PROGRAMA EQ-ANP

Processamento, Gestão e Meio Ambiente na

Indústria do Petróleo e Gás Natural

Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo

Valéria Souza Millioli

Tese de Doutorado

Orientadores

Prof. Denize Dias de Carvalho, DSc.

Prof. Luiz Gonzaga dos Santos Sobral, PhD.

Abril de 2009

AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DA UTILIZAÇÃO DE SURFACTANTES NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Valéria Souza Millioli

Tese submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado por:

_____
(Denize Dias de Carvalho, DSc. – (Orientadora)

_____
Luiz Gonzaga dos santos Sobral, PhD.(Co-orientador)

_____
Adriana Ururahy Soriano – DSc

_____
Paulo Negrais Carneiro Seabra, DSc.

_____
Maria Claudia Barbosa, DSc.

_____
Selma Gomes Ferreira Leite, DSc.

_____
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, DSc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Abril de 2009

Ficha Catalográfica

Millioli, Valéria Souza

Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminada com hidrocarbonetos de petróleo/ Valéria Souza Millioli, Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

xi, 200 p.; il. (romano: pags. texto inicial; arábico: pags. trabalho)

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009. Orientadores: Denize Dias de Carvalho e Luiz Gonzaga dos Santos Sobral.

1. Surfactantes. 2. Solo. 3. Biorremediação. 4. Petróleo - Tese. (Doutorado – UFRJ/EQ). 5. Denize Dias de Carvalho e Luiz Gonzaga dos Santos Sobral .

I. Título.

Ultimamente há uma frase que tem estado no meu coração e retrata muito o mundo em que vivemos que é**: "Família é a base de tudo".**

AGRADEÇO A DEUS POR MINHA FAMÍLIA

Aos meus pais **Elias** e **Doralice** e ao meu Marido **Alexandre** que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta jornada.

DEDICO

Aos meus "anjinhos" **Victor**, **Beatriz** e **Adriana** que amo demais e como forma de incentivo para jornada de vida de cada um.

OFEREÇO

“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade”.

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao apoio financeiro da **Agência Nacional do Petróleo** – ANP – e da **Financiadora de Estudos e Projetos** – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao **PRH 13**, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural para elaboração deste trabalho.

São muitas pessoas e instituições que gostaria de agradecer por este longo caminho que percorri durante o doutorado, mas primeiramente gostaria de agradecer ao meu melhor amigo chamado **JESUS** que esteve comigo durante todo tempo que precisei e também expressar o meu agradecimento a minha família pelo apoio e incentivo de cada um, em especial aos **meus pais.**

Ao Alexandre pelo companheirismo, amor, carinho, força e incentivo dado à realização deste trabalho e em todas as minhas decisões de vida. Amo-te.

À minha orientadora Denize Dias de Carvalho pela amizade, orientação e conselhos de vida. Saiba que gosto muito de ti.

À Eliana Flávia pela sua dedicação, sabedoria, conselhos de vida e incentivo. Muito obrigada por tudo, de coração.

Ao Luiz Sobral pelo apoio, orientação e por acreditar em mim.

Ao Sr. Ronaldo Luiz Correa dos Santos - Coordenador de Processos Metalúrgico e Ambientais do CETEM/MCT. Muito obrigada por acreditar no meu trabalho e na minha capacidade.

As minhas bolsistas de iniciação científica Letícia Cotia, Flávia Romero, Vanessa Monteiro, Paula Aragão, Jamile Marquez, Juliana Labre e Débora Sanchez que me ajudaram na parte experimental do meu trabalho.

Aos estagiários de nível superior e médio do CPMA que também me ajudaram de alguma forma durante todos esses anos como Rosana Macedo, Denner Conceição, Paula Batista, Pedro Felix, Janaína Pires, Danielle Reichwald, Gisele Furukawa, Edilson Gama dos Santos, Diego Valentim, Julianna Prata, Marion Cony, Yaci e ao colaborador Jorge Luiz Cruz pela ajuda, descontrações e brincadeiras de todos os momentos.

Ao Sandro Baptista pela disponibilidade e ajuda em todo o tempo que lhe pedi. Tu és muito especial.

À minhas amigas Alcione e Andrea Moreira pelas horas de “ombro” concedidas por cada uma durante a realização da tese e pela ajuda em algumas análises.

Aos técnicos da CPMA Jorge Moura, Grace Maria de Britto, Ary Caldas, Ana Lúcia Carriello de Moraes e Márcia Bifano. Obrigada pela ajuda de cada um de vocês.

Às pesquisadoras do grupo de biorremediação Andrea Rizzo, Erika Valdman e Liliana Lemos pelos conselhos relacionados à tese.

Ao CENPES/Petrobras pelo fornecimento do solo e do óleo cru, em especial a Adriana Soriano.

À Escola de Química e ao CETEM por concederem as suas instalações para a condução dos experimentos deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA) pelo companheirismo e profissionalismo: Cristina Lima, Verônica, Suzana, Leandro, Márcia, Fernanda, etc.

À Fátima Engel pela ajuda fornecida durante a tese de doutorado.

Também não poderia deixar de agradecer as minhas companheiras de caminhada pós almoço pelas conversas e descontrações: Virginia, Sonia e Patrícia.

À equipe do PRH 13 pelo apoio e dedicação: Alzirene (Zizi), Eduardo Mach, Pelegrini e Peter Seidl.

Aos companheiros e bolsistas da ANP/PRH13 pelos momentos de descontrações em congressos e encontros relacionados à ANP.

A toda equipe do CPMA/CETEM que direta e indiretamente me apoiaram na realização da Tese.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DA UTILIZAÇÃO DE SURFACTANTES NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Valéria Souza Millioli

ABRIL, 2009

Orientadores: Profª. Denize Dias de Carvalho, DSc.

Luiz Gonzaga dos Santos Sobral, PhD.

RESUMO

Um dos grandes problemas ambientais atuais é a contaminação de solo por derramamento de petróleo e quando ocorre este tipo de contaminação, há uma necessidade de ações imediatas para que minimizem os impactos negativos causados pelo petróleo em solo.Há várias tecnologias para tratar o solo com as técnicas, químicas, físicas e as biológicas; entretanto, as técnicas biológicas, como a biorremediação, são consideradas de baixo custo e eficazes para redução do petróleo no solo. Porém, alguns fatores podem limitar a ação dos microrganismos para que esses sejam capazes de reduzir esse passivo ambiental, como alto peso molecular, forte adsorção e baixa solubilidade desses contaminantes. Contudo, a adição de surfactantes pode amenizar esses problemas aumentando a efetividade do processo de biorremediação e, dessa forma, a biodegradabilidade do óleo no solo. Entretanto, alguns fatores devem ser investigados para melhorar a utilização dos surfactantes como auxiliares na técnica de biorremediação. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi descrever algumas contribuições técnicas nos últimos anos em que se tem utilizado surfactante como auxiliares na biorremediação, além de uma revisão bibliográfica sobre solo, petróleo, surfactantes e suas utilizações, bem como alguns testes eco toxicológicos que podem ser utilizados para avaliar o comportamento dos surfactantes quando adicionados ao solo. Dessa forma, o principal desafio do trabalho foi definir uma metodologia a ser utilizada para aplicação de surfactantes como auxiliares à técnica de biorremediação de solo impactado com óleo cru. Neste contexto, foram avaliados seis surfactantes, sendo quatro químicos (SDS, Tween-80, Biosolve e Biononex) e dois biossurfactantes do tipo ramnolipídio (JBR 210 e JBR 425) quanto à capacidade emulsificante, capacidade de dessorção do óleo do solo por lavagem,

