Uma destas técnicas consiste na produção de biosurfactantes para aumentar a solubilidade de contaminantes ou a aderência à superfície do contaminante. Este método torna o ambiente mais acessível para degradação.

A consideração da biodisponibilidade dos HPAs com base nas características dos componentes, características do solo e sedimentos e organismos receptores é importante na remediação de sedimentos de dragagem. A composição dos elementos pode mudar no decorrer de desidratação, onde alguns HPA's de baixo peso molecular volatilizam, enquanto os de alto peso persistem. A adsorção da matéria orgânica pode ocorrer com a idade dos sedimentos e as comunidades microbianas também podem sofrer alterações de acordo com o ambiente anaeróbio ou aeróbio.

Os hidrocarbonetos diferem quanto a sua susceptibilidade ao ataque microbiano, tendo sido ordenados de forma decrescente: n-alcenos, aromáticos de baixo peso molecular, alcenos ramificados e cicloalcenos. Dessa forma, os alcenos não ramificados e os compostos aromáticos de baixo peso molecular são mais suscetíveis ao ataque dos microrganismos do que os compostos aromáticos alquil-substituídos, cicloalcenos, compostos polares e asfaltenos (SALANITRO, 2001). A

solubilidade em água diminui com o aumento do tamanho da molécula e, com exceção do naftaleno, que é relativamente solúvel (32mg/L), os HPAs têm baixa solubilidade em água. Seus coeficientes de partição entre carbono orgânico e água (Kow) são também elevados e, como resultado, em sistemas aquosos, os HPAs tendem a concentrar-se em sedimentos ou ficam associados à matéria orgânica em suspensão (COSTA, 2001).

A pressão de vapor também diminui com o aumento do peso molecular. Como consequência desses fatos, HPAs de dois ou três anéis tendem a concentrar-se na fase gasosa do ar; HPAs com quatro anéis distribuem-se entre as fases do ar e HPAs com cinco anéis ou mais concentram-se principalmente no material particulado atmosférico (COSTA, 2001). Portanto, o metabolismo microbiano de HPAs com um máximo de três anéis aromáticos (naftaleno, fenantreno, antraceno e fluoreno) tem sido estudado intensivamente, havendo, entretanto, uma menor quantidade de informações no que diz respeito às degradações de compostos com mais de quatro anéis benzênicos (CERNIGLIA, 1993). Várias vias metabólicas de degradação dos HPAs já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém, as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos ligninolíticos e os não-ligninolíticos. Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação aeróbica de hidrocarbonetos aromáticos podem ser divididas em três partes: Na primeira, o substrato aromático é transformado num metabólito dihidroxiaromático, tipicamente um catecol, como mostra a Figura 3. A segunda fase consiste na abertura do anel do Catecol por Dioxigenases e na terceira fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central como Acetil-CoA, Oxalato e Piruvato.

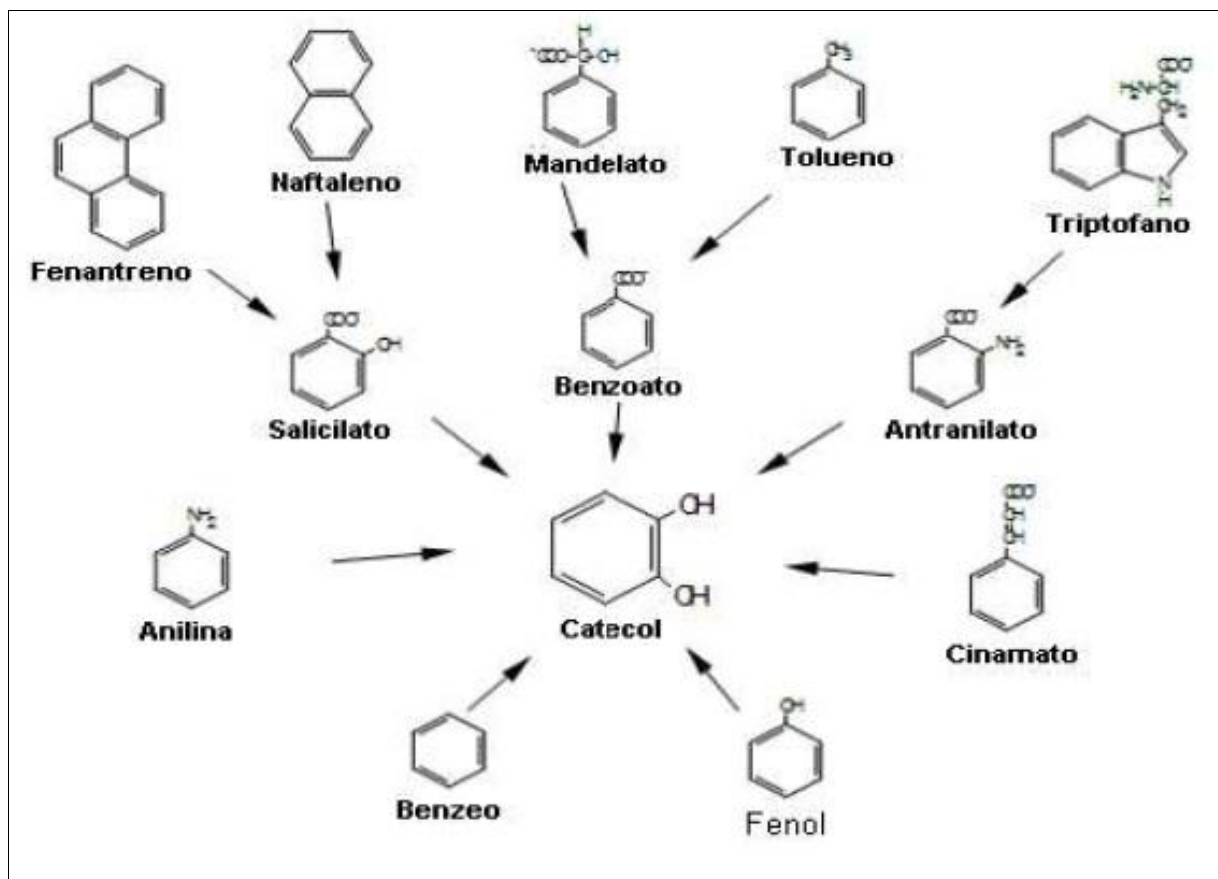


FIGURA 3 - TRANSFORMAÇÃO DE DIVERSOS COMPOSTOS AROMÁTICOS EM CATECOL.
 FONTE: www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=376&canal=5

Durante degradação aeróbia por bactérias, HPAs são oxidados para cis-dihydrodiols através da incorporação de uma molécula de oxigênio. Os cis-dihydrodiols são depois oxidados para os compostos aromáticos di-hidroxi (catecóis) e, em seguida, os anéis de HPAs são clivados com dioxigenases intracelulares (CERNIGLIA, 1989, ALEXANDER, 1999; JOHNSEN *et. al.*, 2005). Oxidação de HPAs não substituídos com alta estabilidade termodinâmica muitas vezes resultam em HPAs que são menos estáveis do que os compostos originais e mais suscetíveis a clivagem (Volkering e Breure, 2003). Produção de oxigenase por bactérias pode ser aumentada utilizando bioestimulantes, como por exemplo o ácido salicílico, que é um conhecido indutor de dioxigenase em naftaleno. YI e CROWLEY (2007) descobriram que o ácido linoleico é um poderoso estimulante de degradação por bactérias gram-positivas de Pireno e Benzo[a]pireno. A adição de substâncias húmicas também aumenta muito a degradação microbiana de HPAs (HOLMAN *et. al.*, 2002; BOGAN e SULLIVAN, 2003).

Fungos da podridão branca (White rot fungi) também foram utilizados para oxidar alguns tipos de HPAs (Antraceno, Fluoranteno, e Benzo[a]pireno) através de desestabilização dos anéis utilizando enzimas não específicas, lignina peroxidase e enzimas peróxido Mn-dependentes (Mn-dependent peroxide enzymes). Estas enzimas produzem compostos intermediários altamente reativos que são oxidados para produzir Quinonas (CERNIGLIA *et. al.*, 1993; JUHASZ e NAIDU, 2000). Citocromo P450, uma enzima encontrada em quase todas as formas de vida, utiliza HPAs como um substrato para uma reação de mono-oxigenase onde o oxigênio é inserido no anel de benzeno durante a biodegradação por fungos de podridão branca. A acumulação de subprodutos de degradação fúngica de alguns HPAs, como por exemplo o Benzo[a]pireno, é motivo de preocupação, uma vez que a monoxigenase oxida estes HPAs para Diol Epóxidos e Dihydrodiols Trans (moléculas ativas relacionadas com a carcinogenicidade de HPAs). CERNIGLIA e GIBSON (1980) observaram que a transformação de fungos de Benzo[a]pireno produz de Benzo[a]pireno, 7,8-diol-9,10-epóxidos, os quais são forma de cancerígena do Benzo[a]pireno em organismos superiores. Isso ocorreu dentro de 12 horas durante uma experiência de incubação. Contudo, mesmo com esta transformação documentada, os pesquisadores ainda não têm certeza do que acontece com os metabolismos no solo.

A completa mineralização é comum para os HPAs de baixo peso molecular. Contudo, degradação parcial e transformação dos HPAs sempre leva a um acúmulo de sub-produtos (CERNIGLIA, 1993). Cetonas e Quinonas são subprodutos comuns da degradação anaeróbia (LEE and HOSOMI, 2001; KOCHANY e MAGUIRE, 1994; MALLAKIN *et. al.*, 1999) e ácidos aromáticos policíclicos hidroxilados resultam da degradação parcial e/ou a transformação de algumas Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos de alto peso molecular (KELLEY *et. al.*, 1993; ROPER e PFAENDER, 2001).

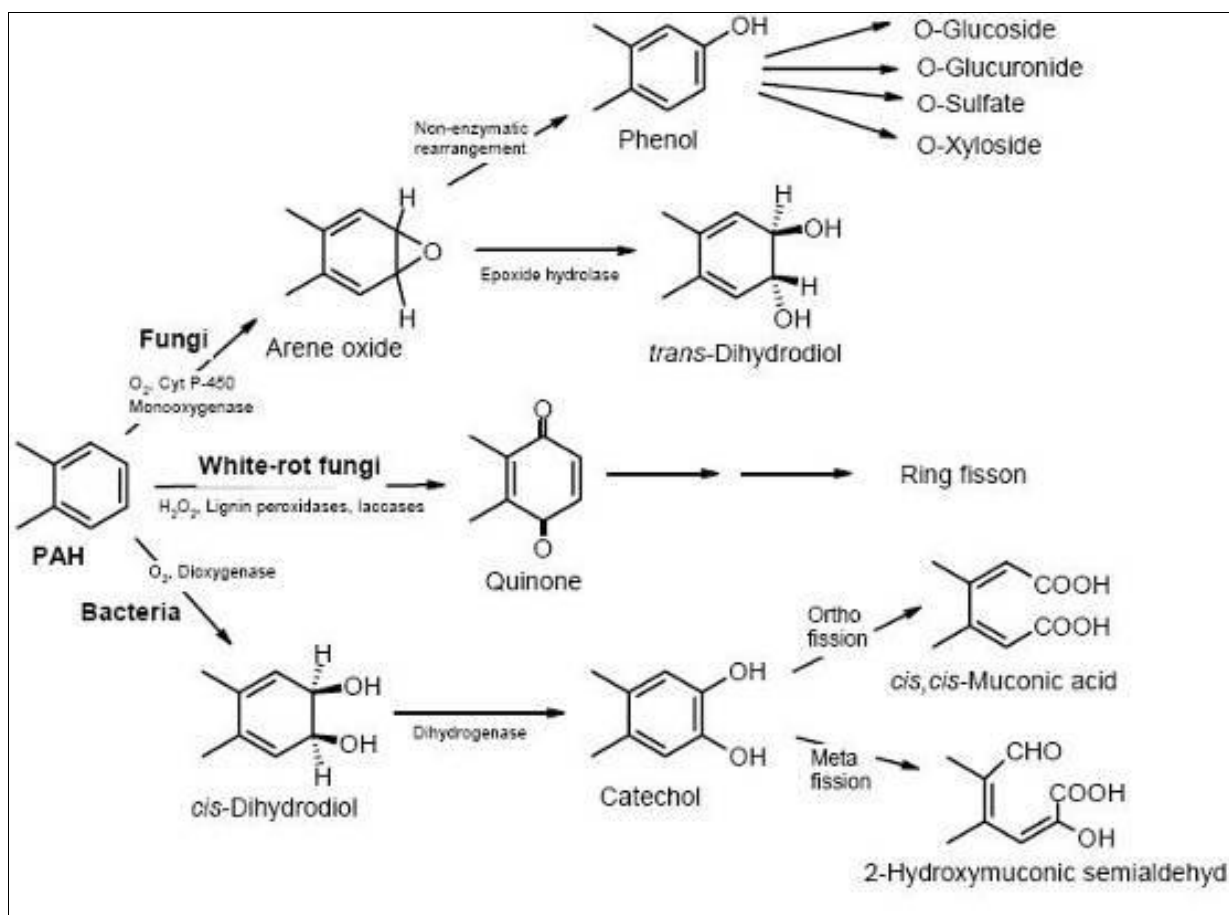


FIGURA 4 – DEGRADAÇÃO AERÓBIA DE HPAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS.
 FONTE: Cerniglia, 1992

Acredita-se que a degradação microbiana dos HPAs seja limitada pelo montante dissolvido na fase de água (OGRAM *et.al.*, 1985; RIJNAARTS *et al.*, 1990; VOLKERING *et. al.*, 1992; VOLKERING *et al.*, 1993; HARMS e BOSMA, 1997; BOSMA *et. al.*, 1997), sendo os contaminantes presentes na fase cristalina (não-dissolvida) indisponível aos microrganismos. Em altas taxas de transferência de massa, a taxa global de biodegradação é controlada pela atividade metabólica das bactérias, ou seja, tanto a atividade específica das células e a densidade de população. Quando o transporte do substrato diminui ou a população bacteriana cresce, a transferência de massa torna-se o fator que limita a biodegradação (VOLKERING *et al.*, 1992). VOLKERING *et al.* (1992) propôs curvas de crescimento bacteriano e concentração de contaminante dissolvido seguindo o modelo exponencial (Figura 5). Estas curvas podem ser divididas em três fases: (I) fase exponencial, (II) fase de crescimento pseudo-linear e (III) fase pseudo-estacionária.

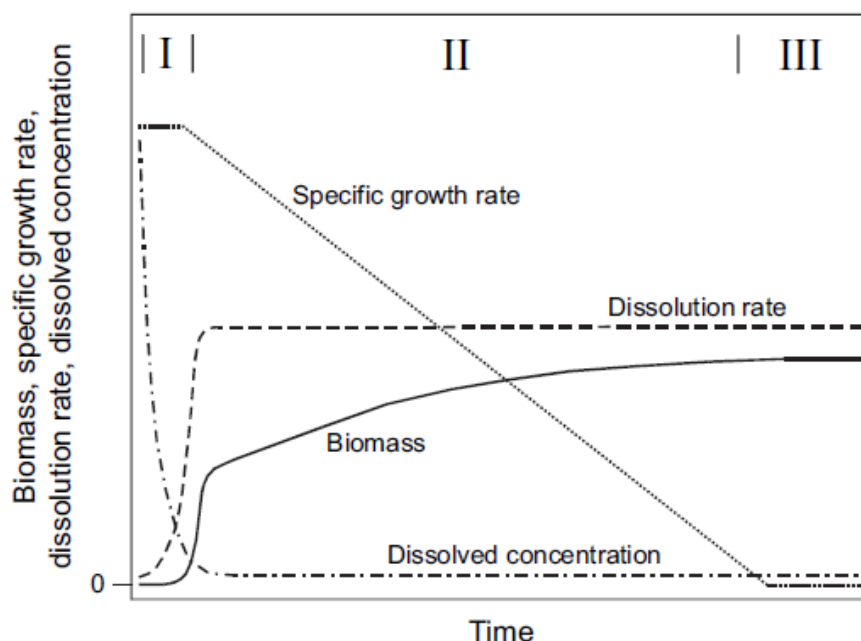


FIGURA 5 – CURVAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO PARA BIOMASSA, TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO, TAXA DE DISSOLUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DISSOLVIDA DE HPAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

FONTE: JOHNSEN, A., R. Principles of microbial PAH-degradation in soil

Portanto, conforme proposto por Volkering et al., a concentração de contaminantes deve seguir o modelo exponencial de primeira ordem descrito pela equação 3.2.1.1.

$$\frac{dC}{dt} = -C \cdot k \quad (3.2.1.1)$$

Integrando a equação acima obtém-se:

$$\ln(C) - \ln(C_0) = -k \cdot t \quad (3.2.1.2)$$

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (3.2.1.3)$$

Expressando os resultados em termos de porcentagem de degradação e adicionando a constante “A” referente ao limite representando pela degradação de contaminante (fase pseudo-estacionária) finalmente encontra-se:

$$100 \cdot \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) = A \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (3.2.1.4)$$

Portanto, realizando-se a regressão exponencial de 1ª ordem obteremos uma equação no modelo da equação 3.2.1.5.

$$y = A \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (3.2.1.5)$$

No cálculo do tempo de meia vida do contaminante, isto é, o tempo necessário para que a concentração total de contaminantes fosse reduzida pela metade, o valor da constante “A” é de extrema importância, pois esta expressa o valor da concentração final do contaminante considerando tempo infinito. Como alguns compostos apresentam degradação com estabilização da concentração final diferente de zero, a avaliação da constante “A” no tempo de meia degradação é indispensável. Assim, para o cálculo do valor de tempo de meia degradação, foi considerado na equação 3.2.1.5 que “y” é igual a 50% e a constante “A” dependente de cada contaminante e do tipo de composto auxiliar utilizado.

$$50 = A \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (3.2.1.6)$$

$$1 - \frac{50}{A} = e^{-kt} \quad (3.2.1.7)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln\left(1 - \frac{50}{A}\right)}{-k} \quad (3.2.1.8)$$

Para o cálculo do tempo de meia degradação ($t_{1/2}$), isto é, o tempo necessário para o contaminante degradar-se até metade do seu valor final estabilizado, é indispensável a consideração de que “y” na equação 3.2.1.5 seja igual a “A/2”, pois a constante “A” expressa o valor da degradação final estabilizada.

Portanto, o cálculo do tempo de degradação de cada contaminante é realizado conforme as equações abaixo:

$$\frac{A}{2} = A \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (3.2.1.9)$$

$$0,5 = 1 - e^{-kt} \quad (3.2.1.10)$$

Finalmente:

$$t_{md} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (3.2.1.11)$$

3.2.2 Fatores que influenciam a biodegradabilidade dos contaminantes orgânicos

Embora vários contaminantes podem ser metabolizados por microrganismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, muitas áreas contaminadas possuem uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias não é metabolizada na mesma velocidade. Em vez disso, as taxas de degradação dos diversos compostos que são metabolizados são diferentes e dependentes de vários fatores. Em especial, a velocidade de degradação é comumente depende da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas *on-site* pelos microrganismos. Nesse contexto, a quantidade de catalisador presente, de certa forma, representa o número de microrganismos hábeis em metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula. Então, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de microrganismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante. Em suma, as medidas corretivas a serem adotadas

em quaisquer projetos que envolvam a biorremediação dependem de vários fatores, dentre eles, pode-se citar:

- a) Tipos e as quantidades dos microrganismos
- b) Condições físicas e químicas do sítio contaminado (como pH, umidade, temperatura, salinidade, teor de oxigênio e quantidade de nutrientes).

Os nutrientes, que geralmente são representados por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), durante a biorremediação, normalmente são utilizados na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3), di-hidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) e nitrato de potássio (KNO_3), respectivamente (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2006). Além das condições citadas, é de extrema importância o conhecimento prévio do teor de matéria orgânica, o qual pode ser expresso pela quantidade de carbono orgânico total no meio. Adicionalmente, HUTCHINSON *et al.* (2003) constataram que o fator principal que influencia na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é a atividade microbiológica. Neste caso, Alexander (1977) discutiu, em detalhes, os efeitos desses fatores sobre os microrganismos. Para estes pesquisadores, a atividade e a população microbiana estão fortemente associadas com os conteúdos de água e de nutriente nos solos, com as espécies de plantas e com os tipos de contaminantes. Além disso, a atividade microbiológica é afetada, sobretudo, pelo valor do pH (Figura 6) e pela temperatura dos solos conforme Figura 7 (TATE, 1995). No tocante ao valor do pH, observa-se da Figura 6 que a faixa ideal de pH para que os microrganismos tenham atividade máxima é entre 6,5 e 8,5. De modo similar, VIDALI (2001) também sugere que o valor do pH do meio reacional deve ser mantido próximo da neutralidade, no qual há o predomínio de bactérias e de fungos no local contaminado. Por outro lado, quando há diminuição do valor do pH, por exemplo, em função dos subprodutos ácidos gerados durante a biorremediação, sugere-se que se faça imediatamente a correção do pH do solo, caso contrário, a eficiência do processo poderá ser diminuída consideravelmente. Normalmente, essa correção é feita por meio da "calagem", processo através do qual se aplica calcário ao solo, objetivando neutralizar a acidez e, então, propiciar condições para o desenvolvimento de plantas e de microrganismos. Salienta-se, porém, que nos solos ácidos o desenvolvimento dos

microrganismos é bastante reduzido, principalmente das bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico, além de tornar o fósforo de difícil aproveitamento pelos vegetais. Nesta situação, embora a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo seja, na maioria das vezes, realizada por bactérias, pesquisas mostram que a utilização de fungos é uma opção considerada bastante viável. Esses microrganismos têm sido mais eficientes que as bactérias para agirem em condições ambientais adversas, como em valores extremos de pH (menor que 5 e maior que 10), em concentrações limitadas de nutrientes e em solos com teores reduzidos de umidade (VIDALI, 2001).

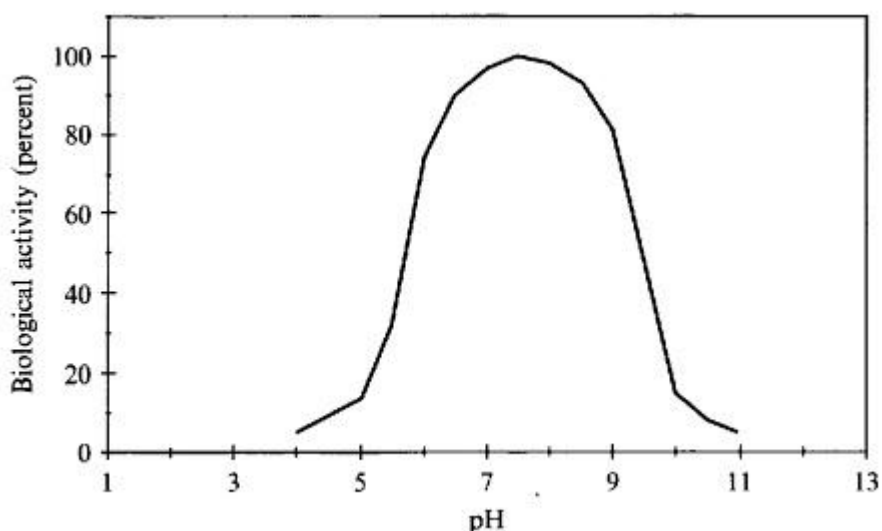


FIGURA 6 – VARIÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA DEVIDO A MUDANÇAS DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO DO SOLO.

FONTE: R.L. Tate, Soil Microbiology (1995).

A faixa de temperatura ideal para os microrganismos metabolizarem os contaminantes com eficiência ótima está entre 25 e 30 °C, conforme Figura 7, na qual se encontra a temperatura média da maior parte dos solos do Brasil contendo áreas degradadas por contaminação de hidrocarbonetos do petróleo (Tate, 1995). Analogamente, estudos realizados pelo USEPA (1995) constatam que a atividade microbiana é bastante comprometida em temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 45 °C. Esta é uma excelente característica para a utilização de biorremediação em solos tipicamente brasileiros e, portanto, reforça a probabilidade da implantação

dessa técnica em números maiores de locais contaminados. Além disso, verifica-se que a temperatura do solo varia diariamente nas proximidades da superfície, em solos com baixa densidade de cobertura vegetal. Abaixo de 50 cm, a variação da temperatura dos solos é pouco significativa.

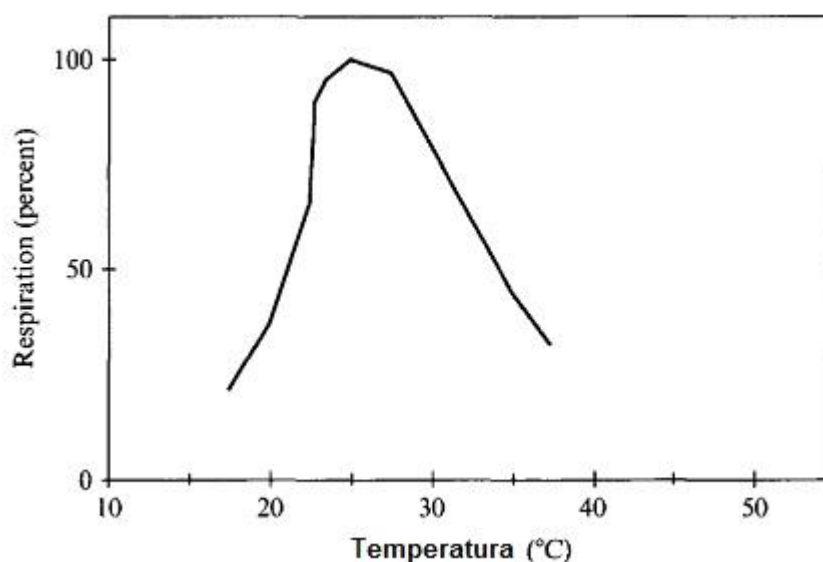


FIGURA 7 – RESPOSTA TÍPICA DE POPULAÇÃO DE BACTÉRIA MESÓFILA À VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

FONTE: R.L. Tate, Soil Microbiology (1995).

A presença de vegetação sobre a área contaminada também afeta atributos físicos dos solos, incluindo estrutura, porosidade, condutividade hidráulica e taxa de infiltração. Esses atributos, em geral, influenciam positivamente a atividade microbiológica por regular o transporte requerido de água e de nutrientes através do perfil dos solos e por controlar a aeração da zona vadosa. Além do mais, a biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo é assistida por microrganismos, que, em geral, dependem fortemente das quantidades de umidade e de oxigênio adequadas. As propriedades físicas dos solos influenciam o transporte de ambas espécies, oxigênio e água. Nesse caso, para a biorremediação de solos, os conteúdos de água entre 50 e 80 % da capacidade e o teor de O_2 dissolvido maior que 1 mg L^{-1} , geralmente, são ótimos para a atividade microbiológica (MORGAN e WATKINSON, 1989).

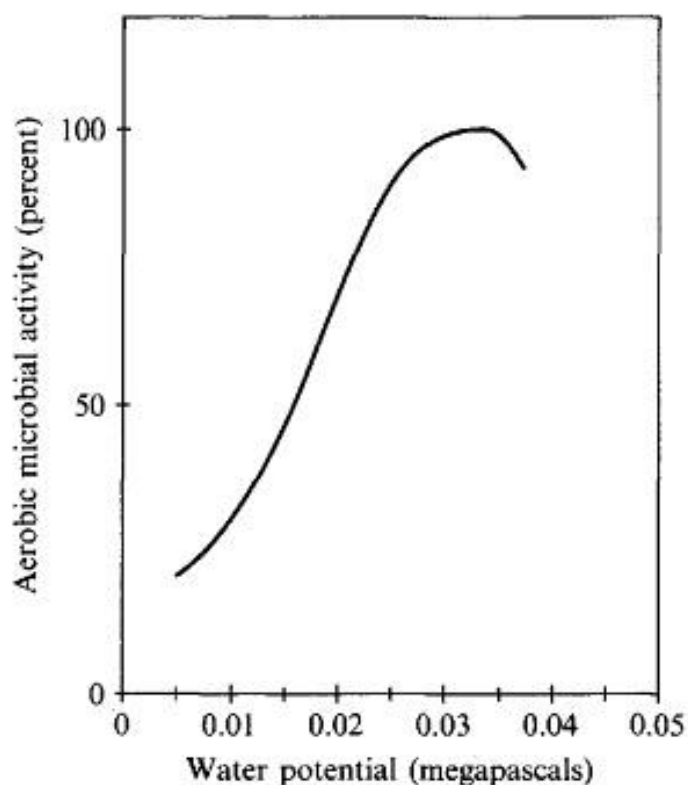


FIGURA 8 – VARIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA EM SOLO EM RELAÇÃO A UMIDADE. FONTE: R.L. Tate, Soil Microbiology (1995).

