UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo contaminado

Maria Clara Siqueira Campos Lisboa Telhado

Rio de Janeiro
2009

Maria Clara Siqueira Campos Lisboa Telhado

AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE CONTAMINANTE ORGÂNICO EM SOLO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras:

Prof. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite
Dra. Andréa Camardella de Lima Rizzo

EQ / UFRJ
Rio de Janeiro
2009

Maria Clara Siqueira Campos Lisboa Telhado

AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE CONTAMINANTE ORGÂNICO EM SOLO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Profª. Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc. – EQ/ UFRJ
(Orientadora – Presidente da Banca)

Profª. Andréa Camardella de Lima Rizzo, D.Sc. – CETEM/MCT
(Orientadora)

Profª. Eliane Carollo Salgado, D.Sc. – CETEM/MCT

Prof. Paulo Rubens G. Barrocas, D.Sc. – FIOCRUZ

Profª. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc. – EQ/ UFRJ

Escola de Química / UFRJ
Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Telhado, Maria Clara Siqueira Campos Lisboa.
Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo. Rio de Janeiro, 2009.
XVIII, 115 f.: il.
Orientadoras: Selma Gomes Ferreira Leite e Andréa Camardella de Lima Rizzo

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.
Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Escola de Química/Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.
1. Biodisponibilidade. 2. Petróleo. 3.Atenuação Natural Monitorada – I. Título. II. Dissertação (Mestrado -UFRJ/ EQ).

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Jose Luiz e Ophelia, e minhas irmãs, Ana e Lilia, por tudo que vocês fizeram por mim para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelo amor, carinho e dedicação que vocês me deram, que fizeram com que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Cada um de vocês contribuiu, da sua maneira, para que este trabalho fosse realizado.

- Ao meu namorado Jimmy, que me acompanhou durante todo esse período com muita paciência, amor e carinho. Obrigada pelo seu incentivo incondicional. Até mesmo no laboratório você esteve do meu lado, auxiliando.

- Às minhas orientadoras Andréa e Selma, pela confiança no meu trabalho, pela calma nos momentos de desespero, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela amizade.

- Ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), por ter disponibilizado toda infra–estrutura para o desenvolvimento experimental desta dissertação de mestrado e, em especial, ao Dr. Ronaldo, Coordenador de Processos Metalúrgico e Ambientais.

- À pesquisadora Claudia Cunha, responsável pela identificação dos microrganismos por biologia molecular, por toda orientação e conselhos que me deu durante o mestrado.

- Aos amigos Danielle Reichwald, Elton Santos, Eliane Carollo e Natália Franco, não apenas por toda ajuda que vocês me deram durante o desenvolvimento desse trabalho, mas também por terem sido verdadeiros anjos pra mim. Tenho certeza que a nossa amizade permanecerá independentemente dos caminhos que nós seguiremos.

- Aos amigos que fiz no CETEM, pela convivência e auxílio durante o período que estive no laboratório: Grace, Rodrigo, Junior, Jorginho, Ary, Claudinha, Sabrina, Luzia, Marion, Bianca, Alessandra, Iacy, Diego, Débora, Renata, Hugo, Felipe, Jorge Luiz, Gabriel, Leticia, Tuba, dentre outros.

- Ao Dr. Alexandre Rosado, do Laboratório de Ecologia Molecular do Instituto de Microbiologia da UFRJ, pela cessão da infra-estrutura laboratorial para a realização das análises de biologia molecular.

- Ao Dr. Rodolfo Mattos Albano, do Laboratório de Genoma da UERJ, pelo seqüenciamento das amostras de DNA e posterior identificações microbianas.

- Às minhas amigas de mestrado Luciana, Fernanda, Ivy, Debora e Iara, por tudo que compartilhamos durante este sacrificante, mas sem dúvidas recompensador período de nossas vidas.

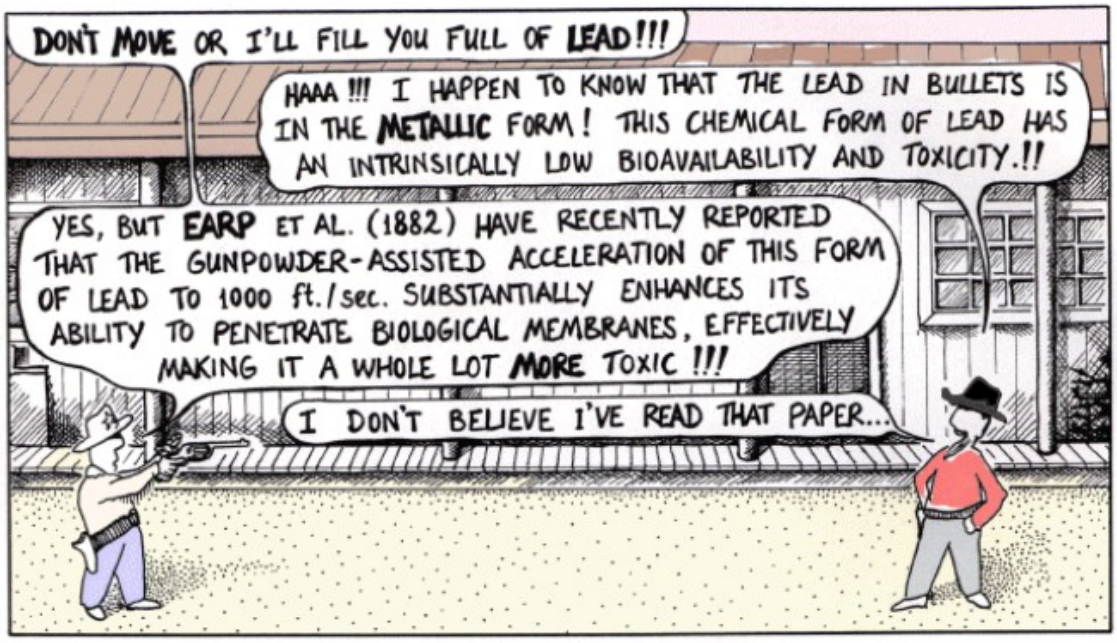
- Ao CENPES/Petrobras pelo fomento, fornecimento dos solos e do óleo e pela disponibilização de sua estrutura laboratorial para as análises de TPH, em especial à Dra. Adriana Soriano e Luiz Fernando.

- Ao Dr. Paulo Barrocas e à técnica Ana Paula do Laboratório de Micropoluentes Ambientais do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da ENSP/Fiocruz, pelo apoio analítico.

- À Escola de Química e à UFRJ e todos os seus docentes por contribuírem em mais uma etapa da minha formação.

- A CAPES, pela minha bolsa de mestrado.

- A Deus, que está do meu lado em todos os momentos.



ENVIRONMENTAL SCIENTISTS IN THE WILD WEST

copyright Nick Kim
http://strangematter.sci.waikato.ac.nz/

RESUMO

TELHADO, Maria Clara Siqueira Campos Lisboa**. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo contaminado.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

A biodisponibilidade de contaminantes orgânicos em solo, do ponto de vista de processos, pode ser definida como interações físicas, químicas e biológicas que determinam a exposição de seres vivos a substâncias em solos e sedimentos. No presente trabalho, investigou-se se a extração química com Hidroxipropil – Beta - Ciclodextrina (HPCD–ß) poderia prever a biodisponibilidade de petróleo em um solo submetido a um processo de Atenuação Natural Monitorada (ANM), em três diferentes concentrações (0,5%; 2,5% e 5% m/m) de contaminação. Para isto, foram montados dois sistemas experimentais (um biótico e um abiótico), que foram expostos a intempéries por um período de 180 dias. Durante este tempo, foi realizado o monitoramento através de análises microbiológicas (concentração de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo), e do teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) por infravermelho.

Em relação às análises microbiológicas, observou-se que não houve variação significativa na população de microrganismos heterotróficos totais, já que para todas as concentrações de óleo testadas, a densidade microbiana ficou em torno de 10^7 UFC/g solo. O mesmo não aconteceu com a população de microrganismos degradadores, onde ocorreu significativa variação, especialmente a partir dos 90 dias de experimento. Verificou-se que esta variação está associada, principalmente, à remoção dos HTP e à pluviosidade. Ademais, a remoção biológica foi o processo predominante na ANM do sistema biótico, com exceção do solo contaminado a 2,5%, onde as perdas abióticas foram próximas aos valores de degradação biológica.

Após o teste de extração com diferentes concentrações da solução de HPCD–ß, concluiu-se que a fração biodisponível prevista seria de aproximadamente 18,3% dos HTP no solo contaminado a 0,5%, 19,2% dos HTP no solo contaminado a 2,5% e 35,0% dos HTP no solo contaminado a 5%, em relação ao método convencional de extração dos HTP com n – hexano no ultrassom.

Em comparação com os dados de biodegradação no sistema experimentais, observou-se que os valores de remoção biológica por ANM (49,3% dos HTP no solo contaminado a 0,5%, 42,6% no solo contaminado a 2,5% e 51,3% no solo contaminado a 5%) após 180 dias, foram superiores aos previstos pela extração com HPCD–ß nos três teores de óleo cru adotados. Portanto, a extração com HPCD–ß parece não ter sido capaz de prever, nas condições experimentais realizadas, os hidrocarbonetos totais do petróleo biodisponíveis no solo contaminado. Os microrganismos endógenos desse solo se mostraram capazes de remover, eficientemente, uma grande parte do óleo presente no solo, mostrando que a ANM é uma técnica eficaz para remediação deste solo e óleo.

Paralelamente, foi observado o desenvolvimento de oito tipos diferentes de plantas daninhas no sistema biótico. Destaca-se o crescimento de duas que cresceram nos três teores de óleo adotados: a planta da subfamília *Papilionoideae*, que cresceu em solos com uma concentração relativamente alta do poluente; e *Heliotropium indicatum*, que se desenvolveu quando os teores de óleo estavam abaixo de 1%, indicando, possivelmente boa qualidade do

solo. Adicionalmente, identificou-se por análise de DNA, espécies de actinomicetos possivelmente envolvidos na degradação do petróleo nesse mesmo sistema.

ABSTRACT

TELHADO, Maria Clara Siqueira Campos Lisboa**. Evaluation of the bioavailability of an organic contaminant in contaminated soil.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertation (Master in Sciences) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

Bioavailability of organic contaminants in soils, around the process perspective, can be defined as physical, chemical and biological interactions that determinate exposure of organisms to chemicals in soils and sediments. The present work investigated if the Hidroxypropyl –Beta – Cyclodextryn (HPCD-ß) extraction could predict the bioavailability of petroleum in a soil submitted to Natural Monitored Attenuation (NMA), in three different oil concentrations (0,5%; 2,5% e 5% w/w). Two experimental systems were built (one biotic and another abiotic) and exposed to intemperies for 180 days. During that time, microbiology analyses (densities of general heterotrophic and hydrocarbon degrader bacteria) and total hydrocarbon determination by infrared were performed for monitoring.

The microbiology analyses showed that there wasn´t significant variation in the density of general heterotrophic bacteria, since for all oil concentrations tested, the density were about 10^7 CFU/g soil. The same didn´t happen with the hydrocarbon degrader bacteria, which a significant variation occurred, especially after 90 days of experiment. This variation is mainly associated to the rain and total petroleum hydrocarbons (TPH) remove. Moreover, the biological degradation was the dominant process in the NMA of the biotic system, with exception of the soil contaminated with 2,5%, where the abiotic losses were close to the biodegradation levels.

After the test with different HPCD-ß concentrations solution, we could conclude that the bioavailability fraction would be 18,3% of the TPH in soil contaminated to 0,5% of oil, 19,2% of the TPH in soil contaminated to 2,5% and 35,0% of the TPH in soil contaminated to 5% in respect to the conventional exhaustive TPH extraction method in ultrasound sonication.

In comparison with biodegradation data in the experimental systems, the biological remove by NMA (49,3% of the TPH in soil contaminated to 0,5%, 42,6% in soil contaminated to 2,5% and 51,3% in soil contaminated to 5%) after 180 days were higher than those predicted by HPCD-ß extraction in the three oil concentrations. Therefore, the HPCD-ß extraction not seems to be able to predict the TPH bioavailable fraction in a contaminated soil in the experimental conditions performed. It´s seems that the endogens microorganisms of this soil can be effective in the removal of a great part of the oil in the soil, showing that NMA is an efficient strategy to remediate this contaminated soil.

In parallel, the development of eight different types of harmful plants was observed in the biotic system. The development of two plants that had grown in the three oil content adopted can be detached: the plant of the subfamily *Papilionoideae*, which grew in soil with relative high content of the pollutant and *Heliotropium indicatum* that grew when the oil concentration in soil was below 1%, indicating, possibly, good soil quality. Additionally, actinomicetes species possibly involved in soil bioremediation were identified by DNA analyses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmula estrutural e nomenclatura de alguns HPA´s. Fonte: MELO, 2006. 8

Figura 2: Rompimento de oleoduto em condomínio em Barueri, 2001. 10

Figura 3: Triângulo das classes texturais, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo para classificação das classes texturais do solo (EMBRAPA, 1999). 14

Figura 4: Cromatogramas (CG-DIC) representativos de amostras de solo contendo 5% de óleo retiradas de um experimento de ANM nos tempos de 0 e 12 meses. Fonte: RIZZO, 2008. 21

Figura 5: Resumo das interações entre as moléculas do contaminante e o solo. 30

Figura 6: Representação esquemática da Hidroxipropil-ciclodextrina.(n=1 corresponde a HPCD - a; n=2 a HPCD–ß e n= 3 a HPCD-γ). Fonte: SIKORSKI E WILKINSON, 2004. 38

Figura 7: Visão estereoscópica de um dímero de HPCD–ß com moléculas hospedeiras dentro da cavidade. As setas vermelhas apontam as moléculas hospedeiras. Fonte: FAN *et al*., 2007. 39

Figura 8: Detalhe da coleta do solo. 41

Figura 9: Esquema representativo da homogeneização e quarteamento do solo. 42

Figura 10: Representação das caixas utilizadas para o experimento de atenuação natural. Acima, a caixa contendo o solo contaminado, com as camadas de brita e areia. Abaixo, encontra-se a caixa coletora. 45

Figura 11: Montagem do sistema 1. 46

Figura 12: Caixas do sistema 1 contendo solo e suas respectivas concentrações de óleo cru. 46

Figura 13: Modelo idealizado da caixa do sistema sujeito a intempéries. 48

Figura 14: Imagens do Sistema 1 pronto nas dependências da Usina Piloto do CETEM. 49

Figura 15: Sistema 2 pronto nas dependências da Usina Piloto do CETEM. 49

Figura 16: Equipamento Infracal, modelo HART -T da Wilks Enterprise. 53

Figura 17: Comparação entre a cultura de microrganismos degradadores de óleo no solo contaminado a 0,5%, no qual houve crescimento diferencial em forma de grumos (A) e em solo não contaminado, no qual não houve crescimento (B). 60

Figura 18: Gráfico relativo à quantificação dos microrganismos heterotróficos totais no Sistema 1 ao longo do tempo. 65

Figura 19: Gráfico relativo à quantificação dos microrganismos degradadores de óleo no sistema 1 ao longo do tempo. 65

Figura 20: Gráfico relativo à concentração dos HTP (remoção total) no sistema 1 ao longo do tempo. 67

Figura 21: Gráfico relativo à concentração dos HTP (remoção total) no Sistema 2 ao longo do tempo. 67

Figura 22: Gráfico indicando a pluviosidade ao longo do tempo (meses) na estação "Ilha do Governador – RJ" da Geo - Rio. Fonte: http://www2.rio.rj.gov.br/georio/site/alerta/download.htm . 68

Figura 23: Imagem de uma caixa colhetora do Sistema 2, após um período de chuvas. 73

Figura 24: Gráfico indicando o percentual de HTP extraídos pela solução de HPCD- ß em diferentes concentrações. 78

Figura 25: Funcionários fazendo a coleta do solo em Sergipe. 84

Figura 26: Presença de plantas daninhas no local de retirada do solo. 84

Figura 27: Fotos do Sistema 1 nos meses de Junho, Outubro e Dezembro de 2008 e os respectivos desenvolvimentos das plantas. 85

Figura 28: Fotos da espécie da subfamília Papilionoideae, no Sistema 1. A primeira imagem, à esquerda, mostra o caule com as folhas; a segunda imagem, à direita, mostra o detalhe da flor. 87

Figura 29: Fotos da espécie *Heliotropium indicatum* no Sistema 1. 88

Figura 30: Fotos da espécie *Jatropha curcas* no Sistema 1. A primeira imagem, à esquerda, mostra o caule com as folhas; a segunda imagem, à direita, mostra o detalhe da flor. 89

Figura 31: Fotos da espécie *Leucaena* sp no Sistema 1. A primeira imagem, à esquerda, mostra o caule com as folhas; a segunda imagem, à direita, mostra o detalhe da flor. 90

Figura 32: Fotos da espécie *de Gramineae* no Sistema 1. 90

LISTA DE DIAGRAMA

Diagrama 1: Fluxograma das etapas de extração com a HPCD- ß 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reservas totais de Petróleo, por localização (terra e mar), segundo Unidades da Federação. Fonte: ANEEL, 2008 6

Tabela 2: Valores referenciais e orientadores para solo na Holanda e Estado de São Paulo, respectivamente 11

Tabela 3: Caracterização do solo (adaptado de RIZZO, 2008) 43

Tabela 4: Percentual de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos – SARA (%) no óleo cru. 43

Tabela 5: Cronograma das coletas. 50

Tabela 6: Composição do meio orgânico. 51

Tabela 7: Composição do meio mineral líquido. 52

Tabela 8: Quantificação dos HTP e HPA´s nos solos contaminados a 0,5%, 2,5% e 5% com óleo cru. 62

Tabela 9: Comparação entre o valor teórico de óleo contaminado no solo com os resultados das análises por diferentes métodos analíticos. 63

Tabela 10: Remoção dos HTP dos solos contaminados do Sistema 1 após 180 dias. 70

Tabela 11: Dados da extração exaustiva pelo método convencional com n-hexano no ultrassom (concentração total), no tempo inicial experimental (t=0), para cálculo da fração biodisponível prevista pela HPCD–ß. 76

Tabela 12: Dados da fração residual quantificada pelo método convencional com n-hexano no ultrassom após o uso da HPCD- ß, no tempo inicial experimental (t=0), para cálculo da fração biodisponível prevista pela HPCD–ß. 76

Tabela 13: Fração biodisponível prevista pela HPCD-ß. (%) calculada pela diferença entre os dados das Tabelas 11 e 12. 77

Tabela 14: Comparação entre os valores de remoção biológica observada no sistema de ANM (%) a fração biodisponível prevista pela HPCD–ß. 79

Tabela 15: Espécies vegetais identificadas ao longo do processo de ANM no Sistema 1. 86

Tabela 16: Ocorrência das duas espécies dominantes ao longo da ANM no sistema 1, correlacionando o teor de óleo presente no momento do desenvolvimento das mesmas.

87
93

Tabela 17: Identificação dos microrganismos isolados a partir do Sistema 1 durante o experimento de ANM na cultura de micro- organismos degradadores de petróleo.

Tabela 18: Valores obtidos pela quantificação dos microrganismos degradadores de óleo cru e heterotróficos totais e seus respectivos desvios padrão. 1115

LISTA DE SIGLAS

ASE	*Acelerated Solvent Extraction*
ANM	Atenuação Natural Monitorada
BTA	Gerência de Biotecnologia e Tratamentos Ambientais
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CENPES	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama
CPMA	Coordenação de Processos Metalúrgicos Ambientais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELL	Extração Líquido – Líquido
Geo-Rio	Fundação Instituto de Geotécnica do Município do Rio de Janeiro
HPA´s	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPCD–ß	Hidroxipropil–Beta–Ciclodextrina
HTP	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
MO	Matéria Orgânica
NMP	Número Mais Provável
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RJ	Rio de Janeiro
SARA	Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USEPA	Agência Americana de Proteção Ambiental

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA** 1

2 **OBJETIVO** 4

3 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 5

3.1 **O petróleo e os impactos ambientais associados** 5

3.2 **Solo** 13

3.2.1 Características Gerais 13

3.2.2 Propriedades Físicas 14

3.2.3 Poluição do solo por contaminantes orgânicos 15

3.2.4 Microrganismos do solo e seu papel na degradação de poluentes orgânicos 18

3.3 **Processos biológicos aplicados na remediação de solos contaminados com petróleo** 22

3.3.1 Atenuação Natural Monitorada 24

3.4 **Biodisponibilidade** 27

3.4.1 Fatores que afetam a biodisponibilidade 30

3.5 **Metodologias utilizadas para prever a biodisponibilidade** 35

3.5.1 Extração com solventes orgânicos 35

3.5.2 Oxidação Química 36

3.5.3 Extração em fase sólida 36

3.5.4 Extração com ciclodextrinas 37

4. **METODOLOGIA** 41

4.1 **Solo** 41

4.1.1 Caracterização do solo empregado 42

4.2 **Óleo** 43

4.3 **Montagem do sistema experimental para simulação do processo de atenuação natural** 44

4.3.1 Sistema 1 44

4.3.2 Sistema 2 47

4.3.3 Disposição e coleta das amostras 48

4.4 **Metodologias para o monitoramento do processo de ANM** 50

4.4.1 Análises Microbiológicas 50

4.4.1.1 *Quantificação de microrganismos heterotróficos totais* 51

4.4.1.2 *Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru (hidrocarbonoclásticos)* 51

4.4.2 Análise da concentração de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo 52

4.5 **Estabelecimento da metodologia de extração química para avaliação da fração biodisponível das amostras de solo** 54

4.6 **Ensaios complementares** 57

4.6.1 Identificação de Vegetais 57

4.6.2 Isolamento e identificação de microrganismos 58

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61

5.1 **Caracterização do óleo e solo empregados** 61

5.2 **Monitoramento do processo de ANM** 64

5.2.1 Ensaios microbiológicos 64

5.2.2 Análise dos HTP nos sistemas 66

5.3 **Avaliação da fração biodisponível com HPCD- ß** 75

5.4 **Ensaios complementares** 83

5.4.1 Crescimento de plantas no Sistema 1 83

5.4.2 Identificação de microrganismos isolados do solo no Sistema 1 92

6 **CONCLUSÕES** 95

7 **SUGESTÕES** 99

8 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 100

ANEXO 111

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A descoberta de um campo de petróleo tem poder para mudar as características socioeconômicas de uma região. No entanto, tão acentuado quanto os efeitos sócio-econômicos é o impacto ambiental. Em terra, a exploração, prospecção e produção podem provocar alterações no lençol freático e degradação do solo.

O destino de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) no meio ambiente é objeto de interesse devido ao seu potencial de transporte a longas distâncias, persistência, bioacumulação e toxicidade (DOICK *et al*, 2005). Entretanto, por causa de fatores como características do solo, propriedades do composto, temperatura e pressão, os contaminantes podem estar mais ou menos disponíveis aos organismos (CHAPMAN, 2007).

Tradicionalmente, as técnicas de extração de contaminantes em solos e sedimentos determinam as concentrações "totais" de contaminantes orgânicos através da aplicação de solventes orgânicos (n-hexano, diclorometano) e sistemas como Soxhlet, Ultrassom e ASE (Acelerated Solvent Extraction; DIONEX).

Tendo em vista os conhecimentos relativos à disponibilidade de poluentes orgânicos no solo, esses métodos exaustivos podem ter pouca relevância para estimar a quantidade de contaminantes que estejam realmente disponíveis para a biodegradação, ou seja, a fração biodisponível.

Atualmente, a avaliação de risco ambiental de poluentes é baseada na quantidade total da substância química presente no solo, ar ou água. Todavia, ela não é necessariamente indicativa de quanto está disponível para organismos (DEAN e SCOTT, 2004), podendo estar sendo estimada em excesso. Como conseqüência, as abordagens para avaliar os riscos podem escolher áreas em que a necessidade de remediação é pequena ou negligenciar áreas em que o

risco é maior. Em razão disso, autores têm destacado que o estudo da biodisponibilidade deve ser levado em conta na avaliação do risco de um contaminante (ALEXANDER, 2000; SEMPLE *et al.*, 2006).

Entender a biodisponibilidade em um sítio contaminado é essencial para determinar a eficácia de um tratamento de biorremediação. Quando um solo contaminado é submetido à biorremediação, a depleção do contaminante normalmente exibe uma taxa de degradação inicialmente rápida, que decresce ao longo do tempo de tratamento. Este efeito tem sido atribuído, dentre outros fatores, à diminuição da biodisponibilidade (SABATÉ *et al*, 2006). No final do processo, técnicas de extração exaustivas mostram muitas vezes que uma concentração residual do contaminante ainda permanece no solo. Desse modo, o tratamento pode ser considerado ineficiente, pois a concentração do contaminante permanece acima do limite legal. Por outro lado, ela pode representar uma fração não biodisponível, que é difícil de ser eliminada por biodegradação e pode oferecer menor risco ambiental (ALEXANDER, 2000).

O principal objetivo da avaliação da biodisponibilidade é prever quanto do contaminante está acessível à microbiota do solo para ser degradado, e conseqüentemente até onde uma área contaminada pode ser biorremediada. Essa avaliação pode ser realizada pela exposição direta de organismos como minhocas, plantas e bactérias à amostra num dado tempo, com a subsequente determinação da absorção ou degradação do contaminante (FENG *et al*, 2000; CHOJNACKA *et al*, 2005; UDOVIC e LESTAN, 2007). Contudo, um procedimento de extração química que prevê rapidamente a disponibilidade microbiana no solo é extremamente útil num contexto cientifico e regulatório para análise de risco. Isto

porque geralmente a avaliação biológica da disponibilidade é lenta, requer pessoal especializado e tem alto custo.