biodegradabilidade em fase aquosa e em solo, além da caracterização da diluição micelar crítica (DMC) e diluição micelar crítica aparente (DMCA). Ao se analisar estes seis surfactantes foi observado que o SDS e JBR 210 foram os que mais se destacaram, e dessa forma, foram escolhidos para serem avaliados quanto a toxicidade em diferentes concentrações. Os testes de toxicidade de ambos os surfactantes como mortalidade das minhocas, atividade da desidrogenase e fitotoxicidade com *L. sativa e L. esculentum* indicaram que ambos apresentaram alta toxicidade em altas concentrações. Em relação à utilização do SDS e JBR 210 como auxiliares no processo de biorremediação verificou-se para o JBR 210 a adição de 4 mg/g de ramnolipídio removeu cerca de 50% dos Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e a adição de SDS ao solo contaminado não melhorou os índices de biodegradação, apresentando remoção de 20 a 26% de HTP, sendo estes resultados bem semelhantes ao controle (sem adição de surfactante).

Ao se investigar a adição do ramnolipídio em diferentes tempos de contaminação, verificou-se que numa contaminação recente a adição do ramnolipídio não foi totalmente benéfica, provavelmente, pela alta concentração do óleo no solo e pela toxicidade do próprio biossurfactante. Dessa forma, foi observado que a adição do ramnolipídio (JBR 210) removeu cerca de 1 a 2 vezes mais que o controle com uma concentração ótima de ramnolipídio de 4 mg/g. Entretanto, após 180 dias, com a microbiota mais adaptada, a remoção de HTP aumentou um pouco mais, ou seja, foi de 1 a 3,5 vezes maiores que o controle, sendo que a maior remoção do óleo foi encontrada pela adição de 6 mg/g. Após 420 dias, com a fração do óleo já bem reduzida e com a microbiota bem mais adaptada, foi verificado que todos os tratamentos estavam bem acima do controle, sendo que a remoção de HTP foi cerca de 3,5 a 6,5 vezes maiores que o controle e foi necessário apenas 2 mg/g de ramnolipídio para se obter o melhor resultado de remoção de HTP. A aplicação do ramnolipídio (JBR 210) também foi estudada em dose única e em batelada, não tendo sido verificada uma diferença significativa em relação à remoção de HTP. Contudo em relação à toxicidade, numa contaminação recente a adição em batelada do ramnolipídio pode causar maior toxicidade ao final do tratamento já que o ramnolipidio é considerado tóxico em algumas concentrações.

Abstract of a Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

EVALUATING THE POTENTIALITY OF THE ADDITION OF SURFACTANTS IN BIOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS CONTAMINATED SOIL

VALÉRIA SOUZA MILLIOLI

April, 2009

Supervisors: Prof. Denize Dias de Carvalho, DSc.
Luiz Gonzaga dos Santos Sobral, PhD.

ABSTRACT

One of the most serious environmental problems is the soil contamination due to oil spills. When the oil spill occurs, some immediate actions are needed to minimize the negative impacts caused by this contaminant. The release of crude oil into the environment by oil spill is gaining attention in the world and many accidents cause soil pollution and for this reason, many techniques have been developed to cleaning up the petroleum bearing soil and it knows that biological treatments are more efficient and cheaper than chemical and physical ones. Regarding these biological treatments, the bioremediation technology is being used for degrading crude oil in soil matrix by using microorganisms to transform the petroleum hydrocarbons into less toxic compounds. However, the low solubility and adsorption are two major properties of high molecular weight hydrocarbons that limit their availability to microorganisms. Thus, the addition of surfactants enhances the solubility and removal of those contaminants, improving the oil biodegradation rates. Surfactants are widely used in household, industrial products and lately in bioremediation and, however, the behavior and fate of the surfactant as auxiliary of bioremediation can be investigated. For this reason, the main challenge of this work was to define a methodology to be used for the application of surfactants as auxiliaries of bioremediation of petroleum contaminated soil. In this context, six surfactantes had been evaluated, being four chemistries (SDS, Tween-80, Biosolve and Biononex) and two rhamnolipid biosurfactants (JBR 210 and JBR 425). They were evaluated by their emulsification capacity, the dessorption of crude oil by soil washing, biodegradability in watery phase and soil, besides the characterization of critical micelar dilution (CMD) apparent critical micelar dilution (ACMD). Analyzing these six surfactants it was observed that SDS and JBR 210 were the best surfactants and they were chosen to be evaluated as the toxicity in different concentrations. The toxicity

tests of both surfactants as earthworm's mortality, dehydrogenase activity and phytotoxicity with *L. sativa and L. esculentum* indicated that both presented high toxicity in high concentrations.

The tests for characterizing the surfactants indicated that the most effective surfactants were SDS and JBR 210. The toxicity tests of both surfactants as earthworms' mortality, desidrogenase activity and phytotoxicity with *L. sativa* and *L. esculentum* indicated that both presented very similar toxicity and were very poisonous in high concentrations. Regarding the use of SDS and JBR 210 as auxiliaries in the bio-remediation process were verified for JBR 210 the addition of 4 mg/g of rhamnolipid presented higher TPH removal (50%), being still observed a tendency to reach even higher removal for treatment period higher than 45 days. The addition of SDS to the polluted soil didn't improve the biodegradation indexes in comparison to the control (treatment without surfactant), presenting TPH removal between 20 and 26% in all the experiments. Thus, it was opted to use JBR 210 (rhamnolipid) in the subsequent tests.

While investigating the addition of the rhamnolipid in different times of contamination, it was verified that in the beginning, probably, for the impact caused by crude oil to the soil, the addition of rhamnolipid was not totally beneficial to the soil treatment as in some treatments there was low or any increment regarding the treatment controls, being verified an increase in the TPH removal among 1.02 to 1.82 times higher than the control. After 180, days and with adaptation of the micro-biota, the removal of TPH, that was about 1.2 to 3.2 times higher than the control, being 6 mg/g the better concentration. After 420 days of oil natural bio-degradation it was verified that all the treatments are well above the control, and the TPH removal was about 3.5 to 6.5 times higher than the control. However, regarding the optimum concentration only 2 mg/g of rhamnolipid was enough to obtain good results of TPH removal. In terms of TPH removal it was not observed a significant difference among the bio-degradability of crude oil using rhamnolipid in a unique dose or in batch. In toxicity terms, in a recent contamination, the addition in a batch scale of rhamnolipid can cause higher toxicity at the end of the treatment. However, as the time goes on, the 180 and 420 days, this toxicity is not so different in comparison to the addition in a unique dose.