Portanto, observa-se que os solos possuem, naturalmente, diversos microrganismos com atividades metabólicas variadas e que são capazes de degradar eficientemente diferentes contaminantes, como o petróleo e seus derivados. Contudo, em alguns casos, a contaminação de solos por estas substâncias tem se tornado uma problemática mundial, principalmente, devido à dificuldade de reabilitar a área contaminada. Estes problemas têm ocorrido devido as dificuldades envolvendo a descontaminação dessas matrizes e, entre outros fatores, à presença de materiais argilominerais. Estes argilominerais, quando presentes em quantidades elevadas no solo contaminado, podem reduzir consideravelmente a eficiência do processo de biorremediação. Sabe-se que os solos argilosos, de modo geral, apresentam baixa permeabilidade, o que pode comprometer significativamente tanto a difusão de oxigênio, que é o elemento fundamental ao processo aeróbico de degradação, bem como a incorporação de nutrientes. É evidente que a estrutura dos solos também exerce influências significativas sobre as características físico-químicas. Dependendo da estrutura, mesmo que os solos sejam argilosos, eles

podem ter permeabilidades elevadas. Os latossolos argilosos, por exemplo, que ocupam extensas áreas no Brasil, apresentam comumente estrutura granular e, desta forma, elevada permeabilidade. Além da presença de argilominerais, muitos compostos orgânicos apresentam como características físico-químicas, baixa solubilidade em água, elevada afinidade pela matéria orgânica do solo, como os ácidos húmico e fúlvico e, conseqüentemente, baixa taxa de transferência de poluentes da fase sólida para a aquosa. Sendo assim, devido principalmente às características hidrofóbicas, esses contaminantes tendem a se adsorverem nos colóides do solo dificultando a ação de microrganismos e, por conseqüência, inviabilizando a técnica de biorremediação. Portanto, outra limitação da biorremediação surge devido à baixa disponibilidade de contaminantes orgânicos, como os HPA e outros hidrocarbonetos de petróleo. SCHWARZENBACH *et al.* (2005) presenciaram e relataram sobre estas e outras propriedades para os HPA estudados. Nesse contexto, a utilização de um agente tensoativo pode minimizar essas dificuldades e aumentar a eficiência da biorremediação, haja vista que os problemas relativos à baixa solubilidade em água, elevada adsorção e baixa transferência dos hidrocarbonetos para a fase aquosa, são minimizados. De acordo com OU (2000), de fato, a maior eficiência na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo pode ser alcançada empregando-se surfactantes. Estes compostos diminuem a tensão superficial entre a fase aquosa (na qual normalmente ocorre a degradação do contaminante) e a fase orgânica (na qual o contaminante se encontra inicialmente presente), favorecendo a dessorção e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade dos contaminantes. Os surfactantes, como por exemplo o Dodecil Sulfato de Sódio, são capazes de emulsificar e aumentar a solubilidade dos contaminantes hidrofóbicos, tornando-os mais acessíveis aos microrganismos (CLU-IN, 2006). Contudo, a degradação biológica de compostos orgânicos é alcançada com alta eficiência somente em condições naturais favoráveis, que proporcionem interações otimizadas entre o microrganismo, o solo, e o contaminante, assim como a relação mútua dos microrganismos entre si.

COULON e DELILLE (2006) e HAWROT e NOWAK (2006) investigaram que as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação de poluentes em solos contaminados, por exemplo, com óleo diesel. Neste caso, podem ser empregados nutrientes, como o nitrogênio, o fósforo e o potássio, além de procedimentos para a

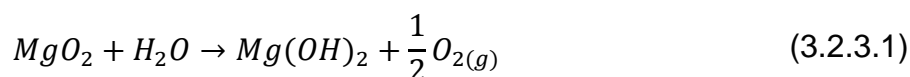
correção de umidade e o controle da aeração para acelerar os processos de biorremediação.

3.2.3 Utilização de Peróxido na bioestimulação de bactérias

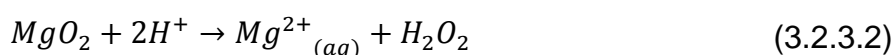
Sabendo-se que os microorganismos presentes nos solos, em condições favoráveis, tem o poder de degradar hidrocarbonetos de petróleo muitas pesquisas vêm sendo realizadas envolvendo a biorremediação. Os baixos custos envolvidos nas transformações bioquímicas *in-situ*, além da possibilidade de redução, ou até mesmo de eliminação total dos contaminantes, são fatores que favorecem a atratividade das técnicas de biorremediação. No tocante ao desenvolvimento de novos reagentes, cujas utilizações estão voltadas para a aceleração de processos bioquímicos de degradação *in-situ*, pode-se citar o composto *Oxygen Release Compound* (ORC®). Este produto, que vem sendo utilizado em inúmeros casos nos Estados Unidos, apresenta em sua composição peróxido de Magnésio (MgO_2). O peróxido, após combinado com a água, apresenta a propriedade única de liberar gradativamente gás Oxigênio (O_2) no sistema, promovendo a bioestimulação dos microorganismos presentes. Conseqüentemente, promete reduzir a concentração de contaminantes (hidrocarbonetos de petróleo) no sistema.

O oxigênio sempre foi um fator limitante para a degradação aeróbica de contaminantes em áreas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo. Sem a quantidade adequada de oxigênio, a degradação dos contaminantes poderá cessar ou ocorrer de maneira muito lenta. O composto ORC® foi desenvolvido para acelerar o processo de degradação natural de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. O ORC® é um peróxido de magnésio industrial formulado para liberar oxigênio de maneira controlada. Pesquisas mostram que estes reagentes, dependendo das condições do local, quando hidratados, podem liberar oxigênio molecular de maneira lenta e em concentrações controladas durante um período de até 12 meses (BASTIAENS *et al.*, 2003; COLVIN, 2005; FUKADA e TAKAGI, 2003; KOENNIGSBERG e WILLETT, 2005; REED, 2004; WYNN, 2003). O ORC® também apresenta em sua estrutura intercalação de moléculas de MgO_2 com moléculas de fosfato. Esta disposição evita a ocorrência do fenômeno chamado de "travamento do

oxigênio. Quando soluções de peróxido de magnésio não intercaladas com fosfato reagem com água, uma camada de hidróxido de magnésio se forma em torno dos cristais, dificultando a hidratação das moléculas restantes. Portanto, com a adição de fosfato, todo o oxigênio disponível pode ser liberado. Esta disposição resulta na liberação de oxigênio de maneira controlada e de longa duração, sendo estes são fatores essenciais para a introdução de oxigênio de modo passivo no sistema (CLEAN ENVIRONMENT BRASIL, 2014). O termo "intercalado" refere-se à maneira pela qual o fosfato permeia na estrutura dos cristais do peróxido de magnésio, conforme ilustrado na Figura 9. A equação química que envolve a reação utilizando compostos a base de Peróxido de Magnésio é a seguinte:



A taxa de oxigênio ativo gerado depende das propriedades físicas e químicas do ambiente. Em ambiente aquoso e com baixo valor de pH, peróxido de magnésio se decompõe como ilustrado nas equações 3.2.3.2 e 3.2.3.3. (WALAWSKA *et al.* 2007).



Os peróxidos, quando em altas concentrações combinados a outros parâmetros, resultam em maiores níveis de degradação. WATTS e STANTON (1999) verificaram que altas concentrações de H_2O_2 , foram suficientes para promover a maior dessorção e oxidação de Hexadecano em areia (silica). KONG *et al.* (1998) estudaram um solo arenoso contaminado com diesel e querosene, e observaram

que quanto maior a concentração de H_2O_2 maior a degradação dos contaminantes. Os Peróxidos de Cálcio e Magnésio são também bastante utilizados como liberadores de oxigênio e por serem pouco solúveis na água, liberam oxigênio por um longo período de tempo (WALAWSKA et al. 2007). Segundo WALAWSKA *et al.* (2007) o conteúdo de oxigênio ativo nos produtos comerciais de MgO_2 e CaO_2 pode variar numa ampla faixa: 8-10% e de 17-18% m/m respectivamente, com uma solubilidade de $<0,01\%$ a $T=20^\circ\text{C}$, para ambos os compostos.

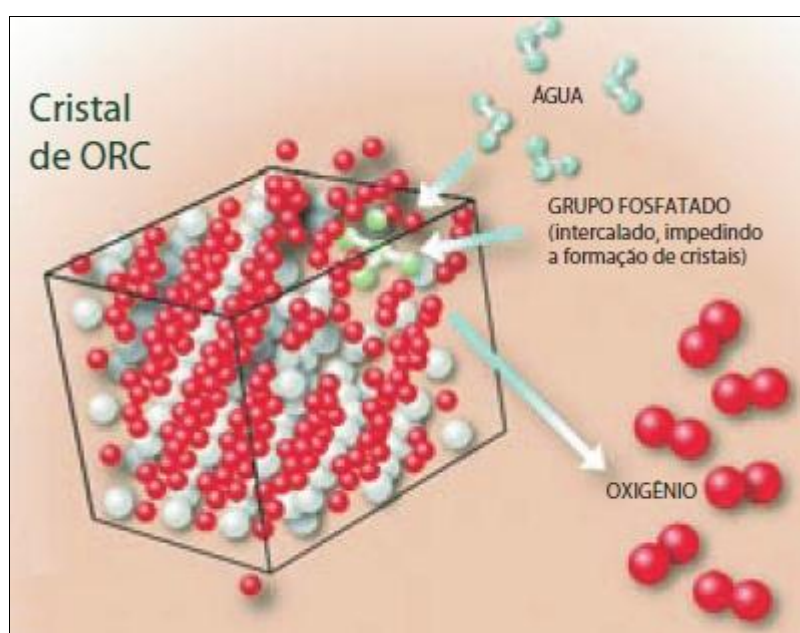


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO OXIGÊNIO SENDO LIBERADO PELA INTERCALAÇÃO DO PERÓXIDO DE MAGNÉSIO E FOSFATO.

FONTE: Regenesis (2014)

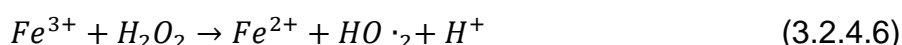
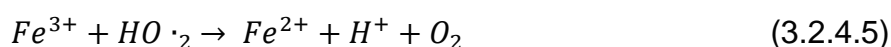
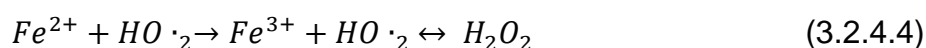
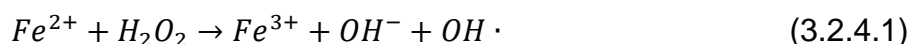
3.2.4 Reação Clássica de Fenton

Em 1894, H.J.H. Fenton observou pela primeira vez as propriedades fortemente oxidantes de uma solução de peróxido de hidrogênio e íons Fe^{2+} . Utilizando este reagente muitas moléculas orgânicas podiam ser facilmente oxidadas sem recorrer a altas pressões, altas temperaturas ou equipamentos complexos. A Reação de Fenton, definida hoje como a geração catalítica de radicais hidroxila a

partir da reação em cadeia entre o íon ferroso (Fe^{2+}) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), em meio ácido, tem demonstrado ser bastante eficiente na oxidação de compostos orgânicos tóxicos e não biodegradáveis.

Na reação de Fenton a formação dos radicais hidroxila (reação 3.2.4.1) que normalmente são referenciados como as espécies oxidantes dominantes, é determinante na velocidade de reação (WLASSICS, 1995). Os radicais hidroxila podem ser gerados por pequenas quantidades de ferro em concentrações tão baixas como 0,05 mM. Além desta etapa de iniciação, é possível que ocorram diversas reações competitivas durante o tratamento com o reagente de Fenton, envolvendo as espécies Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2 , $HO\cdot$, HO_2 dentre outros (VENTAKADRI e PETERS, 1993).

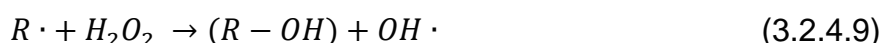
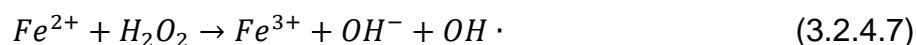
O mecanismo de reação, proposto e estudado por Metilitsa é apresentado na equações 3.2.4.1 a 3.2.4.6.



Metilitsa (1999) concluiu que, quando se trabalha com excesso de íons Fe^{2+} , ocorre preferencialmente as reações (3.2.4.1) e (3.2.4.2), enquanto que com excesso de Peróxido de Hidrogênio em meio ácido ocorrem preferencialmente as reações (3.2.4.1), (3.2.4.3) e (3.2.4.4). As reações (3.2.4.5) e (3.2.4.6) são consideradas desprezíveis. Por fim, para concentrações semelhantes de Fe^{2+} e H_2O_2 , ocorrem apenas as reações (3.2.4.1), (3.2.4.2), (3.2.4.3) e (3.2.4.4).

O radical hidroxila é uma espécie sujeita a um tempo de vida extremamente curto. Contudo, seu potencial de oxidação é muito alto, podendo ser sequestrado por outras espécies como o Fe^{2+} (reação 3.2.4.2) ou mesmo H_2O_2 (reação 3.2.4.3). Na ausência de um substrato observa-se a decomposição auto catalítica do peróxido de hidrogênio em oxigênio gasoso e água (AL-HAYEK e DORÉ, 1985), mas, na sua presença, os radicais hidroxila oxidam a matéria orgânica (reação 3.2.4.7).

Em 1949 Mertz e Waters demonstraram que a oxidação da matéria orgânica com reagente de Fenton pode ocorrer através de um mecanismo de reação em cadeia na qual a etapa limitante é a formação de radicais hidroxila.



Em relação à cinética, estudos realizados anteriormente estão condicionados quer pelo tipo de substrato orgânico presente no efluente, quer pelas condições em que se realiza a oxidação. No entanto, é consensual que a temperatura, a quantidade de matéria orgânica, as concentrações de peróxido e de ferro influenciam a velocidade de reação. Vários estudos indicam que a reação global com reagente de Fenton é de primeira ordem em relação à concentração de substrato orgânico no efluente. (CASTO, J.P. e FARIA, P.; 2001).

Os radicais hidroxila gerados através do reagente de Fenton têm mostrado oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos complexos em sistemas puros, efluentes industriais e solos (Flaherty e Huang,1997). Este processo avançado de oxidação pode ser usado no tratamento de uma grande variedade de

resíduos contaminados com uma grande diversidade de compostos tóxicos e efluentes industriais complexos resultantes das indústrias de corantes, borrachas, pesticidas, aditivos plásticos.

Al-Hayek e Doré (1985) estudaram a oxidação Fenton em compostos modelo como fenóis, ácidos aromáticos e ácidos alifáticos, concluindo que a reatividade depende da natureza dos compostos orgânicos e que a reação em qualquer caso é condicionada pela presença de Fe^{2+} no meio reacional.

Alguns estudos da aplicação do reagente de Fenton, à escala laboratorial, no tratamento de águas residuais, são também citados por Ventakadri e Peters (1993) como os de Walton et al. (1985), que obtiveram uma redução de 90% de tiosulfatos e sulfuretos em poucos minutos. O tratamento de águas residuais contendo dodecilbenzenossulfonato de sódio e ácido p-toluenossulfónico, usando o reagente de Fenton, foi também estudado pelos mesmos autores. Referem também o seu uso no tratamento de águas residuais contendo fenol e formaldeído resultantes da produção de resinas de fenol/formaldeído.

Bowers et al. (1992) estudaram a aplicação do reagente de Fenton na remoção de compostos fenólicos de águas residuais como pré-tratamento do tratamento biológico, tendo observado uma significativa redução da toxicidade e aumento da biodegradabilidade. A oxidação com o reagente de Fenton pode aumentar a biodegradabilidade da solução de pentaclorofenol (PCP) de 30 a 100% (Ravikumar e Gurol, 1991) e de 32 a 73% a da solução de tricloroetileno (Gurol e Ravikumar, 1992), tal como é referido por Guedes (1998).

O reagente de Fenton também foi proposto para a descontaminação de solos, tanto para tratamento de PAHs refractários antes do tratamento biológico como para pós-tratamento de PAHs residuais. Solos contaminados com misturas de PAHs foram testados com sucesso com um período de reacção de 16 horas (Kelley et al., 1990).

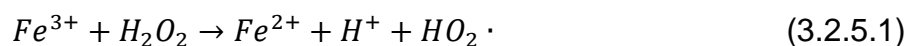
3.2.4.1 Fatores que influenciam as reações de Fenton

3.2.4.1.1 Concentração de Ferro

Na ausência de Ferro não se verifica formação de radicais hidroxilo. A partir de uma dada concentração, um aumento na dosagem de Ferro não causa uma maior remoção. Este fator leva a crer que existe uma quantidade ótima de catalisador a utilizar. Vários estudos indicam que uma razão mássica de 1:5 entre Ferro e Peróxido de Hidrogênio (1:5 Fe:H₂O₂ m/m) provoca uma remoção de cor e matéria orgânica que não são melhoradas pela adição de uma maior quantidade de Ferro (BIGDA, R. J.,1995).

3.2.5 Reação Modificada de Fenton

Na reação clássica de Fenton, o peróxido de hidrogênio diluído (H₂O₂) (0,03% m/v) reage com íon ferroso (Fe²⁺) em uma solução homogênea originando o radical hidroxila (•OH) e o íon férrico (Fe³⁺) (HABER e WEISS, 1934). O radical hidroxila é conhecido como sendo a segunda espécie química mais reativa, ao lado apenas do átomo de Flúor. Ele atua como o principal radical que oxida contaminantes orgânicos, como por exemplo os HPAs. Para regenerar Fe²⁺ a partir de Fe³⁺, a solução tem de ser acidificada a pH abaixo de 5 (KWAN e VOELKER, 2002), conforme equação 3.2.5.1.



Qualquer desvio da reação clássica de Fenton é chamado Reação de Fenton Modificada. Estas reações utilizadas para redução de contaminantes HPAs focam principalmente sobre os desafios da redução da disponibilidade de contaminantes devido à adsorção à matriz do solo, decomposição do Peróxido de Hidrogênio, diminuição da disponibilidade do catalisador de ferro e devido à manutenção do pH da reação. No entanto, nos casos em que a modificação envolve

apenas maior concentração de reagentes (todas as outras condições permanecem as mesmas), estas reações são taxadas como Reação de Fenton Convencional, permitindo uma diferenciação a partir de outros tipos de reações de Fenton modificadas.

Particularmente no solo, a necessidade de pH baixo para o desenvolvimento da reação de Fenton convencional é um obstáculo grande a ser superado, pois impossibilita o tratamento biológico. Apresenta também impactos negativos sobre as propriedades do solo, (SIRGUEY *et al.*, 2008;. SAHL e MUNAKATA-MARR, 2006). Portanto, a reação de Fenton foi modificada para alargar a sua gama de aplicabilidade em solo com pH nativo, que é aproximadamente a condição neutra. Com relação a isso, reagentes de Fenton modificado utilizando agentes quelantes biodegradáveis tem atraído muito interesse. Os agentes quelantes são adicionados para prevenir a precipitação do ferro em pH aproximadamente neutro formando complexos com o ferro catalisados e minimizando as perdas não específicas de ferro solúvel (KANG e HUA, 2005). Estes agentes, tais como Catecol, Ácido Nitrilotriacético (NTA), Etanol Dissódico Diglicina (HEIDA) e Ácido Gálico foram testados em solos contaminados por HPAs, tal como tratamento único ou em combinação com tratamento biológico (NAM *et al.*, 2001;. FERRARESE *et al.*, 2008.; GRYZENIA *et al.*, 2009).

A Degradação de contaminantes e geração de radicais livres sem ajuste de pH nas reações de Fenton modificadas é considerada muito mais prática para aplicações *in-situ*, sendo sugerida também por KAKARLA *et al.* (2002). Outras vantagens da adição de agentes quelantes incluem a prevenção de que nutrientes necessários ao desenvolvimento dos microrganismos sejam precipitados e redução de toxicidade de alguns íons metálicos no ecossistema do solo. Apesar das vantagens, a maiorias dos trabalhos utilizando agentes quelantes orgânicos relataram a formação de subprodutos tóxicos (por exemplo ácido tetracético de etileno-diamina e nitrilo triacético ácido) causando baixa aplicabilidade ambiental. NAM *et al.* (2001) examinaram a eficácia da reação de Fenton para remediar solos em plantas de gás. Os resultados revelaram que apenas 20-40% de HPAs de elevado peso molecular foram degradados pela reação de Fenton convencional. Na tentativa de superar as limitações de oxidação convencional Fenton, tratamentos com Fenton modificado utilizando íons férrico e agentes quelantes orgânicos (Catecol e Ácido gálico) resultaram em uma remoção de HPAs de baixo peso

molecular maiores que 98%. Para HPAs de alto peso molecular a remoção foi próxima de 70%.

VENY *et al.* (2012) avaliou a aplicabilidade de agentes quelantes inorgânicos como por exemplo o Pirofosfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Segundo o autor, umas das vantagens de se utilizar agentes quelantes inorgânicos é a diminuição de competição por radicais ativos gerados para oxidar os poluentes, a quantidade de carbono orgânico total não é aumentada pela adição do agente e não formação de subprodutos tóxicos. O autor, utilizando concentrações ótimas de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solo}$ 0,05; $\text{Fe}^{3+}/\text{solo}$ 0,025; $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7/\text{solo}$ 0,04, apresentou remoção de HPAs entre 79,42% e 68,08%.

Outros compostos têm sido estudados para aumentar a eficácia das reações de Fenton. Para o pH acima de 4, estabilizadores de sais ter sido aplicados para evitar a decomposição de H_2O_2 . Entre os sais testados, Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) conferem maior estabilidade (KARKALA e WATTS, 1997). Este tem sido utilizado por VALDERRAMA *et al.* (2009) para aumentar o desempenho do tratamento biológico em HPAs. Outra alternativa para a utilização de peróxido de hidrogênio é a adição de Peróxido de Cálcio ou Magnésio que permite a liberação de H_2O_2 em pH quase neutro (BOGAN *et al.*, 2003.; NDJOU'OU e CASSIDY, 2006; GRYZENIA *et al.*, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados ensaios com o objetivo de analisar o comportamento dos sistemas estudados (solo-contaminante-MgO₂). Com esse intuito, foram feitos ensaios para a caracterização do solo utilizado, extração do contaminante da matriz do solo e reações de oxidação usando o sistema Fenton para verificar a remoção do contaminante (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos).

4.1 PREPARAÇÃO DO SOLO

O solo utilizado nos experimentos foi coletado nas instalações da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico. A parte superior do solo foi descartada, sendo coletado apenas o solo abaixo de 15 cm da superfície. No momento da coleta, a amostra foi caracterizada quanto à cor e à textura. Antes de ter sido usado em qualquer ensaio experimental, o solo foi macerado e passado em peneira de 4 mm (#5 *mesh TYLER*) para que o mesmo apresentasse granulometria uniforme (Wang e Lemley, 2006; Rissato *et al.*, 2006).

4.1.1 Contaminação do Solo

O solo foi contaminado seguindo as orientações e técnicas descritas por BRINCH *et. al.* em seu trabalho “Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds” (método para contaminação de amostras de solos com compostos orgânicos). Neste trabalho o autor descreve qual a melhor forma de se realizar a contaminação de solos com compostos orgânicos, neste caso hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sem alterar drasticamente o ambiente, evitando o comprometimento dos resultados da biorremediação.

Foi utilizado como ambiente de reação tubos de ensaio de 10 ml, todos contendo tampa com rosca e selos de Teflon®, evitando a perda de compostos voláteis e consequente modificação do ambiente de reação. Todas as proporções de

solvente, umidade e solo foram mantidas conforme apresentado por BRINCH *et. al.*. Inicialmente, em cada tubo de ensaio, foram pesados aproximadamente 1,4 g de solo úmido, anteriormente caracterizado e preparado. Em seguida foi adicionada a solução de solvente contendo os contaminantes (HPAs). Os tubos de ensaios foram então fechados e misturados por 5 min para homogeneização do meio. Em seguida todos os tubos foram abertos e deixados evaporar (para retirada dos solventes) pelo período de 16 horas. Finalmente foi adicionada em cada tubo a proporção de água perdida durante a evaporação dos solventes.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

4.2.1 Medida do pH

O pH do solo foi determinado utilizando-se um método baseado em SILVA *et al.* (2006). O procedimento consistia em colocar 100 mL de água destilada e deionizada com pH neutro sobre uma amostra de 20 g de solo. O solo ficou em contato com a água por 30 minutos em constante mistura e, em seguida, utilizando o pHmetro, foi determinado o valor do pH do solo. Esse procedimento foi realizado para seis amostras.

4.2.2 Teor de Umidade

Utilizando cadinhos de porcelana previamente muflados, 5 diferentes amostras de solo bruto (aproximadamente 5,0 g) foram pesadas em balança analítica. Em seguida, essas amostras de solo foram colocadas numa estufa a 100°C por 4 horas. Após secagem na estufa, as amostras ficaram no dessecador até atingirem a temperatura ambiente, que era de aproximadamente 25°C. Ao final deste último procedimento as amostras foram pesadas novamente e calculado o teor de umidade conforme equação 4.2.2.1. O calculado efetuado foi por média simples da diferença gravimétrica, método baseado em SILVA *et al.*, 2006.

$$U\% = \frac{P_o - P_f}{P_o} \times 100 \quad (13)$$

Onde:

- P_o : Massa inicial de solo [g]
- P_f : Massa final de solo [g]
- $U\%$: Percentual de Umidade Total [%]

4.3 COMPOSTOS A BASE DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO

4.3.1 ORC® (Oxygen Release Compound)

O composto industrial ORC®, utilizado neste trabalho, é um produto comercial composto basicamente por Peróxido de Magnésio (MgO_2) e Óxido de Magnésio (MgO) produzido pela empresa Regenesis, Estados Unidos, Califórnia. Conforme ensaios realizados em laboratório, o teor de Peróxido de Magnésio foi de 29,19%, sendo o teor especificado pelo fabricante entre 25-35%.

4.3.2 Peróxido de Magnésio Preparado em Laboratório

No laboratório foram realizados testes com o propósito de se obter um composto alternativo ao uso do ORC®. O elemento responsável pela liberação do oxigênio é o mesmo do produto comercial ORC®, o Peróxido de Magnésio (MgO_2), porém foram utilizados diferentes teores de peróxido de magnésio e fósforo com o propósito de se obter uma melhor eficiência de remoção dos contaminantes (HPAs).