Processos de extração menos exaustivos têm sido desenvolvidos no intuito de acessar essa fração biodisponível, como a aplicação da técnica de extração baseada na utilização da Hidroxipropil–Beta–Ciclodextrina (HPCD–ß). O arranjo estrutural das moléculas de glicose nas ciclodextrinas possibilita sua utilização como hospedeiras na formação de complexos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a "dissolução" em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade. Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de ciclodextrinas para prever a biodisponibilidade dos contaminantes orgânicos em processos de biorremediação (REID *et al*, 2000; CUYPERS *et al*, 2002; SABATÉ *et al*, 2006; DIPLOCK *et al.*; 2009).

2 **OBJETIVO:**

O objetivo geral do presente trabalho de dissertação de mestrado foi investigar a biodisponibilidade de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP) através de um método de extração química com Hidroxipropril–Beta–Ciclodextrina (HPCD-ß).

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar um extratante químico que possa ser utilizado para estimativa da fração biodisponível do contaminante orgânico;
- Definir a melhor concentração da HPCD–ß para a extração da fração de petróleo teoricamente biodisponível para o solo;
- Investigar o efeito da atenuação natural monitorada na biodisponibilidade dos HTP, comparando com a fração biodisponível prevista pela HPCD–ß;
- Verificar se a extração com HPCD–ß pode ser utilizada para estimar a biodisponibilidade dos HTP, comparando-a com um método de extração exaustivo que utiliza o n-hexano como solvente e o ultrassom.

3 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

3.1 **O petróleo e os impactos ambientais associados**

Explorado comercialmente desde meados do século 19, o petróleo foi usado, por muitas décadas, para a iluminação e, em menor escala, como lubrificante (CRAPEZ *et al.*, 2002). Ademais, a invenção do motor de combustão interna e sua adoção rápida em todas as formas de transporte, fizeram com que o emprego desse recurso natural fosse ampliado. Consequentemente, a produção, o transporte, a estocagem e a distribuição tanto do óleo cru, quanto de seus derivados, aumentaram, tornando-se uma das mais importantes fontes de energia da atualidade.

O petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Possui, em termos de abundância, entre 10000 e 100000 constituintes quimicamente isolados (MARSHALL & RODGERS, 2003) e sua composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físico – químicas e biológicas que o originaram.

Desde sua criação, a Petrobras já descobriu petróleo nos Estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina. Dentre os campos de exploração em terra, destacam-se os Estados de Rio Grande do Norte e Sergipe, como mostra a Tabela 1. Estima-se que as

reservas totais de Petróleo em terra, nestes Estados, são em torno de 264,6 e 231,8 milhões de barris, respectivamente, no ano de 2007 (ANEEL, 2008).

Tabela 1: Reservas totais de Petróleo, por localização (terra e mar), segundo Unidades da Federação.

Unidades da Federação	Localização	Reserva Total de Petróleo (milhões barris) - 2007
AM	Terra	102,7
CE	Terra	8,4
	Mar	57,5
RN	Terra	264,6
	Mar	98,1
AL	Terra	8,7
	Mar	0,7
SE	Terra	231,8
	Mar	34,6
BA	Terra	216,1
	Mar	37,8
ES	Terra	54,1
	Mar	1277,1
RJ	Mar	10177,9
SP	Mar	27,6
PR	Mar	21,3
SC	Mar	4,8
TOTAL	Terra	886,5
	Mar	11737,5

Fonte: Atlas de energia elétrica do Brasil / Agência Nacional de Energia Elétrica.3. ed. – Brasília : Aneel, 2008.236 p. : il.

Dentre as classes de compostos que fazem parte do petróleo, podemos citar os hidrocarbonetos, compostos nitrogenados (piridinas, quinolinas, pirróis), oxigenados (fenóis, cresóis, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos), sulfurados (mercaptanas, gás sulfídrico, sulfetos alifáticos e cíclicos) e alguns metais (SPEIGHT, 2007).

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio. De acordo com sua estrutura, são classificados em saturados, insaturados e aromáticos. Os hidrocarbonetos saturados, também chamados de alcanos ou parafinas, são aqueles cujos

átomos de carbono são unidos somente por ligações simples, constituindo cadeias lineares, ramificadas ou cíclicas, interligadas ou não (THOMAS *et al*., 2001).

Os hidrocarbonetos insaturados, também denominados de olefinas, apresentam pelo menos uma dupla ou tripla ligação carbono – carbono, enquanto que os hidrocarbonetos aromáticos, também chamados de arenos, apresentam pelo menos um anel de benzeno na sua estrutura (THOMAS *et al*., 2001).

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA´s) são compostos constituídos, principalmente, de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e, das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há, atualmente, mais de 100 HPA´s reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). No entanto, poucos são considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica (JACQUES *et al.*, 2007). A Figura 1 apresenta alguns dos HPA´s comumente encontrados no Petróleo.

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura
Naftaleno		Fluoranteno	
1-metilnaftaleno		Pireno	
2-metilnaftaleno		Benzo(*a*)antraceno	
Bifenil		Criseno	
2,6-dimetilnaftaleno		Benzo(*b*)fluoranteno	
Acenaftileno		Benzo(*k*)fluoranteno	
Acenafteno		Benzo(*e*)pireno	
2,3,5-trimetilnaftaleno		Benzo(*a*)pireno	
Fluoreno		Perileno	
Fenantreno		Indeno[1,2,3-*cd*]pireno	
Antraceno		Dibenzo(*ah*)antraceno	
1-metil-fenantreno		Benzo(*ghi*)perileno	

Figura 1: Fórmula estrutural e nomenclatura de alguns HPA´s. Fonte: MELO, 2006.

O óleo cru, fração líquida do petróleo, é fisicamente, quimicamente e biologicamente perigoso porque ele contém muitos compostos tóxicos, dentre eles os HPA´s em concentrações relativamente altas. Os HPA´s são considerados a classe de carcinógenos humanos mais amplamente distribuída no ambiente (LI *et al.*, 2005), e uma das suas fontes é através da contaminação por petróleo. Seu metabolismo gera compostos epóxidos com propriedades mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele (IARC, 2002).

A contaminação de solo por óleo cru e seus derivados tem se tornado, inquestionavelmente, um problema mundial. Da fase de exploração, prospecção até a comercialização de seus derivados, alguns impactos ambientais podem ser identificados durante seu processamento (CORRÊA, 2003 apud RIZZO, 2008).

Ele pode ser liberado no solo como resultado de derramamentos acidentais, por exemplo, durante a perfuração dos poços, rupturas em dutos (Figura 2), rachaduras em tanques de estocagem ou deposição atmosférica de partículas de óleo resultantes de combustão parcial (WANG & BARTHA, 1990; DEUEL & HOLLIDAY, 1997).

Figura 2: Rompimento de oleoduto em condomínio em Barueri, 2001.[1]

Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre Petróleo e HPA´s está principalmente nos Estados Unidos, sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), e na União Européia, através da Comissão das Comunidades Européias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea (CETESB, 1999).

No Brasil, poucos estados possuem legislação relacionada à contaminação do solo e das águas subterrâneas por petróleo, tais quais São Paulo e Rio de Janeiro. No entanto, o Instituto Estadual do Ambiente (INEA), órgão ambiental estadual do Rio de Janeiro (RJ), adota os valores orientadores constantes da "Lista Holandesa", como base para estabelecer valores de qualidade do solo (Tabela 2)

[1] Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/dutos/aa_consequencias.asp. Acesso em 27 de julho de 2009.

Tabela 2: Valores referenciais e orientadores para solo na Holanda e Estado de São Paulo, respectivamente.

Legislação	**Lista Holandesa (CETESB, 1999)**						**Legislação do Estado de São Paulo (CETESB, 2005)**			
	Valores referenciais para solo, considerando-se um teor de argila e de matéria orgânica de 0%.			**Valores referenciais para solo, considerando-se um teor de argila de 25,0% e de matéria orgânica de 10,0%.**			**Valores orientadores para solo**			
	Concentração em peso seco (mg/kg)			**Concentração em peso seco (mg/kg)**			**Concentração em peso seco (mg/kg)**			
Parâmetro	**Referência**	**Alerta**	**Intervenção**	**Referência**	**Alerta**	**Intervenção**	**Prevenção**	**Intervenção - Agrícola**	**Intervenção - Residencial**	**Intervenção - Industrial**
Benzeno	0,01	0,11	0,20	0,05	0,53	1	0,03	0,06	0,08	0,15
Estireno	0,02	10	20	0,1	5,1	100	0,2	15	35	80
Etilbenzeno	0,01			0,05	25	50	6,2	35	40	95
Tolueno	0,01	13	26	0,05	65	130	0,14	30	30	75
Xilenos	0,01	4	8	0,05	12,5	25	0,13	25	30	70
Antraceno	-	-	-	-	-	-	0,039	-	-	-
Benzo(a) antraceno	-	-	-	-	-	-	0,025	9	20	65
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	-	-	-	-	0,57	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-	0,052	0,4	1,5	3,5
Criseno	-	-	-	-	-	-	8,1	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	-	-	-	-	-	0,08	0,15	0,6	1,3
Fenantreno	-	-	-	-	-	-	3,3	15	40	95
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	-	-	-	-	-	-	0,031	2	25	130
Naftaleno	-	-	-	-	-	-	0,12	30	60	90
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (soma 10)*	0,2	4,1	8	1	20,5	40	-	-	-	-
Hidrocarbonetos Totais de Petróleo	10	505	1000	50	2525	5000	-	-	-	-

*****Naftaleno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Benzo(ghi)perilene, Indenol(1,2,3cd)pireno.

Para avaliação de uma contaminação proveniente de um vazamento de petróleo, um dos parâmetros comumente usado são os Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP). Para este fim, diversas metodologias são empregadas, que diferem quanto à forma de extração do hidrocarboneto do solo, ao solvente de extração e à técnica de detecção instrumental utilizada (NASCIMENTO *et al*., 2008). Dentre elas, destacam-se cromatografia gasosa, imunoensaio, gravimetria e infravermelho.

Devido à existência de muitas substâncias químicas presentes no petróleo e seus derivados, não é prático medir cada uma dessas substâncias separadamente para efeito de monitoramento do progresso da remediação de uma área contaminada. Torna-se de maior utilidade medir a concentração total de hidrocarbonetos nessa área utilizando-se o parâmetro HTP (NASCIMENTO *et al*., 2008).

3.2 **Solo**

3.2.1 Características gerais

O conceito mais popular de solo vem a ser sinônimo de qualquer parte da superfície da Terra. Dependendo do seu uso, pode ser visto sob diversos aspectos: para geólogos, solo é tido como parte de uma sequência de eventos geológicos no chamado “ciclo geológico”; os ecólogos veem o solo como uma porção do ambiente condicionado por organismos vivos e que, por sua vez, influencia também esses organismos; e, finalmente, para os pedólogos, o solo é a coleção de corpos naturais dinâmicos, que contém matéria viva, e é resultante da ação do clima e da biosfera sobre a rocha, cuja transformação em solo se realiza durante certo tempo e é influenciada pelo tipo de relevo (LEPSCH, 2002).

Entre os recursos naturais de nosso planeta, os solos são de relevante importância, sobretudo porque a maior parte dos nossos alimentos, direta ou indiretamente, provém dos campos de cultivo e pastagem neles implantados (LEPSCH, 2002). Também muito nos importam porque sustentam campos, cerrados, florestas; recebem a água das chuvas que depois emerge nas nascentes e mananciais, atuando na manutenção do ciclo da água e dos nutrientes.

O solo é um meio complexo e heterogêneo, produto da alteração do remanejamento e da organização do material original. Exposto à atmosfera, sofre ação direta do calor do sol, da umidade das chuvas, e do crescimento de organismos, dando inicio a processos dos quais decorrem inúmeras modificações no aspecto físico e na composição química dos materiais. A

esse processo dá – se o nome de intemperismo ou meteorização, fenômeno responsável pela formação do material semiconsolidado que dará inicio à formação do solo (LEPSCH, 2002).

3.2.2 Propriedades físicas

A textura do solo é a distribuição por tamanho de partículas inorgânicas, designando a proporção relativa das frações argila, silte ou areia no solo, como mostra a Figura 3. A área da superfície de uma partícula de argila é de 100 a 10000 vezes maior do que uma de areia (DEUEL & HOLLIDAY, 1997).

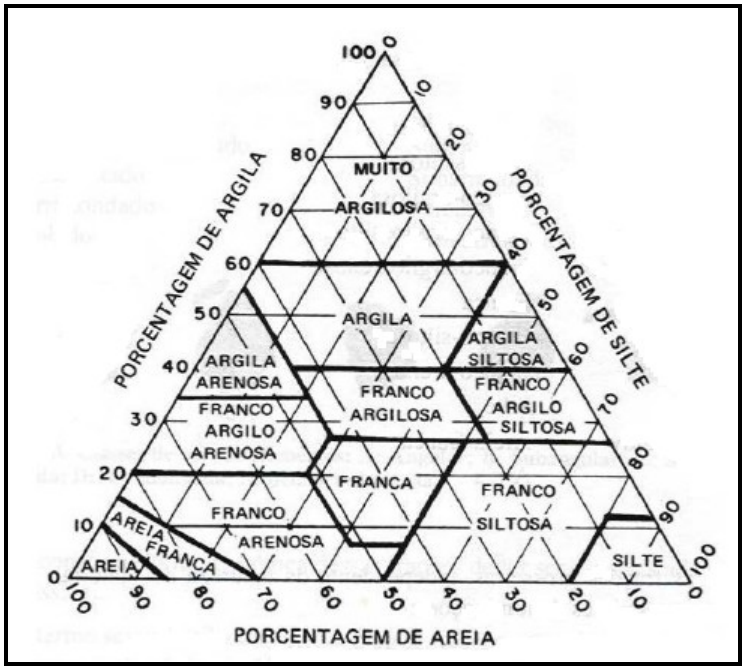


Figura 3: Triângulo das classes texturais, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo para classificação das classes texturais do solo (EMBRAPA, 1999).

A estrutura do solo é a forma na qual suas partículas se agrupam em formas estáveis ou agregados, podendo afetar a infiltração da água. Alguns constituintes do solo podem

aumentar a agregação, como microrganismos, matéria orgânica e percentual de argila (DEUEL & HOLLIDAY, 1997).

Outrossim, a composição dos solos pode ser variável, sendo normalmente dependente dos processos que levaram à sua formação. No entanto, de modo geral, costuma-se dizer que um solo constitui-se de: 20-30% de ar, 20-30% de água, 45% de minerais (areia, silte e argila) e 5% de matéria orgânica, composto por fases sólida, líquida e gasosa (RIZZO, 2008).

3.2.3 Poluição do solo por contaminantes orgânicos

A qualidade do solo, bem protegido pela Política Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 1981), apresenta uma profunda influência na saúde e produtividade de um ecossistema. O solo atua, constantemente, como um “filtro”, representando grandes reservatórios de poluentes no ambiente, tendo a capacidade de depuração e imobilizando grande parte das impurezas nele depositadas.

De acordo com a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental -CETESB (2001), uma área contaminada pode ser definida como área, local ou terreno onde há comprovadamente poluição ou contaminação, causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural.

Vários são os problemas gerados pelas áreas contaminadas. Seus principais exemplos são riscos à saúde pública e do meio ambiente, redução do valor imobiliário das propriedades

e restrições ao desenvolvimento urbano. Esses locais limitam, em resumo, os possíveis usos do solo (CETESB, 2001).

Frequentemente, a primeira preocupação associada à poluição do solo é que ela pode resultar no comprometimento das fontes de águas subterrâneas (lençol freático). A segunda preocupação é a exposição direta ao solo contaminado e ao vapor que se origina do sítio poluído, que pode representar risco de explosão, incêndio ou asfixiação.

Os mecanismos de transformação de contaminantes orgânicos no solo são muito complexos. O solo pode ser considerado como um sistema catalítico contendo uma mistura de componentes biológicos (enzimas, vírus, bactérias, fungos, algas, plantas e a fauna) e não biológicos (argila, óxidos, hidróxidos, matéria orgânica, componentes não – cristalinos). Muitos deles, de forma conjunta, estão envolvidos nos mesmos processos, e a importância relativa de cada um desses elementos individualmente no habitat natural é muito difícil de determinar (RUGGIERO *et al.*, 2002). Ademais, as transformações abióticas dos contaminantes, através de reações de fotólise, hidrólise e oxidação, são fortemente influenciadas por uma variedade de fatores ambientais (RUGGIERO *et al.*, 2002).

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POP´s), apesar de serem submetidos a diversos processos de perdas e reações, como volatilização, biodegradação, transformação, lixiviação, *run off* e erosão, podem permanecer nos solos. Sua persistência é consequência do tempo de contato do contaminante com a terra (ou, em inglês, "*aging*"), da formação de compostos recalcitrantes e da formação de resíduos difíceis de serem extraídos (ALEXANDER, 2000).

A ocorrência desse fenômeno é de considerável importância, visto que a toxicidade das moléculas sequestradas são diferentes daquelas dissolvidas ou fracamente adsorvidas (RIVAS, 2006). Tanto a perda quanto a persistência são influenciadas por fatores como composição do solo e textura, dos contaminantes, tempo e clima e diversidade biológica

(DOICK *et al*., 2005). Além disso, estudos têm mostrado que as interações solo – compostos são influenciadas pela quantidade e natureza da matéria orgânica, biota local e concentração da substância (REID *et al.*, 2000). Por essa razão, a legislação holandesa para compostos contaminados faz o uso de valores específicos para cada tipo de solo (Tabela 2).

Ademais, aspectos geomorfológicos são importantes fatores que podem ampliar o impacto ambiental. Hidrocarbonetos, quando derramados na superfície do solo, penetram a diversas profundidades, dependendo do tipo de solo. Decerto, solos mais permeáveis, como os arenosos, propiciam a percolação de líquidos, favorecendo a contaminação do aquífero freático [2]. Por outro lado, nos solos argilosos, o óleo não penetra tão intensamente, devido à afinidade por argila (DEUEL & HOLLIDAY, 1997).

Como resultado, a toxicidade de um poluente orgânico irá depender das características do solo no qual ele foi disposto. Em geral, quanto maior a Capacidade de Troca Catiônica (devido a grandes quantidades de matéria orgânica ou conteúdo argiloso), maior a adsorção do poluente e menor o seu efeito tóxico no ecossistema (LABUD *et al.*, 2007).

Os mecanismos de retenção para compostos orgânicos são absorção, partição, adsorção e, principalmente, sorção. Esta é responsável pelo "aprisionamento" dos contaminantes, removendo-os do estado dissolvido. Por conseqüência, se os compostos encontram-se fortemente sorvidos, eles podem se apresentar indisponíveis aos microrganismos, limitando assim a sua biodegradação (ALEXANDER, 2000).

A sorção de compostos hidrofóbicos orgânicos em solos tem sido amplamente investigada por diversos autores (WALTER *et al*., 2000; HWUANG & CUTRIGHT, 2004; RIVAS, 2006). Em relação aos HPA´s, segundo Rivas (2006), os parâmetros que mais

[2] Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/artigos/artigos/aspectos.pdf, acesso em 27 de julho de 2009.

influenciam sua sorção são as diferentes solubilidades dos diferentes HPA´s, além da temperatura, salinidade ou a presença de matéria orgânica dissolvida no solo.

Contaminantes orgânicos podem ser retidos em diferentes componentes da porção sólida da superfície terrestre. Compostos orgânicos não polares são normalmente retidos em material húmico ou partículas de ferrugem (NRC, 2003); compostos orgânicos polares e ionizáveis, em contraste, podem associar-se através de interação com sítios reativos nos componentes minerais (SPOSITO, 1989; SCHWARZENBACH *et al*., 1993).

No caso de contaminantes orgânicos, existem, ainda, dois tipos de processos gerais que afetam a retenção: processos difusionais ou reacionais da substância orgânica e processos diagenéticos que modificam as propriedades do solo (NRC, 2003).

3.2.4 Microrganismos do solo e seu papel na degradação de poluentes orgânicos

A microbiota edáfica, que inclui representantes de todos os grupos de microrganismos, apresenta alta diversidade metabólica e fisiológica, o que os torna extremamente versáteis para ocupação de diversos nichos ecológicos. Outrossim, a presença de um microrganismo específico em determinado solo é função das condições ambientais dominantes e dos limites de sua bagagem genética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

A abundância, composição e diversidade dos organismos do solo são fortemente dependentes da profundidade do solo (HANSEL *et al*., 2008). Ademais, mudanças na estrutura das comunidades microbianas estão atribuídas às respostas dos seres vivos às condições químicas e físicas, como pH, tamanho da partícula, matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes e oxigênio (HANSEL *et al*., 2008).

Acima de tudo, a dimensão do dano causado por uma contaminação depende da vulnerabilidade do solo e sua capacidade de recuperação (resiliência). A resiliência de um solo é definida pela habilidade do ecossistema de retornar ao equilíbrio dinâmico após o distúrbio (BLUM, 1997 apud FRANCO *et al*., 2004). A atividade microbiana é essencial nos ciclos biogeoquímicos e, portanto, qualquer efeito que a poluição exercer na microbiota do solo, também afetará o desenvolvimento dos vegetais, a funcionalidade do ecossistema e sua produtividade (FRANCO *et al*., 2004; LABUD *et al*., 2007).

Segundo Melloni (2007), os microrganismos apresentam grande potencial de utilização em estudos de qualidade do solo por apresentar as seguintes características:

a) alta sensibilidade a perturbações antropogênicas (PANKHURST *et al*., 1997; LABUD *et al*., 2007);

b) correlações com diversas funções benéficas do solo, incluindo armazenamento e disponibilidade de água, decomposição de resíduos orgânicos, transformação e ciclagem de nutrientes, biorremediação, controle de fitopatógenos e outros (RISER – ROBERTS, 1998);

c) papel direto em muitos processos do ecossistema, incluindo conversão de nutrientes em formas disponíveis às plantas, supressão de organismos nocivos, formação da estrutura do solo e papel indireto em processos como infiltração de água (ZHANG, 2006);

A biodegradação é o fenômeno pelo qual os compostos orgânicos são degradados biologicamente, através de reações em cadeia do tipo oxidação, redução, hidrólise, desalogenação, desalquilação, ruptura de anéis e condensação. Por intermédio dessas reações, essas substâncias perigosas podem ser mineralizadas a CO_2 e H_2O, transformadas em outros compostos menos tóxicos ou, às vezes, com maior toxicidade do que o inicial (ZAGATTO *et al*., 2006).

O petróleo é, provavelmente, a mistura de compostos orgânicos mais complexos que ocorre na Terra. Desse modo, óleos crus de origens distintas possuem diferentes suscetibilidades a degradação pelos organismos (HEAD *et al*., 2006). Em geral, a biodegradação do petróleo é um processo sequencial, com os n-alcanos sendo os primeiros hidrocarbonetos a serem removidos, seguidos por iso-alcanos, cicloalcanos, aromáticos com 1-3 anéis, poliaromáticos, asfaltenos e resinas (GREENWOOD *et al*., 2008). No entanto, preferências metabólicas podem mudar dependendo do habitat (GREENWOOD *et al*., 2008).

A Figura 4 exibe o perfil dos componentes do óleo no tempo inicial e, após 12 meses, submetido a processo de Atenuação Natural Monitorada (ANM). Como pode ser observado, apenas os compostos orgânicos de maior massa molecular permanecem no solo ao final dos 12 meses de ensaio.

Bactérias degradadoras de petróleo foram isoladas, pela primeira vez, há um século aproximadamente (SÖHNGEN, 1913 apud HEAD *et al*., 2006). Atualmente, estudos listam 79 gêneros de bactérias que usam hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, assim como 9 gêneros de cianobactérias, 103 de fungos e 14 de algas que são conhecidos por degradar ou transformar hidrocarbonetos (HEAD *et al*., 2006).

Organismos degradadores de hidrocarbonetos estão presentes na maior parte dos solos (CANET *et al*., 2001; GREENWOOD *et al*., 2009). Geralmente, os solos contêm quantidade e diversidade suficientes de organismos para degradarem hidrocarbonetos derivados de petróleo sob condições controladas (DEUEL & HOLLIDAY, 1997).

Adicionalmente, solos recentemente contaminados respondem mais rapidamente à presença de contaminantes (ALEXANDER, 2000). Em conformidade, estudos têm demonstrado que o sequestro de HPA´s no solo é inversamente relacionado com a taxa inicial de degradação de HPA´s por microrganismos (MUELLER & SHANN, 2006).