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS **17**

1.1 – INTRODUÇÃO **17**

1.2 – OBJETIVOS **18**

1.2.1 – Objetivo geral 18

1.2.2 - Objetivos específicos 18

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **20**

2.1– SOLO **20**

2.1.1 – Características físico-químicas do solo 21
2.1.1.1 – Fase sólida 21
2.1.1.2 – Fase líquida 24
2.1.1.3 – Fase gasosa 24

2.1.2 – População microbiana no solo 25
2.1.2.1 – O papel dos microrganismos no solo 26
2.1.2.2 – Atividade microbiológica 28

2.2 – PETRÓLEO: FORMAÇÃO, DEFINIÇÃO, DERIVADOS E POLUIÇÃO CAUSADA PELOS MESMOS EM SOLO **29**

2.2.1 - Formação 29

2.2.2 – Definição e derivados do petróleo 29

2.2.3 – Poluição causada pelo óleo cru no solo 31
2.2.3.1 – Transformação de hidrocarbonetos de petróleo em solo 31
2.2.3.2 – Compostos persistentes no solo 33

2.3 – SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁREAS IMPACTADAS COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO **34**

2.3.1 – Processos Físicos 35
2.3.1.1 – Processo de encapsulamento e solidificação 35
2.3.1.2 – Lavagem do solo 35
2.3.1.3 - Separação Eletrocinética (Electrokinetic Separation): 36
2.3.1.4 – Contenção hidráulica, bombeamento e tratamento (Pump-and-treat) 37

2.3.2 – Processos químicos 37
2.3.2.1 – Processos oxidativos avançados (POAS) 37
2.3.2.2 – Extração química 37

2.3.3 – Processos térmicos 38

2.3.4 – Processos biológicos 38
2.3.4.1 – Processos biológicos in situ 38

2.3.4.2 – Processos biológicos ex situ 42

2.3.5 – Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo: o estado da arte 43
2.3.5.1 – Técnicas de biorremediação de solo impactado com hidrocarbonetos de petróleo 43
2.3.5.2 – Fatores que afetam a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo 44

2.4 – SURFACTANTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS 47

2.4.1 – Surfactantes Químicos 47

2.4.2 - Surfactantes biológicos ou biossurfactantes 48

2.4.3- Propriedades dos surfactantes químicos e biológicos 50
2.4.3.1- Adsorção 50
2.4.3.2 – Concentração Micelar Crítica (CMC) 51
2.4.3.3 – Solubilidade 52
2.4.3.4 – Solubilização de substâncias hidrofóbicas e microemulsão 53
2.4.3.5 – Balanço Hidrofílico/Lipofílico (BHL) 54

2.4.4 – Efeitos dos surfactantes 55
2.4.4.1 - Umectante (molhabilidade) 55
2.3.4.2 – Agente espumante e antiespumante 56
2.4.4.3 – Detergência 56
2.4.4.4 - Dispersante 57

2.4.5- Principais propriedades específicas dos biossurfactantes 57

2.4.6 – Aplicação dos surfactantes na remoção, limpeza e recuperação de hidrocarbonetos 58
2.4.6.1 – Limpeza de reservatórios de petróleo 58
2.4.6.2 - Recuperação melhorada do petróleo por ação microbiana (MEOR) 58
2.4.6.3 – Remediação de áreas impactadas com petróleo 59

2.4.7 – Efeito da adição de surfactantes na melhora da biodegradação de compostos orgânicos sorvidos no solo 59

2.5 – ECOTOXICIDADE 61

2.5.1 – Testes enzimáticos 62

2.5.2 – Testes com minhocas 62

2.5.3 – Fitoxicidade 64

2.6 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A BIBLIOGRAFIA ESTUDADA E O INEDITISMO DO TRABALHO 65

3 – MATERIAIS E MÉTODOS 67

3.1 – ÓLEO CRU 67

3.2 – CARACTERIZAÇÃO DO SOLO **67**

3.3 – SURFACTANTES **68**

3.4 – CARACTERIZAÇÃO DOS SURFACTANTES **68**

3.4.1 – Índice de emulsificação dos surfactantes 68

3.4.2 – DMC (Diluição Micelar Crítica) e DMCA (Diluição micelar crítica aparente) 69

3.4.3 – Lavagem do óleo do solo 69

3.4.4 – Avaliação da biodegradabilidade dos surfactantes no solo 70
3.4.5 – Avaliação da biodegradabilidade dos surfactantes em fase líquida 71

3.4.6 – Escolha dos surfactantes a serem utilizados no processo de biorremedição 72

3.5 – TESTES DE ECOTOXICIDADE **72**

3.5.1 - Verificação da atividade da desidrogenase em amostras de solo 73

3.5.2 – Fitotoxicidade 74
3.5.2.1 – Teste de germinação com Lactuca sativa 74
3.5.2.2 – Teste de crescimento do tomateiro 76

3.5.3 – Teste de minhocas 78

3.6 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO NUTRICIONAL ÓTIMA NOS ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL **80**

3.6.1 – Planejamento experimental fatorial 2^3 80
3.6.1.1 – Ensaio de biodegradabildade 80
3.6.1.2 – Ensaios de biodegradabilidade realizados após o planejamento experimental 82

3.7 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU NO SOLO **82**

3.7.1 – Atenuação Natural Monitorada 82

3.7.1.1 – Avaliação da captação de água percolada pela chuva 83

3.7.3 – Avaliação da biodegradabilidade de solo contaminado ao longo do tempo 84

3.7.4 – Ensaios de biodegradabilidade em solo contaminado com óleo cru conduzidos em biorreatores: avaliação da adição de diferentes concentrações de surfactantes e da toxicidade ao longo do tempo 85

3.7.5 – Ensaios de biodegradabilidade em solo contaminado com óleo cru conduzidos em biorreatores em escala ampliada: avaliação da melhor condição experimental com ênfase em toxicidade. 87

3.7.6 – Avaliação do efeito da adição do surfactante em duas etapas. 88

3.8 – METODOLOGIAS ANALÍTICAS **88**

3.8.1 – Propriedades físicas do solo 88
3.8.1.1- Densidade aparente e densidade da partícula 88
3.8.1.2 - Porosidade 89
3.8.1.3 - Capacidade de retenção de água 89
3.8.1.4 –Teor de umidade 90

3.8.2 – Propriedades químicas do solo 90
3.8.2.1 - Teor de Nitrogênio 90
3.8.2.2- Teor de fósforo assimilável 91
3.8.2.3- Teor de matéria orgânica 92
3.8.2.4- pH 93
3.8.2.4.1 – Curva de calibração do pH 93

3.8.3 – Caracterização biológica do solo. 93
3.8.3.1 - Quantificação de bactérias heterotróficas totais 93
3.8.3.2 - Quantificação de bactérias hidrocarbonoclásticas 94

3.8.4 – Determinação de óleos e graxas (por gravimetria) 95

3.8.5 – Hidrocarbonetos totais de petróleo 95
3.8.5.1 – Por infravermelho 95
3.8.5.2 – Por cromatografia gasosa 95