4.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE HPAs NA MATRIZ SOLO

4.4.1 Materiais e Equipamentos

Todos os solventes utilizados (Acetona, Diclorometano e n-Hexano) apresentam pureza acima de 95%, fornecidos pela empresa Panreac.. A Sílica Gel utilizada nas colunas cromatográficas foi fornecida pela Macherey-Nagel, modelo Sílica Gel 60 / 70-270 mesh ASTM, próprias para HPAs e ativadas em estufa a 130°C por tempo não menor que 16 horas seguindo as orientações da USEPA 3630C. Sulfato de Sódio Anidro fornecido pela empresa Dinâmica apresenta pureza superior à 99%, sendo ativado por mufla a 400°C por 4 horas, também utilizando as orientações contidas na referência da USEPA 3630C. Um padrão analítico contendo os 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos prioritários segundo a USEPA fornecido pela Sigma-Aldrich foi utilizado para contaminar as amostras de solo, apresentando seguintes compostos na concentração de 2.000 ug/mL cada elemento:

Naftaleno, Acenafteno, Acenaftileno, Antraceno, Fenantreno, Fluoreno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Criseno, Benzo(g,h,i)perileno, Dibenzo(a,h)antraceno, Indeno(1,2,3-c,d)pireno.

O composto ORC® foi fornecido pela empresa Regenesis, apresentado teor aproximado de 35%. Para a síntese do Peróxido de Magnésio preparado em laboratório foram utilizados Peróxido de Hidrogênio 200 volumes marca Alphatec e Óxido de Magnésio fornecido pela empresa Vetec, teor mínimo de 95%. Para a reação Fenton modificada foram utilizados Pirofosfato de Sódio Tetrabásico Decahidratado teor acima de 99% e Sulfato de Ferro III Hidratado teor 75,6%, ambos fornecidos pela empresa Neon.

4.4.2 Extração dos Hidrocarbonetos

A extração dos hidrocarbonetos seguiu a metodologia descrita no trabalho de BANJOO, D. e NELSON, P. (2005) com alterações na quantidade de amostra, porém sempre mantendo a proporção descrita pelos autores. Alguns procedimentos utilizaram técnicas descritas pela USEPA 3550 e 3630C com o intuito de aumentar a eficiência de extração.

Partindo-se de aproximadamente 1,4 g de amostra de solo pesado em balança analítica, foram realizadas 3 extrações em série. Cada etapa da extração utilizava 2,5 mL de solução 1:1 n-Hexano e Acetona (v:v). Após a adição da mistura de solvente, os tubos de ensaio contendo a amostra de solo e o solvente eram homogeneizados em Vortex. Posteriormente, os tubos de ensaio eram postos em banho ultrassônico com duração de 10 minutos para cada extração. Nesta etapa, com a presença de fortes ondas ultrassônicas, a energia cedida pelo banho ultrassônico desprendia as moléculas orgânicas da matriz, ocorrendo a migração dos analitos desejados para o solvente. Em seguida as amostras eram centrifugadas em centrífuga marca Celm modelo LS-3, cada etapa com duração de 6 minutos com rotação de 3.000 rpm. Os três extratos obtidos eram combinados em balões volumétricos para posterior redução do volume em rotaevaporador, modelo R-210 da marca Buchi. Segundo USEPA 3550, sob risco do procedimento de Cleanup não ser efetivo, é necessário que apenas o solvente não polar (neste caso o n-Hexano) contenha os contaminantes. Logo, foram realizadas duas reduções no volume, com posterior adição de n-Hexano nos balões volumétricos, para volatilizar toda a Acetona utilizada previamente. Nas reduções sempre se manteve o volume final acima de 1,0 ml. Quando o volume é reduzido a um valor menor que 1,0 ml a perda de semi-voláteis passa a ser intensa (USEPA 3630C). A adição do Surrogate (9,10 DihidroAntraceno) foi efetuada na primeira extração.

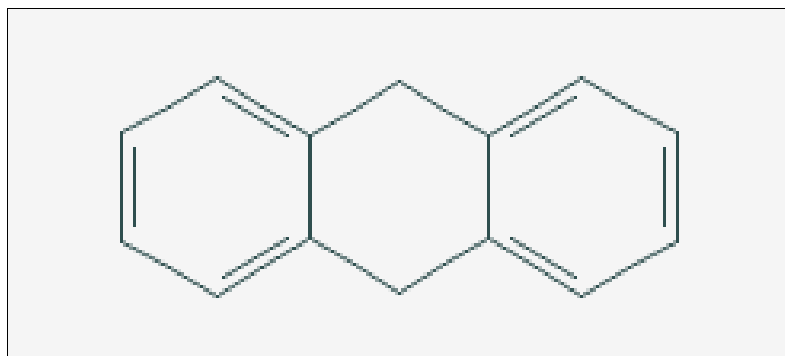


FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 9,10-DIHIDROANTRACENO.
 FONTE: Sigma-Aldrich, 2014. Disponível no site:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/126179?lang=pt®ion=BR>

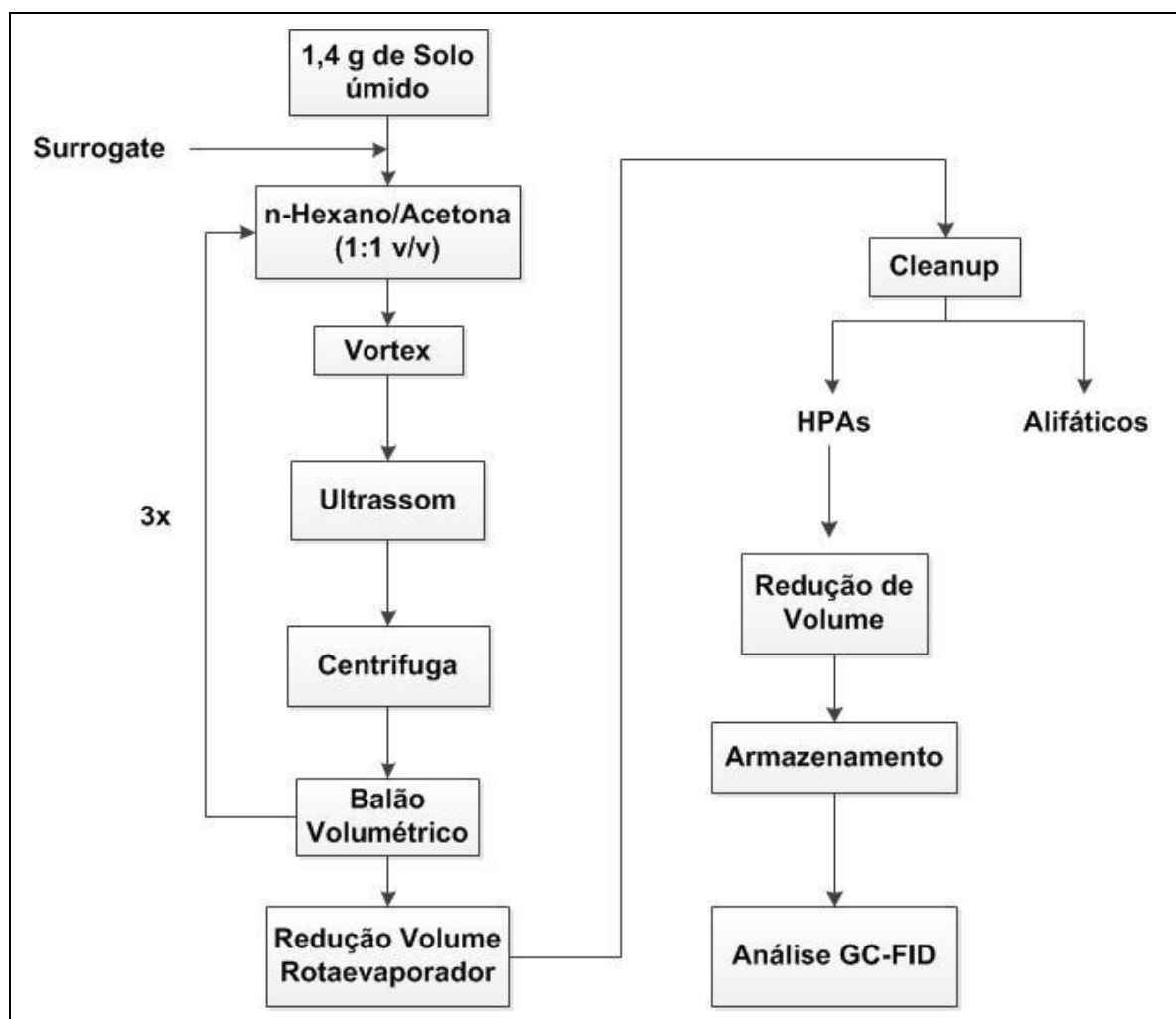


FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA ENSAIOS DE HPAs

4.4.3 Cleanup das amostras

Após o procedimento de extração foi efetuado o procedimento de Cleanup. Em virtude das amostras de solo conterem diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, é indispensável a utilização do Cleanup com o intuito de separar os diferentes elementos para posterior análise cromatográfica dos HPAs. A passagem das amostras por uma coluna de sílica promove a separação dos hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.

A metodologia utilizada no processo segue os princípios descritos por Banjoo e conforme USEPA 3630C. Para a realização do Cleanup utilizou-se como colunas cromatográficas pipetas de vidro de 5mL, em cada coluna 1,4 g de sílica gel cromatográfica ativada (16 horas em mufla a 130°C) e 0,2 g de Sulfato de Sódio Anidro ativado (4 horas em mufla a 400 °C). Após o preenchimento da coluna, foi efetuado a pré-eluição com 5,0 mL de n-Hexano. Em seguida foi adicionado o solvente contendo os contaminantes (HPAs). Uma porção de n-Hexano de 5,0 mL é adicionada à coluna com o intuito de remover a fração dos hidrocarbonetos alifáticos. Logo em seguida, duas porções de 5,0 mL de solução n-Hexano e Diclorometano 10:1 (v/v) foram utilizadas para remover a fração dos HPAs. Este extrato foi coletado e posteriormente reduzido de volume para, finalmente, ser realizada a análise em cromatógrafo gasoso com detector por ionização de chama (GC-FID). Os “*vials*” contendo os HPAs foram acondicionados em ambiente protegidos da luz a uma temperatura de -18°C até o momento das análises cromatográficas. O fluxograma da Figura 11 ilustra esquematicamente as etapas da extração dos hidrocarbonetos desejados neste estudo.

4.4.4 Condições cromatográficas do GC-FID

As condições cromatográficas utilizadas nas análises dos HPAs e hidrocarbonetos alifáticos estão descritas na Tabela 3. Elas foram adaptadas do trabalho de Banjoo e Nelson (2005).

TABELA 3 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.

Informações do equipamento	Fabricante: Agilent Modelo: GC-FID 7890A
Injetor	Modo: Splitless Temperatura: 250°C Pressão: 6,1545 psi Volume de injeção: 1,0 uL
Coluna	Modelo: Agilent HP5 Dimensões: 30m x 320µm x 0,25µm Temperatura máxima: 320°C
Fluxo de gás na coluna (gás de arraste)	1,32 mL/min de Nitrogênio
Rampa de Temperatura	1) Início 45°C por 1 min 2) Elevação da temperatura a 25°C/min até 160°C. 3) Elevação da temperatura a 5°C/min até 270°C, permanecendo por 13 min Tempo Total de corrida: 40,6 minutos.
Fluxo de Gases no FID	30 mL/min de Hidrogênio 300 mL/min de Ar 15 mL/min de Nitrogênio
Detector	Ionização de Chama (FID) Temperatura: 300°C

Para uma maior confiabilidade dos resultados obtidos, anteriormente as análises, toda a vidraria e objetos utilizados permaneceram em banho contendo detergente especial (Extran Merk) durante o período mínimo de 8 horas para que possíveis resíduos orgânicos contidos no material fossem eliminados. Os utensílios foram enxaguados com água corrente e água destilada e secos em estufa a 40°C, com exceção da vidraria volumétrica, seca a temperatura ambiente.

4.4.5 Calibração e Ajuste do Método de Análise Cromatográfica

Antes que cada análise possa ser efetuada é indispensável a calibração e ajuste do método cromatográfico nas análises GC-FID. Uma curva de calibração foi construída para cada HPA investigado, incluindo também o Surrogate (9,10-DihidroAntraceno), utilizando-se 07 padrões com concentração de 1,0, 5,0, 20, 50, 100, 150 e 200 µg/mL. Todos os coeficientes de regressão das curvas finais foram superiores a 0,998.

TABELA 4 – CURVAS ANALÍTICAS, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PARA OS HPAS INVESTIGADOS.

HPA	Equação linear ajustada	R ²	Faixa de aceitação [µg/mL]	Limite de Detecção [mg/Kg seco]	Limite de Quantificação [mg/Kg seco]
Naftaleno	$y=6,62784e-6x + 0,848855$	0,999921	1 - 200	0,0536	0,110
Acenaftileno	$y=7,09483e-6x + 0,778037$	0,999941	1 - 200	0,0536	0,110
Acenafteno	$y=7,00686e-6x + 0,622313$	0,999950	1 - 200	0,0536	0,110
Fluoreno	$y=7,13684e-6x + 0,809416$	0,999943	1 - 200	0,0536	0,110
Fenantreno	$y=7,36464e-6x + 1,02950$	0,999941	1 - 200	0,0536	0,110
Antraceno	$y=7,38418e-6x + 0,332096$	0,999978	1 - 200	0,0536	0,110
Fluoranteno	$y=7,82741e-6x + 0,2455941$	0,999969	1 - 200	0,0536	0,110
Pireno	$y=7,92263e-6x + 0,098554$	0,999966	1 - 200	0,0536	0,110
Benzo[a]Antraceno	$y=8,55423e-6x + 0,725383$	0,999990	1 - 200	0,0536	0,110
Criseno	$y=1,18637e-5x - 3,39818$	0,998459	1 - 200	0,0536	0,110
Benzo[b]Fluoranteno	$y=8,95980e-6x + 1,06121$	0,998616	1 - 50	0,0536	0,110
Benzo[k]Fluoranteno	$y=7,90726e-6x - 1,15696$	0,998495	1 - 50	0,0536	0,110
Benzo[b,k]Fluoranteno	$y=7,84714e-6x + 4,33028$	0,998628	2 - 400	0,1072	0,220
Benzo[a]Pireno	$y=7,51370e-6x + 2,65671$	0,998337	1 - 200	0,0536	0,110
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	$y=7,56139e-6x + 1,70498$	0,998425	1 - 100	0,0536	0,110
Benzo[g,h,i]Perileno	$y=7,27925e-6x + 0,199214$	0,999978	1 - 200	0,0536	0,110
Dibenzo[a,h]Antraceno	$y=1,07324e-5x - 0,474149$	0,996938	1 - 200	0,0536	0,110
9,10-DihidroAntraceno	$y=7,77674e-6x + 1,22568$	0,998213	1 - 100	0,0536	0,110

Infelizmente não foi possível a manutenção da mesma faixa de aceitação para todos os elementos, sendo observado ligeira sobreposição de picos dos elementos Benzo[b]Fluoranteno e Benzo[k]Fluoranteno em concentrações acima de 50 µg/mL. Para contornar este problema, em concentrações acima de 50 µg/mL, foi necessária a quantificação dos dois compostos juntos (Benzo[b,k]Fluoranteno).

Os limites de detecção do método foram determinados correndo sucessivas amostras diluídas, considerando a análise de sete ou mais amostras branco e de brancos com adição (INMETRO, 2003). A concentração limite no recipiente de análise (Vial) foi de 0,35 µg/mL para todos os HPAs. Considerando o volume final do recipiente igual a 150µL, massa de solo úmido igual a 1,4g e umidade de 30,04%, o limite de detecção encontrado foi de 0,0536 mg/Kg de solo seco. O limite de quantificação foi determinado multiplicando-se por dois o valor do limite de detecção (THOMPSON et al; IUPAC, 2002).

Os tempos de retenção para os diferentes elementos foram obtidos utilizando dois padrões utilizados anteriormente para a determinação da curva de calibração, um de alta concentração (200 mg/L) e o outro de baixa concentração (0,5 mg/L). A média de cada composto foi calculada e o resultado obtido foi utilizado no método cromatográfico. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 – VALORES DO TEMPO DE SAÍDA PARA OS 16 HPAS QUANTIFICADOS.

HPA	Tempo de saída médio [minutos]	Janela [minutos]
Naftaleno	6,4297	0,50
Acenaftileno	8,6000	0,20
Acenafteno	8,9500	0,20
Fluoreno	10,048	0,40
9,10-DihidroAntraceno	11,2019	1,0
Fenantreno	12,6800	0,15
Antraceno	12,8400	0,20
Fluoranteno	17,0000	0,40
Pireno	17,7962	0,36
Benzo[a]Antraceno	23,0200	0,20

Criseno	23,1866	0,20
Benzo[b]Fluoranteno	27,5250	0,15
Benzo[k]Fluoranteno	27,6200	0,15
Benzo[a]Pireno	28,8223	0,40
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	35,0100	0,40
Benzo[g,h,i]Perileno	35,3000	0,40
Dibenzo[a,h]Antraceno	36,5613	1,32

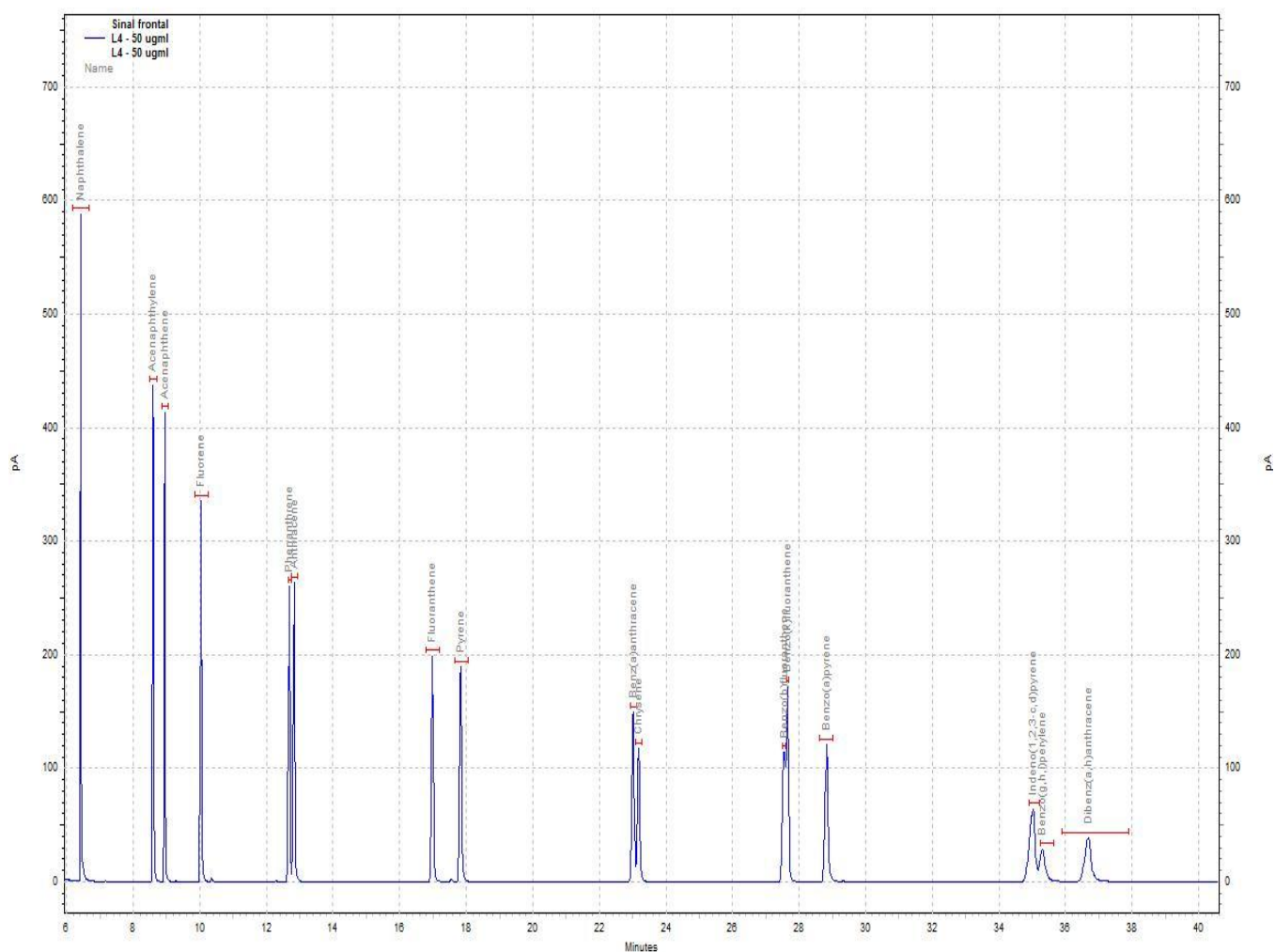


FIGURA 12 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA DOS 16 HPAS QUANTIFICADOS E RESPECTIVOS TEMPOS DE SAÍDA.

4.4.6 Teste de Extração de HPAs em Solo

Com o propósito de se medir a eficácia da extração dos HPAs em solo foi realizada uma sequência de experimentos analisando a eficiência de cada composto submetido ao procedimento de extração citado anteriormente. O composto 9,10-DihidroAntraceno foi utilizado como surrogate pois sua estrutura química é muito parecida com os 16 HPAs estudados (Figura 10). Outra característica importante para sua utilização é o tempo de saída na análise cromatográfica GC-FID. Este elemento apresenta um tempo de saída entre dois compostos estudados, Fluoreno e Fenantreno, com um intervalo relativamente grande entre outros elementos, não comprometendo a análise de outros compostos. Podemos observar na Figura 13 que o tempo de saída do Fluoreno é de aproximadamente 10 minutos, enquanto o do Surrogate (9,10-DihidroAntraceno) é de 11,2 minutos e o Fenantreno de 12,6 minutos. Caso estes tempos fossem muito próximos, a análise de HPAs no GC-FID poderia ficar comprometida, uma vez que os picos entre estes elementos poderiam sobrepor-se. Outros elementos foram testados, porém não apresentaram um tempo de saída apropriado.

Foram realizados quatro testes de extração, utilizando aproximadamente 1,4g de solo úmido contaminados com 400 μ L de uma solução de HPAs com concentração igual a 40 mg/L para cada um dos 16 HPAs. Exatamente no mesmo dia em que ocorreu a contaminação, foram realizados todos os processos de extração e análise no GC-FID. O esperado na análise cromatográfica era de que cada um dos 16 elementos apresentasse concentração final de 106,6667 mg/L, utilizando um volume de solvente final no frasco de análise (Vial) de 150 μ L. Para o Surrogate, o volume adicionado foi de 20 μ L de uma solução com concentração igual a 600 mg/L. O padrão de HPAs utilizado para contaminar as amostras de solo também foi analisado, sendo representado pela coluna “Valor esperado (Amostra SPIKE)”. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Analisando os resultados da Tabela 6 observou-se que os valores do padrão de HPAs (amostra Spike) são condizentes ao esperado, apresentando uma pequena variação do valor calculado (106,67 mg/L). Os compostos de HPA com alto peso molecular apresentaram uma recuperação alta, independente do resultado da eficiência de extração do Surrogate. Já os compostos com baixo peso molecular

apresentam variação no resultado final conforme a variação da eficiência de extração do Surrogate. Esta relação já era esperada, visto a similaridade das estruturas químicas entre o Surrogate e os HPAs de baixa massa molecular. Visando a correção destas distorções, normais nos procedimentos de extração, foi realizado correção dos resultados tendo como base a recuperação de um elemento previamente determinado, o 9,10-DihidroAntraceno (surrogate). Esta correção foi realizada conforme equação 5.2.1 para todos os compostos de HPAs e os resultados são apresentados na TABELA 7.

$$Resultado_{corrigido} = \frac{Resultado_{análise}}{Recuperação_{Surrogate}} \quad (5.2.1)$$

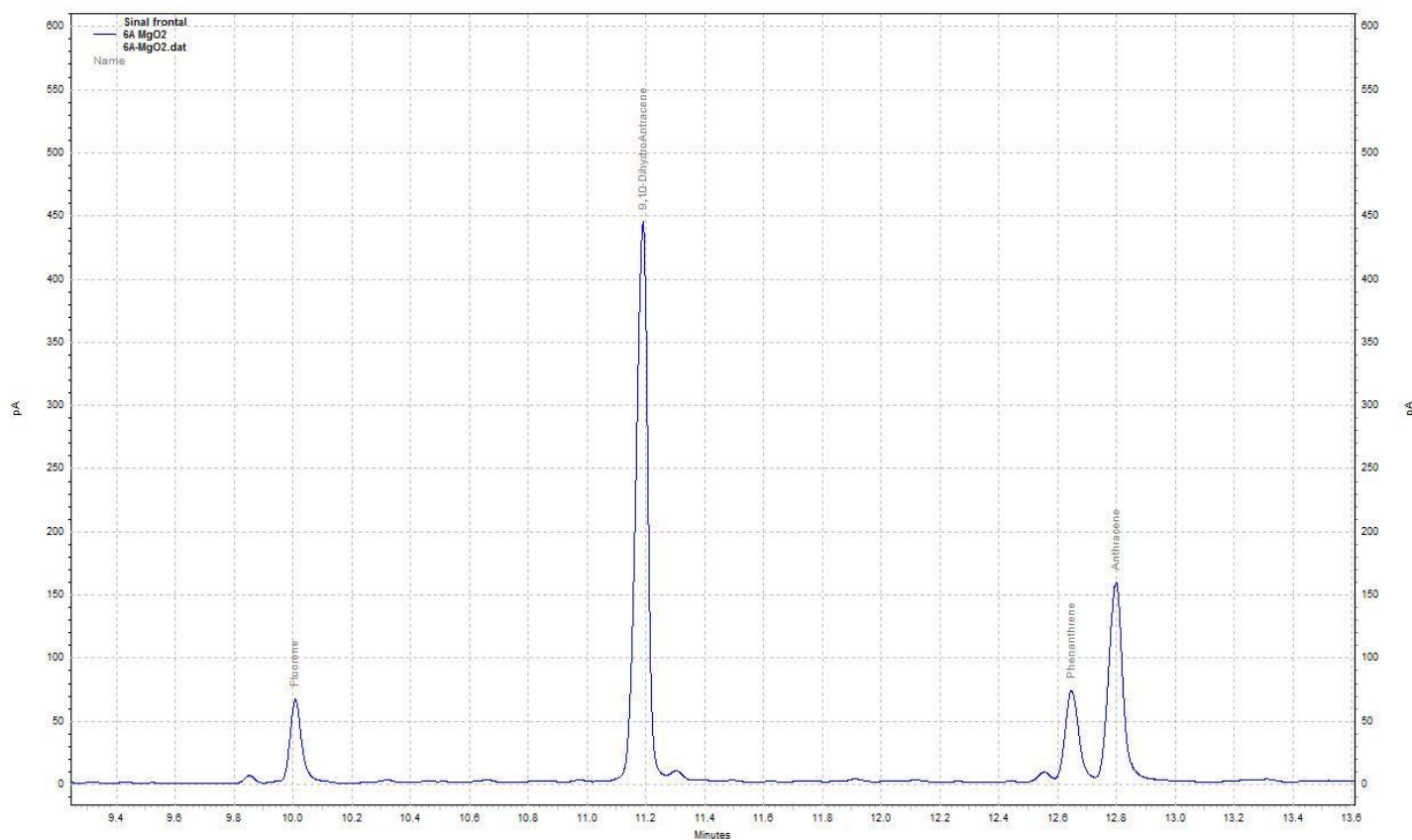


FIGURA 13 - EXEMPLO DE CROMATOGRAMA APRESENTANDO OS TEMPOS DE SAÍDA DO SURROGATE (MAIOR PICO) E OUTROS COMPOSTOS.
 FONTE: O autor.

TABELA 6 – VALORES DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE HPAS EM SOLO SEM CORREÇÃO POR SURROGATE.