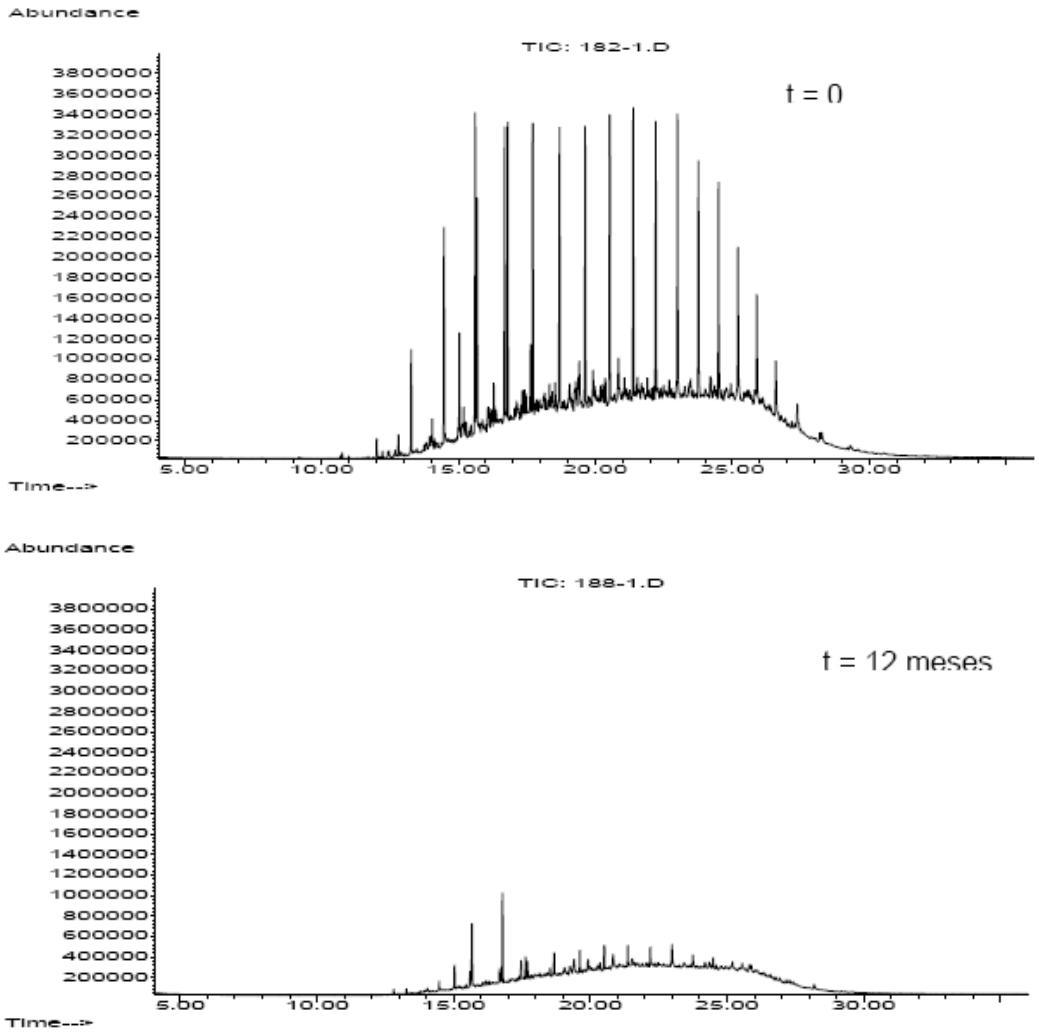


Figura 4: Cromatogramas (CG-DIC) representativos de amostras de solo contendo 5% de óleo retiradas de um experimento de ANM nos tempos de 0 e 12 meses. Fonte: RIZZO, 2008.

Segundo Hamamura e colaboradores (2006), os fatores predominantes que influenciam a estrutura da comunidade microbiana após uma contaminação, são: tipo da mistura de contaminantes, tipo de solo e tempo. Desse modo, os microrganismos podem não degradar o poluente no contato inicial, mas fazê-lo após uma exposição prolongada devido a mutações ou adaptações das populações.

Em conformidade, em solos contaminados com HPA´s, tem sido demonstrado que não existem vantagens em se adicionar bactérias metabolicamente competentes no solo para facilitar a degradação (bioaumento), obtendo – se o mesmo resultado quando se utiliza os microrganismos do próprio solo (ALLARD *et al*., 2000).

Nos últimos anos, por conseguinte, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que, comparativamente às culturas puras, têm se mostrado muito efetivos na degradação dessas substâncias (JACQUES *et al*., 2007). Estes consórcios podem apresentar maior capacidade de utilização em locais com misturas de contaminantes, devido à complementaridade metabólica entre os membros do consórcio (JACQUES *et al*., 2007).

3.3 **Processos biológicos aplicados na remediação de solos contaminados com petróleo**

Com o aumento do uso do petróleo e seus derivados e, conseqüentemente, os impactos ambientais gerados, observa-se um aumento na utilização de bioprocessos para reverter esses passivos.

A biorremediação é um bioprocesso que utiliza microrganismos para remediar contaminantes, através de mecanismos de biodegradação naturais (biorremediação intrínseca ou atenuação natural) ou pelo aumento da biodegradação natural por adição de microrganismos (bioaumento), nutrientes, água, doadores e aceptores de elétrons (bioestímulo).

Sua eficácia é testada, em laboratório, pela determinação da biomassa da população bacteriana (total e hidrocarbonoclástica), pelo isolamento e a manutenção de consórcios das bactérias que fazem a biodegradação, pela medição da taxa de respiração (consumo de

oxigênio e/ou produção de gás carbônico), quantificação da atividade de enzimas ligadas à degradação do óleo e determinação das taxas de degradação do poluente (CRAPEZ *et al*., 2002).

Desempenhada *ex situ* ou *in situ*, a biorremediação é capaz de degradar compostos orgânicos em substâncias menos tóxicas, como dióxido de carbono (CO_2) e metano através de mecanismos aeróbios ou anaeróbios.

Dentre as tecnologias de biorremediação *ex situ*, as biopilhas ou biocélulas envolvem o empilhamento de solos contaminados, o qual simula a atividade microbiana aeróbia acelerando a degradação do poluente pela aeração, adição de nutrientes e correção de umidade. As biopilhas são similares à “landfarming”, visto que ambas são realizadas na superfície terrestre e usam oxigênio, geralmente do ar, para estimular o crescimento e reprodução de bactérias que degradam os constituintes do petróleo. Por outro lado, o “landfarming" consiste na aplicação de resíduos perigosos na superfície do solo, na qual encontra - se uma maior atividade microbiana, dispostos em células de tratamento de grandes dimensões que sofrem revolvimento e aeração (USEPA, 2000). Ademais, existe uma infinidade de tipos e configurações de biorreatores que podem ser utilizados para biorremediação, cujas condições ambientais no seu interior (pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, aeração) são otimizadas para o máximo crescimento microbiano e degradação (RIZZO, 2008).

Das técnicas *in situ*, “biosparging”, por exemplo, injeta oxigênio e/ou nutrientes na zona saturada para aumentar a atividade biológica de microrganismos endógenos do solo, de forma a reduzir a concentração do óleo dissolvida em águas subterrâneas. Já a técnica “bioventing” baseia-se na introdução de ar na zona insaturada do solo. Outra tecnologia é a fitorremediação, em que as plantas representam o principal mecanismo da biorremediação,

seja através da degradação do poluente no interior da planta (fitotransformação), seja através da estimulação da biodegradação microbiana mediante exsudatos radiculares (ANDRADE *et al*., 2007).

Adicionalmente, outra metodologia, baseada em processos naturais biológicos, químicos e físicos, é a Atenuação Natural Monitorada (ANM). Ela ocorre sem intervenção humana, de forma que a biodegradação ocorre devido à adaptação natural da microbiota nativa do solo à presença do contaminante. Essa estratégia de remediação, a ser estudada durante o desenvolvimento da presente dissertação, será abordada detalhadamente a seguir.

3.3.1 Atenuação Natural Monitorada

Segundo a agência ambiental norte-americana – USEPA - o termo "Atenuação Natural Monitorada" (ANM) refere-se ao uso dos processos de atenuação natural que ocorrem naturalmente no solo, dentro de um contexto de remediação monitorada e controlada de um sítio, em um período de tempo razoável, com objetivo de reduzir a concentração e toxicidade de contaminantes até níveis adequados à proteção da saúde humana e ao meio ambiente (USEPA, 1999).

Este processo *in situ* inclui biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização, estabilização química ou biológica, transformação ou destruição do contaminante. Por depender de processos exclusivamente naturais, a AN pode ser muito lenta, exigindo o uso conjunto de outras técnicas e o monitoramento do local por longos períodos de tempo por meio das análises das concentrações de compostos de interesse.

O processo de biodegradação ocorre devido à adaptação natural da microbiota nativa do solo à presença do contaminante e pode ser monitorado através do aumento da biomassa microbiana, respiração basal e atividades enzimáticas (SCELZA *et al.*, 2007).

As propriedades físicas do solo (textura, estrutura, densidade, porosidade, permeabilidade, fluxo de água, ar e calor) são responsáveis pelos mecanismos de atenuação física de poluentes, como filtração e lixiviação, possibilitando ainda condições para que os processos de atenuação química e biológica possam ocorrer (CETESB, 2001).

As propriedades químicas dos solos (pH, teor de nutrientes, capacidade de troca iônica, condutividade elétrica e matéria orgânica) são, ao lado da atividade biológica, responsáveis pelos principais mecanismos de atenuação de poluentes nesse meio. Entre estes podem ser destacados a adsorção, a fixação química, precipitação, oxidação, troca e a neutralização que invariavelmente ocorrem no solo e através do manejo de suas propriedades podem ser incrementados (CETESB, 2001).

O processo de ANM em sítios com derramamento de petróleo, particularmente biodegradação, são bem documentados na literatura. Em condições de campo apropriadas, os compostos BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno), por exemplo, podem ser naturalmente degradados pela atividade microbiana e produzir compostos finais não tóxicos, como dióxido de carbono e água (MULLIGAN e YONG, 2004). Onde a atividade microbiana é suficientemente rápida, a pluma de BTEX pode estabilizar (por exemplo, reduzindo a expansão) e a concentração do contaminante tanto nas águas subterrâneas quanto no solo pode eventualmente decrescer a níveis satisfatórios para a legislação.

A ANM tem numerosas vantagens e desvantagens, que devem ser cuidadosamente consideradas durante a caracterização de um sítio e avaliação das alternativas de remediação antes de se escolher a ANM como a alternativa de remediação.

Como qualquer processo *in situ*, gera um volume reduzido de resíduos, diminuindo risco de contaminação de outros locais (como pode ocorrer nos tratamentos *ex situ)* (ASTM, 2004). Ainda mais, o processo de ANM pode resultar na degradação no próprio local contaminado, podendo ser aplicado em toda área ou em parte dela, além de poder ser usado em associação com outras tecnologias de remediação. Em geral, tem custo reduzido quando comparado a outros métodos de remediação. Além disso, é um método que pode ser usado antes ou após outras tecnologias de remediação (MULLINGAN e YONG, 2004), podendo ser aplicado mesmo quando o contaminante encontra-se amplamente difundido no solo (IWAMOTO e NASU, 2001).

Entretanto, é considerada menos efetiva quando a concentração de HTP no solo é alta (maior que 5%) (ASTM, 2004). Existe a possibilidade do contaminante migrar, ou as condições hidrológicas e geoquímicas mudarem durante o período, resultando na mobilidade de contaminantes previamente estabilizados, e consequentemente, reduzindo a efetividade do processo. Há uma baixa aceitação do público e, portanto, um projeto de educação ambiental na comunidade afetada pode ser necessário (RUGNER *et al*., 2006). Outrossim, produtos da degradação podem ser ambientalmente mais perigosos do que o contaminante inicial (MULLIGAN e YONG, 2004).

Devido a multiplicidade de detalhes que envolvem a biorremediação, podem existir aspectos que acabam por complicar extremamente o processo. Dentre eles, pode - se mencionar o nível de toxicidade de contaminantes, a degradação incompleta dos compostos e a biodisponibilidade das substâncias.

Quando um solo contaminado com hidrocarbonetos é submetido à biorremediação, a depleção do hidrocarboneto é, tipicamente, marcado por uma rápida taxa de redução. Esta taxa decresce ao longo do tempo e, frequentemente, uma concentração residual ainda

permanece no solo. Esta fração não – biodisponível, recalcitrante, difícil de degradação por populações microbianas, pode representar um baixo risco ambiental.

A determinação da fração biodisponível em um processo de biorremediação representa uma estimativa do nível máximo de biodegradação alcançado, assim como uma indicação do perigo à saúde ambiental.

3.4 **Biodisponibilidade**

O objetivo principal da etapa de avaliação de risco de um sítio contaminado é a identificação e quantificação dos perigos ao meio ambiente, uma vez que a segurança da população deve ser priorizada dentre os bens a proteger. A partir dessas definições, serão escolhidos os alvos a serem atingidos na remediação e as medidas corretivas a serem adotadas.

Atualmente, a avaliação de risco ambiental de poluentes, bem como a eficácia de um processo de biorremediação, são baseadas na quantidade total da substância química presente no solo. As metodologias convencionais de quantificação da concentração do contaminante que remanesce no solo envolvem uma etapa de extração química intensiva, que utiliza solventes orgânicos (n-hexano, diclorometano, acetona) em aparelhos como ultrassom, soxhlet ou ASE. Todavia, ela não é necessariamente indicativa de quanto está disponível para organismos (DEAN e SCOTT, 2004).

Dessa forma, o processo de biorremediação pode ser considerado ineficiente, pois a concentração residual do poluente ainda está acima dos valores permitidos na legislação

ambiental. Como consequência, as abordagens para avaliar os riscos podem escolher áreas em que a necessidade de remediação é pequena ou negligenciar áreas em que o risco é maior.

Conforme as substâncias se tornam menos disponíveis aos microrganismos, elas também terão sua disponibilidade reduzida a outros receptores, como seres humanos. Logo, a baixa biodisponibilidade ao longo do tempo não é necessariamente desvantajosa do ponto de vista da avaliação de risco em longo prazo. Em razão disso, autores têm destacado que o estudo da biodisponibilidade deve ser levado em conta na avaliação do risco de um contaminante (ALEXANDER, 2000; SEMPLE *et al*., 2006).

Embora seja empregado há muito tempo nas ciências agrárias e na toxicologia, o conceito de biodisponibilidade tem provocado o interesse na indústria de resíduos perigosos como uma questão importante nos processos decisórios de remediação.

O reconhecimento de que a concentração total de um composto no solo não é equivalente à concentração efetiva ou biodisponível já é bem estabelecida na agricultura (NRC, 2003). O consórcio de nutrientes disponíveis varia significativamente por tipo de solo e espécie de planta, refletindo na capacidade de diferentes solos e plantas a acessarem os nutrientes (NRC, 2003).

Precipuamente, os primeiros estudos sobre a biodisponibilidade de contaminantes no solo começou nos anos 80 (BONACCORSI *et al*., 1984; CONNELL *et al*., 1984; LUCIER *et al*., 1986; UMBREIT *et al*., 1986; SHU *et al*., 1988), envolvendo Policloreto de Bifenilas (PCB) e HPA´s (FRIES *et al*., 1989; GOON *et al*., 1990). Atualmente, a biodisponibilidade é considerada essencial na determinação da toxicidade dos contaminantes e suas acessibilidades aos microrganismos e nos vegetais superiores (ALLARD *et al*., 2000).

Apesar de todos os trabalhos até hoje, ainda não há consenso sobre sua definição. A biodisponibilidade, do ponto de vista de processos, pode ser definida como interações físicas,

químicas e biológicas que determinam a exposição de plantas, animais e microrganismos a substâncias associadas a solos e sedimentos (NRC, 2003). Mais recentemente, na norma ISO 17402 de 2008 (ISO, 2008), a biodisponibilidade foi descrita como "o grau em que químicos presentes no solo podem ser absorvidos ou metabolizados por seres humanos ou receptores ecológicos ou estão disponíveis para interação com sistemas biológicos.

Segundo a CETESB[3], a distribuição e concentração dos contaminantes na matriz do solo podem variar profundamente. Pode-se considerar a possibilidade de ocorrência de contaminantes nas seguintes fases:

- livre, quando existem altas concentrações do contaminante, ou ainda quando existe produto puro no subsolo;
- gasosa ou vapor, quando o contaminante se apresenta como um gás, nas condições normais do meio ambiente, ou se encontra volatilizado;
- adsorvida – quando os contaminantes estão retidos nas partículas do solo por processos de adsorção, sobretudo em solos com alto teor de argila ou de matéria orgânica;
- dissolvida, quando o contaminante se encontrar dissolvido em meio aquoso.

A Figura 5, adaptada de Ehlers & Luthy (2003) resume as interações entre as moléculas do contaminante no solo. "A" refere-se aos fenômenos físicos, químicos e bioquímicos que associam, dissociam, expõem ou solubilizam um contaminante associado ao solo ou sedimento; "B" envolve o movimento do contaminante para membrana de um organismo, enquanto "C" envolve o movimento do contaminante ainda ligado na fase sólida.

[3] Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/Capitulo_X.pdf . Acesso em 25 de maio de 2009.

O contaminante dissolvido nas fases aquosa ou gasosa é submetido a processos de transporte como difusão e dispersão que podem carregá - lo a superfície de um organismo vivo. “D” mostra o movimento da substância do ambiente externo por uma barreira fisiológica, como a membrana plasmática.

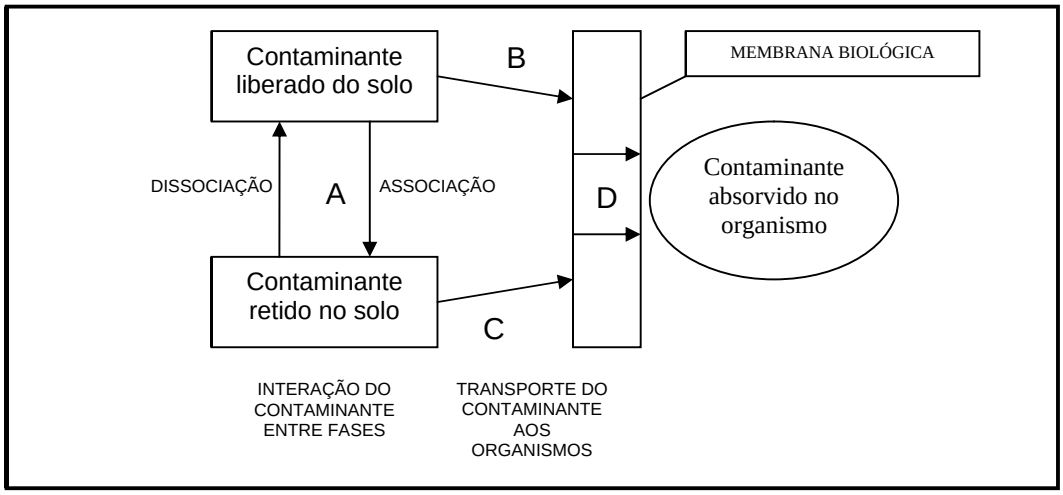


Figura 5: Resumo das interações entre as moléculas do contaminante e o solo. Fonte: SEMPLE, 2004.

3.4.1 Fatores que afetam a biodisponibilidade

Conforme citado por Haws e colaboradores (2000), a biodisponibilidade de um contaminante pode ser alterada por uma grande variedade de fatores, como as características físicas da fase sólida (formato das partículas, tamanho, porosidades internas), propriedades químicas do sorbentes e fatores biológicos (abundância e diversidade microbiana, afinidade pelo contaminante) e a presença de múltiplos contaminantes no local (que poderiam competir por sítios de adsorção e acesso a enzimas microbianas).

Estudos mostram que a biodisponibilidade de um composto pode variar dependendo do tipo de solo (JONKER *et al*., 2003), tempo de contato do contaminante (ALEXANDER, 2000) e pode ser espécie – específica (KELSEY *et al*., 1997). KELSEY e colaboradores (1997) notaram que a biodisponibilidade do fenantreno em solo difere em minhoca (*Eisenia foetida*) e bactéria (*Pseudomonas* sp.), apesar de em ambos a biodisponibilidade declinar com o aumento do tempo de contato da respectiva substância com o solo em estudo.

Uma substância pode estar acessível para absorção por um organismo se ela estiver na fase aquosa, governada por processos de sorção e transferência de massa. Por exemplo, pequenos espaços entre os poros, menores 1 µm, impedem que a substância fique acessível a microrganismos, fazendo com que precisem ir à fase aquosa externa para que possa ser metabolizada (ZHAO & VOICE, 2000; HAWS, 2006). Em contraste, alguns organismos são capazes de degradar compostos diretamente sorvidos na fase sólida (FENG *et al*., 2000), ou produzirem surfactantes que facilitariam sua dessorção (ALEXANDER, 2000; NRC, 2003).

Portanto, se algumas espécies possuem mecanismos que facilitam a dessorção de moléculas sequestradas por partículas no solo, a quantidade do composto disponível variará entre espécies que não possuem tais mecanismos (ALEXANDER, 2000).

Adicionalmente, a matéria orgânica, principal matriz hidrofóbica do solo, constituída principalmente de átomos de C e H (JACQUES *et al.*, 2007), está diretamente relacionada com os processos de sorção e dessorção de substâncias químicas orgânicas no solo (WANG *et al.*, 2001), com impactos na bioacumulação, biodisponibilidade, e biodegradabilidade de poluentes orgânicos (CHUNG & ALEXANDER, 1999; WANG *et al.*, 2001; SCHERR *et al.*, 2007).

As frações do solo, igualmente, também podem influenciar a distribuição e disponibilidade do contaminante no solo. Scherr e colaboradores (2007) demonstraram que

frações arenosas do solo possuem menor capacidade de acumular HTP, que, por sua vez, são mais encontrados nas frações siltosas e argilosas. Em estudo, Talley e colaboradores (2002) determinaram associações entre HPA´s e partículas de sedimento portuário, cujas análises mostraram que o total de HPA´s extraídos estavam mais associados a frações de sedimentos menores, após a remediação em biorreatores.

Além disso, a biodegradação de contaminantes também se difere nas frações do solo. Baixa proliferação e diversidade microbiana, a saber, são típicas de solo de textura arenosa e baixa quantidade de carbono orgânico, quando comparados com solos de textura argilosa (SCHERR *et al.*, 2007).

Estes elementos, que simultaneamente interferem nos processo de degradação do contaminante, devem ser analisados em conjunto. Uma vez que o arranjo da fase sólida do solo determina sua capacidade de sorção de contaminantes orgânicos, é de se esperar que solos com diferentes conteúdos de matéria orgânica e composições mineralógicas apresentem diferentes capacidades de sorção e de biodisponibilidade desses compostos aos microrganismos degradadores do solo (JACQUES *et al.*, 2007).

Um aspecto importante que influencia a biodisponibilidade de contaminantes no solo é o tempo. Com o tempo, o contaminante é geralmente submetido a transformações que fazem com que ele forme associações mais estáveis com as partículas do solo (ALEXANDER, 2000; NRC, 2003). Recentemente, Ncibi e colaboradores (2007) observaram, em condições abióticas, uma redução da extração do Naftaleno e Fenantreno com solventes orgânicos com o aumento do tempo de contato do solo e o contaminante.

Em conformidade, tem sido observado que a mineralização de poluentes orgânicos hidrofóbicos diminui com o tempo de contato com o solo. Quando um solo contaminado é submetido à biorremediação, a depleção do contaminante normalmente exibe uma taxa de

degradação inicialmente rápida, que decresce ao longo do tempo de tratamento (ALEXANDER, 2000). Este efeito tem sido atribuído, dentre outros fatores, à falta de biodisponibilidade (SABATÉ *et al*., 2006). No final do processo, técnicas de extração exaustivas, como ultrassom, Sohxlet ou ASE, mostram, muitas vezes, que uma concentração residual do contaminante ainda permanece no solo.

Desse modo, o tratamento pode ser considerado ineficiente, pois a concentração do contaminante permanece acima do limite legal. Por outro lado, ela pode representar uma fração não – biodisponível, que é difícil de ser eliminada por biodegradação e pode oferecer menor risco ambiental (ALEXANDER, 2000). Entender a biodisponibilidade, portanto, é essencial para determinar a eficácia de um tratamento de biorremediação.

3.5 **Metodologias utilizadas para prever a biodisponibilidade**

O principal objetivo da quantificação apenas da fração biodisponível de um determinado composto é prever quanto está acessível à microbiota do solo para ser degradado e, consequentemente, até onde uma área contaminada pode ser biorremediada. Essa avaliação pode ser realizada pela exposição direta de organismos como minhocas, plantas e bactérias à amostra num dado tempo, com a subsequente determinação da absorção ou degradação do contaminante (FENG *et al*., 2000; CHOJNACKA *et al*., 2005; UDOVIC e LESTAN, 2007).

Uma grande variedade de bioensaios pode ser usada para avaliar a biodisponibilidade de contaminantes em solos e sedimentos (NRC, 2003), bem como para validar os testes químicos e físico-químicos que serão discutidos posteriormente nesta dissertação. Bioensaios

geralmente são divididos em duas categorias: testes que refletem o quanto a substância foi absorvida por um tecido de um organismo (conduzido com plantas, invertebrados e peixes) e testes toxicológicos (NRC, 2003).

Contudo, um procedimento de extração química que prevê rapidamente a disponibilidade microbiana no solo é extremante útil num contexto cientifico e regulatório para análise de risco, e quando se investiga a potencialidade de biorremediar uma área contaminada. Isto porque, geralmente, a avaliação biológica da disponibilidade é lenta, requer pessoal especializado e tem alto custo.

Métodos analíticos para quantificação de substâncias orgânicas no solo ou sedimento têm utilizado, historicamente, métodos de extração exaustivos, como Soxhlet, ultrassom, ASE, com solventes orgânicos de baixa polaridade para remover a maior quantidade possível do contaminante (NRC, 2003). Portanto, essas técnicas superestimam a fração realmente biodisponível destas substâncias nos solos e sedimentos.

Alternativamente, testes de extração suave que se correlacionam com a fração biodisponível do composto orgânico têm sido desenvolvidos como ensaios substitutos para avaliação da biodisponibilidade (SEMPLE *et al*., 2006). Logo, precisam imitar a capacidade das comunidades microbianas em acessar o determinado composto. Preferencialmente, este procedimento de extração deverá fornecer a mesma fração do contaminante que seria transferido para atividade microbiana num contexto de remediação. A seguir, são mostradas as principais técnicas físico - químicas para avaliação da fração biodisponível.