3.8.6 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos 95

3.8.7 - Demanda química de oxigênio 96

3.8.8 – Determinação da tensão superficial 96

3.8.9 – Quantificação do CO_2 96

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO **97**

4.1 – CARACTERIZAÇÃO DO SOLO **97**

4.2 - AVALIAÇÃO DA MELHOR RELAÇÃO NUTRICIONAL PARA TRATAMENTO DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU. **100**

4.2.1 - Análise do CO_2 produzido ao longo do ensaio de biodegradação 102

4.2.2– Análise da relação nutricional ótima 103

4.3 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU ADERIDO AO SOLO POR ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA **104**

4.3.1 – Avaliação das características fisicas, químicas e biológicas do solo ao longo de tempo em conjunto com a remoção de HTP (hidrocarbonetos totais de petróleo) 104

4.3.2 – Avaliação dos testes de ecotoxicidade no processo de atenuação natural monitorada 109

4.3.3 – Avaliação da remoção de HTP e HPA por cromatografia gasosa 110

4.4 – SELEÇÃO DE SURFACTANTES PARA APLICAÇÃO EM PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO **113**

4.4.1 – Índice de emulsificação (IE) 113

4.4.2 - Avaliação da DMC (diluição micelar crítica) e DCMA (diluição micelar crítica aparente) 116

4.4.3 – Lavagem de solo contaminado com óleo cru 117

4.4.4 – Biodegradabilidade dos surfactantes 120
4.4.4.1 – Biodegradabilidade em solo 120
4.4.4.2. Biodegradabilidade em fase líquida 122

4.5 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS SURFACTANTES SDS E JBR 210 **124**
4.5.1 – Avaliação da atividade da desidrogenase (AD) em diferentes concentrações dos surfactantes SDS e JBR 210 124
4.5.2 - Teste de germinação com Lactuca sativa 125
4.5.3 - Teste de germinação com Lycopersicon esculentum 127
4.5.4 - Teste de mortalidade de minhoca da espécie Eisenia fetida 128

4.5 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU ATRAVÉS DA ADIÇÃO DO JBR 210 (RAMNOLIPÍDIO) E SDS **131**

4.6 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU ATRAVÉS DA ADIÇÃO DO BIOSSURFACTANTE DO TIPO RAMNOLIPÍDIO **135**

5- SUGESTÕES **168**

BIBLIOGRAFIA **169**

ANEXO 2: CURVAS DE CALIBRAÇÃO **193**

HP 5890 - INTEGRADOR 3395 **193**

TRABALHOS COMPLETOS EM EVENTOS **195**

Eventos Internacionais 195

Eventos Nacionais 195

TRABALHOS RESUMIDOS EM EVENTOS **196**

Eventos Internacionais 196

RELATÓRIOS TÉCNICOS (CONFIDENCIAL) **197**

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 – INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia do mundo, representando cerca de 40% das necessidades energéticas mundiais. No entanto, as reservas deste recurso natural não renovável são encontradas em poucos países, necessitando, dessa forma, de ser transportado pelo mundo afora através de Navios Tanques e Oleodutos. Em função dessa grande movimentação, há riscos de contaminação tanto no solo quanto no mar, causando danos ao meio ambiente. Diversas técnicas físicas, químicas e biológicas vêm sendo desenvolvidas para a remoção de petróleo derramado ou para a redução dos seus impactos no meio ambiente. Dentre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se a biorremediação que se baseia na propriedade que os microrganismos têm de metabolizar os hidrocarbonetos e outros compostos encontrados no óleo cru que representam uma fonte de energia para os mesmos. Estes microrganismos consomem o óleo, convertendo-o em produtos mais solúveis, sendo que em alguns casos pode ocorrer total mineralização com formação de CO_2 e H_2O.

A biorremediação vem sendo apontada como uma técnica que consegue eliminar ou reduzir efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente. No solo a biodegradação dos hidrocarbonetos ocorre num sistema multifásico, envolvendo gases (O_2/CO_2), material orgânico insolúvel em água, sais dissolvidos e microrganismos. A fração orgânica do solo é responsável pela sorção de muitos compostos, particularmente, os hidrofóbicos. Quanto maior for a fração orgânica do solo maior será o número de moléculas sorvidas, e quanto maior for o tempo de exposição desses contaminantes no solo, maior será sua sorção e, consequentemente, menor a disponibilidade dos hidrocarbonetos para a biodegradação.

Entretanto, há uma possibilidade de se aumentar a disponibilidade desses hidrocarbonetos mesmo em solos com alto teor de argila e/ou óleo cru através da utilização de surfactantes sintéticos e/ou biológicos. Os efeitos positivos mais conhecidos do uso de surfactantes e/ou biossurfactantes, visando o aumento da biodegradação, são: aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos na fase líquida; dessorção dos hidrocarbonetos sorvidos no solo e a difusão facilitada dos hidrocarbonetos da fase sólida para a fase líquida, aumentando, assim, a disponibilidade do óleo para ação dos microrganismos.

Diante do exposto, é necessário um estudo mais aprofundado da aplicabilidade de compostos tensoativos para estimular e/ou aumentar os índices de biodegradabilidade do óleo aderido ao solo, visando um estudo da sua toxicidade, melhor época para

aplicá-los (se imediatamente após um derrame ou não), concentração ótima e forma de aplicação, tendo como objetivo principal a diminuição dos custos de tratamento e minimização do impacto ambiental.

1.2 – OBJETIVOS

1.2.1 – Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi estabelecer uma metodologia de aplicação de surfactantes como auxiliares no processo de biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, avaliando-se alguns parâmetros como melhor época de aplicação (se imediatamente após um derrame ou não) e menor toxicidade.

1.2.2 - Objetivos específicos

1.2.2.1 - Caracterizar o solo contaminado e não contaminado

1.2.2.2 - Avaliar a melhor relação nutricional (C:N:P) e teor de umidade através de um planejamento experimental 2^3.

1.2.2.3 - Verificar a degradação do óleo através de atenuação natural monitorada.

1.2.2.4 - Avaliar o comportamento de seis surfactantes distintos quanto à biodegradabilidade em solo e em fase aquosa; índice de emulsificação; concentração micelar crítica (CMC) e concentração micelar crítica aparente (CMCA), dessorção do óleo do solo por processo de lavagem e atividade da desidrogenase. Dentre os seis surfactantes analisados, selecionar dois surfactantes para serem avaliados no processo de biorremediação.

1.2.2.5 – Investigar a toxicidade dos dois surfactantes selecionados do item 1.2.2.4, adicionando diferentes concentrações desses surfactantes ao solo virgem e ao solo contaminado com 50 mg/g óleo cru em relação à massa do solo, através de testes de fitotoxicidade utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*, teste de mortalidade das minhocas da espécie *Eisenia fetida* e teste da atividade da desidrogenase.

1.2.2.6 – Conduzir ensaios de biodegradabilidade em biorreatores de leito fixo, utilizando os dois surfactantes escolhidos no item anterior (1.2.2.5), visando escolher o melhor surfactante para ser avaliado nos diferentes tempos de contaminação.

1.2.2.7 – Conduzir ensaios de biodegradabilidade em biorreatores de leito fixo, visando a aplicação de uma concentração ótima do surfactante escolhido no item 1.2.2.6 seja numa contaminação recente, após 180 e 420 dias de intemperização do solo.