HPA	Valor esperado (Amostra SPIKE) [mg/L]	Amostra Teste Extração 01		Amostra Teste Extração 02		Amostra Teste Extração 03		Amostra Teste Extração 04		Recuperação Média [%]
		Resultado [mg/L]	Recup. [%]	Resultado [mg/L]	Recup. [%]	Resultado [mg/L]	Recup. [%]	Resultado [mg/L]	Recup. [%]	
Naftaleno	110,480	29,194	26,42	2,050	1,86	36,613	33,14	37,178	33,65	23,77
Acenaftileno	109,225	68,069	62,32	47,890	43,85	60,827	55,69	62,385	57,12	54,74
Acenafteno	112,045	72,879	65,04	53,903	48,11	64,135	57,24	66,496	59,35	57,44
Fluoreno	110,326	80,670	73,12	72,557	65,77	70,058	63,50	73,227	66,37	67,19
9,10-DihidroAntraceno	80,000	68,882	86,10	59,271	74,09	57,413	71,77	61,754	77,19	77,29
Fenantreno	109,553	86,102	78,59	84,639	77,26	75,383	68,81	78,282	71,46	74,03
Antraceno	119,773	93,750	78,27	94,184	78,64	80,594	67,29	91,145	76,10	75,07
Fluoranteno	121,876	91,050	74,71	89,343	73,31	79,221	65,00	81,460	66,84	69,96
Pireno	132,091	98,677	74,70	96,641	73,16	85,560	64,77	87,985	66,61	69,81
Benzo[a]Antraceno	115,645	100,727	87,10	100,988	87,33	86,779	75,04	95,799	82,84	83,08
Criseno	167,565	148,912	88,87	150,921	90,07	133,596	79,73	148,605	88,69	86,84
Benzo[b,k]Fluoranteno	242,301	213,376	88,06	211,424	87,26	181,702	74,99	203,666	84,05	83,59
Benzo[a]Pireno	119,229	102,193	85,71	101,817	85,40	86,974	72,95	97,746	81,98	81,51
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	96,939	84,637	87,31	83,018	85,64	67,724	69,86	79,019	81,51	81,08
Dibenzo[a,h]Antraceno	99,607	86,204	86,54	90,217	90,57	68,386	68,66	84,845	85,18	82,74
Benzo[g,h,i]Perileno	130,204	109,286	83,93	112,809	86,64	92,157	70,78	111,788	85,86	81,80

TABELA 7 – VALORES DO TESTE DE EXTRAÇÃO DE HPAS NO SOLO COM CORREÇÃO POR SURROGATE.

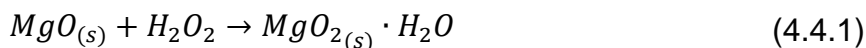
HPA	Valor esperado (Amostra SPIKE) [mg/L]	Amostra Teste Extração 01		Amostra Teste Extração 02		Amostra Teste Extração 03		Amostra Teste Extração 04		Recuperação Média [%]
		Resultado Final [mg/L]	Recup. [%]	Resultado Final [mg/L]	Recup. [%]	Resultado Final [mg/L]	Recup. [%]	Resultado Final [mg/L]	Recup. [%]	
Naftaleno	110,480	33,906	30,69	2,767	2,50	51,017	46,18	48,163	43,59	30,74
Acenaftileno	109,225	79,056	72,38	64,639	59,18	84,757	77,60	80,817	73,99	70,79
Acenafteno	112,045	84,642	75,54	72,755	64,93	89,367	79,76	86,143	76,88	74,28
Fluoreno	110,326	93,691	84,92	97,933	88,77	97,620	88,48	94,863	85,98	87,04
9,10-DihidroAntraceno	80,000	80,000	100,00	80,000	100,00	80,000	100,00	80,000	100,00	100,00
Fenantreno	109,553	99,999	91,28	114,240	104,28	105,040	95,88	101,411	92,57	96,00
Antraceno	119,773	108,882	90,91	127,123	106,14	112,301	93,76	118,075	98,58	97,35
Fluoranteno	121,876	105,746	86,77	120,589	98,94	110,388	90,57	105,528	86,59	90,72
Pireno	132,091	114,604	86,76	130,440	98,75	119,220	90,26	113,981	86,29	90,51
Benzo[a]Antraceno	115,645	116,985	101,16	136,307	117,87	120,919	104,56	124,104	107,31	107,73
Criseno	167,565	172,947	103,21	203,703	121,57	186,154	111,09	192,512	114,89	112,69
Benzo[b,k]Fluoranteno	242,301	247,823	102,28	285,361	117,77	253,173	104,49	263,850	108,44	108,24
Benzo[a]Pireno	119,229	118,688	99,55	137,426	115,26	121,191	101,64	126,626	106,20	105,66
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	96,939	98,298	101,40	112,052	115,59	94,367	97,35	102,366	105,60	104,98
Dibenzo[a,h]Antraceno	99,607	100,118	100,51	121,769	122,25	95,290	95,67	109,914	110,35	107,19
Benzo[g,h,i]Perileno	130,204	126,925	97,48	152,262	116,94	128,413	98,62	144,817	111,22	106,07

É possível observar na TABELA 7 que a correção por surrogate aumentou os valores de recuperação da extração, provando ser indispensável para uma correta interpretação dos resultados, principalmente nos compostos de baixo peso molecular. Podemos citar os valores de recuperação dos compostos Fenantreno e Antraceno, que saltaram de 74,03% e 75,07% para 96,00% e 97,35% com a adição da correção por surrogate. Porém, é possível observar que para os compostos de HPAs com maior peso molecular a correção por surrogate extrapola os valores esperados. Em alguns ensaios químicos, a recuperação final ficou superior a 120%. Este fato era esperado, visto que os compostos de maior peso molecular também são os compostos que apresentam menor pressão de vapor (Tabela 1) e, conseqüentemente, volatilizam menos nos processos realizados na extração. É possível observar também, comparando as Figuras 2 e 13, que a molécula do surrogate (9,10-DihidroAntraceno) é estruturalmente mais parecida com os HPAs de baixo peso molecular, sendo esperado que seus níveis de recuperação sejam mais próximos desses elementos. Portanto, nos ensaios de degradação de HPAs em ambiente fechado, a correção por surrogate foi aplicada apenas nos seguintes compostos: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno.

A correção para os compostos Fluoranteno e Pireno, apesar de gerar resultados mais eficientes conforme descrito e apresentado na TABELA 7, induziu um aumento do erro nos resultados finais, justificando a exclusão da correção. Tais compostos, por apresentarem cadeia carbônica diferente do surrogate (9,10 DihidroAntraceno), não resultaram em uma recuperação efetiva, diferente dos outros compostos de HPAs de baixo peso molecular citados.

4.5 PREPARAÇÃO DO PERÓXIDO DE MAGNÉSIO

Peróxido de Magnésio é facilmente preparado pela reação de óxido de Magnésio e Peróxido de Hidrogênio concentrado (30-70%) utilizando meio com ausência de ferro. Esta reação pode ser expressa por:



A necessidade do meio com baixo teor de Ferro deve-se ao fato de que este elemento tende a catalisar prematuramente a degradação do MgO_2 , abaixando o rendimento da reação de síntese do peróxido de magnésio (Shand, Mark A., 2006). A reação é realizada rapidamente por mistura dos reagentes num recipiente de refrigeração, sendo rápida e exotérmica. A temperatura ótima de processamento está na faixa de 30 a 45°C. Devido a decomposição excessiva do peróxido de hidrogênio, o tempo de mistura no reator é o menor possível. A suspensão resultante pode então ser separada utilizando filtros ou um “spray-drier” (Doetsch et al, 1984;. Doetsch e Casper, 2001).

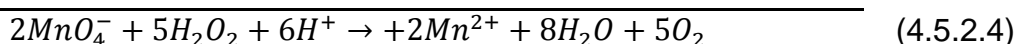
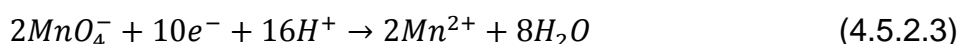
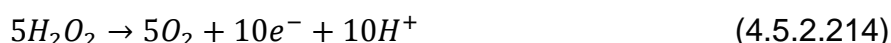
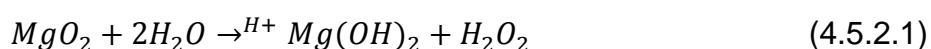
A reação entre o óxido de magnésio e peróxido de hidrogênio forma um lodo de cor branca. Este lodo seco pode conter no máximo 60% de MgO_2 , sendo o restante MgO . Sobre temperaturas acima de 350°C ou pH ácido o MgO_2 se decompõe em O_2 e seu precedente formador, o óxido de magnésio (Advanced Inorganic Chemistry Vol. I, 2008).

4.5.1 Procedimento

Inicialmente preparou-se o sistema de reação adaptando-se ao reator o sistema de refrigeração e o agitador magnético. A solução de H_2O_2 foi adicionada primeiramente ao sistema, deixando-se aproximadamente 2 minutos até a estabilização da temperatura. Em seguida adicionou-se lentamente o óxido de magnésio (MgO) utilizando pequenas espátulas. Após a adição a solução foi deixada reagir com constante mistura por 30 minutos. Após a etapa de reação, a separação dos componentes sólidos e líquidos deverá ser efetuada. Foi utilizada a técnica da Filtração com Funil de Buchner (cerâmica) e papéis de filtro, devido ao tamanho das partículas formadas serem relativamente grandes. Após a filtragem, o produto foi posto em uma Placa de Petri e levado à estufa por 12h.

4.5.2 Determinação do teor de peróxido de magnésio

Para a caracterização da quantidade real de Peróxido de Magnésio (MgO_2) nos compostos auxiliares de biorremediação (ORC®, "PMg Prep." e "PMg Fosf.") foi utilizado a técnica da titulação com Permanganato de Potássio ($KMnO_4$) conforme o trabalho de REICHERT et. al. (Determination of Hydrogen Peroxide and Some Related Peroxygen Compounds). Os peróxidos inorgânicos comerciais, tais como peróxido de sódio, cálcio, bário e o próprio peróxido de magnésio, são considerados variações do peróxido de hidrogênio, pois em solução todos apresentam as mesmas propriedades do H_2O_2 , provavelmente devido à presença do íon comum H_2O^- , ou, como no caso do peróxido de magnésio, irão formar o próprio peróxido de hidrogênio, conforme equação 4.5.2.1. (REICHERT, 1939). Conhecendo-se a quantidade liberada de peróxido de hidrogênio pelo sólido é possível determinar a quantidade de peróxido de magnésio. A determinação de peróxido de hidrogênio por permanganometria envolve uma reação de oxirredução em meio ácido, reduzindo os íons MnO_4^- (agente oxidante) a Mn^{2+} conforme as equações 4.5.2.2 a 4.5.2.4 propostas por VOGEL (2002). A equação 4.5.2.4 demonstra a reação global.



Aproximadamente 0,15 g do produto a ser caracterizado foi posto em Erlenmeyer de 250 mL e, em seguida, foi adicionado 20 mL de água destilada e deionizada (pH neutro), 15 mL de solução de Ácido Clorídrico (HCl) 2 mol/L e 1,0 mL de solução de Sulfato de Manganês II ($MnSO_4$) 0,05 mol/L. A solução foi então titulada com a solução de Permanganato de Potássio ($KMnO_4$) 0,02 mol/L até que a cor rosa permanecesse por pelo menos 30 segundos. O cálculo da porcentagem de MgO_2 em massa foi realizado conforme equação 4.5.2.5.

$$\%m(MgO_2) = \frac{\frac{5}{2}C(KMnO_4) \cdot \frac{V(KMnO_4)}{1000} \cdot MM(MgO_2)}{mTOTAL} \times 100 \quad (4.5.2.5)$$

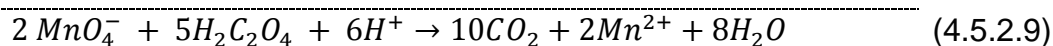
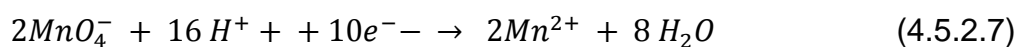
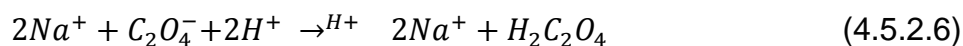
Onde:

- $C(KMnO_4)$: Concentração de $KMnO_4$ [mol/L]
- $V(KMnO_4)$: Volume titulado de $KMnO_4$ [mL]
- $M(TOTAL)$: Massa total de sólido utilizada na titulação [g]
- $\%m(MgO_2)$: Porcentagem em massa de MgO_2 [%]
- $MM(MgO_2)$: Massa molar do MgO_2 , igual a 56,304 g/mol

O restante da porcentagem, conforme descrito anteriormente, é referente à quantidade de óxido de magnésio (MgO).

A padronização da solução de Permanganato de Potássio ($KMnO_4$) foi realizada utilizando-se a técnica da permanganimetria, que utiliza soluções de permanganato (forte agente oxidante) para titular soluções de substâncias redutoras. Esta técnica baseia-se na redução do permanganato a Mn^{2+} em meio ácido. As soluções de permanganato de potássio possuem coloração violeta intensa, onde o ponto final pode ser assinalado pela coloração do íon permanganato, não sendo necessário o uso de indicadores (VOGEL, A. I., 2002).

Aproximadamente 0,5 g de Oxalato de Sódio ($Na_2C_2O_4$) foi inicialmente dissolvido em 30 mL de água destilada e deionizada. Utilizando um Erlenmeyer de 200 mL foram adicionados 10 mL da solução de Oxalato de Sódio anteriormente preparada, 8 mL de solução de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 1,0 mol/L e 60mL de água destilada e deionizada. A solução foi então aquecida entre 55 - 60 °C e titulada com 0.02 mol/L de $KMnO_4$ até que a cor do ponto de viragem permanecesse por pelo menos 30 segundos. O valor do volume final de permanganato utilizado foi anotado. Finalmente, foi efetuado o cálculo da molaridade do $KMnO_4$ a partir das reações 4.5.2.6 a 4.5.2.9, onde a proporção do número de mols do $KMnO_4$ e de $Na_2C_2O_4$ é de 2:5 respectivamente.



4.6 PROCEDIMENTO DE CONTAGEM PADRÃO DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS ESTRITOS E FACULTATIVOS VIÁVEIS.

Com o objetivo de avaliar a presença e a população de bactérias que ocorrem naturalmente e que contribuirão para a degradação de contaminantes orgânicos, foi realizado a contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, conforme instrução normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária Nº 62 de 26/08/2003, Segundo Silva (2007) para que as pilhas sejam efetivas biologicamente a contagem de placas mínima deve ser de 10^3 UFC/g de solo. Contagem de placas inferior a 10^3 podem indicar a presença de concentrações de componentes orgânicos ou inorgânicos tóxicos (como por exemplo, metais pesados) (SILVA, 2007).

A técnica consiste em inoculação em profundidade, com três diluições em duplicatas, aplicável a amostras de solo, matérias-primas, água e alimentos. O processo consiste na semeadura da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem seguida de incubação em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Os reagentes utilizados foram Ágar padrão PCA fornecidos pela empresa Kasvi e solução salina peptonada 0,1%. A solução salina peptonada foi preparada antes de cada experimento, utilizando os seguintes reagentes químicos: Água destilada e deionizada (1,0 Litro), 8,5 g de Cloreto de Sódio e 1,0 g de Peptona.

Primeiramente foi realizada a pesagem da amostra. Aproximadamente 1,4g se solo úmido foi acondicionado em tubos de reação de 10ml com tampa de teflon® (PTFE). Todos os materiais e reagentes utilizados em cada experimento foram necessariamente autoclavados por 15 minutos sob pressão de $1,5 \text{ kgf/cm}^2$ relativo.

Em cada tubo de reação de 10mL foi adicionado o volume de 12,5 mL de solução salina peptonada 0,1% e, em seguida, o sistema foi homogeneizado por aproximadamente 60 segundos em Vortex. Esta primeira diluição é a diluição 10^{-1} . Sucessivas diluições foram feitas utilizando Erlenmeyers de 50 mL, 10 mL de solução peptonada 0,1% em cada Erlenmeyer e 1,0 mL da diluição anterior.

Cada diluição selecionada foi semeada utilizando 1,0 mL da solução em placas de Petri estéreis. Foi adicionado cerca de 20 mL de Ágar PCA fundido e mantido em banho-maria a 40-45°C, homogeneizando em seguida o inóculo. Após a solidificação do ágar na superfície plana, as placas invertidas foram finalmente incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

A Leitura de cada amostra foi realizada contando todas as colônias presentes em placas que contenham entre 25 e 250 colônias. Os resultados são expressos em UFC/g ou mL.

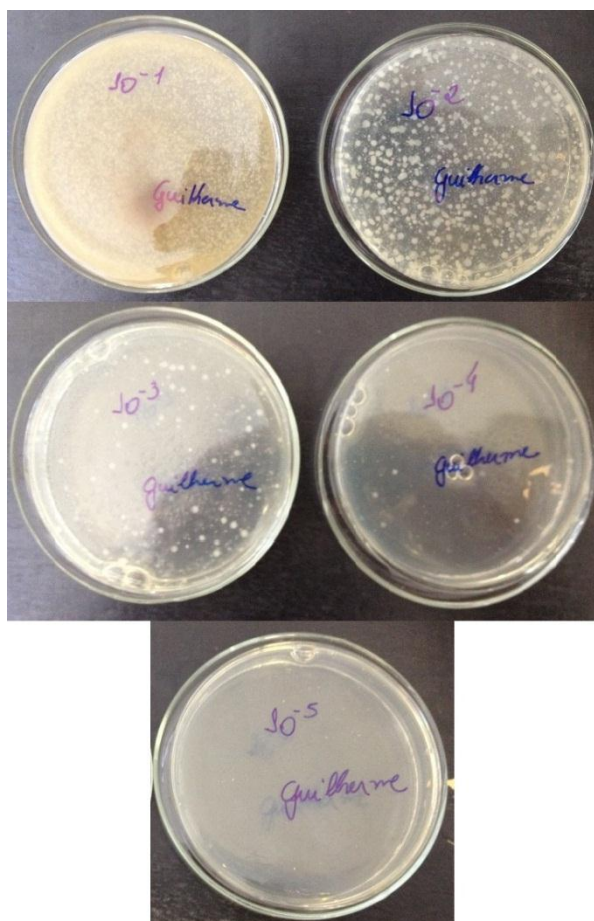


FIGURA 14 – EXEMPLO DO PROCEDIMENTO DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS E DILUIÇÕES.

FONTE: O autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

5.1.1 pH e Percentual de Umidade iniciais.

Foram realizados 06 experimentos para a avaliação do pH e umidade inicial do solo. Os ensaios foram realizados seguindo os métodos discutidos anteriormente. Os resultados são apresentados nas Tabela 8 e Tabela 9, sendo a média encontrada para o valor de umidade igual a 30,04% e 6,32 para pH.

TABELA 8 – RESULTADOS DE UMIDADE INICIAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DO SOLO UTILIZADO.

Amostra	Massa cadinho [g]	Massa de Solo úmido [g]	Massa total depois da secagem [g]	Percentual de umidade [% m/m]
Teste U01	24,8467	5,0213	28,3859	29,52
Teste U02	25,0945	5,1842	28,7038	30,38
Teste U03	25,3379	5,2852	29,0360	30,03
Teste U04	25,5550	5,1089	29,1294	30,03
Teste U05	27,1578	5,0045	30,6292	30,63
Teste U06	25,0368	5,1198	28,6374	29,67
Média				30,04 ±0,42

Conforme discutido anteriormente, a quantidade de água presente no solo é um fator de extrema importância para que exista um ambiente propício à proliferação e desenvolvimento de bactérias e fungos. Deste modo é possível a depuração da matéria orgânica (contaminante). Utilizando a técnica da remediação com Peróxido de Magnésio, este valor torna-se ainda mais importante, visto que a liberação de

Oxigênio e radicais hidroxila apenas acontecem em presença do peróxido. Segundo Haider (1999) a umidade é o fator ambiental mais crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos. Já para Silva et. al. (2007), a faixa ideal de umidade no solo para a correta atividade microbiana deve estar entre 12 a 30% em peso. O valor médio relativo os solo encontrado foi de 30,04%, praticamente no limite recomendado. Porém, é necessário avaliar que no sistema estudado é de vital importância a adição de uma quantidade de água capaz de formar uma suspensão H_2O-MgO_2 no fundo do reator com o propósito de se obter uma liberação contínua de oxigênio. Ressalta-se, ainda, que o valor de umidade final nos ensaios de degradação de HPAs tende a aumentar devido à adição de água para a formação da suspensão H_2O-MgO_2 .

TABELA 9 - RESULTADOS DE pH INICIAL PARA CARACTERIZAÇÃO DO SOLO UTILIZADO.

Amostra	pH
Teste pH01	6,31
Teste pH02	6,42
Teste pH03	6,40
Teste pH04	6,18
Teste pH05	6,22
Teste pH06	6,38
Média	6,32 ±0,1

O pH do solo também influencia a mobilidade de nutrientes e metais. A solubilidade de fósforo é maximizada em pH igual a 6,5 e da mobilidade dos metais é minimizada para mH acima de 6 (Sims et al., 1990). Analisando a Tabela 9 verificamos que o valor médio de pH inicial no solo é de 6,32, maximizando a solubilidade do fósforo e dentro da faixa estipulada por Tate (1995) para atividade biológica (Figura 6).

5.1.2 Quantidade Inicial de HPAs no solo

Foram realizados experimentos com o intuito de quantificar a quantidade de HPAs já existentes no solo, de modo que este valor pudesse ser somado aos valores de HPAs contaminados manualmente, evitando ao máximo desvios em relação às amostras. O método de análise seguiu as orientações apresentadas nas seções anteriores, alterando-se a quantidade de solo nos experimentos. Como a incidência de contaminação por HPAs no solo é baixa, é esperado uma baixa concentração destes contaminantes. Portanto, foi necessário aumentar a quantidade de solo no processo de extração. Os experimentos foram realizados em duplicata e utilizou-se uma massa de aproximadamente 15 g em cada frasco de reação, mantendo-se a proporção de solventes utilizados. Os resultados são apresentados da Tabela 10.

TABELA 10 – RESULTADOS DE HPAS INICIAIS NO SOLO

HPA	Amostra QI-1	Amostra QI-2	Média	Limite de Quantificação [mg/kg seco]
Naftaleno	0,0130	0,0163	0,0147 ±0,0023	0,010
Acenaftileno	0,0168	0,0249	0,0208 ±0,0058	0,010
Acenafteno	0,0086	0,0102	0,0094 ±0,0011	0,010
Fluoreno	0,0110	0,0134	0,0122 ±0,0017	0,010
Fenantreno	0,0295	0,0356	0,0326 ±0,0043	0,010
Antraceno	0,0190	0,0248	0,0219 ±0,0041	0,010
Fluoranteno	0,0137	0,0112	0,0124 ±0,0017	0,010
Pireno	0,0071	0,0173	0,0122 ±0,0072	0,010
Benzo[a]Antraceno	0,0117	0,0092	0,0104 ±0,0018	0,010
Criseno	0,0000	0,0000	0,0000	0,010
Benzo[b]Fluoranteno	0,0000	0,0000	0,0000	0,010
Benzo[k]Fluoranteno	0,0186	0,0211	0,0198 ±0,0018	0,010
Benzo[a]Pireno	0,0322	0,0000	0,0161 ±0,0228	0,010
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	0,0256	0,0000	0,0128 ±0,0181	0,010
Dibenzo[a,h]Antraceno	0,0035	0,0048	0,0042 ±0,0009	0,010
Benzo[g,h,i]Perileno	0,0182	0,0115	0,0148 ±0,0047	0,010
9,10-DihidroAntraceno*	89,54%	81,94%	85,74% ±0,054	0,010

Os resultados provam que a quantidade inicial de HPAs no solo coletado é praticamente nula comparada a quantidade de HPAs inserida na contaminação, não necessitando ajustes de concentração nos valores finais. Para os elementos Acenafteno, Criseno, Benzo[b]Fluoranteno e Dibenzo[a,h]Antraceno os resultados ficaram abaixo do LQ. Para os demais compostos os resultados ficaram muito próximos do valor do LQ.

5.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS EM AMBIENTE FECHADO

5.2.1 Teor de Peróxido de Magnésio nos compostos utilizados

Os resultados foram obtidos utilizando-se a equação 4.5.2.5 discutida no item 4.5.2. Na padronização da solução de permanganato de potássio (KMNO_4), o valor médio titulado foi de 12,29 mL, resultando em uma solução de concentração igual a 0,0403 mol/L. Com base nessas informações foi possível calcular a porcentagem em massa de cada composto utilizado nos experimentos, apresentada na TABELA 11.

TABELA 11 – RESULTADO DO TEOR DE PERÓXIDO DE MAGNÉSIO PARA CADA COMPOSTO UTILIZADO

Composto	Massa Total [g]	Volume titulado [mL]	Porcentagem de MgO_2 [% (m/m)]	
			Simplex	Média
ORC	0,1552	7,10	25,95	25,91 \pm 0,051
	0,1558	7,10	25,85	
	0,1543	7,05	25,92	
PMg Prep.	0,1528	12,10	44,92	45,11 \pm 0,19
	0,1515	12,10	45,30	
	0,1509	12,00	45,11	
PMg Fosf.	0,1511	7,80	29,28	29,19 \pm 0,075
	0,1518	7,80	29,15	
	0,1518	7,80	29,15	

Conforme os resultados apresentados na TABELA 11 o maior teor de peróxido de magnésio foi encontrado no composto “PMg Prep.” (45,11%), composto preparado em laboratório, seguido pelo composto “PMg Fosf.” com 29,19%. Portanto, é de se esperar que os experimentos realizados com “PMg Prep.”

apresentem a maior taxa de degradação, pelo menos nos primeiros instantes analisados, devido a sua maior capacidade de liberação de oxigênio. Contudo, para grande tempos de degradação, espera-se que os experimentos com “PMg Fosf.” (composto produzido em laboratório com adição de fosfato) apresentem taxas de degradação maiores, visto que os fosfatos têm a função de evitar a formação da capa de $Mg(OH)_2$ que impede a liberação do oxigênio (REGENESIS, 2014).

5.2.2 Degradação dos compostos de HPAs via Biorremediação

Os resultados da diminuição da concentração no solo de cada composto de HPA em função do tempo de tratamento utilizando os diferentes compostos auxiliares de biorremediação, incluso a comparação com a amostra “Branco”, estão apresentados nas Figuras 15 a 30. Todas as amostras foram mantidas à 20°C. A massa aplicada de composto auxiliar nos experimentos “ORC”, “PMg Prep.” e “PMg Fosf.” foi de 1,5% da massa total de solo, enquanto no experimento “ORC 5%” a massa foi de 5%. A Figura 31 apresenta o decaimento da soma de HPAs em função do tempo.