As técnicas de extração química podem ser divididas em quatro grupos: uso de solventes orgânicos, em fase sólida, com ciclodextrinas ou oxidação química. De preferência, devem ser rápidas, de baixo custo e proporcionais à mineralização/biodegradação.

Em geral, esta correlação não pode ser dependente nem da concentração do contaminante nem do tempo de contato deste com o solo, pois estes raramente são conhecidos para amostras ambientais (DOICK *et al*., 2006).

3.5.1 Extração com solventes orgânicos

A avaliação química da biodisponibilidade com solventes orgânicos, moderadamente polares, tem sido realizada principalmente com etanol (KELSEY *et al*., 1997; KILBANE, 1998) e n-butanol (KELSEY *et al*., 1997; LISTE & ALEXANDER, 2002; MUELLER & SHANN, 2006). LISTE e ALEXANDER (2002), por exemplo, conseguiram correlacionar a quantidade biodegradada de fenantreno e pireno em solos com a mesma extraída pelo n-butanol. Kelsey e colaboradores (1997), ademais, conseguiram uma boa correlação entre a fração do contaminante extraído com solvente polar e fração absorvida por minhocas.

A facilidade e a rapidez (horas) da extração com solventes orgânicos são vantagens metodológicas, mas a utilização deles para medir a biodisponibilidade é contestada na literatura (SEMPLE *et al*., 2007). A causa, em parte, por diferenças analíticas e pouca ou nenhuma correlação com biodegradação de HPA´s de alto peso molecular.

3.5.2 Oxidação química

A oxidação com persulfato é utilizada para oxidar parcialmente a matéria orgânica do solo, deixando um resíduo recalcitrante (SEMPLE *et al*., 2007). A técnica assume que a bactéria utiliza a mesma fração oxidada pelo persulfato. Ela representa uma metodologia alternativa para avaliação de risco ambiental, pois não quantifica quanto pode ser removido, e sim quanto do contaminante ainda permanece no solo.

Entretanto, Cuypers e colaboradores (2001) não obtiveram bons resultados com a oxidação com persulfato para estimar a fração biodisponível de HTP em solo, devido a fraca correlação com a degradação biológica.

3.5.3 Extração em fase sólida

Nas técnicas de extração em fase sólida, o solo é misturado a um suporte formado por resinas poliméricas e água (ou cloreto de cálcio). XAD-2, XAD-4, Tenax TA ou C-18 são alguns dos sorbentes típicos para extração de contaminantes orgânicos no solo (NRC, 2003). Após a separação física, a fase sólida é extraída e analisada para determinar a quantidade de composto que é transferida para a fase aquosa (DEAN e SCOTT, 2004). Este método quantifica a fração do contaminante que é fisicamente transferida para fase aquosa do solo ou sedimento (NRC, 2003).

Pode ser utilizada em amostras contaminadas com pesticidas e HPA´s de alto e baixo peso molecular (CUYPERS *et al*., 2002; DEAN e SCOTT, 2004; SEMPLE *et al*., 2007), porém, o volume da fração extraída pode variar com o tempo de extração (SEMPLE *et al*., 2007).

3.5.4 Extração com ciclodextrinas

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D- glicose unidas através de ligações glicosídicas a (1-4), obtidas a partir da degradação enzimática do amido (BRITTO *et al*., 2004). As ciclodextrinas apresentam-se na forma de “cones truncados” com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6. O tamanho da cavidade é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes. Por modificação enzimática, é possível obter a ciclização de 6, 7 ou 8 unidades de glicose, dando origem a a, ß e γ–ciclodextrina (Figura 6).

Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade. A presença das hidroxilas livres na parte externa das ciclodextrinas confere a essas moléculas, na superfície, um caráter hidrofílico.

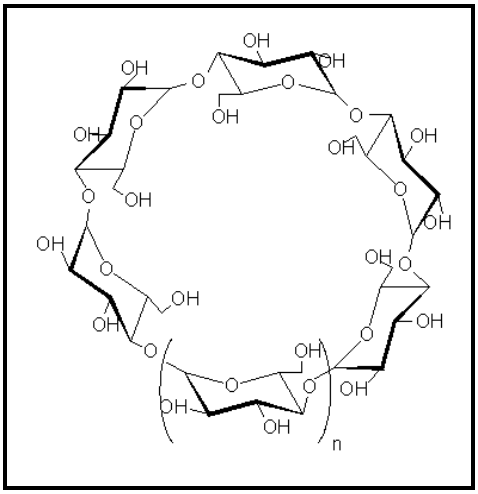


Figura 6: Representação esquemática da Hidroxipropil-ciclodextrina.(n=1 corresponde a HPCD-a; n=2 a HPCD-ß e n= 3 a HPCD-γ). Fonte: SIKORSKI E WILKINSON, 2004.

O arranjo estrutural das moléculas de glicose nas ciclodextrinas possibilita sua utilização como hospedeiras na formação de complexos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a "dissolução" em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade (Figura 7). Nesse sentido, a solubilidade em água de muitos compostos hidrofóbicos é aumentada pelas ciclodextrinas pela sua troca no equilíbrio dinâmico com as moléculas hospedeiras que se dissociam do complexo da ciclodextrina e ficam disponíveis para catabolismo.

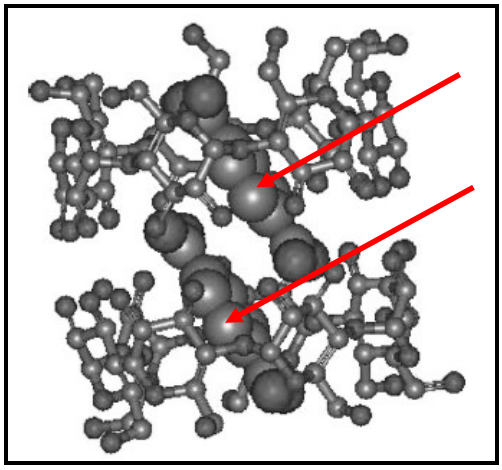


Figura 7: Visão estereoscópica de um dímero de HPCD–ß com moléculas hospedeiras dentro da cavidade. As setas vermelhas apontam as moléculas hospedeiras. Fonte: FAN *et al*., 2007.

Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de ciclodextrinas em diferentes áreas da ciência e tecnologia, como na indústria farmacêutica, alimentícia e ambiental. Nesse último caso, a ciclodextrina pode atuar como surfactante em processos de biodegradação de hidrocarbonetos como dodecano (C12), tetracosano (C24), antraceno e naftaleno (BARDI *et al*., 2000) ou prever a biodisponibilidade dos contaminantes em processos de biorremediação (REID *et al*., 2000; CUYPERS, 2002; SABATÉ *et al*., 2006).

A aplicação da extração com ciclodextrina para prever a biodisponibilidade foi, primeiramente, estudada por Reid e colaboradores (2000), que demonstraram que a extração de alguns HPA´s como fenantreno, pireno e benzo[a]pireno com Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina estava fortemente relacionada com a mineralização por microrganismos. Analogamente, mostrou-se ter uma relação de 1:1 com a fração total disponível para utilização microbiana (REID *et al*., 2000; DOICK *et al*., 2006). Além disso, a extração com HPCD–ß se correlaciona com a fração de HPA´s dessorvida de solo e sedimentos (CUYPERS *et al*., 2002; SABATÉ *et al*., 2006),

Posteriormente, outros trabalhos mostraram que a extração com HPCD-ß pode ser aplicada para avaliação da biodisponibilidade com uma grande variedade de hidrocarbonetos, em solos e sedimentos, incluindo naftaleno (PATTERSON *et al*., 2004), fenantreno (ALLAN *et al*., 2006; DOICK *et al*., 2006; SABATÉ *et al*., 2006), pireno (REID *et al*., 2000; DOICK *et al*., 2006, SABATÉ *et al*., 2007), Benzo[a]pireno (REID *et al*., 2000), alquil benzenos lineares (DEW *et al*., 2005), benzo[a]antraceno (SABATÉ *et al*., 2006), criseno (SABATÉ *et al*., 2006), fluoranteno (SABATÉ *et al*., 2006), hexadecano (STROUD *et al*., 2009).

Recentemente, Paton e colaboradores (2009) acoplaram a extração com HPCD-ß com o uso de um biossensor bacteriano (*Pseudomonas fluorescens*) para detecção de naftaleno. Esses autores obtiveram excelentes correlações entre a quantificação pelo biossensor com experimentos de biodegradação, sendo possível relacionar com a fração de naftaleno biodisponível no solo. O uso da HPCD–ß, portanto, surgiu como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos nos biossensores, visto que os microrganismos geralmente assimilam o contaminante orgânico presente na fase aquosa e rapidamente dessorvido (PATON *et al*., 2009).

Esses artigos, em resumo, focaram em HPA´s individualmente ou misturas deles. No entanto, até o momento, não existem estudos que contemplem solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo. Normalmente, os critérios de avaliação de uma região contaminada por óleo é baseada em termos do conteúdo de HTP, que mede os hidrocarbonetos com 6 a 40 átomos de carbono (GOGOI *et al*., 2003). Um método que possa prever, portanto, quanto de óleo estaria biodisponível para biorremediação, é extremamente interessante.

4 METODOLOGIA

4.1 Solo

O solo utilizado foi proveniente da região nordeste do Brasil (Estado de Sergipe). A coleta do solo foi realizada por uma equipe especializada, de forma a garantir a representatividade da mesma (Figura 8). Esse material logo foi colocado para secar, no pátio do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), a temperatura ambiente durante quatro semanas.

Figura 8: Detalhe da coleta do solo.

Em seguida o solo foi desagregado em um britador de mandíbulas e logo após classificado em uma peneira de 5 mm, que corresponde a 4 mesh, para retirada de folhas, raízes e gravitos (235,8 kg). O material acima dessa granulometria, que ficou retido na peneira, foi desagregado no moinho de rolos, mais uma vez peneirado e todo o material abaixo de 5 mm recolhido ao inicial.

Todo material, após a secagem e peneiramento foi homogeneizado e quarteado conforme esquema apresentado na Figura 9.

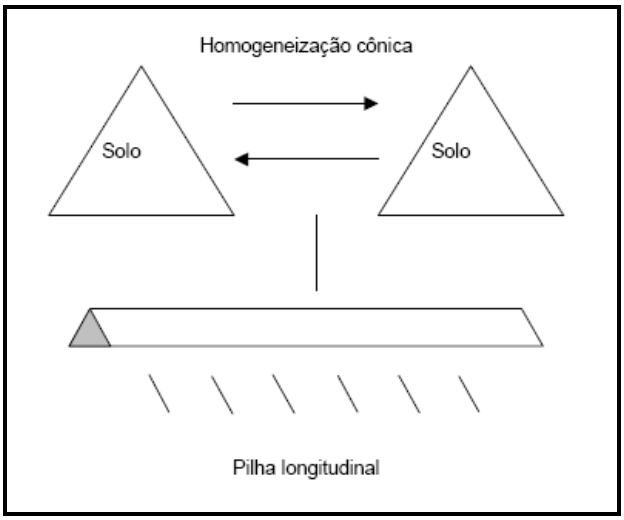


Figura 9: Esquema representativo da homogeneização e quarteamento do solo.

4.1.1 Caracterização do solo empregado

Esse solo, a saber, já vinha sendo empregado no desenvolvimento de outros estudos envolvendo a aplicação do processo de biorremediação (biopilhas e biorreatores) no próprio CETEM, e algumas características físicas e químicas já haviam sido determinadas conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização do solo não contaminado (adaptado de RIZZO, 2008).

Areia	75%
Silte	14%
Argila	11%
Densidade da Partícula (g/mL)	2,2
Densidade do solo (g/mL)	1,3
Porosidade (%)	43
pH	6,8
Capacidade de Retenção de Água (%)	34
Matéria orgânica (%)	1,7

4.2 **Óleo**

No desenvolvimento experimental desta dissertação, foi utilizado o óleo cru proveniente da mesma região de origem do solo, de forma a simular uma contaminação que possa vir a ocorrer durante a exploração dos poços localizados na área (vazamento involuntário de petróleo). Os teores de contaminação adotados foram de 0,5, 2,5 e 5% (m/m). As frações de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos do óleo cru encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Percentual de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos – SARA (%) no óleo cru.

SARA (%)	
Saturados	55,00
Aromáticos	20,46
Resinas + Asfaltenos	24,52

De forma a se obter uma caracterização orgânica inicial das amostras de solo artificialmente contaminadas, procedeu-se ao encaminhamento das mesmas para laboratório externo (Analytical Solutions) para análise de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP;

método USEPA 8015B) e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA; método USEPA 8270C).

Paralelamente, encaminhou-se o solo das mesmas amostras para o Laboratório da Gerência de Biotecnologia e Tratamentos Ambientais (BTA) do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/PETROBRAS), para quantificação dos HTP e servir de base para a avaliação.

4.3 **Montagem do sistema experimental para simulação do processo de atenuação natural**

Para simular o efeito da atenuação natural na biodisponibilidade do óleo, a ser comprovado através do uso de HPCD–ß, foram montados dois sistemas com solo contaminado nas 3 concentrações escolhidas (em duplicatas).

4.3.1 Sistema 1

Para montagem do primeiro sistema, foram utilizadas 7 caixas de polietileno de alta densidade, com largura de 36 cm, comprimento de 53 cm e altura de 19 cm (aproximadamente 36,25 L de volume útil).

As caixas foram furadas no fundo com um espaçamento de 3 cm entre cada furo, e colocadas sobre uma caixa coletora, para recolher qualquer líquido proveniente de chuva que viesse a se infiltrar pelo solo, como mostra a Figura 10.

Todas as caixas foram preenchidas com uma camada de 3 cm de brita (correspondendo a 5,75 L), uma camada de areia de 2 cm (3,83 L) e uma 1 camada de brita (5,75 L) de 3 cm. Preencheu-se o volume restante (aproximadamente 15,33 L) com solo contaminado a 0,5%, 2,5% e 5% (m/m) em duplicata, ou não contaminado (controle) – Figuras 11 e 12.

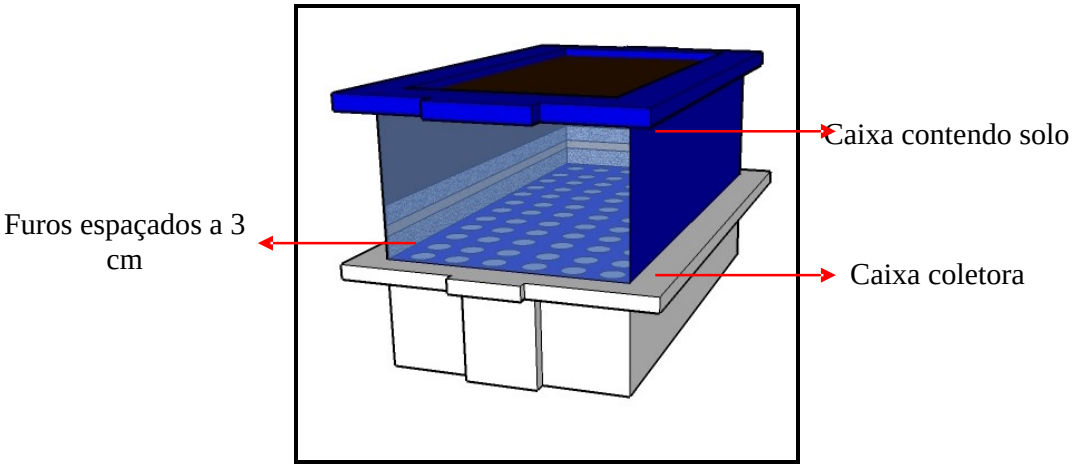


Figura 10: Representação das caixas utilizadas para o experimento de atenuação natural. Acima, a caixa contendo o solo contaminado, com as camadas de brita e areia. Abaixo, encontra-se a caixa coletora.

Figura 11: Montagem do sistema 1.

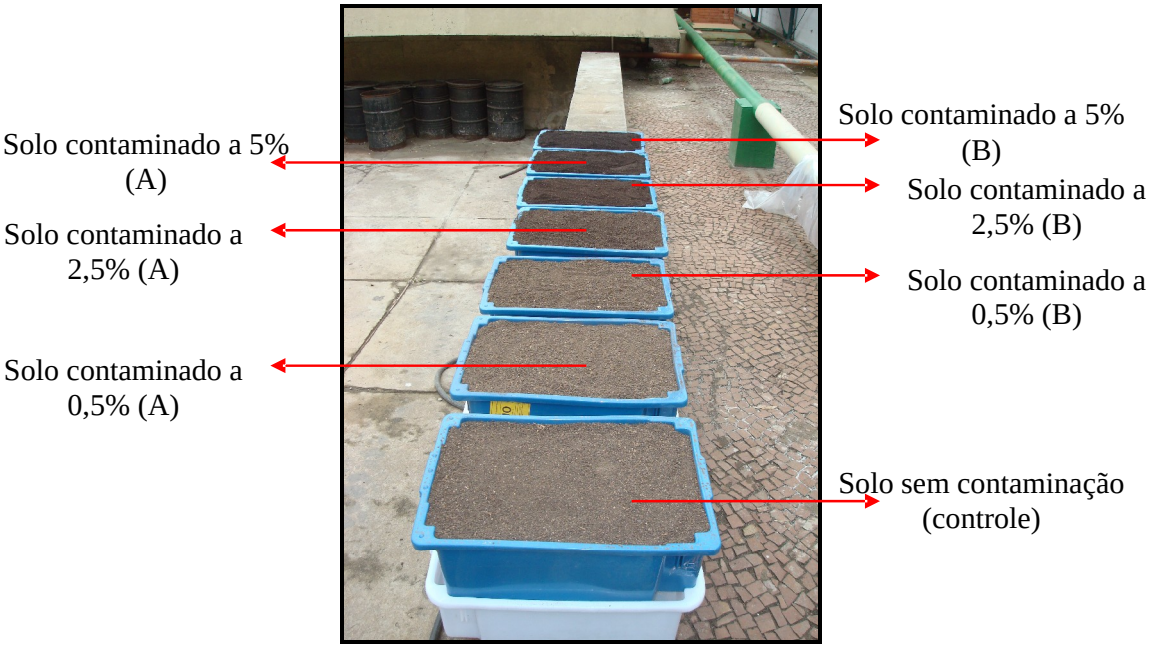


Figura 12: Caixas do Sistema 1 contendo solo e suas respectivas concentrações de óleo cru.

4.3.2 Sistema 2

Como forma de controle do Sistema 1, e também para verificar apenas os efeitos de fatores abióticos como luz, temperatura e chuva na biodisponibilidade dos contaminantes foi montado um sistema semelhante.

Foram utilizadas 6 caixas de polietileno de alta densidade, com largura de 25 cm, comprimento de 34 cm e altura de 12 cm (aproximadamente 10,20 L de volume útil).

As caixas foram furadas no fundo com um espaçamento de 3 cm entre cada furo, e colocadas sobre uma caixa coletora do mesmo tamanho, para recolher qualquer líquido proveniente de chuva que pudesse se infiltrar pelo solo.

Todas as caixas foram preenchidas com uma camada de 1,5 cm de brita, uma camada de areia de 1,5 cm e uma 1 camada de brita (1,5 cm). Preencheu-se o volume restante (aproximadamente 15,33 L) com solo contaminado a 0,5, 2,5 e 5% (m/m) em duplicata. Neste caso, o solo e a areia utilizados foram esterilizados por autoclavação 5 vezes e adicionado um agente biocida (Azida de sódio a 0,5%) periodicamente para evitar crescimento de qualquer organismo e consequentemente biodegradação.

Como controle, realizou-se, periodicamente, o cultivo de microrganismos heterotróficos totais (procedimento descrito a seguir) para se certificar a esterilidade do solo.

4.3.3 Disposição e coleta das amostras

Ambos os sistemas 1 e 2 foram colocados em um espaço aberto nas dependências da usina piloto do CETEM, onde foram submetidos a intempéries (Figuras 13, 14 e 15).

Eles foram montados no início de Junho de 2008, e monitorados até Dezembro de 2008 (180 dias de experimento).

Amostras representativas do solo foram coletadas conforme cronograma pré - estabelecido na Tabela 5 e armazenadas em câmara fria a 4ºC para posterior análise.

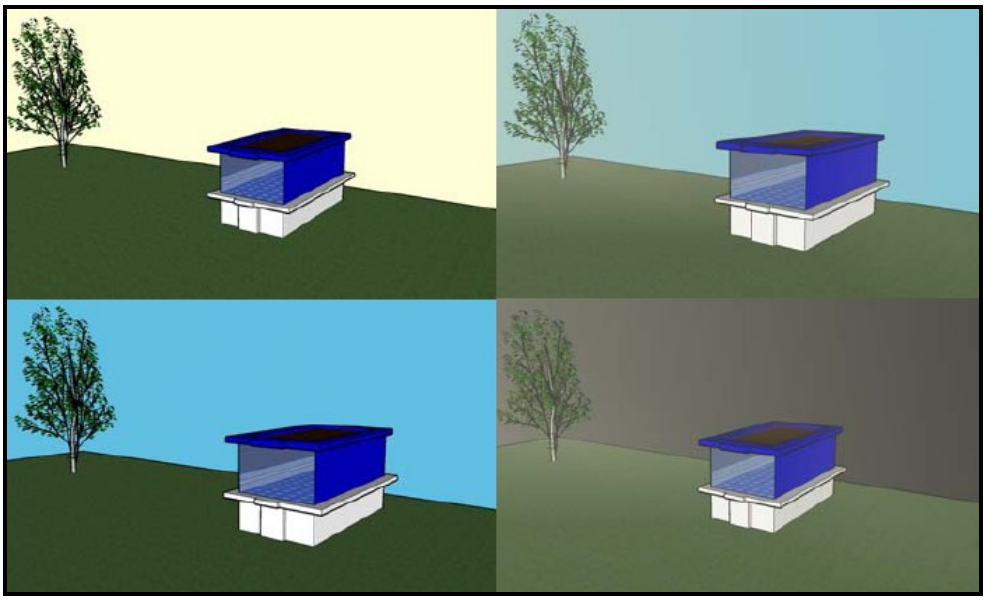


Figura 13: Modelo idealizado da caixa do sistema sujeito a intempéries.

Figura 14: Imagens do Sistema 1 pronto nas dependências da Usina Piloto do CETEM.

Figura 15: Sistema 2 pronto nas dependências da Usina Piloto do CETEM.

Tabela 5: Cronograma das coletas

Amostra	Mês da coleta
t=0	Junho / 2008
t= 15 dias	Junho / 2008
t=30 dias	Julho / 2008
t=60 dias	Agosto / 2008
t=90 dias	Setembro / 2008
t= 120 dias	Outubro / 2008
t=180 dias	Dezembro / 2008

4.4 Metodologias para o monitoramento do processo de ANM

4.4.1 Análises microbiológicas

A diversidade microbiana, em virtude de os microrganismos estarem intimamente agregados aos diversos processos ecológicos do solo, tem se mostrado como um importante indicador da qualidade do solo (ZILLI *et al.*, 2003). Logo, utilizou-se a quantificação de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru como indicativo do processo de biorremediação e de possíveis alterações da população microbiana, decorrente deste processo nas amostras do Sistema 1.

Realizou – se, ademais, para controle da esterilidade do Sistema 2, a quantificação dos microrganismos heterotróficos totais periodicamente.

4.4.1.1 *Quantificação de microrganismos heterotróficos totais*

A quantificação de microrganismos heterotróficos totais seguiu metodologia adotada por Trindade (2002). Acrescentou - se, em erlenmeyer, 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,9%). Fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25ºC a 150 rpm. Após a agitação, os extratos obtidos sofreram diluições sucessivas. Posteriormente, realizou-se o plaqueamento em meio sólido orgânico (Tabela 6) pela técnica *pour - plate*, acrescentando-se 0,1 ml das diluições em placas de Petri (em duplicatas). As placas foram incubadas em estufa a 30ºC por 48 horas e, em seguida, contou – se o número de unidades formadoras de colônias – resultados expressos em UFC / g de solo.

Tabela 6: Composição do Meio Orgânico

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Peptona de Carne	5,0
Extrato de Lêvedo	2,0
NaCl	5,0
Agar-Agar	20,0

4.4.1.2 *Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru (hidrocarbonoclásticos)*

A quantificação da população microbiana degradadora de óleo cru foi realizada empregando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) descrita por Ururahy (1998). Acrescentou -se, em erlenmeyer, 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,9%). Fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25ºC a 150 rpm. Após a agitação, as amostras sofreram diluições e, em seguida, 0,1mL da diluição adequada com 1,8 mL de meio mineral (Tabela 7) foram adicionados em cavidades da placa de polietileno com 24 cavidades.

Por fim, 0,1mL de óleo cru foi acrescentado como única fonte de carbono orgânico. As placas foram então incubadas em estufa a 30ºC por uma semana e, em seguida, procedeu-se à estimativa do número mais provável (NMP) por grama de solo (PAGE *et al*., 1982).

O teste em branco baseou-se na adição de meio, seguido da adição do óleo, sem adição de inóculo.

Tabela 7: Composição do meio mineral líquido

Componente	Concentração (g/L)
NaCl	5,0
K_2HPO_4	1,0
$NH_4H_2PO_4$	1,0
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
$MgSO_4$. $7H_2O$	0,2
KNO_3	3,0

4.4.2 Análise da concentração de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

Adicionalmente, para fins de monitoramento da concentração de óleo nos sistemas de ANM, bem como nos testes de biodisponibilidade com a HPCD-ß, a análise dos hidrocarbonetos totais de petróleo foi realizada através do equipamento Infracal, modelo HART-T da Wilks Enterprise. Este é um medidor portátil de OGT (óleos e graxas totais) / HTP (Figura 16), cuja técnica empregada é a espectrofotometria de infravermelho. Ele permite a quantificação após extração do óleo do solo com solvente orgânico (n-hexano PA padrão HPLC).