1.2.2.8 – Avaliar a melhor forma de aplicação do surfactante ao solo, quer numa aplicação única ou mais de uma aplicação.

1.2.2.9 – Estabelecer uma metodologia de aplicação de surfactantes em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1– SOLO

O solo é uma mistura de compostos minerais e orgânicos, formado pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos. No solo, a ação desses agentes forma faixas horizontais, denominadas de horizontes, os quais lhes confere características próprias. Pode ser representado como um ciclo natural em que participam fragmentos de rochas, minerais, água, ar, seres vivos e seus detritos em decomposição e, ainda, é considerado resultado das interações da litosfera, hidrosfera, atmosfera e biosfera. Os principais processos que levam à sua formação são apresentados na Figura 2.1 (LUCHESE *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2004).

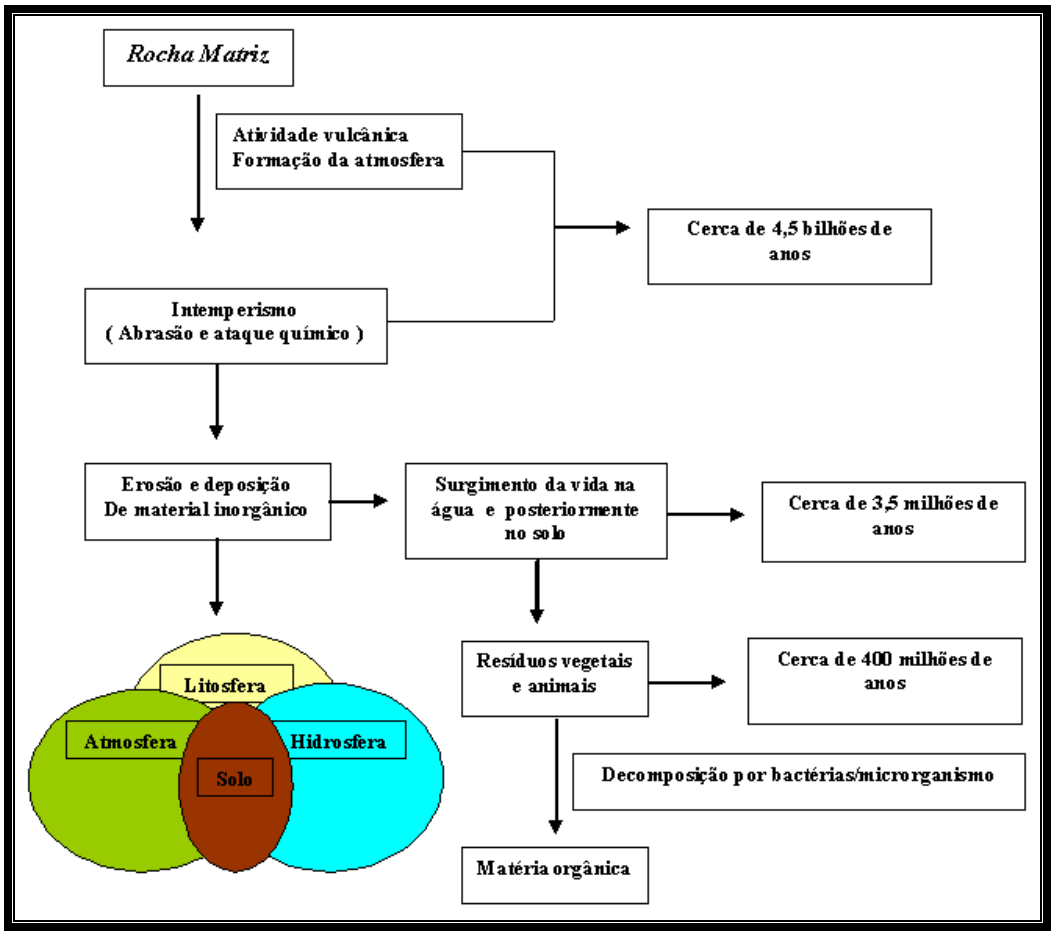


Figura 2.1: Processo de formação do solo
Fonte: ROCHA *et al.* 2004

2.1.1 – Características físico-químicas do solo

2.1.1.1 – Fase sólida

A fase sólida compreende uma fração mineral proveniente da decomposição da rocha-mãe pela meteorização, ou seja, transformação das rochas em solo sob a ação dos fenômenos climáticos e biológicos. A outra fração é a orgânica proveniente da decomposição de restos de organismos vivos, sendo que o material orgânico de fácil decomposição é transformado em gás carbônico, água e sais minerais (LUCHESE *et al.*, 2001; ROCHA *et al.* 2004).

2.2.1.1.1 - Fração mineral

As partículas sólidas minerais do solo são divididas, basicamente, em três frações texturais que são: argila, silte e areia. A classificação do solo é uma proporção relativa de diferentes tamanhos de partículas conforme mostrado na Tabela 2.1

Tabela 2.1: Relação entre o tamanho da partícula e o tipo de solo

TIPO DE SOLO	TAMANHO DA PARTÍCULA (mm)	MEIOS DE OBSERVAÇÃO
Arenoso	**2,00 – 0,05**	**Olhos nus**
Silte	**0,05 – 0,002**	**Microscópio**
Argiloso	**< 0,002**	**Microscópio eletrônico**

Fonte: PREVEDELLO, 1996.

2.1.1.1.2 – Textura e estrutura do solo

Num solo, geralmente, há partículas de tamanhos diversos. Denominações específicas são adotadas para diversas faixas de tamanhos de grãos; seus limites, entretanto, variam conforme os sistemas de classificação empregados pela ABNT. O conjunto de silte e argila são denominados como a fração de finos do solo, enquanto areia e pedregulho são as frações grossas ou grosseiras do solo. A fração argila é considerada, com freqüência, como a fração abaixo do diâmetro de 0,002 mm, que corresponde ao tamanho mais próximo das partículas de constituição mineralógica dos minerais-argila (PINTO 2002).

A textura, que constitui a fase mineral sólida do solo que tem sido utilizada como sinônimo de granulometria. Segundo PRADO (1995), o solo possui textura arenosa quando o teor de argila + silte for menor ou igual a 15%, textura média se o teor de

argila + silte for maior ou igual a 15% e também se o teor de argila não superar 35%, textura argilosa se o teor de argila estiver entre 35 e 60% e, finalmente, textura muito argilosa se o teor de argila for superior a 60%.

É por meio da análise granulométrica que se determina a textura dos solos, parâmetro fundamental na inferência do potencial de compactação, da disponibilidade de água, da aeração, da condutividade do solo ao ar, à água e ao calor, da infiltração e da redistribuição de água (PREVEDELLO, 1996).

A classificação granulométrica dos solos, em função da textura, pode ser feita usando o diagrama triangular de FERET (Figura 2.2). Entretanto, como existem várias versões do triângulo de FERET, deve ser informada qual versão do diagrama foi utilizada na classificação. No diagrama de FERET, apresentado por RESENDE *et. al.* (2002), o solo é dividido em três classes texturais, isto é, areia, argila e silte. A soma das porcentagens dessas três frações é 100%, e conduzem a um ponto no interior do triângulo. Esse ponto pode estar localizado em uma das áreas, nas quais o triângulo é dividido, e que fornece a classificação do solo.