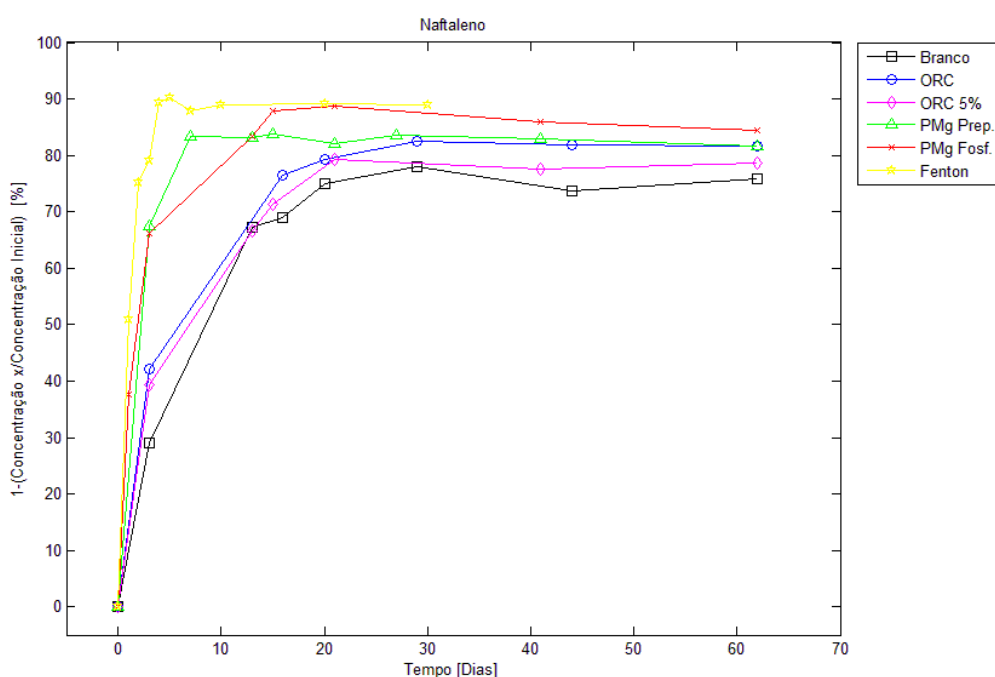


FIGURA 15 – RESULTADOS DE DECAIMENTO DE NAFTALENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

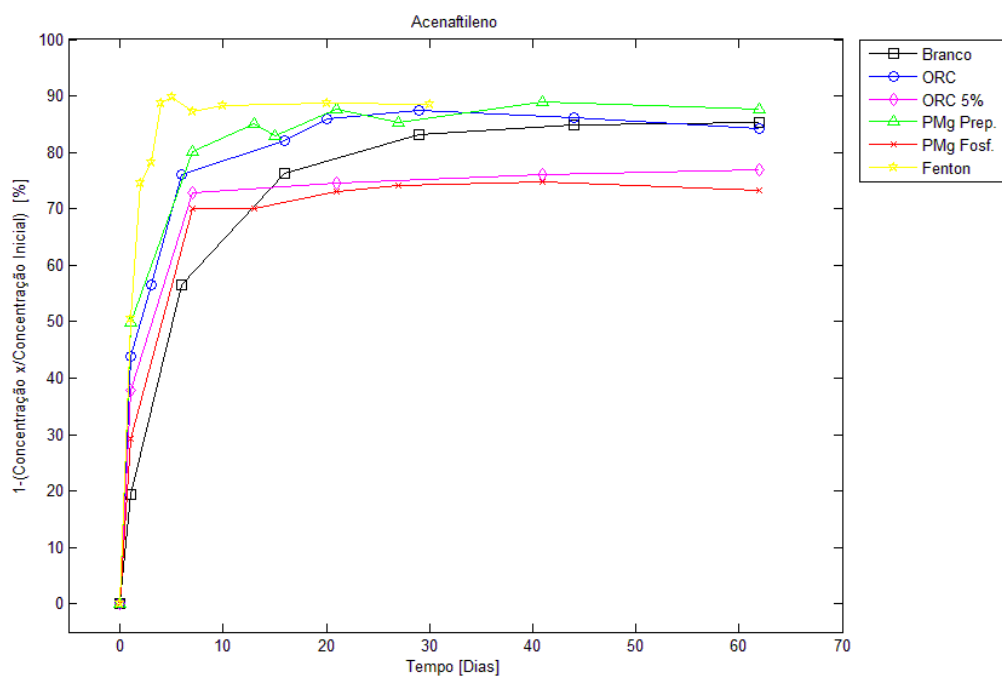


FIGURA 16 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE ACENAFTILENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

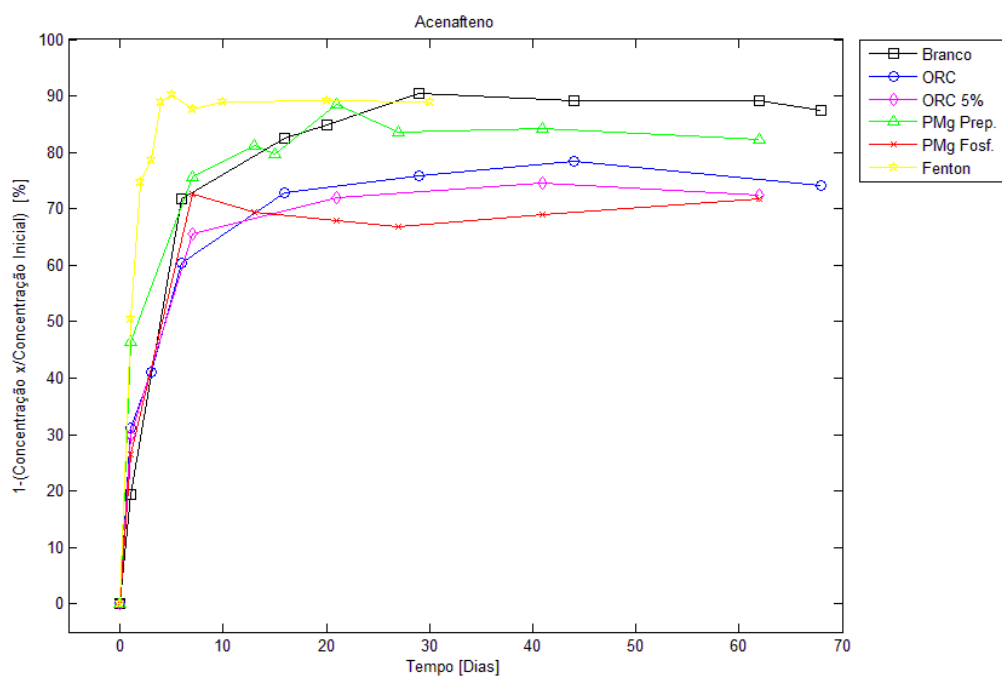


FIGURA 17 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE ACENAFTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

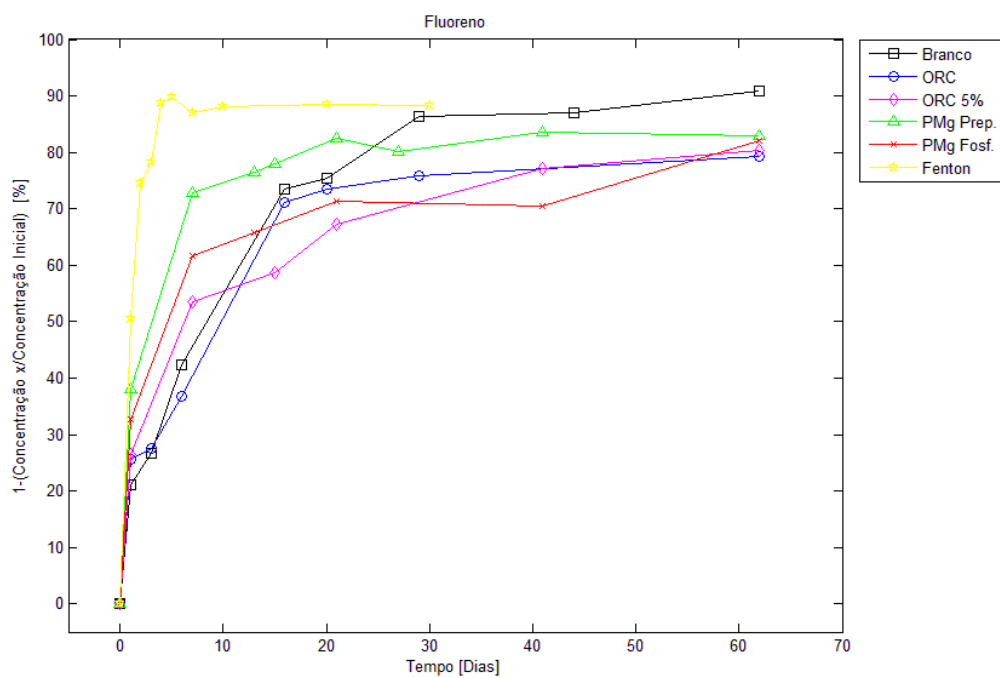


FIGURA 18 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE FLUORENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

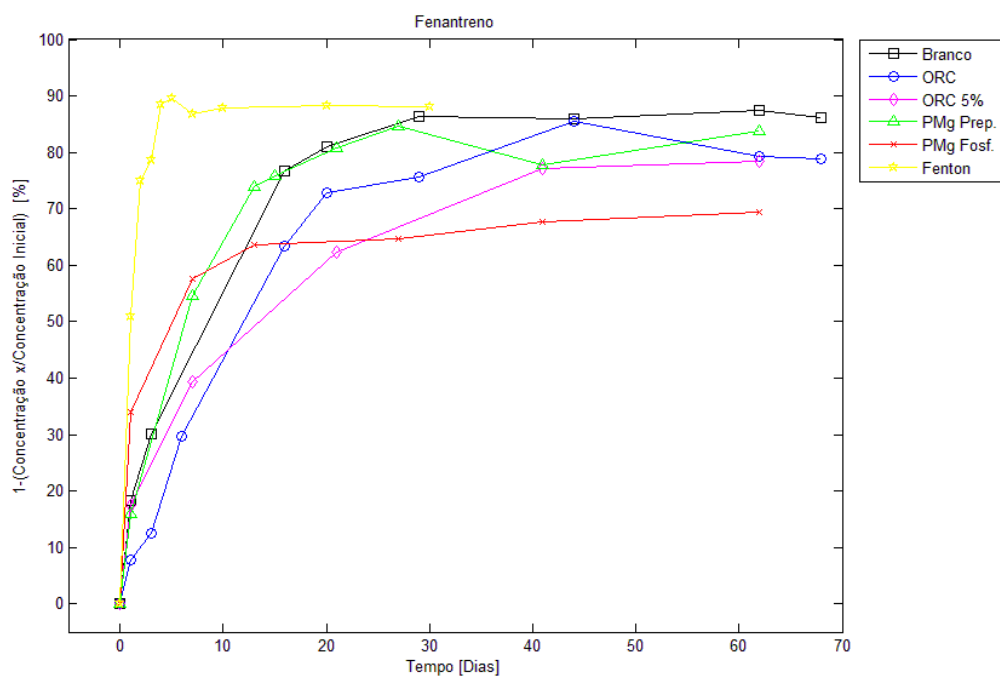


FIGURA 19 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE FENANTRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

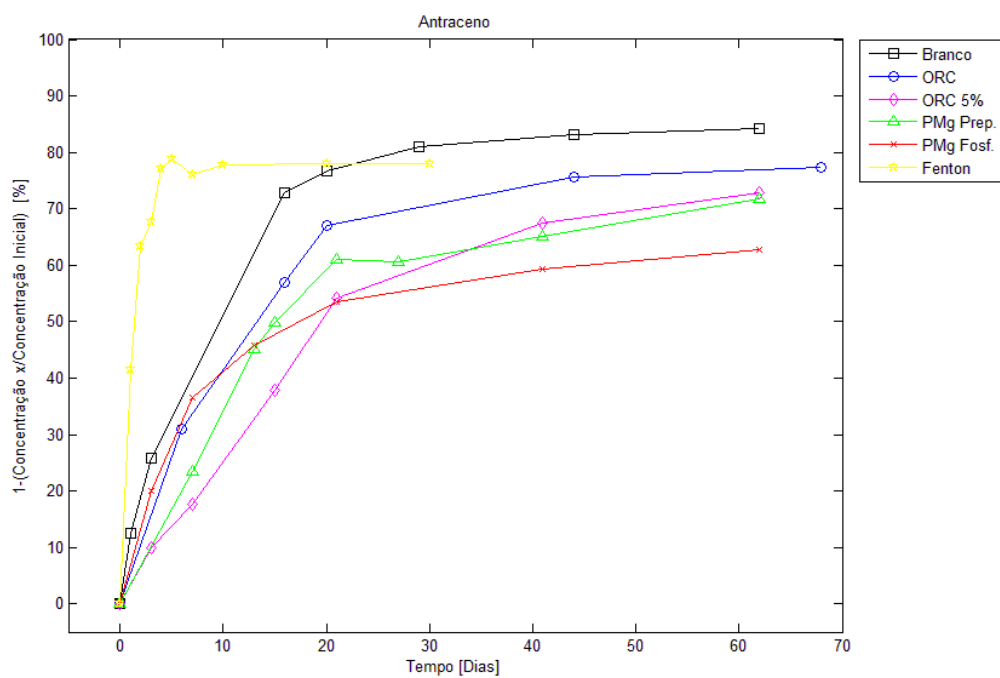


FIGURA 20 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

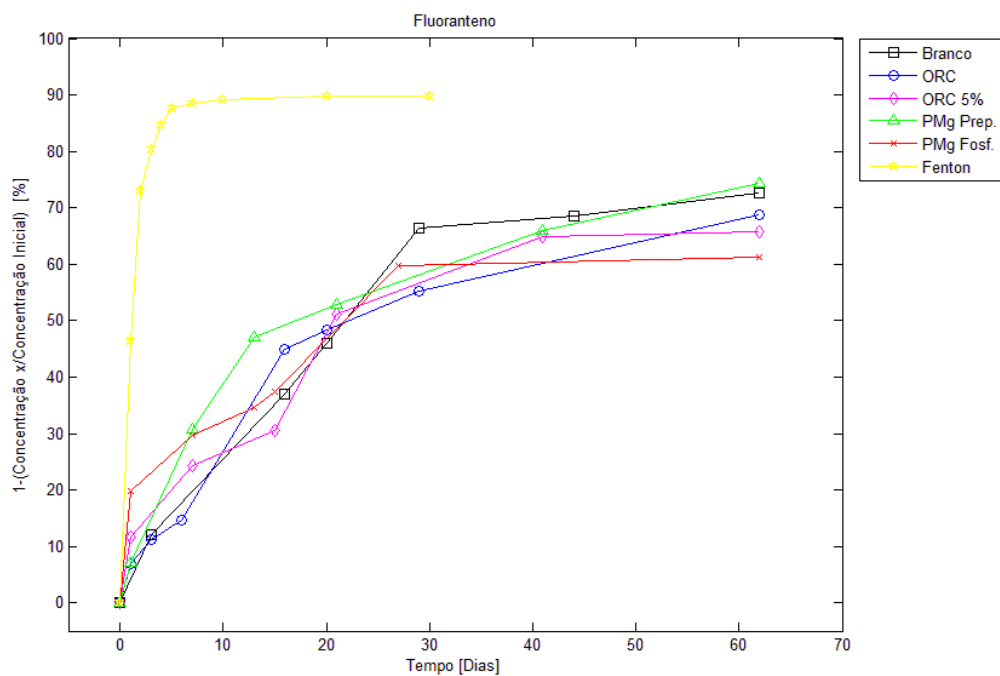


FIGURA 21 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE FLUORANTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

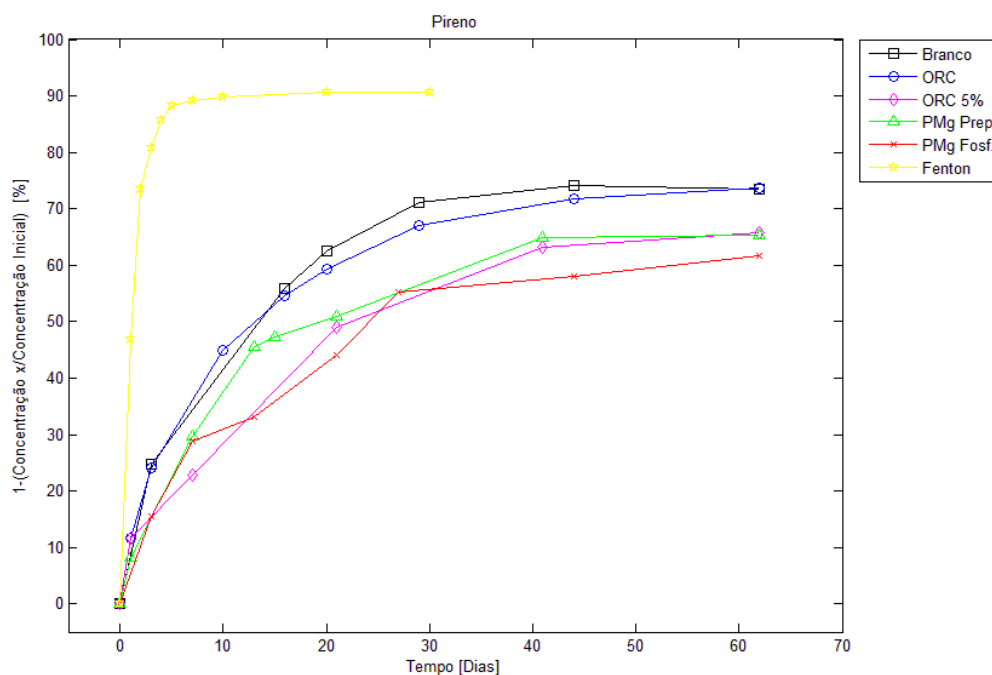


FIGURA 22 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

Analisando-se os resultados foi observado diminuição na concentração dos compostos de HPAs de baixo peso molecular em todos os ensaios com adição de compostos auxiliares e para o ensaio “Branco”, evidenciando uma possível degradação dos seguintes elementos: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno e Pireno. CERNIGLIA (1995) evidenciou esta mesma tendência com o estudo da degradação de Naftaleno, Antraceno, Fenantreno e Pireno, reforçando que a biodisponibilidade dos HPAs é crítica para a efetiva biorremediação. JOHNSEN *et. al.* (2005) discutiu também esta tendência, ressaltando que devido a maior dissolução dos compostos de baixo peso molecular na água estes contaminantes estariam mais disponíveis aos microrganismos e, assim, sua taxa de degradação seria maior comparada aos HPAs de alto peso molecular, que apresentam baixíssimas taxas de dissolução. Conforme a Tabela 1 é possível constatar os compostos citados apresentam os maiores valores de solubilidade em água, reforçando a evidência da degradação dos contaminantes pelos microrganismos. Porém, foi observado grande decaimento da concentração de HPAs de baixo peso molecular para os ensaios “Branco”, sendo estes valores superiores aos valores de ensaios com compostos auxiliares de biorremediação. Este fato indica que a adição de compostos auxiliares a base de

Peróxido de Magnésio não favorece a biorremediação, apesar de ocorrer a redução dos compostos.

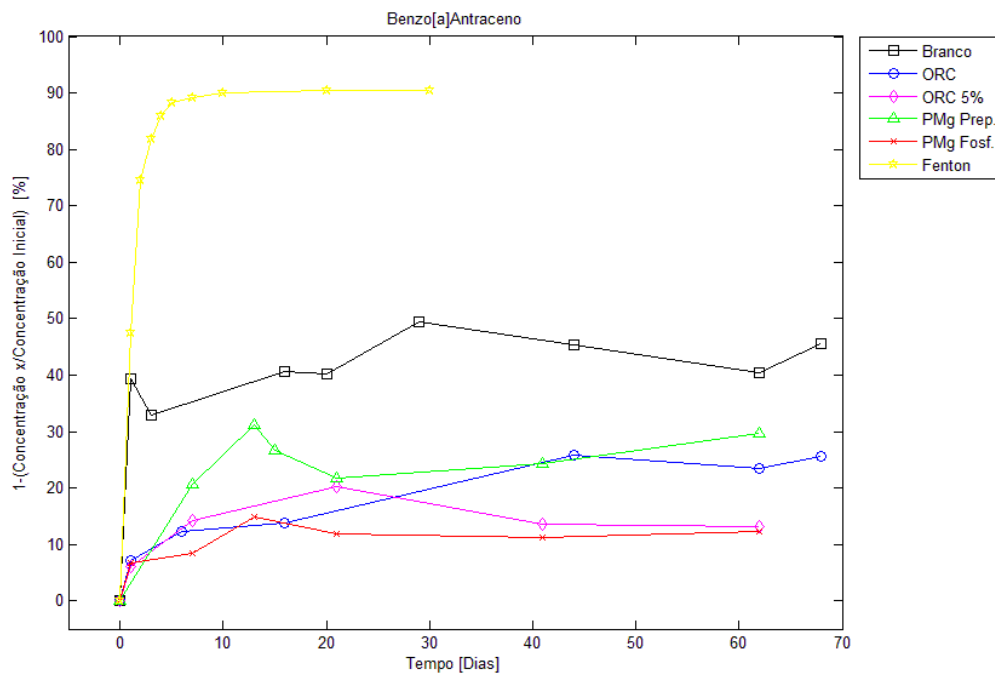


FIGURA 23 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[a]ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

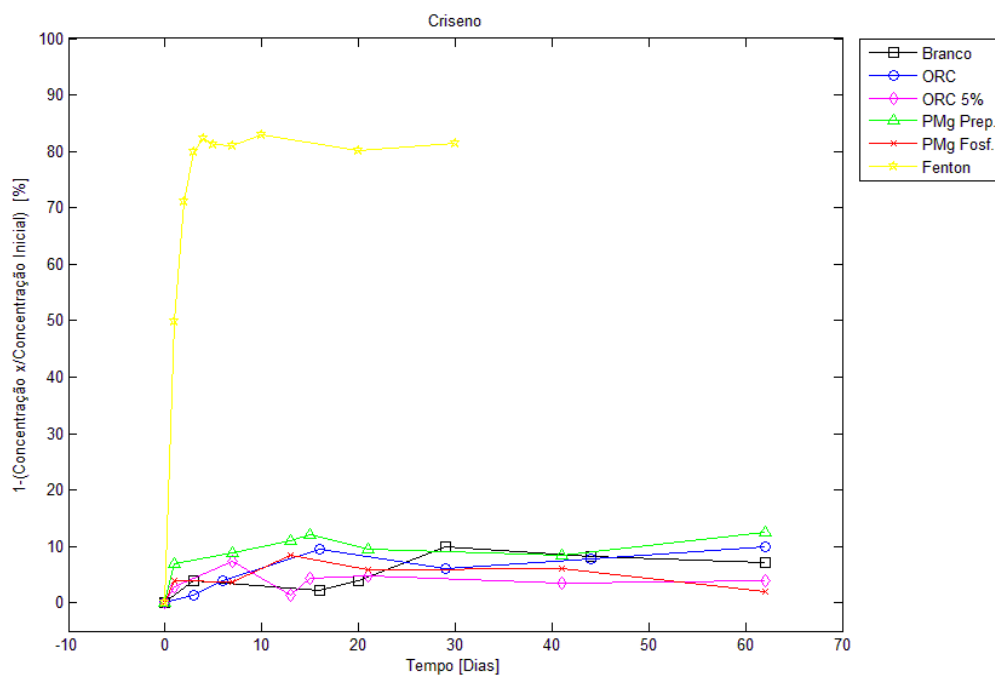


FIGURA 24 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE CRISENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

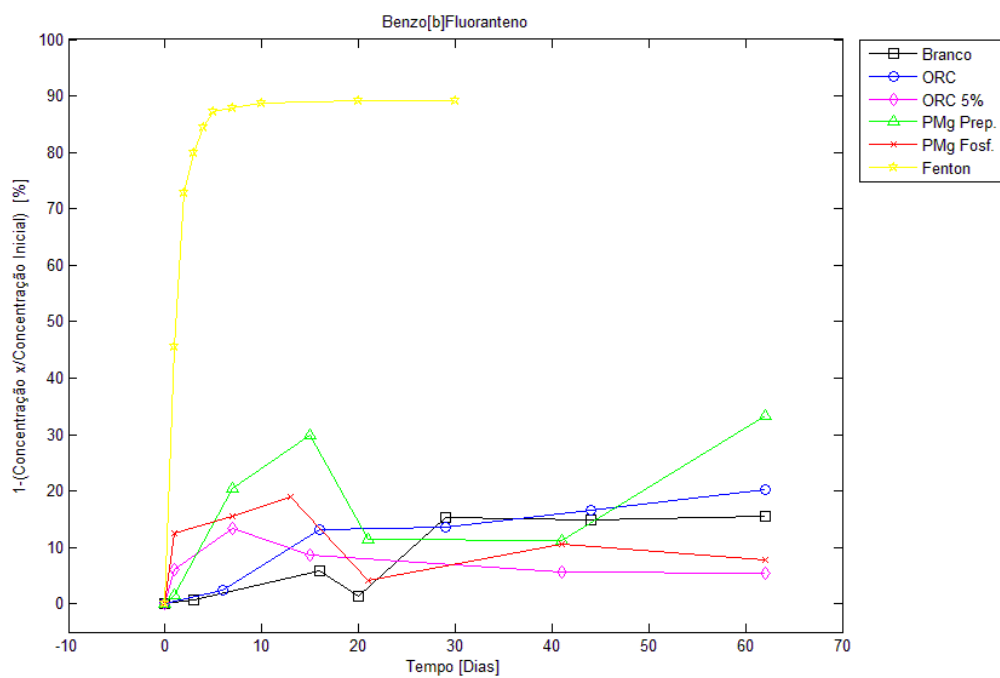


FIGURA 25 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[b]FLUORANTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

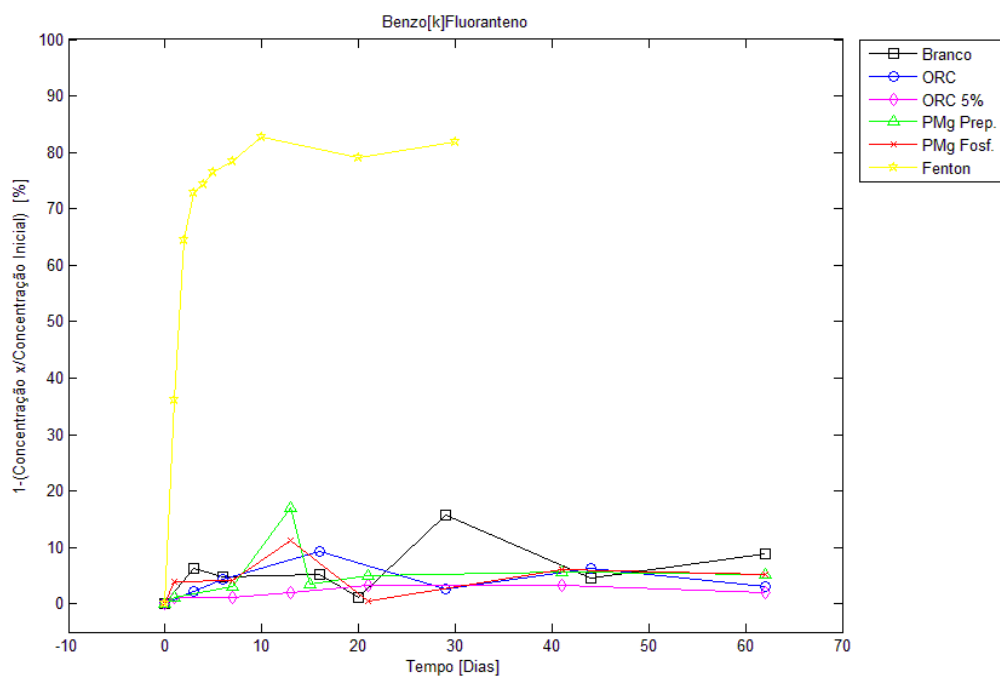


FIGURA 26 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[k]FLUORANTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

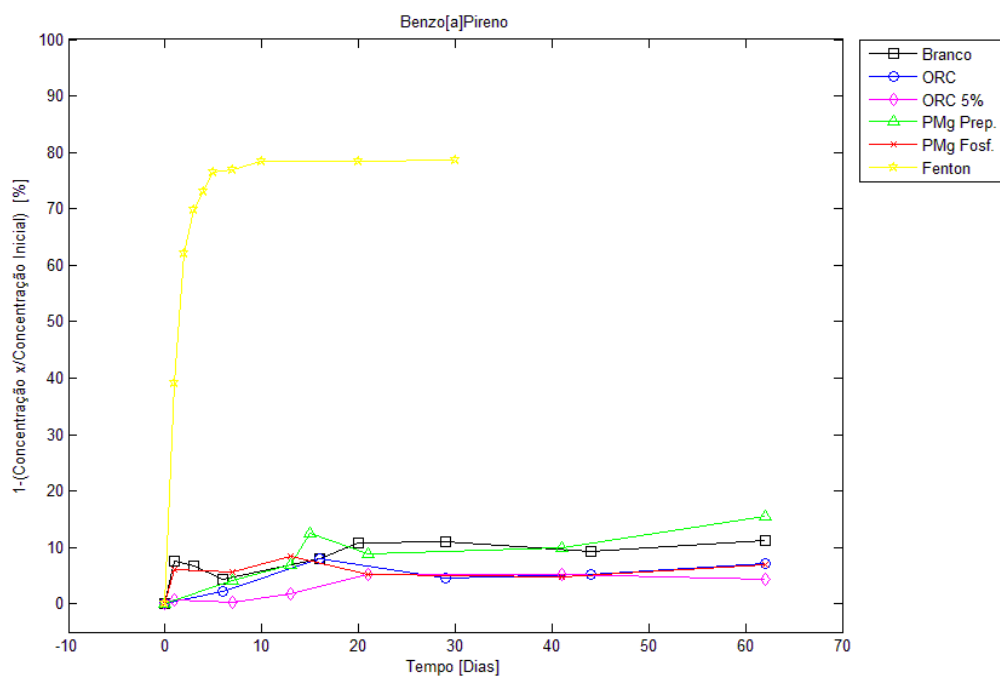


FIGURA 27 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[a]PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