A determinação de HTP por infravermelho baseia-se na medida da absorbância da ligação C-H dos hidrocarbonetos presentes na amostra. As ligações C-H dos hidrocarbonetos alifáticos absorvem energia num comprimento de onda específico e a intensidade de absorção

é proporcional à quantidade de moléculas de hidrocarbonetos numa amostra (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Isto pode ser diretamente convertido à quantidade total de óleo na amostra original se a razão do solvente com o óleo for cuidadosamente controlada, através de uma calibração (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

O teor de HTP nas amostras de solo, para posterior análise no Infracal, foi determinado através de uma extração exaustiva com ultrassom (método convencional). Após secagem (60ºC / 16 horas) e maceração, adicionou – se 2 g de sulfato de sódio anidro (VETEC) ao solo contaminado, e submeteu-se ao ultrassom por 60 minutos, utilizando n-hexano (PA, mistura de isômeros - Tedia) como solvente. Posteriormente, depositou-se o extrato em n-hexano na superfície do cristal e o solvente foi evaporado, deixando uma fina camada de óleo, que foi quantificada.

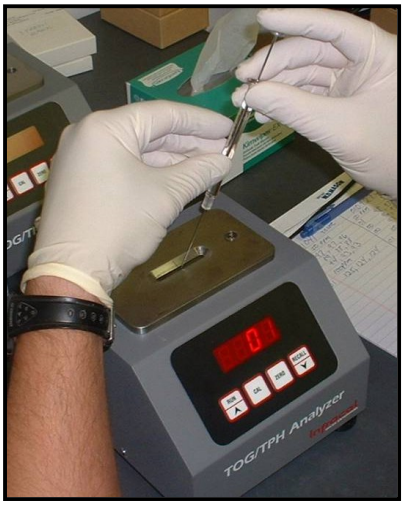


Figura 16: Equipamento Infracal, modelo HART -T da Wilks Enterprise.

4.5 **Estabelecimento da metodologia de extração química para avaliação da fração biodisponível das amostras de solo**

É sabido que a biodisponibilidade varia com diferentes propriedades do solo, tais como quantidade de argila, matéria orgânica e tempo de contato solo – contaminante (ALEXANDER, 2000; DOICK *et al..*, 2005; BONIN e SIMPSON, 2007; NCIBI *et al..*, 2007; SCHERR *et al..*, 2007).

Uma vez que, na literatura, até o momento de realização do desenvolvimento experimental desta dissertação de mestrado, a extração com HPCD–ß ainda não havia sido utilizada para prever a biodisponibilidade de HTP, achou-se interessante testar este método. Por isso, foi necessário estabelecer as melhores condições de extração específicas para HTP, bem como para o solo e óleo utilizados nesta dissertação.

A metodologia de extração com HPCD–ß foi adaptada segundo os métodos descritos por Reid (2000) e Sabaté e colaboradores (2006), como apresentado no Diagrama 1.

Foram colocados, em tubos de centrífuga de 50 ml, 1,5 g de solo contaminados a 0,5%, 2,5% e 5% (m/m) com 25 ml de solução de HPCD–ß (Acros Organic, 97% de pureza) 0,5% de Azida de Sódio (VETEC) em diferentes concentrações (30, 60, 90, 120 e 150 mM). A adição da Azida de Sódio é realizada para impedir a degradação do óleo por microrganismos presentes no solo no período de extração com a HPCD–ß. Os tubos foram vedados e agitados horizontalmente a 150 rpm, 25ºC, protegidos do escuro. Após 22 h, foram centrifugados numa centrífuga digital microprocessada CT 5000, por 15 minutos a 3200 rpm, para separação do solo da solução aquosa de HPCD–ß. O sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido lavado 2 vezes com água destilada para a retirada da solução de HPCD– ß.

Colocou-se o solo numa estufa a 60ºC por 16 horas para secagem e, após maceração, procedeu-se a análise de HTP no Infracal. Como controle, utilizou-se o mesmo solo, porém não contaminado, seguindo o procedimento acima.

A fração biodisponível prevista pela HPCD– ß foi calculada pela diferença entre a concentração inicial total dos HTP e a remanescente após a extração com HPCD–ß, ambos no tempo inicial (t=0) de experimento de ANM.

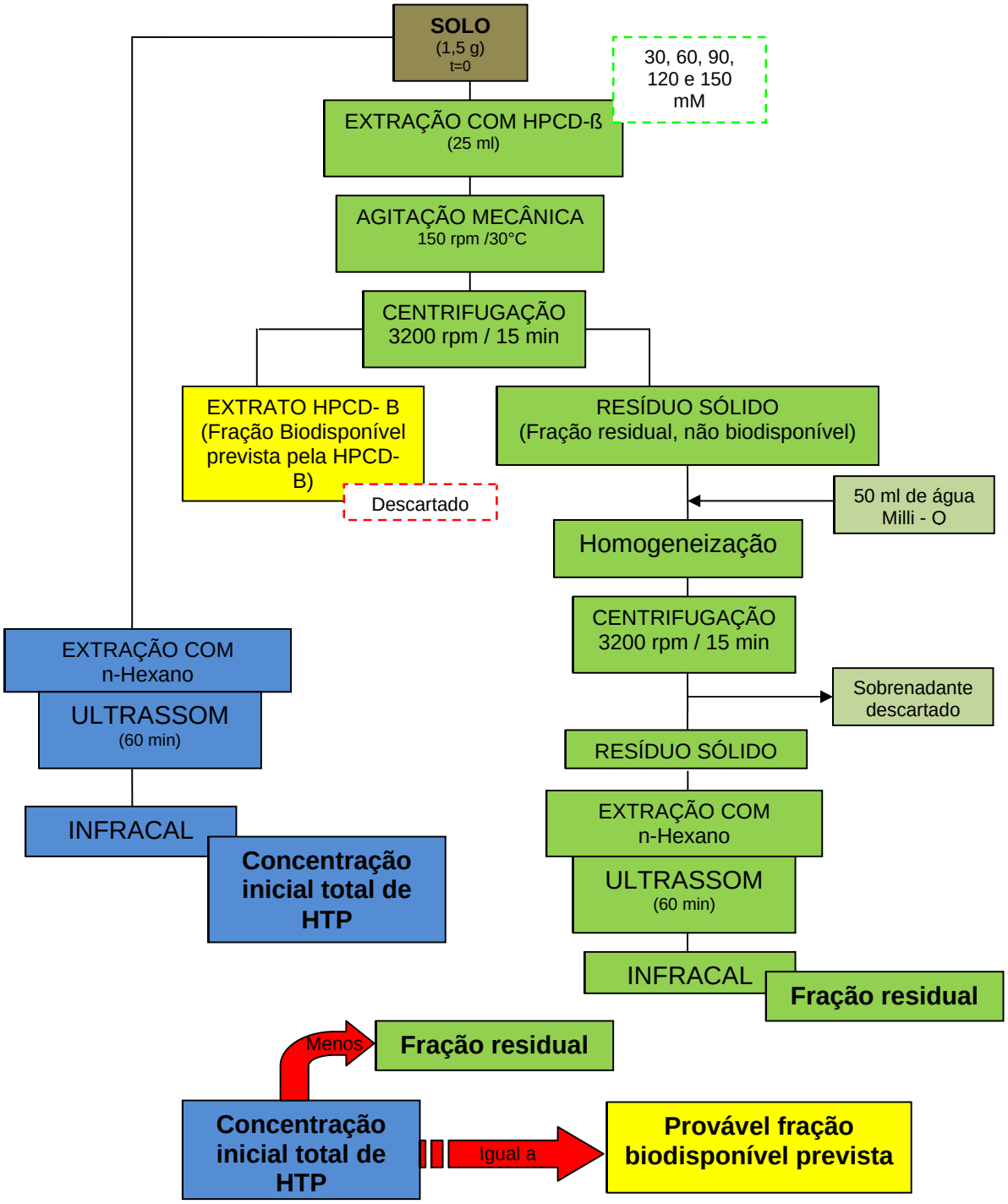


Diagrama 1: Fluxograma das etapas de extração com a HPCD-B

4.6 **Ensaios complementares**

4.6.1 Identificação de vegetais

Denomina-se fitorremediação os casos em que plantas representam o principal mecanismo da biorremediação ou quando são essenciais para desencadear o processo. É uma tecnologia emergente com potencial para tratamento eficaz de solo contaminado com poluentes orgânicos e inorgânicos (ANDRADE *et al*., 2007).

Este método de remediação envolve mecanismos como a bioconversão do poluente no interior da planta (fitotransformação); a absorção e posterior volatilização (fitovolatilização) do contaminante; a imobilização por meio da lignificação ou humificação (fitoestabilização) e / ou a estimulação da biodegradação microbiana mediante exsudatos radiculares, que proporciona um microambiente propício ao crescimento microbiano e, por conseguinte, a decomposição do contaminante.

Este, conhecido como fitoestimulação, pode ser considerado, inquestionavelmente, como um dos mais indicados para tratamento de áreas com hidrocarbonetos derivados de petróleo (ANDRADE *et al*., 2007). Em estudo recente, Kirk e colaboradores (2005) verificaram que *Lolium perenne* e *Medicago sativa* são capazes de alterar a estrutura da comunidade microbiana na rizosfera e aumentar a população de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em solo contaminado com petróleo, podendo, assim, ampliar o potencial biorremediador do sistema.

Outros estudos indicaram que a presença de plantas acelerou e aumentou a degradação de HPA´s (HUANG *et al*., 2004; KIM *et al*., 2004). Segundo Kim e colaboradores (2004), exsudatos radiculares de gramíneas são capazes de solubilizar de 25 a 80 % do antraceno presentes no solo e, com isso, contribuir para a ação biodegradadora dos microrganismos heterotróficos na rizosfera.

Após um mês da montagem dos sistemas, pôde – se observar, inesperadamente, o crescimento de plantas nas caixas do Sistema 1. Pelo fato de o solo, no momento de desenvolvimento de tais plantas, estar com níveis elevados de contaminação, achou-se interessante realizar a identificação. Assim, conforme as espécies vegetais se desenvolviam no solo, elas eram sendo fotografadas para serem posteriormente identificadas através dos seus órgãos taxonômicos. Por conseguinte, buscou-se o reconhecimento das espécies através da consulta à literatura relacionada.

4.6.2 Isolamento e identificação de microrganismos

Depois de quatro meses de ANM (120 dias), observou-se, na cultura de microrganismos para quantificação de degradadores de óleo cru, um tipo de crescimento diferenciado dos meses anteriores, como mostra a Figura 16 (A), nas amostras coletadas das caixas 0,5%B, 2,5%A e 5%B do Sistema 1.

Em virtude da acentuada queda da concentração de HTP nestas caixas, especialmente no solo contaminado a 5%, além de um grande aumento na densidade dos microrganismos degradadores de óleo cru, achou-se interessante isolar estes microrganismos para fins de identificação.

Com auxílio de uma alça de platina, as amostras, em forma de grumos brancos (indicados pelas setas na Figura 17 - A), foram retiradas das cavidades da placa de polietileno e colocadas em erlenmeyers contendo 50 ml de meio mineral com 0,1% de óleo cru. Elas foram mantidas em agitação a 150 rpm a 30ºC durante 7 dias para se confirmar a degradação e manter a cultura.

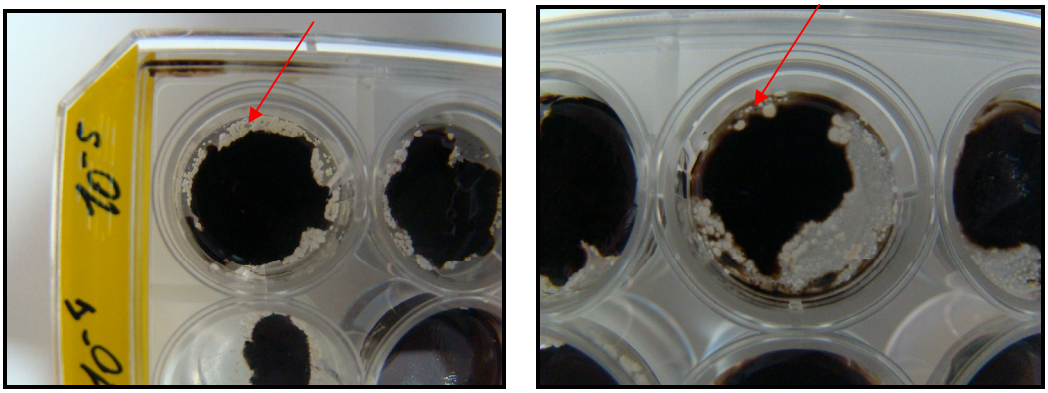
Logo, com a confirmação da turbidez do meio e a diminuição (ou ausência) de óleo nos erlenmeyers através da percepção visual, semeou-se uma amostra com a alça em meio mineral solidificado (2% de Agar) com 0,1% de óleo utilizando-se a técnica de esgotamento.

Uma vez isoladas em colônias puras, e observadas por meio de microscopia óptica (coloração de Gram), realizou-se extração do DNA das colônias com o Kit Genomic DNA wizard da promega. Com este DNA, procedeu-se à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região 16s.

As bandas correspondentes ao peso molecular esperado (aproximadamente 1500 pares de base) foram purificadas com GFX-DNA e kit de purificação de bandas em gel (GE Health Care). Os amplicons de cada cultura foram preparados (100 ng), e as sequências obtidas após as reações de seqüenciamento por eletroforese capilar no MegaBace 1000, utilizando-se o kit de sequenciamento DYENamic dye terminator cycle (GE Healthcare), com os primers pra bactéria (27f, 907r, 532f e 1492r).

Os cromatogramas foram transformados em sequências no formato Fasta através do software Phred (EDWING *et al.*, 1998). Os alinhamentos das sequências bacterianas foram feitas no programa CAP3 Sequence Assembly Program (HUANG & MADAN, 1999). As sequencias obtidas foram comparadas com aquelas presentes no Genbank com a ferramenta de busca BLAST (ALTSCHUL *et al.*,1990).

A



B

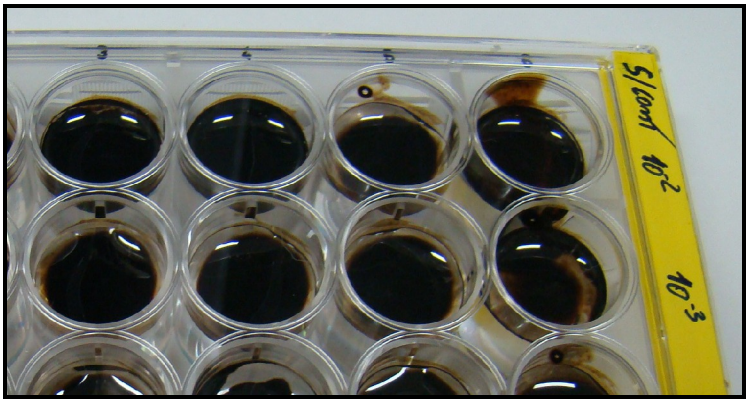


Figura 17: Comparação entre a cultura de microrganismos degradadores de óleo no solo contaminado a 0,5%, no qual houve crescimento diferencial em forma de grumos (A) e em solo não contaminado, no qual não houve crescimento (B).

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5.1 **Caracterização do óleo e solo empregados**

Na Tabela 8, a seguir, são apresentados os resultados dos HPA´s (em mg/kg) e HTP (em mg/kg de solo) obtidos na caracterização orgânica inicial realizada para as amostras de solo artificialmente contaminado com 0,5, 2,5 e 5% de óleo cru utilizado na contaminação (em mg/kg óleo). As análises iniciais foram realizadas pelo laboratório Analytical Solutions (Relatórios de Ensaios Analíticos 06271CS_HEP e 06271CS_PAH).

De forma a validar os resultados obtidos no laboratório externo, as mesmas amostras foram submetidas a análises de óleos e graxas (gravimétrica) e HTP por infravermelho (infracal) no laboratório da Coordenação de Processos Metalúrgicos Ambientais (CPMA) - CETEM, sendo também encaminhadas ao laboratório da BTA/CENPES para análise de HTP por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC – método USEPA 8015b).

Tabela 8: Quantificação dos HTP e HPA´s nos solos contaminados a 0,5%, 2,5% e 5% com óleo cru.

Ensaio Analítico dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos				
HPA	**Solo 0,5% (mg/kg)**	**Solo 2,5% (mg/kg)**	**Solo 5% (mg/kg)**	**Óleo cru (mg/g)**
Naftaleno	0,5283	2,2906	2,9234	0,44231
Acenaftileno	0,033	0,0979	0,0901	0,01865
Acenafteno	0,1587	0,3174	0,2711	0,06086
Fluoreno	0,0688	0,0952	0,1068	0,02837
Fenantreno	0,284	0,918	1,114	0,12953
Antraceno	0,0172	0,0764	0,2284	0,00679
Fluoranteno	0,0178	0,1081	0,1023	0,00594
Pireno	0,0437	0,176	0,2012	0,02039
Benzo[a]antraceno	0,1027	0,4272	0,5025	0,03474
Criseno	0,0716	0,3143	0,3976	0,03292
Benzo[b]fluoranteno	0,0065	0,0214	0,0214	0,00129
Benzo[k]fluoranteno	0,0029	0,0124	0,0185	0,00109
Benzo[a]pireno	0,017	0,0617	0,0775	0,00307
indeno[1,2,3-cd]pireno	0,0036	0,0104	0,0087	0,00102
Dibenzo[a,h]antraceno	0,0074	0,0224	0,0251	0,0021
Benzo[ghi]perileno	0,0071	0,0172	0,0131	0,00107
Ensaio Analítico dos Hidrocarbonetos Totais do Petróleo				
HEP	**Solo 0,5% (mg/kg)**	**Solo 2,5% (mg/kg)**	**Solo 5% (mg/kg)**	**Óleo cru (mg/g)**
n-alcanos	105,67	306,81	406,74	52.714
HRP	185,94	500,1	654,55	91.695
UCM	682,13	1359,63	1637,02	217.148
HTP	868,06	1859,72	2291,57	308.843

UCM: Unresolved Complex Misture; HTP: Hidrocarbonetos Totais do Petróleo; HRP: Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo.

Observa-se que os resultados relativos à concentração dos HTP para todas as amostras de solo foram cerca de 10 vezes inferiores ao valor teórico esperado, em função da quantidade de óleo gravimetricamente adicionada ao solo. As amostras de solo contaminadas com 0,5; 2,5 e 5% (m/m) de óleo apresentaram concentrações de HTP de 868,06 mg/kg solo (0,09%), 1859,72 mg/kg solo (0,19%) e 2291,57 mg/kg solo (0,23 %), respectivamente.

Destaca-se que os teores aproximados de contaminação simulada foram confirmados no laboratório do CETEM através da análise gravimétrica do teor de óleos e graxas (OG; IT

CETEM 2003-001-00) e dos HTP no infracal (IT CETEM 2008-005-00) e no CENPES/Petrobras por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-DIC; Relatório 240608). Os resultados dos dois laboratórios são apresentados na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9: Comparação entre o valor teórico de óleo contaminado no solo com os resultados das análises por diferentes métodos analíticos.

Valor teórico contaminado (%)	HTP (%) – Analytical Solutions (Norma EPA 8015b)	HTP (%) – CENPES (Norma EPA 8015b)	Óleos e Graxas (%) - Análise gravimétrica	HTP (%) - infravermelho / Infracal (%)
0,5%	0,09%	0,43%	1,01%	0,46% ±0,0115%
2,5%	0,19%	2,81%	2,16%	2,32%± 0,0677%
5%	0,23 %	5,07%	4,07%	4,37% ± 0,1618%

Foi observado que tanto os resultados obtidos no CETEM quanto os obtidos no CENPES encontram-se bastante próximos aos valores teóricos considerados para a contaminação inicial dos solos a serem submetidos ao processo de atenuação natural.

As pequenas diferenças obtidas entre o valor teórico contaminado e o valor real obtido são inerentes ao processo de simulação da contaminação e ao método analítico adotado.

Face aos problemas verificados nos resultados dos HTP e descritos acima, por segurança, os resultados de HPA´s obtidos no mesmo laboratório, apresentados na Tabela 9, foram desconsiderados. Assim sendo, os resultados obtidos no laboratório externo Analytical Solutions foram considerados insatisfatórios.

Desse modo, considerou-se, então, no decorrer do trabalho experimental, apenas os resultados obtidos através do Infracal, por fornecer valores semelhantes aos obtidos por CG/DIC no laboratório da BTA/CENPES.

5.2 **Monitoramento do processo de ANM**

5.2.1 Ensaios microbiológicos

A densidade microbiana durante os ensaios de ANM foi monitorada através da quantificação da população de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru no Sistema 1, cujos resultados são apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. Os dados e seus respectivos desvios – padrão encontram-se na Tabela 18 no item Anexo.

Nos seis meses de processo, foram realizadas análises também no Sistema 2 (controle abiótico) com objetivo de confirmar a eficácia do processo de esterilização adotado (autoclavações sucessivas e adição de solução de azida de sódio a 0,5%). Os resultados obtidos indicaram ausência de crescimento microbiano no Sistema 2.

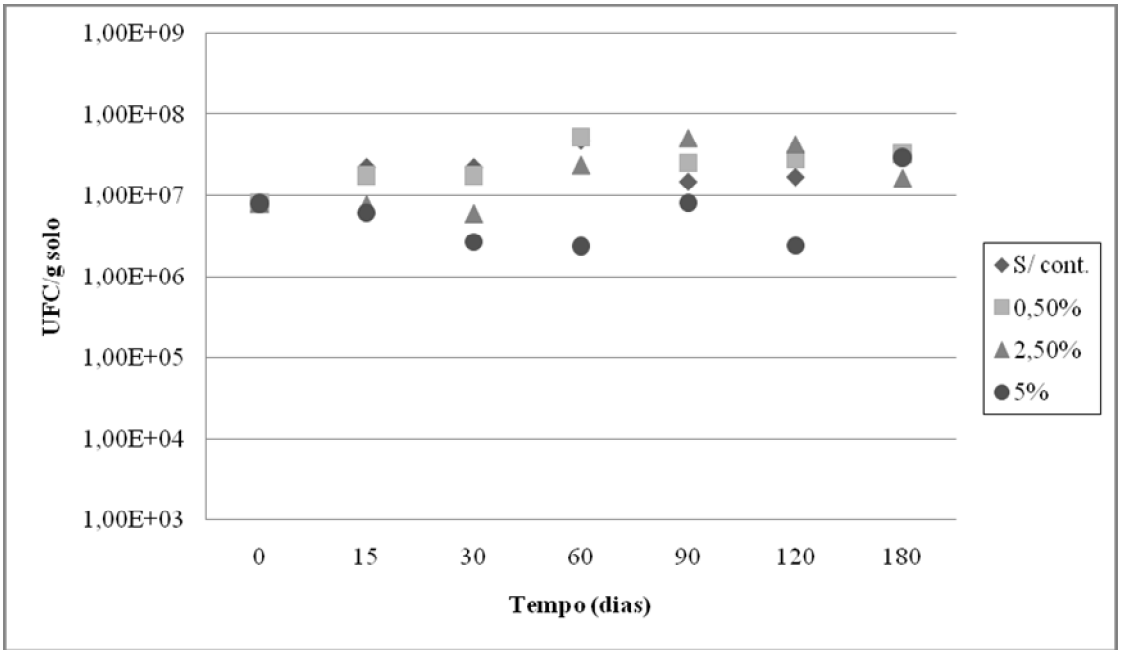


Figura 18: Gráfico relativo à quantificação dos microrganismos heterotróficos totais no Sistema 1 ao longo do tempo.

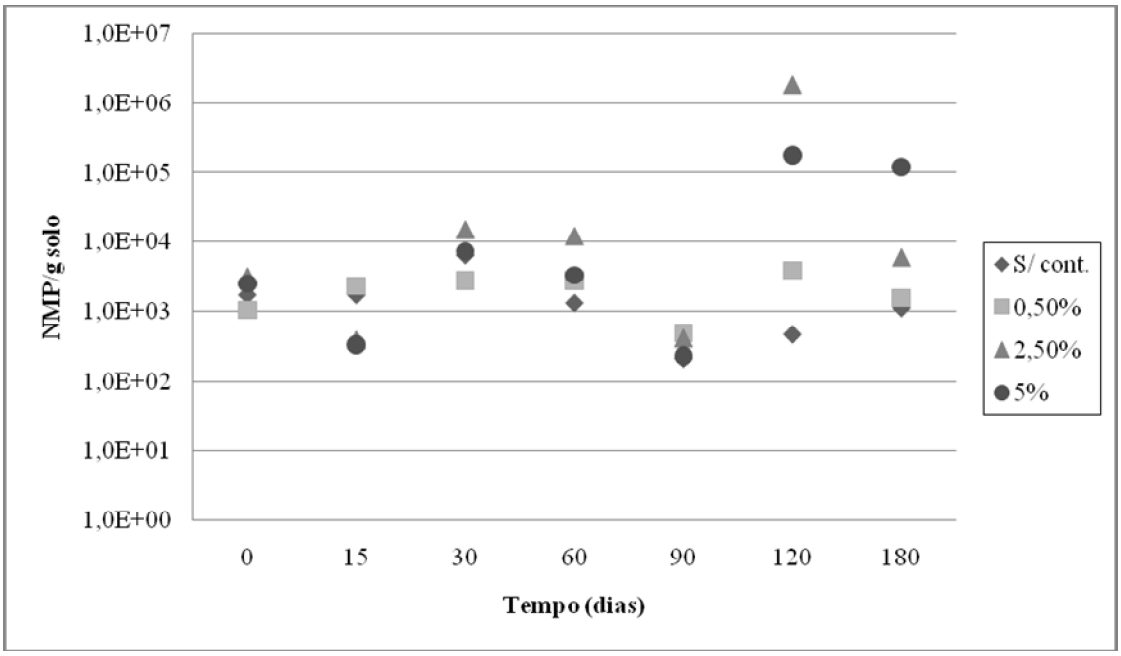


Figura 19: Gráfico relativo à quantificação dos microrganismos degradadores de óleo no Sistema 1 ao longo do tempo.