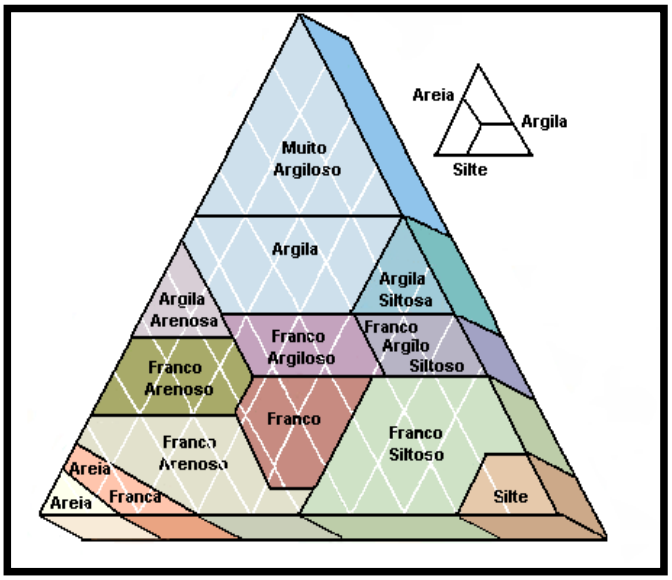


Figura 2.2: Diagrama de Textura adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências do Solo.
Fonte: RESENDE *et al.* (2002)

2.1.1.1.3 – Matéria Orgânica

A matéria orgânica (MO) é proveniente da degradação parcial de resíduos de animais e vegetais por via microbiana, sendo que a população microbiana presente no solo produz enzimas tais como amilases, desaminases, fosfatases e sulfatases, responsáveis pela liberação de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, respectivamente, a partir de moléculas orgânicas (DRAGUN, 1998; LUCHESE, *et al.* 2001). A Tabela 2.2 apresenta algumas constituições da MO no solo.

Tabela 2.2: Constituição da matéria orgânica do solo

MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	
Viva: Raramente > 4% do carbono orgânico	**Morta: Aproximadamente 98% do carbono orgânico**
Microrganismos (60-80%) **Fungos** **Bactérias**	**Matéria Macrorgânica** **Resíduos vegetais**
Macrorganismos (15-30%) • **Protozoários** • **Nematóides** **Mesofauna** • **Ácaros** **Macrofauna** • **Minhocas** • **Termitas**	**Húmus (80-90%)** **Substâncias húmicas (70%):** • **Ácidos húmicos** • **Ácidos fúlvicos** **Huminas Substâncias não-húmicas (30%):** • **Lipídeos** • **Ácidos orgânicos** • **Proteínas** • **Pigmentos**
Raízes (5-10%)	

Fonte: www.cnps.embrapa.br; *Apud* BAPTISTA (2007)

<u>*Mineralização e Humificação*</u>

Os processos de degradação da matéria orgânica são de natureza bioquímica e envolvem uma série de microrganismos. Neste processo destacam-se as bactérias, os actinomicetos e os fungos. Durante a degradação da matéria orgânica, pode-se caracterizar dois processos fundamentais que são a mineralização e a humificação (LUCHESE *et al.,* 2001).

A decomposição da matéria orgânica, através da mineralização, é um processo de degradação total, o qual pode ser representado pela equação 1.

Matéria orgânica [C,O,H,...] + $2O_{2(g)}$ $\rightarrow$ $CO_2 + 2H_2O$ + energia (Equação 1)

Assim, grandes quantidades de CO_2 são liberadas em condições favoráveis, principalmente no início do processo, ou seja, quando o teor de matéria orgânica está em maior quantidade. A quantidade de CO_2 produzido pelos microrganismos, durante a metabolização da matéria orgânica, é um excelente indicativo da atividade desses nos solos, pois representa a medida exata da intensidade de mineralização em um determinado instante, ou seja, da velocidade de decomposição da MO (LUCHESE *et al.* 2001).

A humificação corresponde à polimerização desses compostos orgânicos formando estruturas de até 50.000 u (u=unidade de massa atômica). Os ácidos húmicos produzidos apresentam grupos de estrutura aromática complexa e variável. Após a humificação, determinados grupos presentes nos compostos formados caracterizam a matéria orgânica do solo (LUCHECE *et al.,* 2001).

2.1.1.2 – Fase líquida

No solo, a fase líquida e a gasosa disputam o mesmo espaço, que corresponde aos interstícios, ou vazios, entre as partículas do solo, constituídos pelos micro e macroporos. Portanto, as duas fases são inversamente proporcionais, se uma aumenta a outra diminui. Em condições normais, a fase líquida ocupa os microporos, e a fase gasosa os macroporos do solo.

A fase líquida do solo é constituída, principalmente, por água, onde estão presentes solutos provenientes da dissolução de componentes tanto da fração mineral quanto da orgânica, além do ar no solo. A água caracteriza a umidade do solo e pode conter íons dissolvidos como $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}, NO_3^-, Na^+, K^+, Ca^{2+}, H^+, NH_4^+, Mg^{2+}, Al^{3+}, geralmente tidos como os macronutrientes, e os íons Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, BO_3^{3-}, Cl^-, MnO_4^{2-}, considerados os micronutrientes necessários à atividade metabólica dos microrganismos (PREVEDELLO, 1999; LUCHESE *et al.,* 2001).

2.1.1.3 – Fase gasosa

A presença do ar é importante, pois disponibiliza o oxigênio necessário para a respiração da biota do solo o que, conseqüentemente, favorece a mineralização da matéria orgânica nele presente. Além do O_2 e do CO_2, outros gases como CH_4, H_2S, SO_x NO_x e compostos voláteis (por exemplo, ácidos orgânicos de cadeias curtas,

aldeídos, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos) estão presentes no ambiente gasoso do solo, podendo servir como substrato ou como inibidores para a população microbiana. Mesmo em solos arejados, podem existir sítios anaeróbicos, que irão possibilitar a atividade das bactérias anaeróbicas (PREVEDELLO, 1999; LUCHESE *et al.,* 2001).

Como descrito anteriormente, as fases líquida e gasosa estão em proporções inversas no solo. Em conseqüência, no momento em que o solo apresenta sua capacidade máxima de retenção de água, o teor de ar tende a zero. Além disso, a quantidade de interstícios (macroporos) em maior ou menor percentagem depende da textura do solo. Assim sendo, um solo arenoso que apresenta maior quantidade de macroporos que um solo argiloso estará mais arejado do que o argiloso, nas mesmas condições.

2.1.2 – População microbiana no solo

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Com base nos tamanhos das populações, a biota do solo pode ser classificada como micro, meso e macrofauna. As bactérias são as mais abundantes no solo e incluem formas esporulantes ou não de bacilos, cocos, vibriões, espirilos e filamentosos (actinomicetos), variando, consideravelmente, de tamanho e forma, de metabolismo e de fonte nutricional, autotrófica ou heterotrófica (DRAGUN, 1998). A Tabela 2.3 mostra a distribuição típica da população microbiana na superfície do solo.