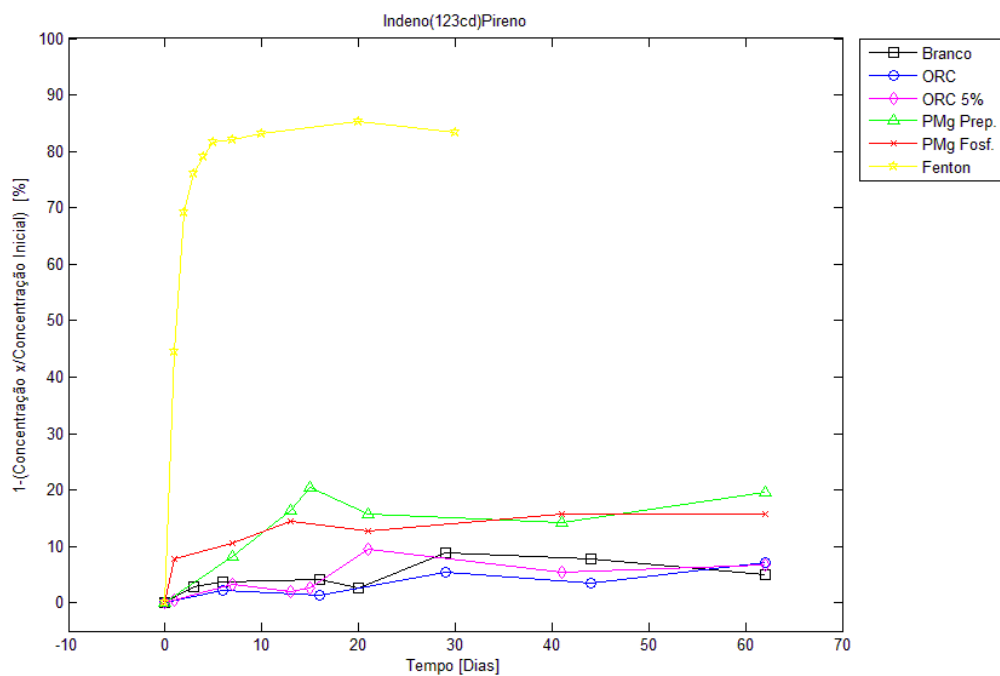


FIGURA 28 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE INDENO[1,2,3-c,d]PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

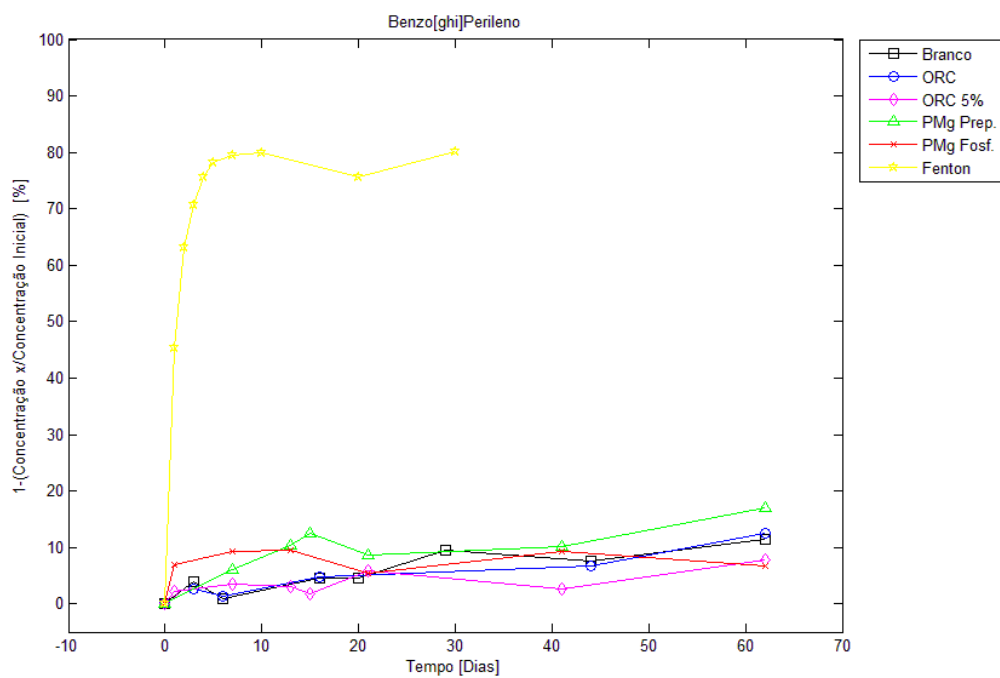


FIGURA 29 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE BENZO[g,h,i]PERILENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

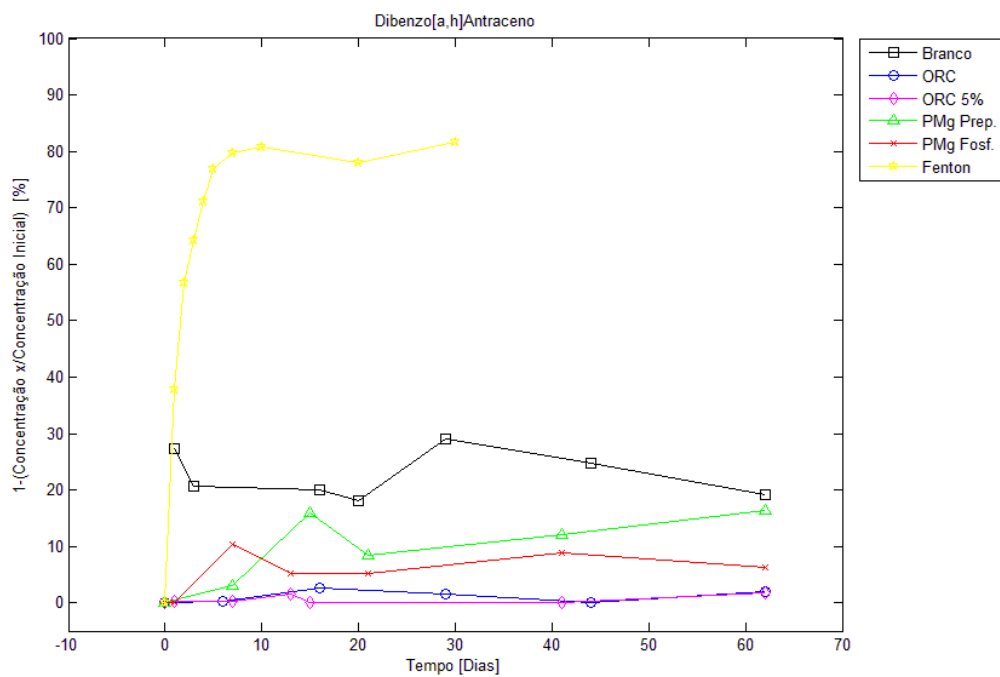


FIGURA 30 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DE DIBENZO[a,h]ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

Os HPAs de alto peso molecular (Benzo[a]Antraceno, Criseno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[k]Fluoranteno, Benzo[a]Pireno, Indeno[1,2,3-c,d]Pireno, Benzo[g,h,i]Perileno e Dibenzo[a,h]Antraceno) apresentaram baixo decaimento se comparados aos de baixo peso molecular. CERNIGLIA (1992 e 1995) atribuiu este fato à baixa solubilidade e volatilidade destes compostos, desfavorecendo o transporte destas substâncias e, conseqüentemente, tornando estes contaminantes menos biodisponíveis aos microrganismos.

Foi constatado também que, semelhante à degradação de HPAs de baixo peso molecular, os contaminantes Dibenzo[a,h]Antraceno, Benzo[a]Antraceno e Benzo[k]Fluoranteno apresentaram maiores limites de degradação para o ensaio “Branco” comparados a outros ensaios de caráter biológico (ORC, ORC5%, PMg Prep. e PMg Fosf.). Para estes elementos a aplicação de compostos a base de Peróxido de Magnésio não é eficiente. Contudo, para os contaminantes, Indeno[1,2,3-c,d]Pireno e Benzo[g,h,i]Perileno foi constatado que a adição do composto “PMg Prep.” elevou, embora em pequena escala, a redução dos contaminantes. Com exceção do ensaio “Fenton” nos demais compostos observou-se resultados relativamente iguais à amostra “Branco”, tornando assim os compostos a base de MgO_2 ineficientes. Para HPAs de alto peso molecular, visto a baixa solubilidade destes compostos, as baixas taxas de decaimento já eram esperadas. Contudo, eram almejados resultados de decaimentos maiores para os ensaios utilizando compostos a base de peróxido de magnésio. Conforme as figuras apresentadas anteriormente, tanto para a maioria dos compostos de baixo peso molecular quanto para compostos de alto peso molecular, não foi evidenciado aumento significativo de decaimento.

A análise dos resultados de decaimento dos diferentes contaminantes estudados mostra que os ensaios realizados apresentam uma grande semelhança no comportamento utilizando diferentes compostos auxiliares de biodegradação, porém com diferenças na concentração final (estabilizada) e no tempo de estabilização.

A Figura 31 representa o decaimento da soma de todos os HPAs estudados. Como a contaminação do solo foi realizada utilizando-se 16 tipos diferentes de HPAs na mesma quantidade, é possível ter uma ideia geral da quantidade total de contaminantes reduzida.

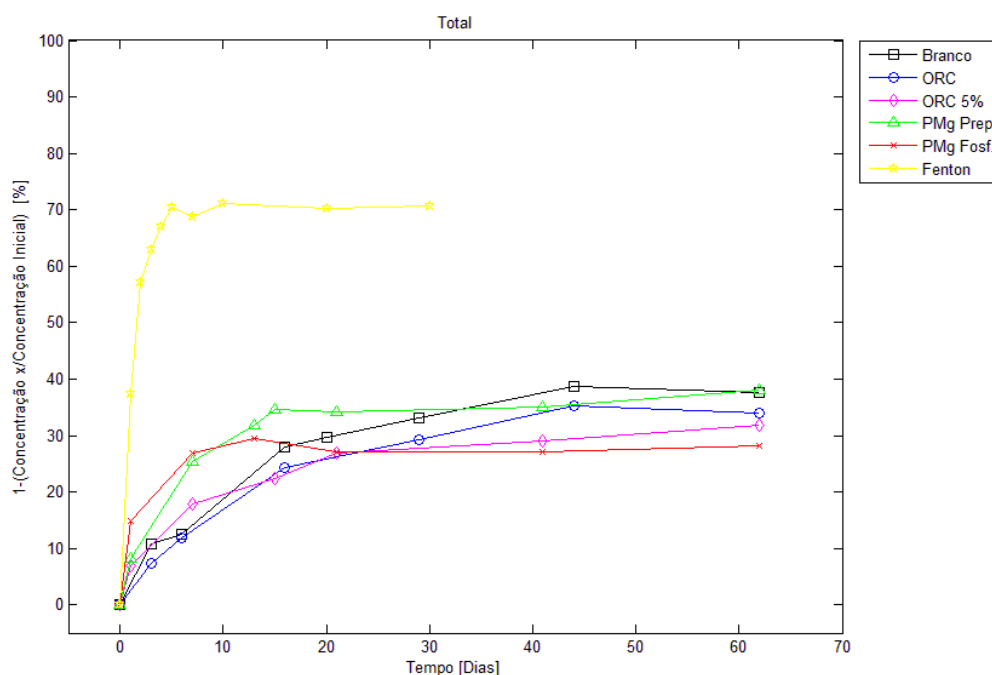


FIGURA 31 - RESULTADOS DE DECAIMENTO DA SOMA DE HPAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Observam-se diferentes tempos de estabilização nos resultados de concentração total de HPAs (Figura 31). Para o ensaio “Branco”, a estabilização no decaimento na concentração total ocorre a partir do dia 30, sendo seu valor final de concentração o maior dentre os compostos auxiliares de biorremediação. No ensaio “PMg Prep.” é possível perceber que, embora a redução de contaminantes seja a mesma verificada pela amostra “Branco”, a estabilização ocorre antes, a partir do dia 17. Assim, este composto auxiliar justifica seu uso apenas neste primeiro período de degradação. Nos ensaios “ORC” e “ORC 5%” a estabilização dos resultados ocorre somente depois do dia 30, resultado ainda em uma redução menor que a amostra “Branco”. O ensaio “PMg Fosf.”, referente ao composto produzido em laboratório com adição de fosfato, apresentou a menor redução de contaminantes total, abaixo de 30% após 62 dias, porém a estabilização ocorreu mais rapidamente, a partir do 15º dia. Este fato pode estar relacionado com as diferentes funções do fosfato, contribuindo tanto para a liberação contínua do oxigênio na macromolécula de MgO_2 quanto para a manutenção das reações microbiológicas no solo, devido a maior

presença do elemento fósforo. Contudo, como este composto apresenta uma parcela significativa de fosfato, o teor de peróxido de magnésio é menor (TABELA 11), justificando decaimentos menores para grandes períodos de degradação.

Analisando-se cada contaminante separadamente, o menor tempo de estabilização foi encontrado utilizando-se peróxido de Magnésio preparado em laboratório (“PMg Prep.”) para ensaios de Naftaleno. Para este experimento foi relatado tempo de equilíbrio igual a sete dias, enquanto que para os outros ensaios a estabilização foi a partir do 15º dia (Figura 15). Isto pode ser explicado pela grande biodisponibilidade do Naftaleno aliado à maior quantidade presente de MgO_2 neste composto, gerando uma maior capacidade de liberação de oxigênio (TABELA 11). Neste experimento a concentração final do ensaio “Branco” foi a menor relatada, evidenciando que a introdução de composto a base de MgO_2 contribuiu positivamente para o decaimento do contaminante (Naftaleno). Contudo, o ensaio para “ORC5%” apresentou decaimento menor que o ensaio “ORC”, este com menor quantidade de peróxido de magnésio industrial, sugerindo que o composto ORC pode exercer certa inibição na depuração da matéria orgânica. Todos os outros contaminantes apresentaram o mesmo comportamento em relação ao ensaio “ORC” comparado ao “ORC5%” reforçando esta hipótese.

Geralmente os HPAs são persistentes no meio ambiente e possuem baixa solubilidade em água, com exceção do Naftaleno. Este composto é relativamente solúvel na água e apresenta as propriedades de grande volatilidade e maior pressão de vapor entre os contaminantes estudados. Assim, o Naftaleno é transportado mais facilmente, pois tende a ter uma baixa adsorção no solo, além de apresentar uma biodisponibilidade aos microrganismos muito maior. Conforme discutido por CERNIGLIA (1993) e JOHNSEN et. al.(2004), a biodisponibilidade é altamente dependente da solubilidade do composto em água. Como o Naftaleno possui a maior solubilidade entre os HPAs estudados, é de se esperar que este contaminante também apresente a maior taxa de degradação. Este fato foi constatado analisando-se as constantes “k” calculadas nas curvas características deste composto expressas na Figura 32. O valor de “k” representa a taxa de degradação do contaminante estudado e estes valores para Naftaleno estão sempre entre os maiores calculados. ZHANG (2006) declara que dos 16 HPAs prioritários segundo a USEPA o Naftaleno é o contaminante mais compatível com a biodegradação por microrganismos. Além disso, devido à sua estrutura carbônica ser mais simples, este

elemento é mais susceptível à biodegradação (CETESB, 2014). Isto justifica o fato do Naftaleno ser o composto que apresentou a maior degradação entre os contaminantes estudados. Porém, esta degradação é de difícil ocorrência em contaminantes com alta massa molecular, como por exemplo o Benzo[a]Pireno (Figura 27). Os resultados referentes a esse contaminante, apesar de apresentarem uma grande instabilidade, expõe a permanência destes compostos no solo. A maior redução para Benzo[a]Pireno foi encontrada utilizando-se “MgO₂ Prep.” e no ensaio “Branco”, valores 15,9% e 11,3% respectivamente, enquanto que para o Naftaleno o decaimento mínimo foi de 75,83% para a amostra “Branco”. CERNIGLIA (1993) cita que a concentração de HPAs no solo com dois a três anéis diminui mais rapidamente do que a concentração de HPAs com quatro a seis anéis. Este fato está relacionado às propriedades físico-químicas dos compostos e pela ausência de microrganismos capazes de degradar estes contaminantes altamente lipofílicos. Geralmente, HPAs de dois a três anéis benzênicos apresentam tempos de meia-vida na ordem de dias, comparados a meses e anos para HPAs de alto peso molecular (CERNIGLIA, 1993). É possível observar pela Tabela 18 que valores de tempo de meia-vida encontrados para Naftaleno a Antraceno estão dentro do citado por CERNIGLIA (1993).

Entre todos os contaminantes com alto peso molecular analisados é possível perceber que os resultados dos ensaios de “PMg Prep.” sempre estão entre os maiores valores de decaimento final, inclusive na soma de HPAs. Portanto, para os HPAs de alto peso molecular, os ensaios de “PMg Prep.” apresentaram efetivo decaimento comparado as amostras “Branco” (sem auxiliares de biorremediação), justificando a aplicação deste composto para o tratamento de áreas contaminadas com HPAs de alto peso molecular. Contudo, a quantidade de contaminantes degradados foi muito baixa em relação ao tempo de decaimento estudado. Conforme citado por CERNIGLIA, tempos de meia-vida para estes contaminantes podem chegar a anos, portanto, é indispensável a avaliação do custo-benefício do tratamento utilizando compostos auxiliares de biorremediação a base de peróxido de Magnésio antes de sua aplicação.

Como não foi possível o acompanhamento dos valores de pH durante todos os pontos de concentração, pois as amostra de solo eram totalmente extraídas, foram obtidos os valores de o pH inicial e final com o propósito de se analisar a faixa de trabalho. Portanto, amostras em triplicata nas mesmas condições dos ensaios

realizados foram sujeitas ao mesmo tempo final de reação. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - VALORES FINAIS DE pH PARA OS ENSAIOS REALIZADOS

Ensaio	pH inicial	pH Final			
		Amostra A	Amostra B	Amostra C	Média
Branco	6,32	6,24	6,35	6,29	6,29
ORC	6,32	6,31	6,39	6,34	6,35
ORC 5%	6,32	6,35	6,31	6,42	6,36
PMg Prep.	6,32	6,35	6,44	6,29	6,36
PMg Fosf.	6,32	6,33	6,41	6,34	6,30
Fenton	6,32	6,35	6,32	6,34	6,34

TABELA 13 – RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “BRANCO”

HPA	Concentração inicial [mg/kg solo seco]	Concentração final [mg/kg solo seco]	CONAMA 420/2009 Valores de prevenção [mg/kg solo seco]
Naftaleno	1,347	0,223	0,12
Acenaftileno	4,173	0,264	-
Acenafteno	4,574	0,214	-
Fluoreno	7,396	0,536	-
Fenantreno	10,636	1,068	3,3
Antraceno	11,224	1,407	0,039
Fluoranteno	11,327	2,506	-
Pireno	13,047	1,991	-
Benzo[a]Antraceno	12,648	6,589	0,025
Criseno	14,416	7,946	8,1
Benzo[b]Fluoranteno	13,110	8,399	-
Benzo[k]Fluoranteno	14,135	8,322	0,38
Benzo[a]Pireno	13,054	7,185	0,052
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	11,672	6,360	0,031
Benzo[g,h,i]Perileno	5,787	3,429	0,08
Dibenzo[a,h]Antraceno	10,324	6,847	0,57

TABELA 14 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO "ORC"

HPA	Concentração inicial [mg/kg solo seco]	Concentração final [mg/kg solo seco]	CONAMA 420/2009 Valores de prevenção [mg/kg solo seco]
Naftaleno	1,559	0,347	0,12
Acenaftileno	4,198	0,634	-
Acenafteno	4,630	1,253	-
Fluoreno	5,732	1,334	-
Fenantreno	6,870	1,453	3,3
Antraceno	6,971	2,346	0,039
Fluoranteno	7,457	2,627	-
Pireno	8,741	2,599	-
Benzo[a]Antraceno	7,894	7,605	0,025
Criseno	8,721	9,465	8,1
Benzo[b]Fluoranteno	8,252	7,832	-
Benzo[k]Fluoranteno	8,768	10,638	0,38
Benzo[a]Pireno	7,600	8,564	0,052
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	6,523	6,675	0,031
Dibenzo[a,h]Antraceno	3,457	3,383	0,08
Benzo[g,h,i]Perileno	6,494	7,413	0,57

TABELA 15 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO "ORC 5%"

HPA	Concentração inicial [mg/kg solo seco]	Concentração final [mg/kg solo seco]	CONAMA 420/2009 Valores de prevenção [mg/kg solo seco]
Naftaleno	2,011	0,275	0,12
Acenaftileno	5,696	0,651	-
Acenafteno	6,405	0,961	-
Fluoreno	7,546	1,280	-
Fenantreno	8,476	1,865	3,3
Antraceno	8,916	2,837	0,039
Fluoranteno	9,173	3,649	-
Pireno	9,174	3,661	-
Benzo[a]Antraceno	8,579	8,558	0,025
Criseno	9,712	10,389	8,1
Benzo[b]Fluoranteno	9,781	9,527	-
Benzo[k]Fluoranteno	9,223	10,729	0,38
Benzo[a]Pireno	8,608	8,970	0,052
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	7,678	7,296	0,031
Benzo[g,h,i]Perileno	3,758	3,567	0,08
Dibenzo[a,h]Antraceno	7,889	7,967	0,57

TABELA 16 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “MgO₂”

HPA	Concentração inicial [mg/kg solo seco]	Concentração final [mg/kg solo seco]	CONAMA 420/2009 Valores de prevenção [mg/kg solo seco]
Naftaleno	1,784	0,396	0,12
Acenaftileno	6,176	0,490	-
Acenafteno	6,962	0,650	-
Fluoreno	8,225	0,878	-
Fenantreno	9,082	1,415	3,3
Antraceno	9,089	2,465	0,039
Fluoranteno	9,683	3,021	-
Pireno	9,859	3,154	-
Benzo[a]Antraceno	9,218	6,634	0,025
Criseno	10,362	8,682	8,1
Benzo[b]Fluoranteno	11,024	7,029	-
Benzo[k]Fluoranteno	9,935	9,021	0,38
Benzo[a]Pireno	9,164	7,336	0,052
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	8,506	5,655	0,031
Dibenzo[a,h]Antraceno	4,077	2,502	0,08
Benzo[g,h,i]Perileno	8,774	6,602	0,57

TABELA 17 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INICIAL E FINAL PARA O ENSAIO “FÓSFORO”

HPA	Concentração inicial [mg/kg solo seco]	Concentração final [mg/kg solo seco]	CONAMA 420/2009 Valores de prevenção [mg/kg solo seco]
Naftaleno	1,938	0,327	0,12
Acenaftileno	4,485	0,716	-
Acenafteno	5,120	1,003	-
Fluoreno	6,912	1,340	-
Fenantreno	8,706	2,132	3,3
Antraceno	9,195	3,127	0,039
Fluoranteno	10,065	3,489	-
Pireno	10,221	2,132	-
Benzo[a]Antraceno	7,673	7,733	0,025
Criseno	8,820	8,434	8,1
Benzo[b]Fluoranteno	8,580	7,794	-
Benzo[k]Fluoranteno	8,442	9,016	0,38
Benzo[a]Pireno	7,805	7,539	0,052
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	6,932	6,069	0,031
Dibenzo[a,h]Antraceno	3,343	2,907	0,08
Benzo[g,h,i]Perileno	6,783	6,619	0,57

Nota-se que os resultados da Tabela 12 evidenciam uma mudança, embora pequena, no ambiente estudado. Para o ensaio “Branco”, onde não se adicionou nenhum composto auxiliar de biorremediação, o valor de pH foi o menor encontrado (6,29). Comparando com seu valor inicial, nota-se uma pequena diminuição na faixa de pH. Conforme citado por ROPER e PFAENDER (2001), ácidos aromáticos policíclicos hidroxilados resultam da degradação parcial e/ou da transformação de alguns Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos de alto peso molecular.

Para os ensaios de “ORC”, “ORC 5%” e “PMg Fosf.”, os valores de pH obtidos foram muito próximos, porém maiores que os valores iniciais. Devido ao seu caráter básico, o óxido de Magnésio e o peróxido de Magnésio tendem a aumentar o valor de pH do sistema, superando as expectativas quanto ao decréscimo de pH devido a formação de subprodutos ácidos. Dentre os ensaios com compostos auxiliares, o “PMg Fosf” obteve o menor valor final de pH. A Figura 31 apresenta os resultados de decaimento na soma total de contaminantes, onde o “PMg Fosf.” também obteve a maior redução de contaminantes entre todos os estudados. Isto reforça o fato de que, dentre todos os composto auxiliares de biorremediação estudados, os ensaios com peróxido de magnésio com adição de fosfato estão entre as melhores eficiências apresentadas.

Analisando-se os resultados de concentração final expressos nas Tabelas 13 a 17, apenas foram obtidos valores de prevenção menores que os aceitos pelo CONAMA n.420/2009 para o contaminante Fenantreno, em todos os ensaios realizados, e Criseno, para o ensaio “Branco”. Portanto, o objetivo de obter um ambiente dentro dos limites de contaminação proposto pela legislação brasileira não foi alcançado no período de tempo estudado (68 dias). Contudo, se observarmos as curvas de degradação dos HPAs de baixo peso molecular (Naftaleno a Pireno) e da soma de HPAs concluiremos que tais curvas se assemelham muito com curvas de degradação de modelos de primeira ordem, conforme VOLKERING *et al.* (1992) propõe para a degradação de diferentes HPAs. Avaliando cada curva de degradação e propondo uma equação característica para cada curva é possível determinarmos a porcentagem máxima de degradação para um tempo infinito e também a velocidade de degradação de cada composto.

Com o propósito de se obter uma curva característica que represente a cinética da degradação de cada contaminante em função do tempo e assim estimar a máxima degradação possível considerando longos tempos de exposição, foi

realizada regressão exponencial dos resultados conforme modelo de degradação de primeira ordem proposto por VOLKERING *et al.* (1992). Cada curva de degradação é representada pelos coeficientes “A” e “k” no modelo exponencial, conforme equação 3.2.1.5, onde o primeiro coeficiente demonstra o valor da estabilização da degradação de cada contaminante e o segundo coeficiente (“k”) representa a velocidade em que este contaminante é degradado no ambiente estudado. Foi verificado que apenas os contaminantes Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno e a soma total de HPAs possuíam curva característica seguindo o modelo exponencial de 1ª ordem. Portanto, os tempos de meia-vida e meia-degradação foram calculados apenas para estes compostos, incluindo a soma de HPAs (“TOTAL”). Os resultados são apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – TEMPOS DE MEIA-VIDA E MEIA-DEGRADAÇÃO CALCULADOS PARA OS HPAs DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO DIFERENTES COMPOSTOS AUXILIARES DE BIOREMEDIAÇÃO.