Através da Figura 18, percebe-se que não houve variação significativa na população de microrganismos heterotróficos totais, já que para todas as concentrações de óleo testadas, a densidade microbiana ficou em torno de 10^7 UFC/g solo, variando de 10^6 a 10^8 UFC/g de solo.

O mesmo não aconteceu com a população de microrganismos degradadores (Figura 19), onde ocorreu significativa variação, principalmente entre 90 e 120 dias de ensaio. Em particular, para a condição de 2,5% de contaminação, foi verificado um Esta queda, possivelmente, está associada a um decréscimo na principal fonte de carbono neste solo (Figura 20, a seguir). A partir do momento que a concentração dos HTP no solo contaminado inicialmente a 2,5% atinge níveis mais baixos, a concentração dos microrganismos hidrocarbonoclásticos se aproxima dos valores do solo controle e contaminado inicialmente a 0,5% (que já estava com valores de HTP bastante reduzidos). Por outro lado, a concentração dos HTP no solo contaminado a 5% encontra-se em determinado nível o qual permite que os degradadores de óleo se mantenham em torno de 10^5 NMP/g de solo.

5.2.2 Análise dos HTP nos sistemas

Nas Figuras 20 e 21 são apresentados os gráficos relativos ao acompanhamento da concentração dos HTP (%), analisada no Infracal, nos Sistemas 1 e 2, respectivamente.

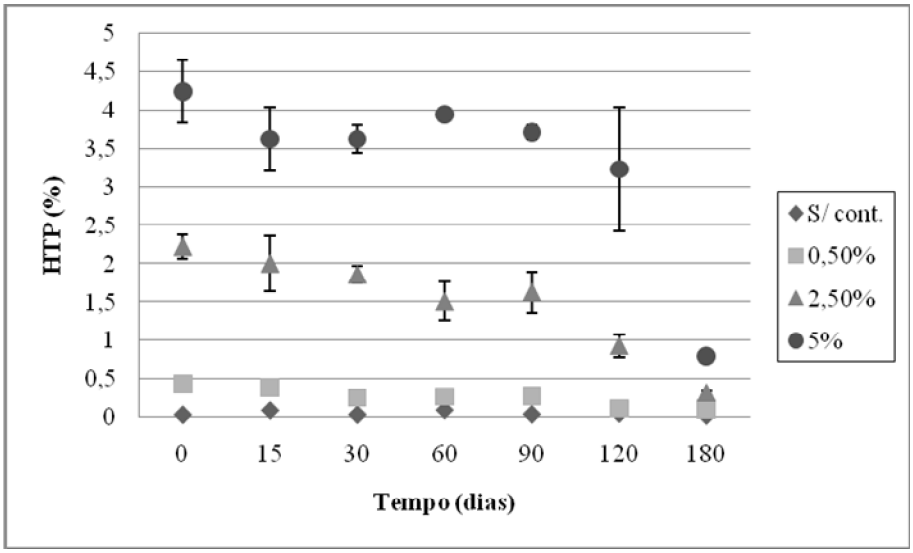


Figura 20: Gráfico relativo à da concentração dos HTP (remoção total) no Sistema 1 ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

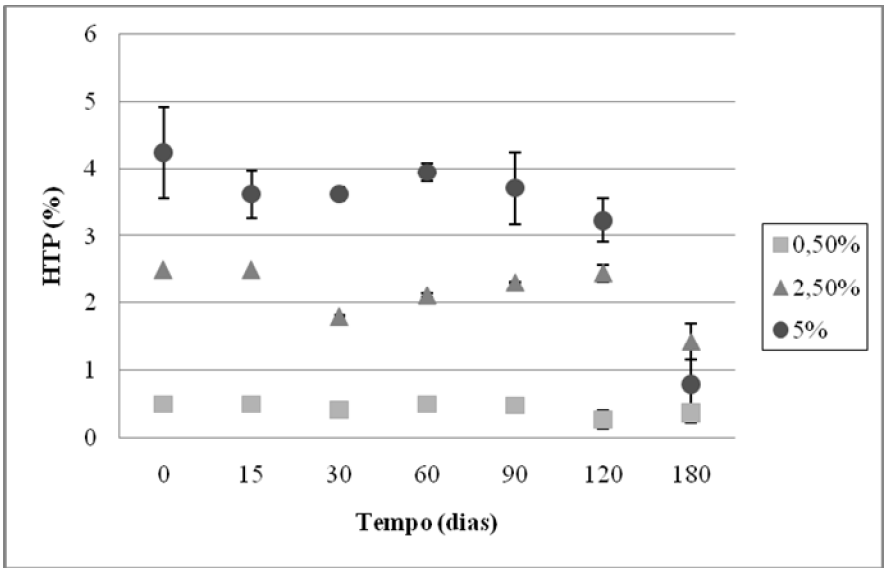


Figura 21: Gráfico relativo à concentração dos HTP (remoção total) no Sistema 2 ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

Analisando a Figura 20, é possível verificar que a degradação dos HTP, no Sistema 1, é significativamente mais intensa nos últimos 2 meses de ensaios para todos os teores de

contaminação, provavelmente devido a efetiva adaptação da microbiota nativa à presença do contaminante.

De forma a contribuir na caracterização das condições ambientais as quais os sistemas de ANM foram submetidos, a pluviosidade na região de estudo foi avaliada ao longo do tempo de experimento, como mostra o gráfico da Figura 22. Os dados correspondem às chuvas ocorridas no período de Junho a Dezembro de 2008 na estação "Ilha do Governador-RJ", localizada na Ilha do Governador (estação mais próxima à Ilha do Fundão) do Programa "Alerta Rio", da Fundação Instituto de Geotécnica do Município do Rio de Janeiro (Geo – Rio).

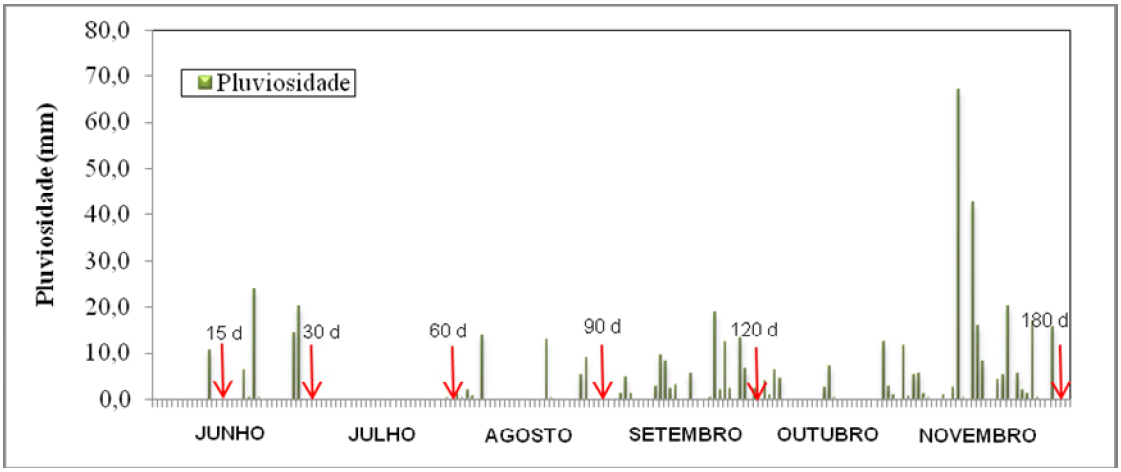


Figura 22: Gráfico indicando a pluviosidade ao longo do tempo (meses) na estação "Ilha do Governador – RJ" da Geo - Rio. Fonte: http://www2.rio.rj.gov.br/georio/site/alerta/download.htm

Verifica-se que tanto os resultados da quantificação microbiana, bem como os de remoção dos HTP no Sistema 1 e 2, estão associados aos valores de pluviosidade. Nos períodos mais secos (três primeiros meses de experimento), observa-se pouca remoção dos HTP, assim como pouca variação dos microrganismos degradadores de óleo. A partir dos 90

dias, com aumento do volume de chuvas, verifica-se um aumento dos degradadores de óleo, especialmente nos solos contaminados a 2,5% e 5%, relacionando –se com uma grande remoção dos HTP.

Sabe-se que a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos em solo depende de diversos fatores, como temperatura, pressão, processos de transferência de massa do contaminante (dentre outros) ao longo do tempo, que irão determinar o quanto do composto estará disponível para biodegradação. Durante o processo de atenuação natural, o contaminante fica sujeito a todos esses fatores diretamente, sem qualquer influência externa, sendo um bom modelo para se estudar a biodisponibilidade.

No Sistema 1, a degradação dos HTP foi avaliada em conjunto com parâmetros biológicos, como a quantificação dos microrganismos heterotróficos totais e dos degradadores de óleo cru (hidrocarbonoclásticos). Porém, a remoção dos HTP nesse sistema (Figura 20) indicou não apenas o que foi degradado biologicamente, mas também o que foi perdido através de processos abióticos.

Em tese, a quantificação do que foi removido biologicamente no Sistema 1 corresponde à fração biodisponível ao longo de 6 meses de tratamento. Então, para que fosse possível avaliar apenas o que foi biorremediado no Sistema 1, ou seja, quanto de óleo cru foi degradado por processos biológicos, era necessário descontar toda a fração de óleo perdida através de fatores abióticos.

Portanto, montou-se um sistema semelhante (Sistema 2), sujeito aos mesmos intempéries que o Sistema 1, exceto pelo fato de que o solo foi esterilizado (e assim mantido ao longo do tempo de experimento), para que se pudesse medir somente as perdas abióticas (Figura 21). A partir dos resultados obtidos (e apresentados nas Figuras 20 e 21) foi possível calcular a remoção dos HTP apenas por processo biológico (Remoção total dos HTP no

Sistema 1 – Perdas abióticas no Sistema 2), descontando-se as perdas abióticas (Remoção dos HTP no Sistema 2), como mostra a Tabela 10.

Tabela 10: Remoção dos HTP dos solos contaminados do Sistema 1 após 180 dias.

Teor de óleo no solo (%)	Remoção total (%)	Perda abiótica (%)	Remoção biológica (%)
0,5%	76,35	27,05%	49,3%
2,5%	85,54	43,04%	42,5%
5%	81,22	29,02%	52,2%

Como resultado, observou-se, ao final de 180 dias de experimento, uma alta biodegradação dos HTP, com remoção de 49,3% para o solo contaminado a 0,5%, 42,5% no solo a 2,5% e 52,2% no solo a 5% (Tabela 10). Esta elevada redução da concentração de HTP após seis meses de ANM, para todos os teores de contaminação simulados no Sistema 1, demonstram que os microrganismos nativos são capazes de biodegradar de forma satisfatória o contaminante, indicando que os mesmos utilizaram parte do carbono do petróleo como fonte de energia.

Os valores de remoção biológica também se correlacionam com a variação dos microrganismos degradadores de óleo ao longo do tempo. No solo contaminado a 2,5%, entre 90 e 120 dias, a remoção biológica foi de 42,72%, enquanto as perdas abióticas não foram significativas, contribuindo para um aumento na concentração desses organismos no solo. Entre 120 dias e 180 dias, a remoção total de HTP no Sistema 1 foi de 65,70%, porém desse total 41,92% foram de perdas abióticas, o que justifica uma queda na concentração dos microrganismos, associada também ao baixo teor de óleo presente no solo. Por outro lado, no solo contaminado a 5%, entre 120 e 180 dias, a remoção biológica foi de 64,41%. Associada à disponibilidade do óleo no solo como fonte de carbono, a microbiota hidrocarbonoclástica

presente no referido solo se mantém em torno de 10^5 NMP/g de solo no solo contaminado a 5%.

Conforme mostra a Tabela 10, a remoção abiótica encontrada foi bastante elevada, sendo de 27,05% no solo contaminado a 0,5%; 43,04% no solo contaminado a 2,5% e 29,02% no solo contaminado a 5%. Na literatura, os percentuais de perdas abióticas dos HTP em solo citados variam muito, entre 10,5 a 44%, dependendo do tipo de solo e tempo do processo de remediação (FRANCO *et al.*, 2004; LI *et al*. 2007; ABU e DIKE, 2008). Sabe – se, atualmente, que a remoção de óleo por esses processos está intimamente relacionada com as propriedades do solo e do contaminante. Por exemplo, solos com teores reduzidos de matéria orgânica, como o solo utilizado nesta dissertação, parecem absorver menos os componentes do petróleo, contribuindo, possivelmente, para um aumento do montante dissipado por fatores abióticos (FRANCO *et al*., 2004).

A pluviosidade, da mesma forma, pode ser um dos motivos para uma alta perda abiótica nos sistemas experimentais de ANM. Observa-se que tanto no Sistema 1, quanto no Sistema 2, após 90 dias de experimento, houve uma queda na concentração dos HTP. Nesse mesmo período, o volume de chuvas aumentou intensamente na região, o que poderia ter contribuído não apenas para um aumento dos microrganismos degradadores de óleo, mas também uma remoção do óleo nos dois sistemas por percolação.

Em conformidade, Dror e colaboradores (2002) afirmam que o destino do óleo em solos, muitas vezes, é controlado pela lixiviação, determinada por parâmetros como a quantidade de água que entra no sistema e sua taxa de infiltração. De fato, pôde-se observar, visualmente, a presença de um líquido escuro recolhido nas caixas coletoras dos dois sistemas após um intenso período de chuvas, como mostra a Figura 23.

Ademais, solos submetidos a flutuações em seu conteúdo de água, adicionalmente, sofrem influência de uma variável muito importante, denominada potencial redox. Este, por sua vez, é controlado pela concentração de O_2 na fase gasosa e líquida e de H_2O na fase líquida, que modificam as formas solúveis e insolúveis de minerais presentes na superfície de partículas do solo, que estão envolvidos diretamente nas reações de adsorção com os poluentes (RUGGIERO *et al.*, 2002).

A remoção biológica foi o processo predominante na ANM do Sistema 1 após 180 dias, confirmando outros estudos (FRANCO *et al*., 2004; LI *et al*., 2007; ABU e DIKE, 2008), com exceção do solo contaminado a 2,5%, onde as perdas abióticas foram próximas aos valores de degradação biológica. De acordo com Smets e Pritchard (2003), em aproximadamente todas as situações, a degradação através de processos biológicos é o principal responsável pela remediação de contaminantes orgânicos e inorgânicos na ANM.

É importante destacar que a presença de plantas no Sistema 1 formou uma barreira para a chuva e radiação solar que incidiam diretamente no solo contaminado. Desse modo, elas podem ter reduzido o percentual de perdas abióticas por foto-oxidação, percolação etc nesse sistema. Uma hipótese pode ser que os valores de remoção dos HTP apenas por processos biológicos podem estar sendo subestimados, visto que os fatores abióticos podem não ter ocorrido da mesma forma nos dois sistemas.

Figura 23: Imagem de uma caixa colhetora do Sistema 2, após um período de chuvas.

Ao final do experimento de ANM, a remoção do contaminante foi de 1040 mg/kg no solo contaminado a 0,5%, 3200 mg/kg no solo contaminado a 2,5% e 7930 mg/kg no solo contaminado a 5%. Em áreas contaminadas com valores de HTP superiores a 5000 mg/kg, a legislação holandesa (CETESB, 1999) sugere implementação de ações voltadas para a remediação, pois o nível de qualidade do solo é considerado inaceitável. Com exceção do solo contaminado inicialmente a 5%, os demais percentuais alcançaram valores plausíveis de remoção.

Em alguns casos, a atenuação natural monitorada sozinha pode não ser suficiente para a remediação de sítios contaminados em um tempo razoável de processo (MULLINGAN e YONG, 2004), sendo necessária a aplicação de outras tecnologias em conjunto para reduzir o risco ambiental. No entanto, o presente trabalho mostrou que a remoção total do contaminante no Sistema 1 foi de 76,35% no solo contaminado a 0,5%, 85,54% no solo contaminado a 2,5% e 81,22% no solo contaminado a 5% após seis meses de ANM. Sabe-se que esta

metodologia está associada a longos períodos de degradação e para locais que não necessitam de intervenção imediata. Dessa forma, a ANM torna-se uma ótima medida de remediação.

Mesmo com uma alta remoção dos HTP no sistema de ANM, uma fração residual de óleo, não biodisponível, permaneceu no solo nos três percentuais adotados após 180 dias de experimento. Entretanto, alguns estudos mostram que uma fração residual do poluente costuma remanescer no solo mesmo quando condições ótimas de biodegradação são fornecidas pela técnica de remediação adotada (RIZZO, 2008).

Conforme citado por Sarkar e colaboradores (2005), o sucesso da biorremediação está altamente relacionado com a população nativa degradadora de óleo cru, o que faz com que um determinado tipo de solo seja ou não candidato ao processo de ANM. Logo, a variação da população microbiana degradadora de óleo cru observada, associada aos percentuais de remoção biológica após 6 meses, indicam que a atenuação natural monitorada (ANM) pode vir a ser uma alternativa para o tratamento do referido solo. Em contraste com outras tecnologias de tratamento biológico, como biorreatores, biopilhas e landfarming, a ANM proporciona benefícios relacionados, especialmente, ao custo do processo.

A análise através do aparelho Infracal forneceu dados em relação à quantificação dos HTP, porém não indicou quais tipos de hidrocarbonetos foram degradados e que ainda remanescem no solo. Apesar do foco do trabalho ter sido os hidrocarbonetos totais, é muito importante que estudos futuros sejam realizados para se identificar hidrocarbonetos específicos (como os HPA´s) que permaneceram na fração residual, para fins de critérios legais e avaliação de risco ambiental em função da toxicidade que estas substâncias podem oferecer.

5.3 **Avaliação da fração biodisponível com HPCD–ß**

Os primeiros estudos envolvendo a extração com HPCD–ß para se avaliar a fração biodisponível de contaminantes orgânicos tiveram como foco os HPA´s (SEMPLE *et al*., 2007). Posteriormente, a aplicação desta metodologia estendeu - se, incluindo compostos alifáticos (STROUD *et al*., 2008), e mais recentemente, HTP (DIPLOCK *et al*., 2009).

Uma vez que as condições de extração precisam ser específicas para o solo e óleo utilizados nesta dissertação, testou-se, primeiramente, diferentes concentrações da solução de HPCD–ß no solo com os três teores de óleo cru adotados (0,5%, 2,5% e 5% m/m).

Durante esse teste, o objetivo era quantificar, diretamente, o teor de óleo extraído pela HPCD–ß. No entanto, a solução de HPCD–ß é aquosa, portanto, inviável de ser analisada através do método analítico escolhido para análise dos HTP - o infracal - que utiliza o solvente orgânico n-hexano.

Logo, era necessário realizar um processo de separação do óleo da solução de HPCD–ß, para que ele pudesse ser diluído, posteriormente, no solvente adequado e ser analisado no infracal. O método de separação escolhido foi a Extração Líquido – Líquido (ELL), que utiliza a propriedade de miscibilidade entre líquidos para realizar separações, e que já havia sido realizada em outro trabalho (SABATÉ *et al.*, 2006).

Todavia, foram constatadas diversas perdas durante o procedimento de ELL, ora pelo uso do funil de separação, ora pelas sucessivas trocas de vidraria utilizadas. Dessa maneira, tornou-se inviável a utilização desta metodologia para quantificação do teor de óleo extraído pela HPCD–ß.

A alternativa encontrada, utilizada também por outros autores (SEMPLE *et al*., 2006; DIPLOCK *et al*., 2009), foi calcular o teor de óleo extraído através da diferença entre o valor total de HTP inicial presente no solo (t=0) e a fração residual remanescente no solo após a extração com HPCD–ß também no tempo inicial, utilizando a extração convencional com n-hexano no ultra – som. Com base nos dados das Tabelas 11 e 12 foi possível fazer o cálculo do percentual que foi extraído pela HPCD–ß, conforme a Tabela 13.

Tabela 11: Dados da extração exaustiva pelo método convencional com n-hexano no ultrassom (concentração total), no tempo inicial experimental (t=0), para cálculo da fração biodisponível prevista pela HPCD–ß.

Extração exaustiva no ultra - som (mg/g)			
	0,5%	**2,5%**	**5%**
Média	4,67	23,16	43,70
Desvio padrão	0,115	0,677	1,618

Tabela 12: Dados da fração residual quantificada pelo método convencional com n-hexano no ultrassom após o uso da HPCD- ß, no tempo inicial experimental (t=0), para cálculo da fração biodisponível prevista pela HPCD–ß.

Fração residual após extração com HPCD - B (mg/g)			
30 mM			
	0,5%	**2,5%**	**5%**
Média	4,66	23,06	43,58
Desvio Padrão	0,133	0,177	1,089
60 mM			
	0,5%	**2,5%**	**5%**
Média	3,96	21,36	43,58
Desvio Padrão	0,067	0,315	1,089
90 mM			
	0,5%	**2,5%**	**5%**
Média	3,84	18,71	28,37
Desvio Padrão	0,284	0,297	1,250
120 mM			
	0,5%	**2,5%**	**5%**
Média	3,84	18,71	28,39
Desvio Padrão	0,113	0,015	1,549
150 mM			
	0,5%	**2,5%**	**5%**
Média	3,83	18,75	28,37
Desvio Padrão	0,042	0,057	0,078

Tabela 13: Fração biodisponível prevista pela HPCD – B (%) calculada pela diferença entre os dados das Tabelas 11 e 12.

Fração biodisponível prevista pela HPCD - B (%)		
30 mM		
0,5%	**2,5%**	**5%**
0	0,43	0,27
60 mM		
0,5%	**2,5%**	**5%**
15,74	7,77	0,27
90 mM		
0,5%	**2,5%**	**5%**
18,30	19,21	35,08
120 mM		
0,5%	**2,5%**	**5%**
18,30	19,21	35,06
150 mM		
0,5%	**2,5%**	**5%**
18,51	19,04	35,10

O gráfico da Figura 24 mostra o percentual de HTP extraído (%) após a extração com as cinco concentrações diferentes de solução de HPCD–ß (30, 60, 90, 120 e 150 mM) com os três teores de óleo cru adotados para contaminação no solo.

Foram realizados, paralelamente, testes - controle com as cinco diferentes soluções de HPCD–ß com solo não contaminado. Os resultados obtidos indicaram ausência de HTP na fração de óleo extraída.

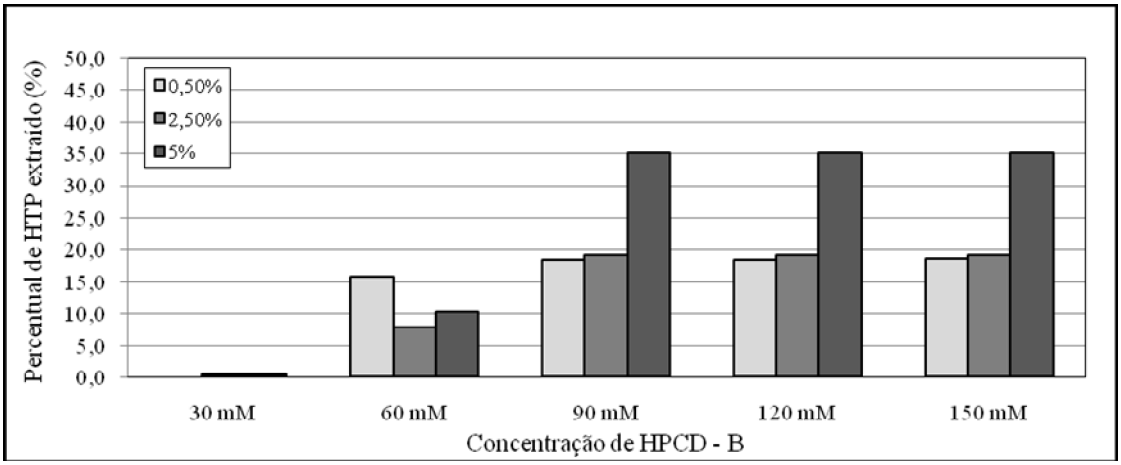


Figura 24: Gráfico indicando o percentual de HTP extraídos pela solução de HPCD- ß em diferentes concentrações.

Foi verificado que nas concentrações da solução de HPCD–ß superiores a 90 mM, a fração de óleo extraída se mantinha constante. Este fato, provavelmente, está associado à saturação dos complexos de inclusão da HPCD–ß. A extração com a HPCD- ß foi feita de forma que as moléculas ficassem em excesso, para garantir que todas as moléculas do contaminante dessorvidas ficassem encapsuladas no interior da molécula, como recomendada por Reid e colaboradores (2000). Entretanto, sabe – se que a cavidade formada por estes complexos suportam um determinado tamanho de moléculas hospedeiras, e os hidrocarbonetos maiores, presentes no petróleo, poderiam ser grandes demais para serem incluídos nas cavidades da ciclodextrina e, consequentemente, permaneceriam retidos no solo após a extração (SABATÉ *et al.*, 2006).