Tabela 2.3: Densidade das populações microbianas presentes na superfície do solo (m^2)

MICROGANISMOS	POPULAÇÃO Nº. de células por g de solo
Bactérias	**$10^8 – 10^9$**
Fungos	**$10^5 – 10^6$**
Algas	**$10^4 – 10^5$**

Fonte: VIEIRA, 1994 *apud* TRINDADE, 2002.

O interesse da utilização de microrganismos na degradação biológica do óleo e seus derivados e produtos tem aumentado nos últimos anos. Por volta de 1903, foi descoberto o primeiro organismo capaz de utilizar hidrocarbonetos como fonte de

energia. Recentemente, muitas espécies de microrganismos são conhecidas na degradação biológica de hidrocarbonetos que podem estar presentes em águas doces, oceanos como também em solos. O número de bactérias e fungos capaz de degradar os hidrocarbonetos aumenta rapidamente após um derrame de óleo (MIROSLAV *et al.,* 1996).

Baseados na descoberta de que os microrganismos endógenos podem degradar os hidrocarbonetos de petróleo, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas em biorremediação de solos impactados com petróleo que, dentre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se por ser um processo atrativo e economicamente viável. Os baixos custos requeridos pelas transformações bioquímicas, capazes de reduzir e até mesmo eliminar os contaminantes, associados à possibilidade do tratamento no próprio local de contaminação são fatores que contribuem para que a técnica de biorremediação seja cada vez mais atrativa dentre as tecnologias de tratamento do solo.

A degradação de contaminantes no solo, através de processos bioquímicos, deve ser aplicada somente se as condições do meio forem favoráveis. O sucesso da técnica de biorremediação depende do estabelecimento de condições que aumentem a atividade dos microrganismos, o que pode ser conseguido pelo controle dos processos interativos no ecossistema do solo (ELEKTOROWICZ, 1994).

2.1.2.1 – O papel dos microrganismos no solo

Os microrganismos são capazes de transformar compostos químicos através de um conjunto de reações químicas, denominado de metabolismo. Essas reações dependem da absorção de nutrientes e substâncias energéticas que, através de transformações metabólicas, sustentam o crescimento e a multiplicação, tornando-se substratos (predação) que serão ingeridos por outros organismos e, assim por diante, estabelecendo-se uma sucessão trófica no ecossistema. Nesse contexto, considera-se o metabolismo microbiano para a atividade dos microrganismos, e metabolismo do solo em referência ao conjunto de todas as transformações biocatalisadas que nele ocorrem (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais. O entendimento dos processos microbianos é importante para o conhecimento da ciclagem de nutrientes, da dinâmica da matéria orgânica, do fluxo de energia do solo, sendo esses fatores importantes

para estabelecer o melhor tratamento a ser dado ao solo numa eventual contaminação (JENKINSON & LADD, 1981; ASSIS *et al.*, 2003).

A intensidade dos processos de biotransformação dos materiais orgânicos no solo depende de vários fatores, sendo a quantidade de resíduos adicionada ao solo e as condições ambientais seus principais determinantes. De acordo com o observado na Figura 2.3, pode-se considerar a atividade da microbiota como um "ciclo" (respiração), cuja velocidade é função da energia disponível, ou seja, da quantidade de resíduo orgânico oxidável presente no solo.

Quanto maior a quantidade de material orgânico adicionado ao solo, mais rapidamente o ciclo é realizado, envolvendo um maior consumo de O_2, com liberação de CO_2 e diferentes produtos metabólicos, que por sua vez resultam em aumento de húmus no solo. Ao final do processo, cerca de 50-70% do carbono adicionado será metabolizado, dos quais 25-30% será incorporado em biomassa, e 5 a 10% ficarão retidos na fração húmica, completando o ciclo do carbono no solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

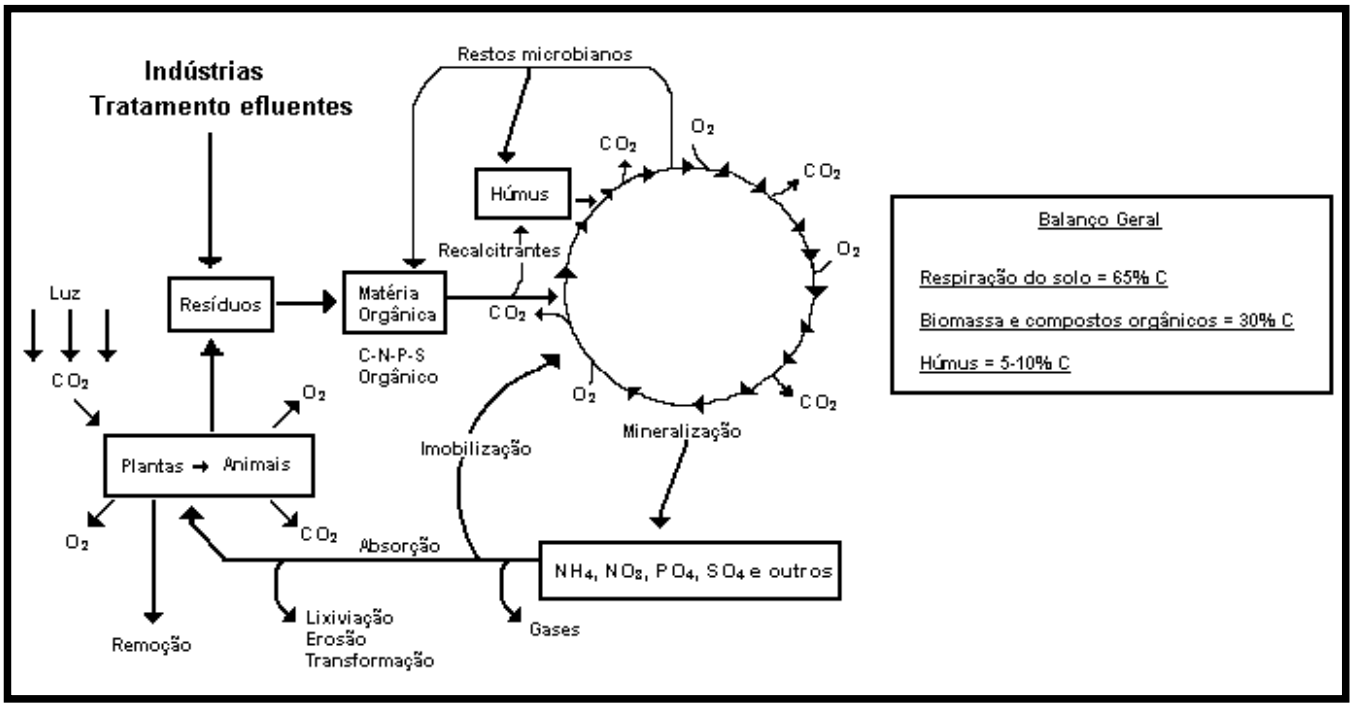


Figura 2.3: Esquema das transformações e ciclagem de C, N, P e S em sistema solo-planta através da microbiota do solo.