	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) [dias]					Tempo de meia-degradação (t_{md}) [dias]				
	Branco	PMg Fosf.	PMg Prep.	ORC	ORC 5%	Branco	PMg Fosf.	PMg Prep.	ORC	ORC 5%
Naftaleno	5,73	1,52	0,22	1,41	1,32	3,70	1,21	0,16	1,00	0,85
Acenaftileno	5,31	2,24	0,45	1,88	1,63	4,11	1,39	0,36	1,49	1,02
Acenafteno	3,19	2,66	0,57	3,57	2,84	2,58	1,43	0,43	2,53	1,70
Fluoreno	5,67	2,12	1,36	6,94	7,53	4,71	1,20	0,98	4,71	4,79
Fenantreno	5,78	2,02	5,56	10,00	10,56	4,61	1,02	4,14	7,43	6,99
Antraceno	7,17	14,60	16,16	16,98	30,60	5,44	5,67	9,33	11,54	27,65
Fluoranteno	21,30	21,10	16,62	22,07	23,38	14,67	9,12	9,32	12,63	12,97
Pireno	15,53	23,45	17,52	13,80	21,40	10,05	10,15	9,69	8,69	10,95
TOTAL	-	-	-	-	-	7,80	0,93	3,71	8,40	7,25

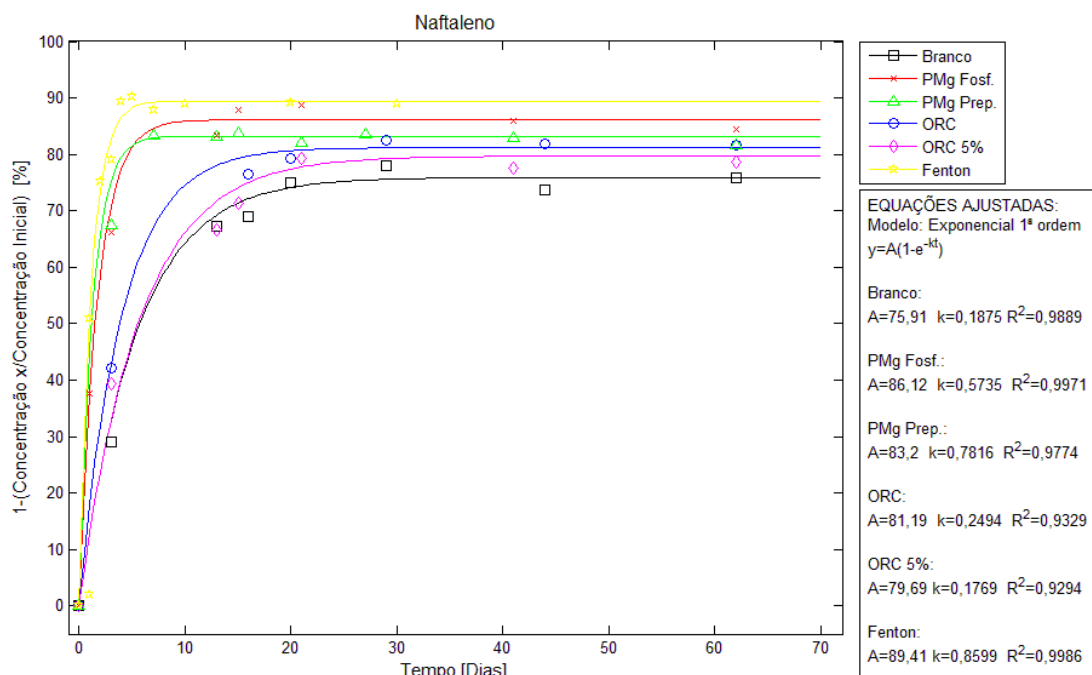


FIGURA 32 – CURVA AJUSTADA PARA O NAFTALENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

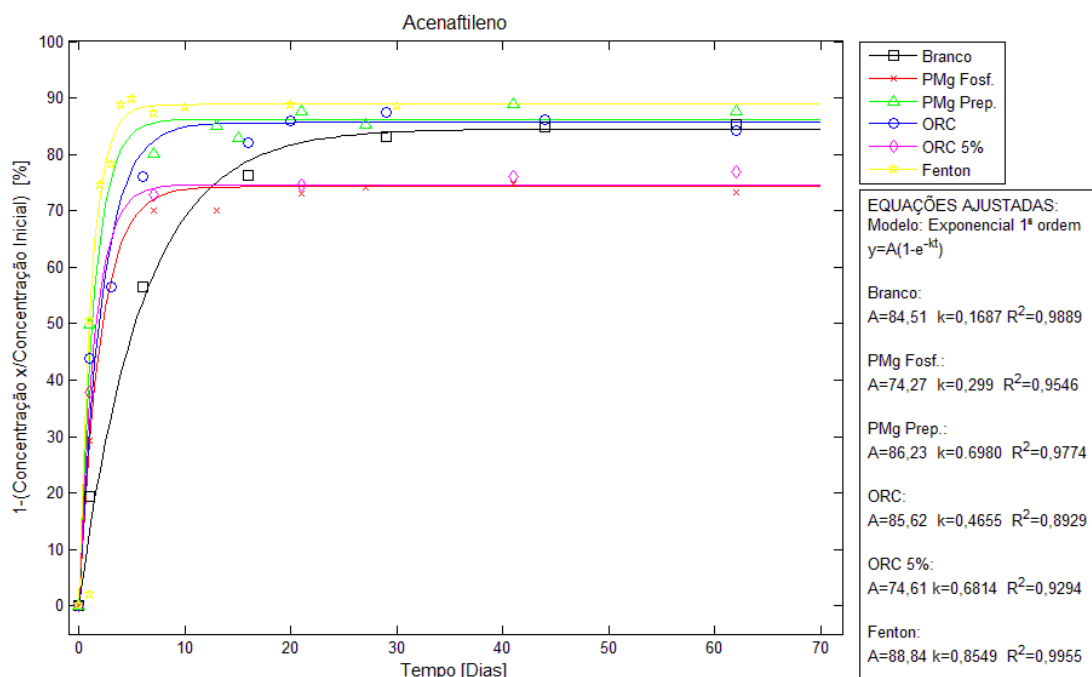


FIGURA 33 – CURVA AJUSTADA PARA O ACENAFTILENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

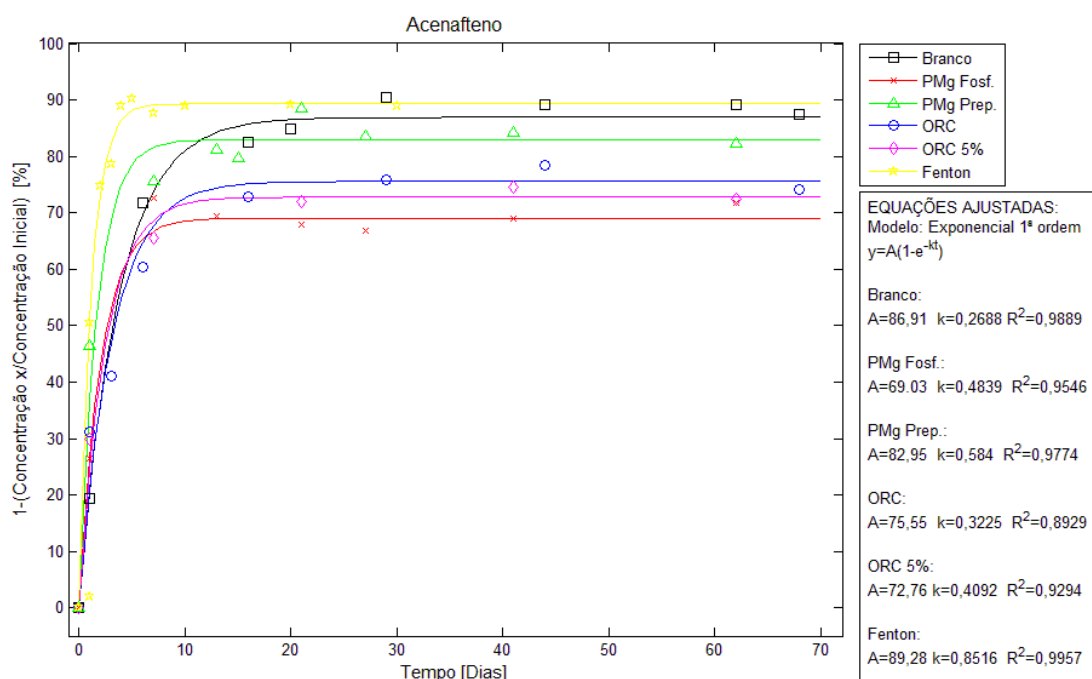


FIGURA 34 - CURVA AJUSTADA PARA O ACENAFTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

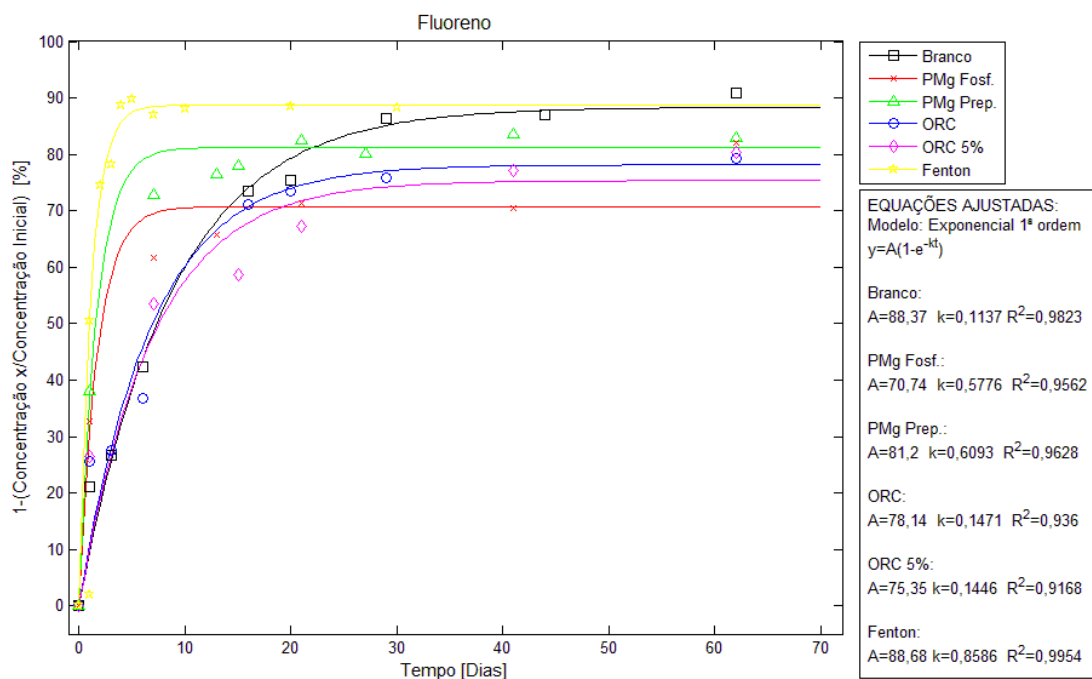


FIGURA 35 - CURVA AJUSTADA PARA O FLUORENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

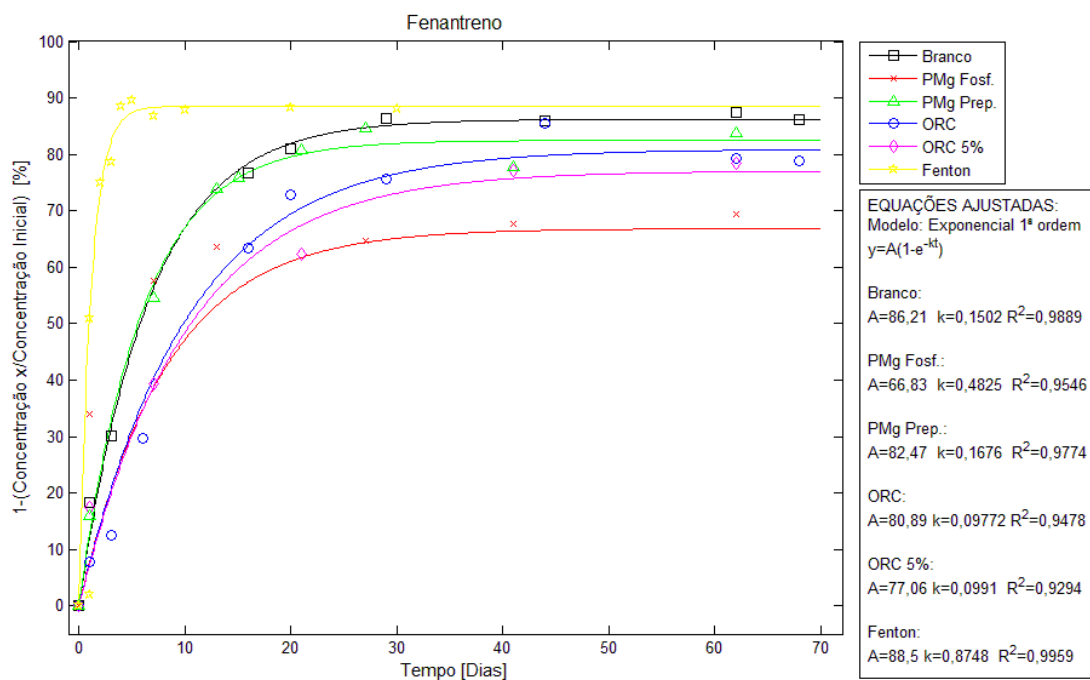


FIGURA 36 - CURVA AJUSTADA PARA O FENANTRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

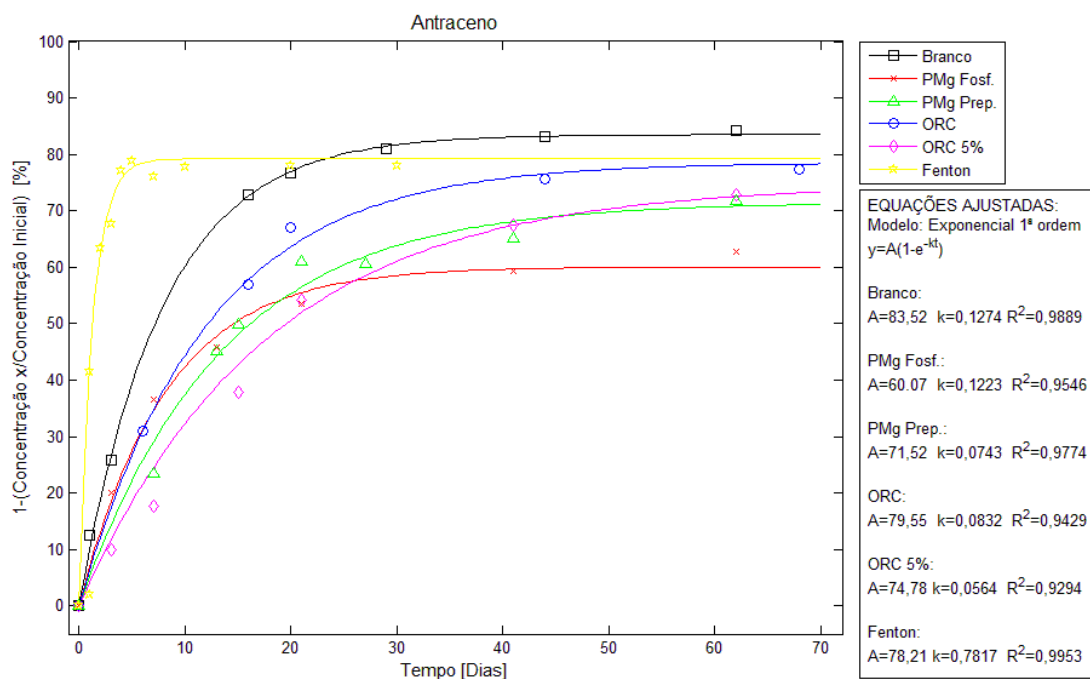


FIGURA 37 - CURVA AJUSTADA PARA O ANTRACENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

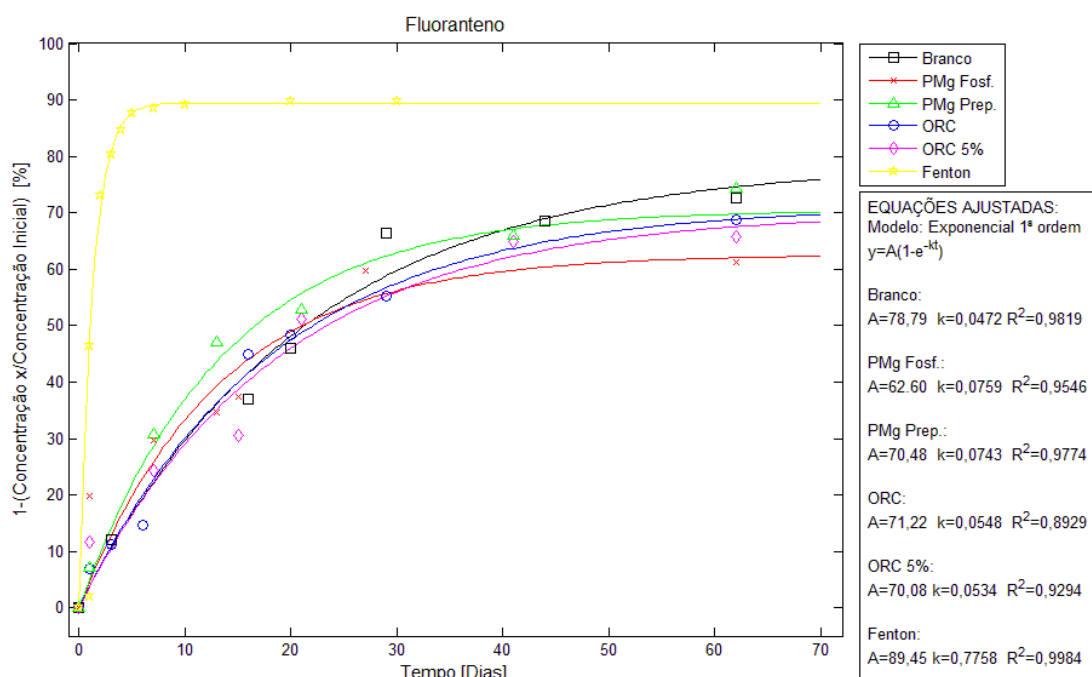


FIGURA 38 - CURVA AJUSTADA PARA O FLUORANTENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

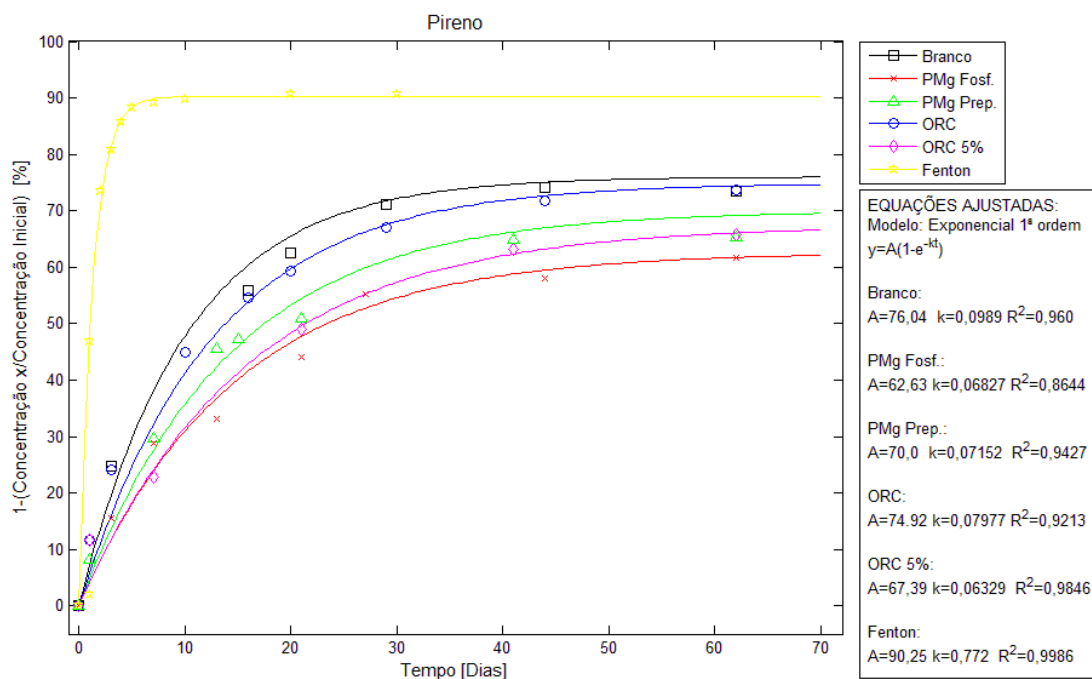


FIGURA 39 – CURVA AJUSTADA PARA O PIRENO EM FUNÇÃO DO TEMPO

Analisando-se as constantes das equações ajustadas observa-se que as culturas mistas apresentaram preferência por HPAs com estrutura química composta por três anéis em relação à HPAs com menos de quatro anéis, de acordo com estudos anteriores de degradação por bactérias isoladas (STRINGFELLOW e AITKEN 1995), misturas binárias de bactérias isoladas (BOUCHEZ *et al.*, 1995) e culturas mistas (MUELLER *et al.*, 1989;. BANERJEE *et al.* 1995).

Considerando os diferentes compostos de biorremediação utilizados é possível constatar que a amostra “Branco” obteve, na maioria dos casos, as menores concentrações finais de contaminantes e, conseqüentemente, a maior redução no valor final de concentração. Isto fica evidente quando comparamos os valores das constantes “A” nas curvas ajustadas para cada elemento. Considerando tempo infinito de exposição o valor da porcentagem de redução do contaminante é o próprio valor da constante “A”. Portanto, é possível sugerir que os compostos a base de peróxido de Magnésio exercem uma inibição na degradação dos contaminantes, com exceção do Naftaleno. Para Pireno, Fluoranteno, Antraceno, Fenantreno, Fluoreno e Acenafteno os valores da constante “A” no ensaio “Branco” (sem adição de compostos a base de peróxido de Magnésio) são os maiores encontrados. Para o Acenaftileno o valor desta constante para amostra “Branco” ficou apenas 2% abaixo do valor máximo. Contudo, é possível perceber também que a redução dos contaminantes Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno e Fluoreno, para tempos de exposição menores que 10 dias e com utilização de compostos a base de MgO_2 , ficou acima da amostra sem adição de compostos a base de peróxido de Magnésio (“Branco”). Isto sugere que a utilização destes compostos pode ser efetiva para curtos períodos de aplicação e para HPAs contendo até duas cadeias carbônicas aromáticas. Tais resultados podem ser relacionados tanto à maior biodisponibilidade dos HPAs de baixo peso molecular, que resultaria em um maior potencial de degradação desses contaminantes, quanto a maior facilidade destes compostos em serem transportados para o ar, devido a sua maior volatilidade. Portanto, o transporte de matéria pode ter sido acentuado devido a maior liberação de oxigênio pelos compostos a base de Peróxido de Magnésio, ocasionando a maior taxa de degradação inicial comentada. Logo, é de se esperar que o contaminante mais volátil conseqüentemente apresente maior taxa de degradação inicial. Como esperado o Naftaleno apresentou tanto a maior degradação quanto a maior taxa de degradação no início do tratamento.

O composto que apresentou a maior eficiência neste curto período de estudo (0 a 10 dias) foi o “PMg Prep.” (Peróxido de Magnésio preparado em laboratório), seguido pelo “PMg Fosf.” (Peróxido de Magnésio com adição de fosfato). As análises dos tempos de meia-vida suportam estes fatos ao compararmos os resultados de do ensaio “Branco” com os ensaios utilizando compostos auxiliares de biorremediação (Tabela 18). Para a faixa de HPAs citada (Naftaleno a Fluoreno) os menores valores de tempo de meia vida são encontrados para os ensaios de “PMg Prep.”, seguido por “PMg Fosf.”. Os maiores tempos são encontrados para “ORC”, “ORC 5%” e “Branco”, indicando que a maior quantidade de ORC® adicionada não contribui efetivamente para o aumento da eficiência de degradação da maioria HPAs. Para a soma total de HPAs os melhores resultados foram obtidos nos ensaios “PMg Prep.” e “PMg Fosf.”.

As análises das sequências de cromatogramas das amostras apresentam vários picos não identificados, sugerindo a formação de outros compostos devido ao co-metabolismo. Porém estes picos não apresentaram um crescimento em função do tempo, podendo também serem associados a outros compostos orgânicos presentes inicialmente no solo.

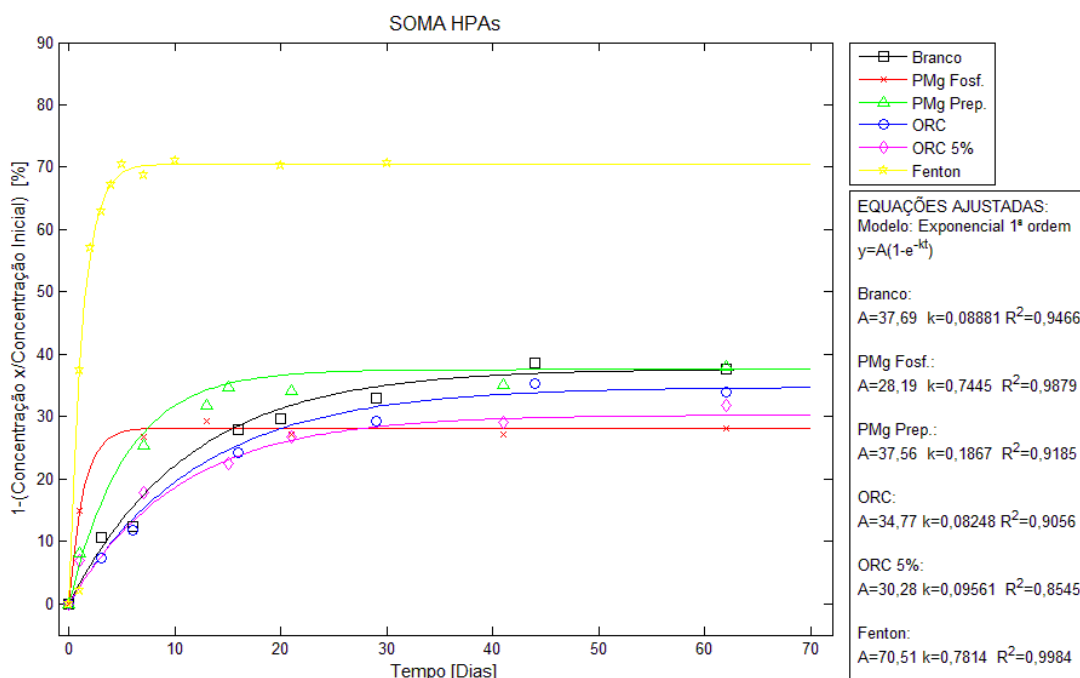


FIGURA 40 - CURVA AJUSTADA PARA O SOMA DE HPAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Observa-se que, para a soma de HPAs e compostos de baixo peso molecular (Naftaleno a Pireno), a diminuição da concentração final atingiu um limite diferente de zero. Este fato sugere que a biodegradação de diferentes contaminantes pode causar a inibição competitiva e levar ao co-metabolismo. STRINGFELLOW *et al.* (1995) sugeriram que a competição pelas enzimas iniciais na biodegradação poderia causar a inibição competitiva de substratos com peso molecular mais elevado. O substrato inibido pode ser utilizado como substrato de crescimento ou co-metabólito, mas a uma taxa inferior. A degradação mais acelerada de um HPA mais solúvel, gerando elementos paralelos, poderia reprimir as enzimas dos microrganismos que sintetizam os HPAs com massa mais elevada produzindo uma fase de latência. Outro caminho seria a liberação de metabólitos como o salicilato, induzindo outras vias, originando-se, por fim, o co-metabolismo (STRINGFELLOW *et al.*, 1995). De fato, conforme as Figuras 32 a 40, quanto maior a massa molecular do HPA, menor sua constante “k”, e conseqüentemente menor será sua taxa.