Visto que em concentrações superiores a 90 mM o teor de óleo extraído permaneceu constante, concluiu-se que a fração biodisponível prevista pela HPCD–ß seria de aproximadamente 18,3% dos HTP no solo contaminado a 0,5%, 19,2% dos HTP no solo contaminado a 2,5% e 35,0% dos HTP no solo contaminado a 5%, em relação ao método de

extração dos HTP com n – hexano no ultrassom. Utilizou-se, portanto, esses valores para comparação com os dados de biodegradação no sistema de ANM.

A partir dos resultados obtidos e apresentados na Tabela 14, observou-se que os valores de remoção biológica do sistema de ANM, após 180 dias, foram superiores aos previstos pela extração com HPCD–ß nos três teores de óleo cru adotados (0,5%, 2,5% e 5% m/m).

Tabela 14: Comparação entre os valores de remoção biológica observada no sistema de ANM (%) a fração biodisponível prevista pela HPCD–ß.

Teor de HTP inicial (%)	Remoção biológica observada no sistema de ANM (%) após 180 dias	Fração biodisponível prevista pela HPCD–ß (%) no tempo inicial
0,5	49,3	18,3
2,5	42,6	19,2
5	51,3	35,0

Dessa forma, a extração com HPCD–ß parece não ter sido capaz de prever, nas condições experimentais realizadas, os hidrocarbonetos totais do petróleo biodisponíveis no solo contaminado. Os microrganismos endógenos desse solo se mostraram capazes de remover, eficientemente, uma grande parte do óleo presente no solo. Portanto, superaram o que inicialmente havia sido previsto pela extração com HPCD–ß.

Em um trabalho recente, Stroud e colaboradores (2009) sugeriram que a HPCD–ß fosse usada para avaliar a biodisponibilidade de HPA´s de baixo peso molecular, como fenantreno, e a HPCD-a, uma ciclodextrina de cavidade menor, para hidrocarbonetos maiores, como hexadecano, quando contaminado individualmente no solo.

No entanto, este mesmo grupo de pesquisadores verificou que na presença de múltiplos contaminantes (presença de outros hidrocarbonetos além daqueles - alvo), não foi

possível prever a fração biodisponível do hexadecano, mesmo com a HPCD- a. Isso mostra que quando a extração com as ciclodextrinas é realizada em solos com misturas complexas de poluentes, tais como o petróleo, a correlação entre a biodisponibilidade prevista e o método biológico é falha, em conformidade com os resultados obtidos no presente trabalho.

Ademais, o presente trabalho simulou em condições de campo, o efeito da ANM na biodisponibilidade de hidrocarbonetos totais do petróleo, diferentemente dos estudos nos quais a HPCD–ß conseguiu prever a fração biodisponível do contaminante, que testaram condições ideais de biorremediação em laboratório. Adicionalmente, ainda que os sistemas experimentais de ANM possuam diferenças em relação a uma área realmente impactada (como a profundidade do solo, por exemplo), eles se mostraram um modelo interessante para avaliação da dinâmica de remoção do óleo, comparando-se as perdas abióticas com a biodegradação ao longo do tempo, e alguns fatores que influenciam estes processos, tais como a pluviosidade.

Após o desenvolvimento experimental desta dissertação de mestrado, foi publicado um trabalho, através do qual Diplock e colaboradores (2009) utilizaram diversas técnicas de monitoramento da biorremediação – respirometria, quantificação de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo, ensaios com biossensores e avaliação da fração biodisponível com HPCD–ß - para comparar a biorremediação em condições controladas em laboratório com ANM em campo, com objetivo de verificar qual dessas técnicas poderia prever os limites do processo de biorremediação *in situ*. Após analisar todos esses parâmetros em mais de 20 tipos diferentes de solo e óleo, constatou-se que nenhuma dessas técnicas conseguiu prever tais limites da biorremediação, muitas vezes superestimando a taxa de degradação dos HTP que foi observada em campo. Verificou-se, adicionalmente, que quando a concentração dos HTP no solo era superior a 10000 mg/kg (1%), a extração com HPCD–ß

falhava em prever a degradação de HTP removida por ANM em campo, corroborando os resultados encontrados nesta dissertação de mestrado.

Hoje, acredita-se que ciclodextrinas maiores, como a gama (y), poderiam prever melhor a fração biodisponível de HPA´s com quatro anéis ou mais, para garantir a eficiência de extração e inclusão de moléculas maiores (STROUD *et al.*, 2009; STOKES *et al.*, 2005; DOICK *et al.*, 2006). Esta variedade poderia ser testada, em estudos futuros, em solos contaminados com óleo cru. Porém, deve-se avaliar o custo – benefício deste método, visto que é um reagente de custo muito mais elevado. Entre os três homólogos da Hidroxipropil – ciclodextrina (a ,ß e y), a HPCD- ß é a de menor custo.

Saber quais hidrocarbonetos estão oclusos nos complexos com a ciclodextrina em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo pode ser de grande utilidade para estudos posteriores, especialmente em casos de solos contaminados com misturas complexas. Essa incerteza pode ser esclarecida através de uma análise denominada HTP Fracionado, sendo realizada, inicialmente, uma análise dos HTP por CG/DIC para determinar a quantidade de amostra a ser fracionada e, em seguida, fracionamento do extrato em alifáticos e aromáticos que, nesta fase, são quantificados por Purge and Trap acoplado em um detector de espectrometria de massas. Dessa forma, é possível identificar os hidrocarbonetos específicos que estão sendo extraídos com a HPCD- ß.

Contudo, os resultados obtidos apenas em relação aos HTP já fornecem algumas indicações interessantes, especialmente em relação ao uso da HPCD–ß para previsão da fração biodisponível do petróleo. Como citado anteriormente, os critérios de avaliação de sítios contaminados com petróleo são baseados, principalmente, em termos do conteúdo dos HTP (GOGOI *et al.*, 2003). E são justamente esses critérios que vão definir a estratégia de remediação.

Um sítio onde o contaminante está bastante biodisponível é, certamente, adequado para biorremediação; por outro lado, nos locais onde a maior parte poluente não está biodisponível, a biodegradação será, possivelmente, menos intensa, mas pode oferecer menos riscos para saúde da população e para o ambiente. Por essa razão, a utilização da HPCD–ß para previsão da fração biodisponível de HTP não pode ser descartada completamente, pois os tipos de solo e óleo variam de uma região para outra. Assim, o que pode não ser adequado para um determinado tipo de solo/óleo, pode ser para outro.

No entanto, uma das premissas de um bom método químico para avaliação da biodisponibilidade é conseguir prever a fração biodisponível do contaminante (e até onde uma área será biorremediada) independentemente do solo e óleo utilizados. Além disso, esse método deve ter repetibilidade e, principalmente, reprodutibilidade (SEMPLE, 2004). Esse fato é de extrema importância para sua padronização e futura validação nos órgãos regulatórios competentes.

5.4 **Ensaios complementares**

5.4.1 Crescimento de Plantas no Sistema 1

Como citado no item 4.6.1, após 30 dias, foi observado um intenso crescimento de plantas no Sistema 1, que levantou a curiosidade quanto à identificação de possíveis espécies fitorremediadoras.

Esse comportamento, no entanto, não foi observado no Sistema 2 devido ao processo de esterilização ao qual as amostras de solo foram submetidas que, além da eliminação da microbiota nativa, foi responsável pela inviabilidade das sementes originalmente presentes no solo.

Algumas plantas puderam ser identificadas prontamente e, verificou-se, inquestionavelmente, que se tratavam de ervas daninhas (LORENZI, 2000). Outras só foram identificadas posteriormente, no momento da floração, visto que esse órgão é um dos mais importantes para fins taxonômicos. O meio de classificação desses vegetais foi o Sistema Binário de Linnaeu (LORENZI, 2000).

As sementes das plantas que se desenvolveram no Sistema 1, provavelmente, estavam presentes no solo na ocasião que foi coletado em Sergipe. Como pode ser observado nas Figuras 25 e 26, no momento da coleta, havia muitas plantas do tipo herbáceo e arbustivo presentes no local. O desenvolvimento das plantas ao longo do tempo, no Sistema 1, pode ser visualizado na Figura 27 (A, B e C).

Figura 25: Funcionários fazendo a coleta do solo em Sergipe.

Figura 26: Presença de plantas daninhas no local de retirada do solo.

Figura 27: Fotos do Sistema 1 nos meses de Junho, Outubro e Dezembro de 2008 e os respectivos desenvolvimentos das plantas.

Segundo Fisher (1973), planta daninha pode ser definida como todo vegetal cujas vantagens não têm sido ainda descobertas ou como aquele que interfere com os objetivos do homem. Ashton e Mônaco (1991), por outro lado, definem planta daninha como sendo a

planta que cresce onde não é desejada. Assim, uma planta de algodão, por exemplo, é considerada planta daninha num plantio de mamona[4].

É sabido que muitas plantas daninhas têm capacidade de degradar contaminantes orgânicos (GERHARDT *et al.*, 2009). Ademais, estes vegetais podem germinar, crescer, desenvolver-se e reproduzir em condições ambientais pouco favoráveis, como em estresse hídrico, umidade excessiva, temperaturas pouco propícias, fertilidade desfavorável, elevada salinidade, acidez ou alcalinidade (EMBRAPA, 2000).

Conforme ZHANG e colaboradores (2006), enquanto algumas ervas daninhas perecem, outras ainda conseguem florescer mesmo quando os solos estão contaminados com grandes quantidades de petróleo, como ocorreu com as plantas que cresceram no Sistema 1. Isso as torna extremamente interessantes na utilização em ambientes altamente impactados.

Das oito plantas que se desenvolveram nos solos contaminados, apenas em três foi possível chegar à classificação taxonômica de espécie, como mostra a Tabela 15. Pôde-se identificar, ademais, três ao nível de gênero, uma ao nível de família e, por fim, uma ao de subfamília.

Tabela 15: Espécies vegetais identificadas ao longo do processo de ANM no Sistema 1.

Espécime	Espécie	Nível de classificação taxonômica	Família
1	Não identificada	Subfamília - *Papilionoideae*	*Leguminosae*
2	*Leucaena* sp	Gênero - *Leucaena*	*Leguminosae*
3	*Portulaca oleracea*	Espécie	*Portulacaceae*
4	*Heliotropium indicatum*	Espécie	*Boraginaceae*
5	*Ipomoea* sp	Gênero - *Ipomoea*	*Convolvulaceae*
6	Não identificada	*Gramineae* – família	*Gramineae*
7	*Solanum sp*	Gênero - *Solanum*	*Solanaceae*
8	*Jatropha curcas*	Espécie	*Euphorbiaceae*

[4] Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/plantasdaninhas.htm. Acesso em 31 de maio de 2009.

Duas delas chamaram atenção, pois se desenvolveram nas três concentrações de óleo. A número 1, da subfamília *Papilionoideae* (Figura 28), e a número 4, *Heliotropium indicatum* (Figura 29).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 16, a planta da subfamília *Papilionoideae* possui certa resistência à presença de óleo no solo, pois cresceu em solos com uma concentração relativamente alta dos HTP: 0,4% no solo contaminado inicialmente a 0,5%; 1,5% no solo contaminado inicialmente a 2,5% e 3,5% no solo contaminado inicialmente a 5%. Portanto, é de fundamental importância que, futuramente, a identificação em nível de espécie seja realizada.

Tabela 16: Ocorrência das duas espécies dominantes ao longo da ANM no sistema 1, correlacionando o teor de óleo presente no momento do desenvolvimento das mesmas.

	Espécie da subfamília *Papilionoideae*		***Heliotropium indicatum***	
Contaminação inicial do solo (%)	Ocorrência (dias de experimento)	HTP (%)	Ocorrência (dias de experimento)	HTP (%)
Solo sem contaminação	30 dias	-	-	-
0,5%	30 dias	0,4%	60 dias	0,35%
2,5%	60 dias	1,5%	120 dias	0,9%
5%	120 dias	3,5%	180 dias	0,8%

Figura 28: Fotos da espécie da subfamília Papilionoideae, no Sistema 1. A primeira imagem, à esquerda, mostra o caule com as folhas; a segunda imagem, à direita, mostra o detalhe da flor.

A espécie *Heliotropium indicatum* (Figura 29), igualmente, cresceu nas caixas contendo as três diferentes concentrações do contaminante, não crescendo apenas na caixa – controle (sem contaminação). Porém, só começou a se desenvolver quando as concentrações de óleo no solo já estavam reduzidas: 0,35% no solo contaminado inicialmente a 0,5%; 0,9% no solo inicialmente contaminado a 2,5% e 0,8% no solo contaminado inicialmente a 5%. Os dados sugerem, preliminarmente, que esta planta pode estar indicando boa qualidade do solo, pois se desenvolveu nos solos justamente quando a concentração dos HTP já estava abaixo de 1%. Especialmente para o solo contaminado inicialmente a 0,5% de óleo, a planta se desenvolveu somente quando o teor era de 0,35%.

Figura 29: Fotos da espécie *Heliotropium indicatum* no Sistema 1.

Essas descobertas contribuem, mesmo que preliminarmente, para os conhecimentos relativos à fitorremediação. Até o presente momento, para nosso conhecimento, ainda não foi publicado qualquer trabalho que utilize tanto plantas da subfamília Papilionoideae, quanto a espécie *Heliotropium indicatum* em estudos de biorremediação.

Embora os demais vegetais identificados só tenham crescido em solo não contaminado ou no solo contaminado a 0,5%, quando o teor de óleo já estava muito baixo, buscou-se

trabalhos em que elas fossem utilizadas como objetos de estudos de contaminação de solo e remediação.

Verificou –se, por um lado, que *Jatropha curcas* (Figura 30) é utilizada em estudos de fitorremediação de metais, como Arsênio, Cromo e Zinco (KUMAR *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2009), além de estar envolvida na produção de biodiesel (SAHOO e DAS, 2009).

Figura 30: Fotos da espécie *Jatropha curcas* no Sistema 1. A primeira imagem, à esquerda, mostra o caule com as folhas; a segunda imagem, à direita, mostra o detalhe da flor.

Por outro lado, uma espécie do gênero *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*) tem habilidade de acumular altas concentrações de Arsênio, podendo tolerar altas quantidades deste mesmo metal no solo (MELO, 2006). Além disso, tem sido utilizada em revegetação de áreas contaminadas (LINS *et al.*, 2006).

Ademais, gramíneas, como as encontradas no Sistema 1, têm sido o principal foco nos estudos de fitorremediação de solos contaminados com HPA´s (MUELLER e SHANN, 2006).

Figura 31: Fotos da espécie *Leucaena* sp no Sistema 1. A primeira imagem, à esquerda, mostra o caule com as folhas; a segunda imagem, à direita, mostra o detalhe da flor.

Figura 32: Fotos da espécie *de Gramineae* no Sistema 1.

É preciso frisar que a origem das plantas é um fator importante a ser levado em consideração em estudos de fitorremediação (ANDRADE *et al.*, 2007). Como citado anteriormente, o Sergipe é o Estado com a segunda maior reserva de petróleo em terra do Brasil (ANEEL, 2008), tendo altos riscos de sofrer vazamentos de óleo em solo. Por serem adaptadas às condições climáticas particulares desta região, assim como às características específicas do solo, o potencial remediador destas plantas precisa ser avaliado profundamente.

Convém lembrar que não foi realizado nenhum controle das condições ambientais, e toda água que abastecia o sistema era proveniente de chuvas. Outrossim, as plantas passaram

por períodos de seca, como mostra o gráfico da Figura 22, e exposição solar direta o dia todo. Além disso, não se pode garantir que todas as caixas continham sementes de todas as espécies de plantas, apesar da homogeneização do solo ter sido realizado antes da contaminação. Portanto, não se pode descartar o papel desses vegetais no processo de remediação só porque eles cresceram apenas quando o teor de óleo já estava reduzido, ou porque deixaram de crescer no solo com os teores mais altos de óleo.

Segundo Gerhardt e colaboradores (2009), uma das maiores dificuldades nos estudos de fitorremediação é encontrar plantas tolerantes aos contaminantes, pois estes limitam o catabolismo. Além disso, fatores de estresse encontrados em campo (e não no laboratório), como variações na temperatura, nutrientes e precipitação, podem diminuir ou impedir o crescimento da planta em campo, refletindo num resultado negativo na fitorremediação.

As plantas identificadas neste trabalho podem superar essas limitações, visto que cresceram em condições adversas (períodos de seca, radiação solar direta) sem nenhum subsídio de nutrientes ou água. Por apresentarem elevado grau de adaptação, podem sobreviver muito mais facilmente.

Os vegetais identificados nesta dissertação podem não estar envolvidos diretamente na degradação do óleo, mas ter contribuído para isso. Alguns estudos demonstraram que determinadas plantas não exercem efeito na degradação de hidrocarbonetos (MUELLER e SHANN, 2006), esta sendo atribuída mais pela ação dos microrganismos do solo. Atualmente, é consenso que comunidades microbianas são maiores e mais ativas em solos com plantas versus solo sem plantas, pois sua rizosfera é, normalmente, enriquecida com organismos capazes de degradar hidrocarbonetos (BINET *et al.*, 2000).

Em conformidade, Zhang e colaboradores (2006) constataram que a rizosfera de ervas daninhas mitigaram o efeito tóxico de resíduos de óleo cru no crescimento e reprodução de

bactérias no solo. Além disso, as Unidades Formadoras de Colônias de bactérias heterotróficas totais em solos com rizosfera costuma ser significativamente maior do que naqueles sem rizosfera (ZHANG *et al.*, 2006).

Para averiguar a potencialidade dessas plantas na remediação do solo, ou até mesmo como bioindicadoras de qualidade, pesquisas aprofundadas devem ser feitas, utilizando - se condições climáticas controladas, bem como experimentos controle, que não foram realizados nesta dissertação, por não ser o objetivo inicial do estudo.

5.4.2 Identificação de microrganismos isolados do solo no Sistema 1.

Como citado no item 4.6.2, após quatro meses de ANM, foi observado na cultura de microrganismos degradadores de óleo cru, um tipo crescimento diferenciado dos meses anteriores nas caixas 0,5%B, 2,5%A e 5%B do Sistema 1 (Figura 17-A). Em função da queda da concentração de HTP nestas caixas em comparação com os meses anteriores, especialmente no solo contaminado a 5%, e um acentuado aumento na densidade dos degradadores de óleo cru durante esse período (Figura 19), isolou-se estes microrganismos para fins de identificação.

A análise dos dados de identificação por sequenciamento do DNA mostrou que algumas das espécies envolvidas na degradação do petróleo no solo se tratam, possivelmente, de actinobactérias, como indicado na Tabela 17. Actinomicetos são bactérias Gram - positivas, que ocorrem amplamente no solo, onde desempenham diversos papéis ecológicos (TRABULSI *et al.*, 2005).

Tabela 17: Identificação dos microrganismos isolados a partir do Sistema 1 durante o experimento de ANM na cultura de micro- organismos degradadores de petróleo.

Amostra	Identificação	Número de acesso	Similaridade (%)
AM 21	*Amycolatopsis* sp	FJ529703	93
	Amycolatopsis saalfeldensis	DQ792502	93
	Amycolatopsis nigrescens	DQ486888	93
AM 20	*Amycolatopsis saalfeldensis*	DQ792502	90
	Amycolatopsis sulphurea	AJ293756	90
AM2	*Arthrobacter* sp	AM689986	93
	Uncultured actinobacterium	EF682999	93
AM4	*Arthrobacter scleromae*	FM955866	95
	Arthrobacter sp	FJ517630	95

Em conformidade com os resultados obtidos, alguns estudos sugerem que actinomicetos Gram – positivos, pertencentes a grupos como *Micobactérias, Rhodococcus* e *Gordonia*, podem desempenhar um papel importante na mineralização de HPA´s e outros hidrocarbonetos (KASTNER *et al.*, 1994; JOHNSEN *et al.*, 2002; LARKIN *et al.*, 2005; ANTIZAR-LADISLAO *et al.*, 2008; MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2009).

Ademais, é sabido que actinomicetos compõem uma grande parte da microbiota da rizosfera de plantas diversas (ARAÚJO, 2000). Como as plantas já estavam presentes no solo no momento em que foi observado este crescimento diferenciado de actinomicetos, é possível que eles estejam associados à rizosfera dessas plantas. Desse modo, o conjunto dos vegetais, da rizosfera enriquecida com actinomicetos e das condições ambientais favoráveis podem ter contribuído para a alta remoção dos HTP no sistema de ANM como foi constatado.

De fato, Rizzo (2008) realizou um experimento semelhante de ANM utilizando o mesmo solo e óleo empregados neste trabalho. No entanto, a autora obteve apenas 20,24% de remoção dos HTP em solo contaminado inicialmente a 5% após 6 meses de teste. Além das diferentes condições ambientais em relação ao presente trabalho, por ter sido realizado em

outro período de tempo, não foi observado desenvolvimento de plantas, tampouco este tipo de crescimento na cultura microbiana dos degradadores de óleo.

Apesar de não ter sido possível avaliar o papel de cada espécie isoladamente na degradação dos HTP, o resultado encontrado sugere que estes organismos podem estar envolvidos na degradação dos HTP nos solos contaminados, corroborando outros estudos (KASTNER *et al.*, 1994; JOHNSEN *et al.*, 2002; LARKIN *et al.*, 2005; ANTIZAR-LADISLAO *et al.*, 2008; MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2009). Até o momento, para nosso conhecimento, não foi publicado nenhum trabalho que fizesse referência a essas espécies, especificamente, na degradação de hidrocarbonetos.

Ademais, em virtude do acentuado aumento na densidade dos degradadores de óleo cru no período de 120 dias, como mostra o gráfico da Figura 19, é possível que os actinomicetos componham a maior parte dos microrganismos degradadores de óleo cru presentes no solo.

Em vista dos resultados acima mencionados, esta dissertação pode contribuir um pouco mais sobre a biorremediação do petróleo, possivelmente associada a presença de "novos" microrganismos, ainda que necessários estudos adicionais. Para isso, as espécies isoladas estão armazenadas e mantidas no laboratório da CPMA/CETEM.

6 CONCLUSÕES

Investigação da biodisponibilidade dos HTP através de um método de extração química

- A partir de estudos na literatura, optou-se por testar a extração com HPCD- ß para previsão da fração biodisponível dos HTP em um sistema experimental de ANM.

- Verificou-se que nas concentrações da solução do extratante químico superiores a 90 mM, a fração de óleo extraída se manteve constante, em torno de 18,3% dos HTP no solo contaminado a 0,5%, 19,2% dos HTP no solo contaminado a 2,5% e 35,0% dos HTP no solo contaminado a 5%, sendo assim considerados como a fração biodisponível prevista pela HPCD–ß, em relação ao método convencional de extração dos HTP com n – hexano no ultrassom.

- Os valores de biodegradação no sistema de ANM, após 180 dias, foram superiores aos previstos pela extração com HPCD–ß nos três teores de óleo cru adotados (0,5%, 2,5% e 5% m/m). Portanto, a extração com HPCD–ß pareceu não ter sido capaz de prever, nas condições experimentais realizadas, a fração biodisponível dos HTP presentes no solo.

Monitoramento do processo de Atenuação Natural Monitorada

- Tanto os resultados da quantificação microbiana, bem como os de remoção dos HTP no Sistema 1, pareceram estar associados aos valores de pluviosidade. Nos períodos mais secos (três primeiros meses de experimento), observou-se pouca remoção dos HTP, assim como pouca variação na concentração dos microrganismos degradadores de óleo. Com aumento do volume de chuvas, verificou-se um aumento da densidade dos degradadores de óleo, especialmente nos solos contaminados a 2,5% e 5%, relacionando - se com uma grande remoção dos HTP.

- Através dos sistemas experimentais de ANM montados, foi possível mensurar quanto foi removido biologicamente no Sistema 1, que corresponde, em tese, à fração biodisponível ao longo de 6 meses de tratamento, bem como foi possível o cálculo das perdas abióticas.

- Ao final de 180 dias de experimento, houve uma alta biodegradação dos HTP, com remoção de 49,3% para o solo contaminado a 0,5%, 42,5% no solo a 2,5% e 52,2% no solo a 5%, demonstrando que os microrganismos nativos são capazes de biodegradar de forma satisfatória o contaminante, indicando que os mesmos utilizaram parte do carbono do petróleo como fonte de energia.

- As perdas abióticas no sistema de ANM foram elevadas, em torno de 27,05% no solo contaminado a 0,5%; 43,04% no solo contaminado a 2,5% e 29,02% no solo

contaminado a 5%. Esses valores parecem estar associados, principalmente, à percolação e lixiviação do contaminante.

- A remoção biológica foi o processo predominante na ANM do Sistema 1, com exceção do solo contaminado a 2,5%, onde as perdas abióticas foram próximas aos valores de biodegradação.

- Ao final do experimento de ANM, a concentração do contaminante atingiu níveis satisfatórios nos três percentuais de óleo testados. Com exceção do solo contaminado inicialmente a 5%, os demais percentuais alcançaram valores plausíveis de remoção dentro da legislação ambiental aplicável.

- A remoção total de HTP alcançou valores máximos de 85,54%, demonstrando que a ANM pode ser uma alternativa de remediação do solo e óleo utilizados neste trabalho.

Ensaios complementares

- Apesar da contaminação presente no solo, algumas espécies de plantas daninhas conseguiram se desenvolver e completar seu ciclo natural. Uma espécie da subfamília *Papilionoideae* e a espécie *Heliotropium indicatum* se destacaram. A primeira, por ter se desenvolvido quando o solo continha teores elevados de óleo; a segunda, quando o nível de óleo estava abaixo de 1%.