5.2.3 Degradação dos compostos de HPAs via transformação química

Analisando os resultados referentes ao ensaio “Fenton” (reação de Fenton Modificada) é possível perceber que não somente os HPAs de baixo peso molecular como os HPAs de alto peso molecular sofreram forte redução em um curto espaço de tempo. Conforme apresentado nas Figuras 15 a 40 foi observado que em até 10 dias de exposição ocorre a estabilização dos contaminantes no solo, diferentemente dos ensaios utilizando técnicas de biorremediação. Os valores totais de redução dos contaminantes estudados ficaram também muito próximos, variando de 90% a 80%.

Tratamentos utilizando a técnica de Fenton modificada com íons férricos e agentes quelantes foram realizados por GAN *et. al.* (2012). O tratamento combinado com a biodegradação resultou em valores finais de 98% de remoção de HPAs de baixo peso molecular e valores acima de 70% de remoção em HPAs de alto peso molecular. Contudo, tais resultados variam fortemente em relação aos tipos de solo e da história de contaminação (GAN *et. al.* 2012).

5.2.4 Caracterização microbiológica do solo

Com o intuito de se analisar os tipos de microrganismos desenvolvidos no solo contaminado com HPAs foram realizados testes de caracterização das bactérias pela técnica de coloração de Gram. A caracterização foi realizada em cada ensaio de solo com tempo de reação de 30 dias. A Figura 41 foi representada o solo com adição de ORC® e tempo de exposição igual a 30 dias. Após a incubação conforme método descrito no item 4.6, foram retiradas 2 porções por esfregaço bacteriano e estas tratadas sucessivamente com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica. A Figura 41 apresenta o resultado do ensaio. É possível observar a predominância de Diplobacilos apresentados na Figura 41-a e Estreptobacilos, Figura 31-b, ambos gram negativos.

Em sucessivas incubações a presença de fungos brancos também foi constatada, citados por CERNIGLIA (1992) como uma alternativa a biodegradação por bactérias. Estes fungos (*White Rot Fungi*) apresentam grande capacidade de degradação de matéria orgânica, incluindo HPAs, em condições mais adversas comparados às bactérias (CERNIGLIA, 1992).

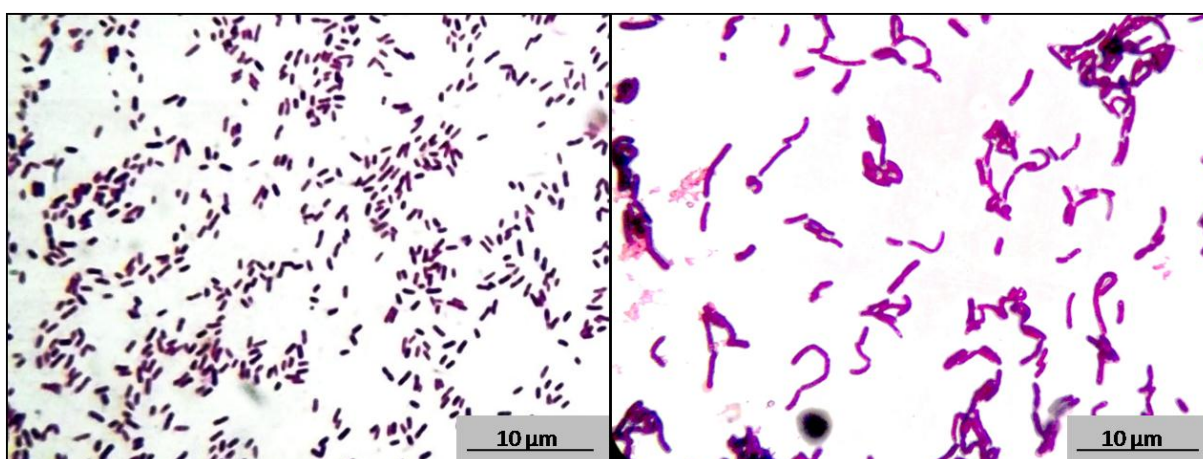


FIGURA 41 – RESULTADO DO ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NO SOLO DEPOIS DE 30 DIAS. ESQUERDA(A): DIPLOBACILOS. DIREITA(B): ESTREPTOBACILOS.

FONTE: O autor.

Duas colônias foram obtidas, majoritariamente, durante os ensaios microbiológicos, a saber: a) colônias grandes (1,5 cm, em média) circulares, com bordos lisos e tonalidade amarela, e b) colônias menores (0,5 cm, em média), circulares, bordos lisos e tonalidade branca.

Com a obtenção do esfregaço bacteriano e a realização dos ensaios de coloração de Gram, foram obtidos dois grupos de microorganismos, cujo crescimento se destacou durante os experimentos. A Figura 41 a-b apresenta as fotomicrografias obtidas para ambos os grupos.

A Figura 41-a apresenta microorganismos provenientes das colônias maiores, constituídas por bacilos gram negativos, organizados na forma de diplobacilos. A morfologia colonial, assim como a análise microscópica, demonstra a similaridade destes organismos com a espécie *Pseudomonas putida*, uma bactéria presente naturalmente no solo e que se destaca por sua facilidade em crescer sob cultivo, utilizando-se meios ágar (GOVAN *et al.*, 1981). Além disto, *P. putida* se destaca pela sua capacidade em metabolizar uma ampla gama de compostos orgânicos, entre eles os HPAs Naftaleno e Fenantreno (SAMANTA *et al.*, 2002; CHAUHAN *et al.*, 2008).

A Figura 41-b, por sua vez, apresenta microorganismos também bacilares e gram negativos, porém organizados em cadeias denominadas de estreptobacilos. Estes organismos, originários do segundo tipo colonial encontrado em abundância nos cultivos microbiológicos realizados, assemelham-se ao gênero *Burkholderia*. As espécies pertencentes a este gênero são, assim como *Pseudomonas putida*, abundantes em amostras de solo, de fácil cultivo, além apresentarem um grande potencial biotecnológico e de biorremediação, principalmente em ensaios de remoção de HPAs, como Fluoranteno e Pireno (JUHASZ *et al.*, 1997). Todas as espécies citadas pertencem ao grupo dos microorganismos aeróbios, eliminando a hipótese de que a inibição na degradação dos contaminantes esteja relacionada com a prevalência da biorremediação anaeróbia sobre a aeróbia.

Apesar da similaridade encontrada com as espécies descritas é importante salientar que apenas a realização de ensaios moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pode assegurar a correta identificação dos microorganismos obtidos nos cultivos realizados.

5.2.5 Contagem de Microrganismos Totais

Com o objetivo de avaliar a presença e a população de bactérias que ocorrem naturalmente e que contribuirão para a degradação de contaminantes orgânicos, foi realizado a contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis seguindo as orientações da instrução normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária Nº 62 de 26/08/2003.

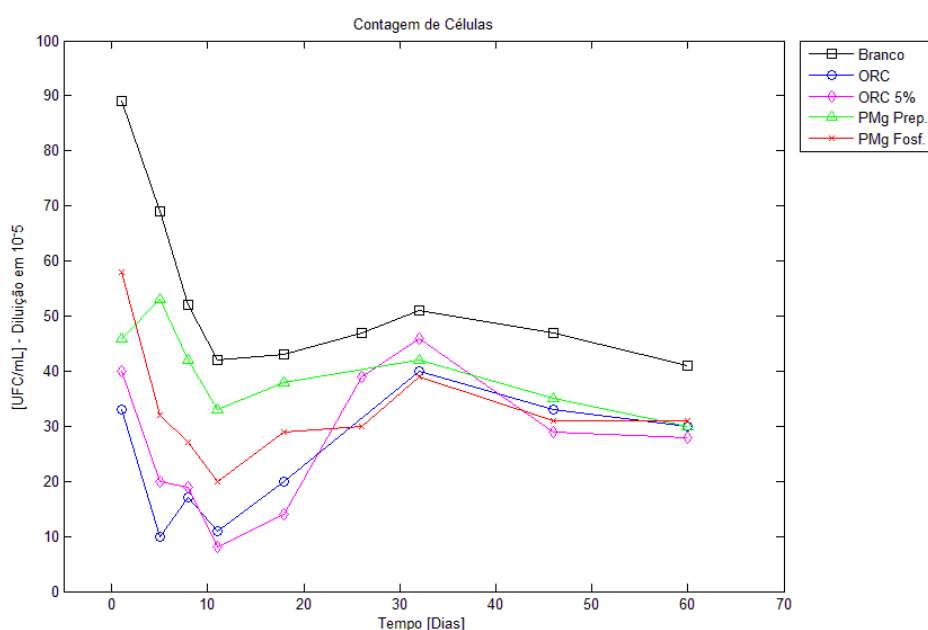


FIGURA 42 – RESULTADO DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS NO SOLO CONTAMINADO UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE COMPOSTOS AUXILIARES DE BIORREMEDIÇÃO.

Os resultados representados na Figura 42 demonstraram que a maior população bacteriana foi atingida em todos os pontos utilizando-se o ensaio “Branco”, isto é, sem a presença de compostos auxiliares de biorremediação a base de Peróxido de Magnésio. Todas as demais populações bacterianas utilizando compostos auxiliares ficaram abaixo do ensaio “Branco”. Estes resultados, embora não esperados, estão de acordo com os efeitos obtidos anteriormente pela quantificação de contaminantes no solo, reforçando a hipótese de que os compostos a base de MgO_2 interferem negativamente no ambiente terrestre (solo), inibindo o processo de biorremediação dos contaminantes orgânicos.

Observa-se também que a maior quantidade de ORC® no ensaio “ORC5%”, comparado ao ensaio “ORC”, não resultou em um aumento efetivo da população bacteriana, ocasionando justamente o efeito contrário. A mesma tendência foi observada nas experiências de quantificação de contaminantes orgânicos, reforçando a ideia da inibição da degradação de HPAs pela adição de compostos a base de MgO_2 . Uma das hipóteses para justificar tal inibição pode estar relacionada com a degradação dos contaminantes pela população anaeróbia. Aumentando-se a quantidade de oxigênio disponível no meio o metabolismo destes organismos pode ter sido afetado, ocasionando a redução na degradação. Contudo, HPAs frequentemente persistem ou sofrem degradação muito lenta em condições anaeróbicas. A completa mineralização dos HPAs normalmente envolve três ou mais espécies de microorganismos em condições anaeróbicas, onde na aeróbia apenas uma espécie necessária. A Abundância de receptores de elétrons em condições anaeróbicas é geralmente o fator limitante para a degradação (ALEXANDER, 1999). No entanto, a transformação de compostos de 2 e 3 anéis de HPAs têm sido relatada (VOLKERING e BREURE, 2003).

Em relação ao comportamento da população bacteriana foi observado, primeiramente, uma brusca redução no número de microorganismos até o 10º dia em todos os ensaios. Tal redução pode estar relacionada ao fato de que, devido à adição de uma grande quantidade de contaminantes orgânicos (HPAs), ocorreu uma pequena seleção natural no meio, sobrevivendo apenas os microorganismos que estavam aptos àquela condição extremamente agressiva. Outro fator determinante para que explica a redução da população inicial é a adição de solvente no momento da contaminação do solo por HPAs. Como os contaminantes estão solubilizados em solvente (n-Hexano e Diclorometano) é inevitável que se adicione uma quantidade, ainda que mínima, no solo. Este contato pode gerar morte de microorganismos menos resistentes (BRINCH, 2002) diminuindo a população no início do estudo.

A partir do dia 10 é possível perceber um aumento, embora pequeno, na população de todos os ensaios, em especial nos ensaios “ORC5%” e “ORC”. Neste período de crescimento é possível observar também a existência de uma redução considerável na maioria dos contaminantes no solo, como mostra, por exemplo, a Figura 40. Tal fenômeno pode ser explicado pelo aumento da oferta de alimento (HPAs) que é utilizado pelos microorganismos. Os organismos que são capazes de sintetizar estes contaminantes se reproduzem gerando uma população maior.

Finalmente, a partir do 30º dia, a população microbiana total começa a se reduzir outra vez. Não por coincidência, observa-se que é neste mesmo período que ocorre a estabilização dos valores de contaminantes no solo. Novamente na Figura 40 observamos que todos os ensaios estão entrando na zona de estagnação dos resultados, isto é, a taxa de redução dos contaminantes é muito pequena, e o valor de quantidade de contaminante permanece constante. Devido ao grande período de exposição a quantidade de substrato produzida é maior. Assim, como o meio estudado apresenta diferentes elementos orgânicos, tanto de cadeia carbônica leve quanto de cadeia carbônica pesada, diferentes substratos podem estar sendo produzidos paralelamente. Tais elementos podem ocasionar uma inibição no metabolismo dos microrganismos e consequente diminuição da população, além do fato da oferta de alimento ser menor.

Os resultados apresentados para a contagem de microrganismos, embora não esperados em um primeiro momento, estão condizentes com a realidade dos experimentos anteriores. É possível observar que o ensaio “Branco” atingiu os maiores níveis de redução de contaminantes na maioria dos experimentos biológicos de quantificação de HPAs. Logicamente esperava-se que a maior redução de contaminantes fosse acompanhada do ensaio que apresentasse maior população microbiana, e este comportamento foi observado. O ensaio “Branco” apresentou maior população microbiana em todos os pontos. Contudo, esperava-se que os compostos a base de Peróxido de Magnésio proporcionassem um aumento dos microrganismos no solo devido a maior quantidade de oxigênio presente. Infelizmente essa hipótese não se tornou realidade, reforçando a teoria de que o MgO_2 resulte em uma inibição na biorremediação. Experimentos de contagem de microrganismos aliados à reação de Fenton não foram realizados por se tratarem de experimentos de oxidação química.

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados sugerem que a biorremediação utilizando-se compostos a base de Peróxido de Magnésio promove a redução dos contaminantes de baixo peso molecular, especificamente o Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, e Pireno, sendo esta redução atribuída à biorremediação por co-metabolismo, característico de processos que apresentam estabilização do resultado final e não o metabolismo total dos contaminantes (mineralização). Contudo, os resultados apontam também que a utilização destes compostos promove pequena inibição na degradação de HPAs de baixo peso molecular, provado em comparação com a amostra “Branco” (sem adição de compostos a base de peróxido de Magnésio). Portanto, a aplicação dos compostos estudados em tratamentos de solo contaminados por HPAs utilizando a técnica da biorremediação, em longos períodos de exposição não é justificado.

Para pequenos tempos de exposição (0 a 20 dias) os compostos “PMg Prep.” e “PMg Fosf.” apresentaram taxa de degradação maiores do que as amostras sem adição de compostos auxiliares de biorremediação. Portanto, a aplicação destes compostos é justificada apenas para curtos períodos de exposição no solo contaminado por HPAs de baixo peso molecular, principalmente para o composto “PMg Prep.”, que sempre esteve entre os melhores resultados. Contudo, é de vital importância o estudo econômico antes de sua aplicação, pois conforme citado no parágrafo acima, para períodos de exposição maiores que aproximadamente 20 dias, as maiores taxas de degradação são encontradas nos ensaios sem a utilização de compostos a base de MgO_2 .

Os ensaios de contagem de microrganismos demonstram o mesmo comportamento evidenciado nos ensaios de quantificação de contaminantes. Deste modo é possível concluir que de fato existe um aumento na população bacteriana decorrente da biorremediação e que a redução da concentração dos contaminantes não é fruto predominante de volatilização, porém não descartando sua existência.

Analisando-se de modo geral as espécies de microrganismos encontradas no solo estudado é possível perceber a predominância de bactérias aeróbias sobre as anaeróbias. Portanto, é possível afirmar que no solo estudado existe a

predominância da biorremediação aeróbia, mesmo nos ensaios sem adição de compostos a base de MgO_2 .

O composto industrial de peróxido de Magnésio (ORC®) provou ser ineficiente no aumento das taxas de degradação e diminuição da concentração final dos contaminantes estudados, apresentando os menores coeficientes “k”, mesmo em concentrações mais altas (ORC 5%). Observou-se ainda que o aumento da concentração de ORC® no solo aumentou a inibição da degradação dos HPAs, de modo que os valores da constante “A” também reduziram. Os ensaios de contagem de microrganismos sustentam também este comportamento, de modo que quanto menor a taxa de degradação, menor é a expectativa de se encontrar microrganismos. Não por acaso, é possível perceber que a maior quantidade de ORC® reduziu também o número de bactérias totais (Figura 42).

Para os compostos de alto peso molecular observaram-se taxas de degradação muito pequenas comparadas às taxas de degradação dos HPAs de baixo peso molecular, fato relacionado às inibições por co-metabolismo dos elementos mais leves. Nos contaminantes Criseno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[k]Fluoranteno, Benzo[a]Pireno, Indeno(1,2,3-c,d)Pireno e Benzo[g,h,i]Perileno notou-se que a degradação final no período estudado de certas amostras com adição de compostos a base de peróxido de Magnésio foram maiores que as degradações apresentadas pelas amostras “Branco”. Para o ensaio com “PMg Prep.” todos os contaminantes citados ficaram abaixo da amostra branco. Este fato sugere que, diferentemente dos HPAs de baixo peso molecular, a aplicação de compostos a base de peróxido de Magnésio tende a aumentar a eficiência de degradação. Contudo, o período sugerido de análise para estes compostos é muito maior do que o realizado, sugerindo um novo estudo com tempos de exposição maiores para a devida caracterização da cinética destes contaminantes. CERNIGLIA (1993) cita períodos de exposição para biorremediação na ordem de anos para contaminações de HPAs de alto peso molecular.

Os níveis mínimos de contaminação no solo para HPAs aceitos pelo CONAMA Nº420/2009, conforme proposto no início do tratamento, não foram atingidos. Entretanto, é necessário levar-se em conta de que a quantidade de HPAs contaminado no solo era relativamente grande, principalmente a quantidade de HPAs de alto peso molecular. Em 68 dias de exposição foram atingidos níveis de redução de 86 a 60 % para HPAs de baixo peso molecular. Deste modo, sugere-se

que novos estudos sejam realizados no âmbito de se investigar a possibilidade de que menores concentrações de contaminantes atinjam os limites estipulados pela legislação brasileira. Sugere-se também estudo de outros compostos auxiliares de biorremediação como, por exemplo, os surfactantes, que apresentam a propriedade de modificar a solubilidade de compostos orgânicos, alterando assim a biodisponibilidade dos contaminantes aos microrganismos. A utilização de biorreatores aeróbios com maior tempo de exposição poderia também ocasionar no aumento da população aeróbia no meio, aumentando assim a eficácia da degradação, caso seja constatado que a população anaeróbia no solo é predominante.

De maneira geral, observando-se todos os métodos utilizados, pode-se afirmar que, nas condições investigadas, a melhor técnica de redução de HPAs em solo visando máxima redução de componentes no menor período de tempo é via reação de Fenton modificada, tratando-se de uma alternativa promissora na remediação de solos contaminados. Como citado anteriormente, a reação modificada de Fenton tem a grande vantagem de não necessitar de alterações na condição de pH do solo, diferentemente da reação tradicional de Fenton, onde o pH do meio deve ser obrigatoriamente ácido. Foram alcançadas reduções de contaminantes na faixa de 80% a 90% em períodos de tempo de no máximo 10 dias. Comparado as técnicas de biorremediação utilizando compostos a base de MgO_2 a utilização da reação de Fenton modificada é muito mais efetiva. Contudo, é de vital importância a verificação dos subprodutos formados durante esta reação química, visando não tornar o ambiente mais tóxico devido a formação de outros compostos químicos.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, Martin. **Biodegradation and bioremediation**. Gulf Professional Publishing, 1999.

BAEK, S. O. et al. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. **Water, air, and soil pollution**, v. 60, n. 3-4, p. 279-300, 1991.

BAIRD, William M.; HOOVEN, Louisa A.; MAHADEVAN, Brinda. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p. 106-114, 2005.

BANJOO, D.R.; NELSON, P. K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography A**, v.1066, p.9–18, 2005.

BIGDA, R.J. Consider Fenton 's Chemistry for Wastewater Treatment, **Chemical Engineering Progress**, p.62-66, 1995.

Bossmann S.H., Oliveros E., Göb S., Siegwart S., Dahlen E.P., Payawan L. Jr., Straub M., Wörner M. and Braun A.M. J. **Phys. Chem.** V.102, p.5542-5550, 1998.

BOSTRÖM, Carl-Elis et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. **Environmental health perspectives**, v. 110, n. Suppl 3, p. 451, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n.420 de 28 de dezembro de 2009.

BRINCH, U. C.; EKELUND, F.; JACOBSEN, C. S. Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p. 1808-1816, 2002.

CASTRO, J. P.; FARIA, P. **Oxidação Química com Reagente de Fenton**. Faculdade de engenharia da universidade do porto, 2001.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Elsevier - Current Opinion in Biotechnology**. v.4, p.331–338, 1993.

CERNIGLIA, C.E.; EITKAMP, M. A **Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment**.CRC Press, Inc., BocaRaton, Florida, 1989.

CHAUHAN, A.; OAKESHOTT, J. G.; JAIN, R. K. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. **Indian journal of Microbiology**, v. 48, n.1, p. 95-113, 2008.

CHUNG, Namhyun; ALEXANDER, Martin. Effect of soil properties on bioavailability and extractability of phenanthrene and atrazine sequestered in soil. **Chemosphere**, v. 48, n. 1, p. 109-115, 2002.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; WILLIAMS, R. e KREMER, F. Effect of bioremediation on the mutagenicity of oil spilled in Prince William Sound, Alaska. **Chemosphere**, v.23, p.643-50, 1991.

DABESTANI, Reza; IVANOV, Ilia N. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Photochemistry and photobiology**, v. 70, n. 1, p. 10-34, 1999.

EMBAR, Keren; FORGACS, Chaim; SIVAN, Alex. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil. **Biodegradation**, v. 17, n. 4, p. 369-377, 2006.

Estados Unidos da América. US Environmental Protection Agency USEPA 3550C Ultrasonic extraction. Revisão 3, Fevereiro, 2007.

Estados Unidos da América. US Environmental Protection Agency. USEPA 3630C Silica Gel Cleanup. Revisão 3, dezembro, 1996.

EWEIS, J.B.; S.J. ERGAS, D. P. Y. CHANG, AND E.D. SCHROEDER. **Bioremediation principles**. McGraw-Hill, Boston, MA.

GAN, Suyin et al. Modified Fenton oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soils and the potential of bioremediation as post-treatment. **Science of The Total Environment**, v. 419, p. 240-249, 2012.

GOVAN, J. R. W.; FYFE, J. A. M., JARMAN T. R. Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. **Journal of General Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 217-220, 1981.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. em: ADRIANO, D.C. *et al.* (Ed). Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.33- 51, 1999.

HARVEY, Ronald G. **Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity**. CUP Archive, 1991.

JUHASZ, A. L.; BRITZ, M. L., STANLEY, G. A. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [a] anthracene and dibenz [a, h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 189-198, 1997.

Kang N, Hua I. Enhanced chemical oxidation of aromatic hydrocarbons in soil systems. **Chemosphere** 2005;61:909–22.

KHAN Z.; TROQUET J.; VACHELARD C. Sample preparation and analytical techniques for determination of polyaromatic hydrocarbons in soils. **Int. J. Environ. Sci. Tech.**, v.2, n.3, p.275-286.

KOENIGSBERG, S.; FARONE, W. A. Use of metallic peroxides in bioremediation **United States Patent**. Patent number 5,264,018, 1993.

LI, Jun et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) deposition to and exchange at the air–water interface of Luhu, an urban lake in Guangzhou, China. **Environmental pollution**, v. 157, n. 1, p. 273-279, 2009.

LOPES, Wilson A.; ANDRADE, JB de. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 497-516, 1996.

LOPES, Wilson A.; ANDRADE, JB de. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 497-516, 1996.

MACKAY, Donald; CALLCOTT, Daryl. Partitioning and physical chemical properties of PAHs. In: **PAHs and Related Compounds**. Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 325-345.

MENZIE, Charles A.; POTOCKI, Bonnie B.; SANTODONATO, Joseph. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 7, p. 1278-1284, 1992.

MOREIRA, Josino C.; BAREK, Jiri. ANALYSIS OF CARCINOGENIC NITRATED POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS-A REVDZW. **Química Nova**, v. 18, p. 4, 1995.

NETTO, Annibal D. Pereira et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NRC. In situ bioremediation: when does it work? National Research Council Water **Science Technology Board**, National Academy Press, Washington, DC, 1993.

OLUSEYI T.; OLAYINKA K.; ALO B.; SMITH R. M. Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. **African Journal of Environmental Science and Technology** . v. 5, n.7 p.482-493, 2011.

PIERZYNSKI, Gary M.; VANCE, George F.; SIMS, J. Thomas. **Soils and environmental quality**. CRC press, 2005.

REICHERT, J. S.; MCNEIGHT, S. A.; RUDEL, H. W. Determination of hydrogen peroxide and some related peroxygen compounds. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition**, v. 11, n. 4, p. 194-197, 1939.

ROPER, J. Chadwick; PFAENDER, Frederic K. Pyrene and chrysene fate in surface soil and sand microcosms. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 20, n. 2, p. 223-230, 2001.

SAMANTA, S. K., SINGH O. V.; JAIN R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 243-248, 2002.

SAMANTA, Sudip K.; SINGH, Om V.; JAIN, Rakesh K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 243-248, 2002.

SCHWARZENBACH, René P.; GSCHWEND, Philip M.; IMBODEN, Dieter M. **Environmental organic chemistry**. John Wiley & Sons, 2005.

SHAND, M.A. **The Chemistry and Technology of Magnesia**. Wiley Interscience, 1ª edição, Findlay, Ohio, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo, 3ª ed., Logomarca Varela, p. 295, 2007.

SONG Y F.; JING X.; FLEISCHMANN S.; WILKE B. M. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. **Chemosphere**, v.48, p.993–1001, 2002.

STOKES, J. D. et al. Prediction of PAH biodegradation in contaminated soils using an aqueous hydroxypropyl-beta-cyclodextrin extraction technique. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 24, p. 1325-1330, 2005.

SUESS, Michael J. The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Science of the total environment**, v. 6, n. 3, p. 239-250, 1976.

TATE III, Robert L. et al. **Soil microbiology**. John Wiley and Sons, 1995.

ULRIC, W. Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. **Biotechnology**. V.11b, environmental Processes II, pp. 5–42, 2000.

VENNY; GAN S; NG H. K. Modified Fenton oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soils and the potential of bioremediation as post-treatment. **Science of the Total Environment** v.419, p.240–249, 2012.

VIDALI, M. et al. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VOGEL, A. I. *Análise Química Quantitativa*; LTC. **Press: Rio de Janeiro, Brazil**, 1992.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J. **Análise química quantitativa** (Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis). p. 447-449, 2002.

VOLKERING, F. et al. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 548-552, 1992.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, v. 8, n. 6, p. 401-417, 1997.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G. Effect of micro-organisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 535-540, 1993.

WALAWSKA, B.; GLUZIŃSKA, J.; MIKSCH, K.; TUREK-SZYTOW, J. Solid inorganic peroxy compounds in environmental protection. **Polish Journal of Chemical Technology**. V.9, n.3, p.68-72, 2007.

WICK, A. F.; HAUS, N. W.; SUKKARIYAH, B. F., HAERING, K. C.; DANIELS, W. L. **Remediation of PAH-Contaminated Soils and Sediments: A Literature Review**. Virginia Polytechnic Institute and State University, 2011.

WILD, S. R.; JONES, K. C. Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. **Environmental toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 5-12, 1993.

WILSON, S.C.; JONES, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Environmental Pollution** v.81, p.229-249, 1993.

YAP C. L; GAN S.; NG H. K. Fenton based remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. **Chemosphere** v.83, p.1414-1430, 2011.