- Possivelmente, algumas espécies de actinomicetos dos gêneros *Amycolatopsis* sp e *Arthrobacter* sp isoladas do solo estão envolvidas na degradação de hidrocarbonetos presentes no petróleo.

7 SUGESTÕES

- Apesar de nas condições experimentais realizadas a HPCD- ß não ter previsto a fração biodisponível dos HTP, seria interessante conhecer quais tipos de hidrocarbonetos estão sendo ocludidos nos complexos de inclusão, pois seria de grande utilidade para estudos futuros, bem como para uma discussão mais detalhada da técnica.

- Assim como sugerido por alguns trabalhos, outros homólogos da HPCD poderiam ser utilizados, tais como a alfa e a gama, visto que ainda não foram testados para previsão da fração dos HTP biodisponíveis.

- Adicionalmente, o potencial fitorremediador dos vegetais identificados no sistema de ANM deve ser profundamente investigado. Algumas plantas precisam ser identificadas em nível de espécie, principalmente a planta da subfamília *Papilionoideae*, para que seu papel na degradação do óleo (caso exista) seja esclarecido. Até o presente momento, para nosso conhecimento, ainda não foi publicado qualquer trabalho que utilize essas plantas em estudos de biorremediação do petróleo.

- Há a necessidade de um estudo mais aprofundado da ação degradadora de óleo pelos actinomicetos isolados neste trabalho, bem como a associação desses organismos à rizosfera dos vegetais isolados dos sistemas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU, G. O; DIKE, P. O. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. **Bioresource Technology**, v.99, p.4761–4767, 2008.

ALEXANDER, M. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 4259 – 4265, 2000.

ALLAN, I. J.; SEMPLE, K.T.; REID,B. J. Cyclodextrin Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Phenols in Contaminated Soil Slurries. **Environmental Science Technology**, v.41, p.5498-5504, 2007.

ALLARD, A-S.; REMBERGER, M.; NEILSON, A. H. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote – contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, p. 43-49, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação – o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental.** Oficina de Textos, 2007, 176 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. Brasília:ANEEL, 3ª Edição, 2008, 236 p.

ANTIZAR-LADISLAO, B.; SPANOVA, K.; BECK, A. J.; RUSSELL, N. J. Microbial community structure changes during bioremediation of PAHs in an aged coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 61, p. 357–364, 2008.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, nº 4, 2000.

ASHTON, F. M.; MÔNACO, T.J. **Weed science**. New York, EUA: John Wiley, 1991. 466p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E-1943-98**: **Remediation by Natural Attenuation (RNA) at Petroleum Release Sites.** West Conshohocken, USA: ASTM, 1998.

BARDI, L.; MATTEI, A.; STEFFAN, S.; MARZONA, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with b-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.709–713, 2000.

BINET, P.; PORTAL, J. M.; LEYVAl, C. Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. **Soil Biology Biochemestry**, v. 32, p. 2011-2017, 2000.

BLUM, W. H. Basic concepts: degradation, resilience and rehabilitation In: LAL, R., BLUM, W. H., VALENTINE, C., STEWARD, B. A. (Editores). **Methods for Assessment of Soil Degradation**., New York, EUA: CRC Press, 1997.

BONACCORSI, A. A.; DI DOMENICO, R.; FANELLI, F.; MERLI, R.; MOTTA, R.; ZAPPONI, G. A. The influence of soil particle adsorption on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin biological uptake in the rabbit. **Archives of Toxicology Supplement**, v. 7, p. 431-434, 1984.

BONIN, J. L.; SIMPSON, M. J. Variation in Phenanthrene Sorption Coefficients with Soil Organic Matter Fractionation: The Result of Structure or Conformation? **Environmental Science Technology**, v.41, p.153-159, 2007.

BRASIL. **Lei nº 6938, de 31 de agosto de 1981**. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/LEIS/L6938.HTM> Acesso em 18 de jul. 2009.

BRITTO, M. A. F. O., NASCIMENTO, C. S.; SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v. 27, p. 882 – 888, 2004.

CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 76, p.113–117, 2001.

CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL - CETEM. **IT2003-001-00**: Determinação de óleos e graxas, em solo, por gravimetria empregando método de extração com ultrassom. Instrução de trabalho, 2003.

CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL - CETEM. **IT 2008-005-00**: Guia rápido para uso do analisador de TOG/HTP por infravermelho, infracal, em amostras de solo. Instrução de trabalho, 2008.

CHAPMAN, P.M. Determining when contamination is pollution – Weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environmental International**, v. 33, p. 492 – 501, 2007.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H.; GÓRECKI, H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. **Science of the Total Environment**, v. 337, p. 175– 182, 2005.

CHUNG, N.; ALEXANDER, M. Effect of Concentration on Sequestration and Bioavailability of Two Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Environmental Science Technology**, v. 33, nº 20, p. 3605–3608, 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Projeto CETESB – GTZ. Lista Holandesa de Valores de qualidade do solo e da água subterrânea – Valores STI 6530**. 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Manual de Gerenciamento de áreas contaminadas**. 2001. Disponível em: <HTTP://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/manual.asp>. Acesso em 10 de mar. 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Decisão de diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005.** Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. 2005.

CONNELL, D. W. & MILLER, G. J.. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution. Jonh Willey and Sons**, 1984, 444 p.

CORRÊA, O. L. S. **Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2003.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, nº 179, p. 32-37, 2002.

CUYPERS, C.; CLEMENS, R.; GROTENHUIS, T.; RULKENS, W. Prediction of petroleum hydrocarbon bioavailability in contaminated soils and sediments. **Soil and Sediment Contamination,** v. 10, no. 5, p. 459 – 482, 2001.

CUYPERS, C.; PANCRAS, T.; GROTENHUIS, T.; RULKENS, W. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-b-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. **Chemosphere**, v. 46, p. 1235 – 1245, 2002.

DEAN, J.R.; SCOTT, W.C. Recent developments in assessing the bioavailability of persistent organic pollutants in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, nº 9, 2004.

DEUEL, L. E.; HOLLIDAY, G.H. **Soil Remediation for the petroleum extraction industry**. 2a ed., Tulsa, U.S.A.: PennWell, 1997, 242 p.

DEW, N. M.; PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Prediction of [3-^{14}C] phenyldodecane biodegradation in cable insulating oil-spiked soil using selected extraction techniques. **Environmental Pollution**, v.138, p. 316-323, 2005.

DIPLOCK, E. E.; MARDLIN, D. P.; KILLHAM, K. S.; PATON, G. I. Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. **Environmental Pollution**, v.157, p.1831–1840, 2009.

DOICK , K. J.; EVAKLINGELMANN , P.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Long-Term Fate of Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in an Agricultural Soil. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 3663-3670, 2005.

DOICK, K. J., Clasper, P. J., Urmann, K. e SEMPLE, K. T. Further validation of the HPCD technique for the evaluation of PAH microbial availability in soil. **Environmental Pollution**, v.144, p.345 – 354, 2006.

DROR, I.; GERSTL, Z.; PROST, R.; YARON, B. Abiotic behavior of entrapped petroleum products in the subsurface during leaching. **Chemosphere**, v.49, p.1375–1388, 2002.

EDWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred I accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175–185, 1998.

EHLERS, L. J.; LUTHY, R. G. Contaminant bioavailability in soil and sediment. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 295A– 302A, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de classificação de solos.** Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, Brasil: Embrapa, 1999.

FAN, Z.; DIAO, C. H.; GUO, M. J.; DU, R. J.; SONG, Y. F.; JING, Z. L.; YU, M. An investigation of the inclusion complex of b-cyclodextrin with p-nitrobenzoic acid in the solid state. **Carbohydrate Research**, p.342, v.2500–2503, 2007.

FENG, Y. C.; JEONG-HUNPARK, R.; VOICE, T. C.; BOYD, S. Bioavailability of Soil-Sorbed Biphenyl to Bacteria. **Environmental Science and Technology**, v.34, p.1977-1984, 2000.

FISHER, H.H. Conceito de erva daninha. In: WARREN, G.F.; WILLIAM, R.D.; SACCO, J. da C.; LAMAR, R.V.; ALBERT, C.A. **Curso intensivo de controle de ervas daninhas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1973. p.5-10.

FRANCO, M.; CONTINA, G.; BRAGATOB, M.; Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, v. 121, p. 17–30, 2004.

FRIES, G. F.; MARROW, G. S.; SOMICH, C. J. Oral bioavailability of aged polychlorinated biphenyl residues contained in soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 43, p. 683-690, 1989.

GERHARDT, K. E.; HUANG, X-D; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. **Plant Science**, v.176, p. 20–30, 2009.

GHOSH, U.; TALLEY, J. W.; LUTHY; R. G. Particle-scale investigation of PAH desorption kinetics and thermodynamics from sediment. **Environmental Science Technology**, v. 35, p. 3468-3475, 2001.

GOGOI, B. K.; DUTTA, N.N.; GOSWAMI, P.; MOHAN, T.R.K. A case study of bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advanced Environmental Research**, v.7, p.767–782, 2003.

GOON, D.; HATOUM, N. S.; JERNIGAN, J. D.; SCHMIDT, S. L.; GARVIN, P. J. Pharmacokinetics and oral bioavailability of soil-adsorbed benzo(a)pyrene (B(a)P) in rats. **Toxicologist**, v. 11, p. 1356. 1990.

GREENWOOD, C.; WIBROW, S.; GEORGE, S. J.; TIBBETT, M. Sequential hydrocarbon biodegradation in a soil from arid coastal Australia, treated with oil under laboratory controlled conditions. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 1336–1346, 2008.

GREENWOOD, P. F., WIBROW, S.; GEORGE, S. J.; TIBBETT, M. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. **Organic Geochemistry**, v.40, p.293–300, 2009.

HAMAMURA, N.; OLSON, S. H.; WARD, D. M.; INSKEEP, W. P. Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. **Applied And Environmental Microbiology**, v.72, nº 9, p. 6316–6324, 2006.

HANSEL, C. M.; FENDORF, S.; JARDINE, P. M.; FRANCIS, C. A. Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochemically Variable Soil Profile. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, no.5, p.1620–1633, 2008.

HAWS, N. W.; BALL, W. P.; BOUWER, E. J. Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 82, p.255– 292, 2006.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.173-182, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, 868-877, 1999.

HUANG, X.; El-ALAWI, Y.; PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. & GREENBERG, B.M. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**, v.130, p. 465-476, 2004.

HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S.; FORTMAN, T.J. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. **Bioremediation Journal**, v.6, p.321–336, 2002.

HWUANG, S.; CUTRIGHT, T.J. Preliminary evaluation of PAH sorptive changes in soil by Soxhlet extraction. **Environmental International**, v.30, p. 151–158, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification.** 2002.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE (INEA). **DZ-1841.R-0**: diretriz para o licenciamento ambiental e para a autorização do encerramento das atividades de postos de serviço que disponham de sistemas de acondicionamento ou armazenamento de combustíveis, graxas, lubrificantes e seus respectivos resíduos.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO 17402**: Guidance for the Selection and Application of Methods for the Assessment of Bioavailability of Contaminants in Soil and Soil Materials Geneva: ISO, 2006.

IWAMOTO, T.; NASU, M. Current Bioremediation Practice and Perspective. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, nº 1, p.1-8, 2001.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, 2007.

JOHNSEN, A.R.; WINDING, A.; KARLSOn, U.; ROSLEV, P. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ^{13}C labeled cell lipids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 6106–6113, 2002.

JONKER, M. T. O.; SINKE, A. J. C.; BRILS, J. M.; KOELMANS, A. A. Sorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Oil Contaminated Sediment: Unresolved Complex? **Environmental Science and Technology**, v.37, p. 5197 – 5203, 2003.

KASTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic hydrocarbons (PAH). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p. 267–273, 1994.

KELSEY, J. W.; KOTTLER, B. D.; ALEXANDER, M. Selective Chemical Extractants To Predict Bioavailability of Soil-Aged Organic Chemicals. **Environmental Science and Technology**, v.31, p. 214-217, 1997.

KILBANE, J. J. Extractability and subsequent biodegradation of PAHs from contaminated soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.104**,** 285–304, 1998.

KIM, Y. B.; PARK, K. Y.; CHUNG, Y.; OH, K.C.; BUCHANAN, B.B. Phytoremediation of anthracene contaminated soils by different plant species. **Journal Plant Biology**, v.47, p.174-178, 2004.

KIRK, J. L.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. **Environmental Pollution**, v.133, p. 455-465, 2005.

KUMAR, G. P.; YADAV, S. K.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; JUWARKAR, A. A. Growth of Jatropha curcas on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and Azotobacter – A greenhouse study. **Bioresource Technology**, v.99, p. 2078–2082, 2008.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect os hydrocarbon pollution on the microbial properties of a Sandy and a Clay soil. **Chemosphere**, v.66, no.10, p. 1863-1871, 2007.

LARKIN, M. J., KULAKOV, L. A., ALLEN, C. C. R. Biodegradation and Rhodococcus-masters of catabolic versatility. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p. 282–290, 2005.

LEPSCH, Igo F. **Formação e Conservação dos Solos**. São Paulo, Oficina de Textos, 2002.

LI, A.; SCHOONOVER, T. M.; ZOU, Q.; NORLOCK, F.; SCHEFF, P. A.; WADDEN, R. A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Air of Ten Chicago Area Homes. **NUATRC Research Report**, nº 6, 2005.

LI, H. Z.; HANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU, H.; ZHANG C. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. **Journal of Environmental Sciences,** v.19, p.1003–1013, 2007.

LINS, C. E. L.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MESSIAS, A. S.; MAIA, L. C. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v.31, p.181–185, 2006.

LISTE, H.; ALEXANDER, M. Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. **Chemosphere**, v.46, p.1011–1017, 2002.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 3ª Edição, Instituto Plantarum, 2000.

LUCIER, G. W.; RUMBAUGH, R. C.; MCCOY, Z.; HASS, R.; HARVAN**,** D.; ALBRO, P. Ingestion of soil contaminated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters hepatic enzyme activities in rats. **Fundamental Applied Toxicology**, v.6, p.364–371, 1986.

MARSHALL, A. G.; RODGERS, R. P. Petroleomics: The Next Grand Challenge for Chemical Analysis. **Accounts of Chemical Research**, v.37, p.53-59, 2004.

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NEŠVERA, J.; KREN, V. Biodegradation potential of the genus Rhodococcus. **Environment International**, v.35, 162–177, 2009.

MCCONNELL, E. E.; LUCIER, G. W.; RUMBAUGH, R. C.; ALBRO, P. W.; HARVAN, D. J.; HASS, J. R.; HARRIS, M. W. Dioxin in soil: bioavailability after ingestion by rats and guinea pigs. **Science**, v.223, p.1077–1079, 1984.

MCLAUGHLIN, M. J.; SMOLDERS, E.; MERCKX, R. Soil-root interface: physicochemical processes. In: HUANG, P. (editor). **Soil chemistry and ecosystem health**. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1998.

MELLONI, R. Capítulo 11: Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo. In: SILVEIRA, A. P. S.; FREITAS, S. S. (Orgs.) **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, 312 p.

MELO, R.F. **Potencial de espécies vegetais para fitorremediação de um solo contaminado com arsênio.** (Tese de doutorado). Viçosa: UFV, 2006, 107 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MUELLER, K. E.; SHANN, J. R. PAH dissipation in spiked soil: impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. **Chemosphere**, v.64, p.1006-1014, 2006.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. **Environment International**, v.30, p. 587– 601, 2004.

NASCIMENTO, R.; ZIOLLI, R. L.; ARARUN, J. T.; PIRES, C. S.; SILVA, T. B. Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no infravermelho. **Eclética Química**, v.33, no.1, p.35-42, 2008.

NCIBI, M. C.; MAHJOUB, B; GOURDON, R. Effects of aging on the extractability of naphthalene and phenanthrene from Mediterranean soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.146, p.378–384, 2007.

NOCENTINI, M; PINELLI, D.; FAVA, F. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. **Chemosphere**, v.41, p.1115-1123.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2003, 432p.

PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis**. 2ª Edição, USA, 1982.

PANKHURST, C. E.; HAWKE, B. G.; MACDONALD, H. J.; KIRBY, C. A.; BUCKERFIELD, J. C.;MICHELSEN, P.; O´BRIEN, K. A.; GUPTA, V. V. S. R.; DOUBE, B. M. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators os soil health. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.35, p.1015-1028, 1995.

PATTERSON, C.J.; SEMPLE, K. T.; PATON, G. I. Non-exhaustive extraction techniques (NEETs) for the prediction of naphthalene mineralisation in soil. **FEMS Microbiology Letters**, v.241, p.215–220, 2004.

PATON, G. I.; REID, B. J.; SEMPLE, K. T. Application of a luminescence-based biosensor for assessing naphthalene biodegradation in soils from a manufactured gas plant. **Environmental Pollution**, v.157, p.1643–1648, 2009.

REID, B. J., STOKES, J. D., JONES, K. C., SEMPLE, K. T. Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. **Environmental Science and Technology**, v.34, p.3174–3179, 2000.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soils**, Florida: Lewis, 1998.

RIVAS, F. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. **Journal of Hazardous Materials**, v.B138, p.234–251, 2006.

RIZZO, Andréa Camardella de Lima. **Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, 2008. 188 p.

RUGNER, H.; FINKEL, M.; KASCHL, A.; BITTENS, M. Application of monitored natural attenuation in contaminated land management—A review and recommended approach for Europe. **Environmental science & policy**, v.9, p.568 – 576, 2006.

SABATÉ, J., VINÃS, M.; SOLANAS, A. M. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. **Chemosphere**, v.63, p.1648 – 1659, 2006.

SAHOO, P.K.; DAS, L.M. Process optimization for biodiesel production from Jatropha, Karanja and Polanga oils. **Fuel**, v.88, p.1588–1594, 2009.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187-195, 2005.

SCELZA, R.; RAO, M. A.; GIANFREDA, L. Effects of compost and o bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1303 – 1317, 2007.

SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A. P. Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology**, v.43, p. 341-350, 2007.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEN, D. M. **Environmental organic chemistry**. New York: John Wiley & Sons 1993.

SEMPLE, K. T.; KIERON, D. J.; JONES, K. C.; BURAUEL, P.; CRAVEN, A.; HARMS, H. Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediments is Complicated. **Environmental Science and Technology**, p.229A-231A, 2004.

SEMPLE, K. T., DOICK, K. J., BURAUEL, P., CRAVEN, A., HARMS, H., JONES, K. C. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. **Environmental Science and Technology**, v.38, p.228A-231A, 2004.

SEMPLE, K. T.; DEW, N. M.; DOICK, K. J.; RHODES, A. H. Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil? **Environmental Pollution**, v.140, p.164 – 172, 2006.

SEMPLE, K. T.; DOICK, K. J.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. **Environmental Pollution**, v.150, p.166 -176, 2007.

SHU, H.; PAUSTENBACH, D.; MURRAY, F. J. Bioavailability of soil-bound TCDD: oral bioavailability in the rat. **Fundamental Applied. Toxicology**, v.10, p.648-654, 1988.

SIKORSKI, M.; WILKINSON, F. **Triplet state decay of xanthione (XT) and 4H-1-benzopyran – 4- thione (BPT) in solid b-cyclodextrin complexes**. Faculty of Chemistry, Universitu of A. Mickiewicz, 0 780 Poznan, Poland, Department of Chemistry, Loughborough University, Loughborough, Leicestershire, LE11 3TU, UK. Disponível em: <http://www.photobiology.com/v1/marek>. Acesso em 10 Jan. 2008.

RUGGIERO, P.; PIZZIGALLO, M.D.R.; CRECCHIO, C. Effects of soil abiotic processes on the bioavailability of anthropogenic organic residues**. Developments in Soil Science**, v. 28B, p. 95-133, 2002.

SÖHNGEN, N. L. BENZIN, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben.Zentralbl. **Bakteriol Parasitenkd Infektionskr**, v.2, nº 37, 595–609, 1913.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**. New York:CRC Press, 2007, 945 p.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989.

STOKES, J.D.; WILKINSOn, A.; REID, B.J.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T. Validation of the use of an aqueous hydroxypropyl-b-cyclodextrin (HPCD) extraction as an indicator of PAH bioavailability in contaminated soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.24, p.1325-1330, 2005.

STROUD, J. L.; PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Predicting the biodegradation of target hydrocarbons in the presence of mixed contaminants in soil. **Chemosphere**, v.74, p.563–567, 2009.

TALLEY, J. W.; GHOSH, U.; TUCKER, S.; FUREY, J.; LUTHY, R. G. Particle-scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment. **Environmental Science Technology**, v.36, p.477-483, 2002.

THOMAS, J. E. (organizador). **Fundamentos da Engenharia do Petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência/PETROBRAS, 2001.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. Editora Atheneu, 4ª Edição, 2004.

TRINDADE, P.V.O. **Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ/Escola de Química, 2002. 127p.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **USEPA 8015B**:Nonhalogenated Organics Using GC/FID. EPA, Revision 2, 28p, 1996.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA). **Directive 9200.4-17P**: Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites. 1999. Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/directiv/d9200417.pdf>. Acesso em 27 Jul. 2009.

UDOVIC, M.; LESTAN, D. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after soil remediation. **Environmental Pollution**, v.148**,** p.663-668, 2007.

UMBREIT, T. H.; HESSE, E. J.; GALLO, M. A. Comparative toxicity of TCDD contaminated soil from Times Beach, Missouri, and Newark, New Jersey. **Chemosphere**, v.15, p.2121-2124, 1986.

URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo,** 344p, 1998. Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil,1998.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A.; KUMAR, P.; THAWALE, P. R. SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, K. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromiumand zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, 2009.

ZAGATTO P. A.; BERTOLETTI, E. (Orgs.). **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

ZHANG, Q-R, ZHOU Q-X, REN, L-P, ZHU, Y-M, SUN, S-L. Ecological effects of crude oil residues on the functional diversity of soil microorganisms in three weed rhizospheres. **Journal of Environmental Sciences**, v.18, nº 6, p.1101-1106, 2006.

ZHAO, X.; VOICE, T. C. Assessment of Bioavailability Using a Multicolumn System. **Environmental Science and Technology**, v.34, p.1506-1512, 2000.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

WALTER, H. J.; EDERER, C.; FORST, L.; STIEGLITZ, T. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils in oil contaminated systems. **Chemosphere**, v.41, p.387–397, 2000.

WANG, X., BARTHA, R. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. **Soil Biology Biochemestry**, v.22, p.501–505, 1990.

WANG, X.-C.; ZHANG, Y.-X.; CHEN, R. Distribution and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in sediments from Boston Harbor, United States. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p, 1139-1149, 2001.

WARD, O. et al. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.5, p.260-270, 2003.

WARRINGTON, G.E.; SKOGLEY, E.O. **Bioavailability and the Soil Solution**. Wecsa, Montana,1997. Disponível em: <www.wecsa.com/Refrence/soilsltn.htm>. Acesso em 20 maio 2009.

ANEXO

Tabela 18: Valores obtidos pela quantificação dos microrganismos degradadores de óleo cru e heterotróficos totais e seus respectivos desvios – padrão.

Microrganismos Degradadores de Óleo							
Tempo	**Solo sem cont.**	**0,5%**		**2,5%**		**5%**	
(dias)	**(NMP/g solo)**	**(NMP/g solo)**	**Desvio padrão**	**(NMP/g solo)**	**Desvio padrão**	**(NMP/g solo)**	**Desvio padrão**
0	1,30E+02	1,30E+02	3,61E+02	1,30E+02	2,47E+03	1,30E+02	2,93E+03
15	1,70E+03	2,35E+03	1,34E+03	3,85E+02	1,06E+02	3,30E+02	0,00E+00
30	6,40E+03	2,80E+03	0,00E+00	1,50E+04	2,83E+03	7,40E+03	1,41E+03
60	1,30E+03	2,80E+03	7,07E+02	1,21E+04	1,27E+04	3,30E+03	0,00E+00
90	2,10E+02	4,90E+02	0,00E+00	4,10E+02	1,13E+02	2,30E+02	0,00E+00
120	4,60E+02	3,90E+03	4,39E+03	1,86E+06	2,33E+06	1,81E+05	2,40E+05
180	1,10E+03	1,55E+03	2,12E+02	5,95E+03	1,48E+03	1,23E+05	1,24E+05

Microrganismos Heterotróficos Totais							
Tempo	**Solo sem cont.**	**0,5%**		**2,5%**		**5%**	
(dias)	**(UFC/g solo)**	**(UFC/g solo)**	**Desvio padrão**	**(UFC/g solo)**	**Desvio padrão**	**(UFC/g solo)**	**Desvio padrão**
0	8,00E+06	8,00E+06	0,00E+00	8,00E+06	0,00E+00	8,00E+06	0,00E+00
15	2,23E+07	1,76E+07	1,84E+06	7,68E+06	2,47E+05	6,13E+06	2,44E+06
30	2,22E+07	1,76E+07	4,24E+05	5,98E+06	6,01E+05	2,70E+06	2,20E+06
60	4,75E+07	5,30E+07	2,12E+06	2,34E+07	2,21E+07	2,38E+06	1,24E+06
90	1,48E+07	2,54E+07	1,21E+07	5,03E+07	5,06E+07	8,15E+06	3,39E+06
120	1,70E+07	2,80E+07	1,77E+07	4,20E+07	1,98E+07	2,43E+06	1,52E+06
180	3,15E+07	3,29E+07	2,84E+07	1,62E+07	1,32E+07	2,97E+07	6,68E+06

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.