Fonte: MOREIRA & SIQUEIRA, 2002

2.1.2.2 – Atividade microbiológica

As propriedades biológicas e bioquímicas do solo, tais como: atividade enzimática, taxa de respiração, diversidade da biomassa microbiana, podem ser usadas como indicadores no monitoramento de alterações ambientais. Entretanto, as determinações quantitativas da biomassa no solo não fornecem indicação sobre o nível da atividade das populações microbianas nele presentes, sendo, por isso, importante avaliar parâmetros que estimem a atividade microbiana, tais como: o teor de carbono prontamente mineralizável e a atividade enzimática, para verificar o estado metabólico das comunidades de microrganismos do solo (MATSUOKA *et al.*, 2003).

A atividade biológica pode ser definida como toda reação bioquímica catalisada pelos organismos do solo. As atividades microbianas podem ser divididas em dois tipos: gerais e específicas. As atividades gerais são aquelas provenientes de todos ou quase todos os microrganismos do solo, como a respiração e a geração de calor, apresentando valores representativos como índice de atividade total do solo. As atividades específicas são medidas para grupos microbianos específicos, como os fixadores de nitrogênio e os nitrificadores, entre outros (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

2.1.2.2.1 – Respiração

A respiração representa a oxidação total da matéria orgânica por microrganismos aeróbios do solo a CO_2, que, para tanto, utilizam O_2 como aceptor final de elétrons. Assim sendo, a atividade de microrganismos heterotróficos aeróbicos, durante a oxidação de compostos orgânicos, pode ser avaliada tanto pelo consumo de O_2 quanto pela geração de CO_2. A medida da taxa respiratória é um dos mais antigos parâmetros para quantificar a atividade microbiana e, ainda hoje, é uma das mais utilizadas (KENNEDY & SMITH, 1995; MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

2.1.2.2.2 – Atividade enzimática

As enzimas do solo têm origem tanto de micro como macro organismos, incluindo plantas e animais. No entanto, a atividade das enzimas nem sempre pode ser relacionada a células metabolicamente ativas. As desidrogenases, envolvidas no transporte de elétrons acoplado à síntese de energia (ATP), podem ser exemplo de enzimas diretamente envolvidas no metabolismo celular (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Assim sendo, a atividade das desidrogenases nos processos oxidativos das células microbianas reflete a bioatividade geral de uma grande parte da população microbiana, o que permite seu emprego como medida de atividade biológica (TREVORS, 1984; NIELSEN & WINDING, 2002).

2.2 – PETRÓLEO: FORMAÇÃO, DEFINIÇÃO, DERIVADOS E POLUIÇÃO CAUSADA PELOS MESMOS EM SOLO

2.2.1 - Formação

A teoria mais aceita é de que o petróleo teve origem a partir da matéria orgânica de animais e vegetais em sedimentos, que sofreram transformações ao longo de milhares de anos. Os tipos de hidrocarbonetos gerados, óleo ou gás, são decorrentes da constituição da matéria orgânica original e pela intensidade dos processos de transformações atuantes sobre a mesma. O elemento mais importante e fundamental para a ocorrência de petróleo em quantidades significativas em uma bacia sedimentar, em algum tempo geológico passado ou presente, é a existência de grandes volumes de matéria orgânica de qualidade adequada acumulada quando da deposição de certas rochas sedimentares que são denominadas de geradoras. São estas rochas que, submetidas a certas temperaturas e pressões, geram o petróleo na subsuperfície. Se esta etapa não for realizada a natureza não terá meios de substituí-la, ao contrário de outras etapas constituintes do sistema petrolífero, que mesmo estando ausentes, podem ser de alguma forma compensadas por condições de exceções geológicas. As rochas geradoras são normalmente constituídas de material detrítico de granulometria muito fina (fração argila). A princípio, quanto maior a quantidade de matéria orgânica, mais capacidade terá a rocha para gerar grandes quantidades de petróleo. Entretanto, a incorporação desta matéria orgânica na rocha deve vir acompanhada da preservação de seu conteúdo original, rico em compostos de C e H. Para isto, o ambiente deve estar livre de oxigênio, elemento altamente oxidante e destruidor de C e H das partículas orgânicas originais (MILLANI *et al*. 2000).

2.2.2 – Definição e derivados do petróleo

O petróleo pode ser definido como um líquido viscoso, em geral de coloração escura, que ocorre naturalmente, cuja composição química varia de lugar para lugar. Em geral, também contém compostos de enxofre, oxigênio, nitrogênio, metais e outros elementos. É formado por uma mistura de diferentes hidrocarbonetos com diferentes pontos de ebulição, sendo matéria-prima de grande importância para a economia. Os hidrocarbonetos consistem em três grandes grupos de compostos que são: alcanos (parafinas), alquenos (olefinas) e os aromáticos. As parafinas são os maiores constituintes do petróleo, havendo três grandes classes de parafinas: a linear, a ramificada e os naftênicos (CARRARO, 1977; NEIVA, 1986; BURGER, 1997). Os hidrocarbonetos compostos de hidrogênio e carbono representam cerca de 90% do dos óleos crus e dependendo da sua densidade *("gravity"),* os óleos são classificados pelo American Petroleum Institute (API) em vários graus, sendo que quanto maior o

grau, melhor e mais leve é o petróleo. Todavia, alguns fatores podem afetar o grau API dos óleos como a idade geológica, a profundidade do reservatório, os tectonismos, a salinidade e o teor de enxofre (CORREA, 2003).

Devido à sua complexidade de formação, o petróleo é considerado um bem precioso e necessário para a humanidade, sendo transportado para diversos países no mundo para subsistência dos mesmos. Os derivados de petróleo são obtidos a partir da destilação do óleo cru, onde as frações são submetidas a complexos tratamentos para que sejam convertidas nos produtos finais desejados, tais como: a) produtos de baixo peso molecular - gasolina (contendo em média 50-70% (p/p) de hidrocarbonetos alifáticos, 25-45% (p/p) de aromáticos e até 20% (p/p) de olefinas), combustíveis de aviação e óleo diesel; b) produtos de alto peso molecular - óleos lubrificantes e outros combustíveis; c) produtos de altíssimo peso molecular - asfaltenos e piches. O óleo cru e o gás natural são encontrados em quantidades comerciais em reservas sedimentares situadas em mais de 50 países de todos os continentes; sendo que as maiores jazidas se encontram no Oriente Médio, onde se concentram mais da metade das reservas conhecidas de óleo cru e quase um terço das reservas conhecidas de gás natural (CRAVO JR., 1998; *Apud* BAPTISTA, 2007). O petróleo é normalmente separado em frações de acordo com a faixa de ebulição dos compostos. A Tabela 2.4 mostra as frações típicas que são obtidas do petróleo.

Tabela 2.4: Principais frações do petróleo, respectivas características e suas aplicações**.**

FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO APROXIMADA	PONTO DE EBULIÇÃO	PRINCIPAL APLICAÇÃO
Gás residual Gás liquefeito de petróleo – GLP	**C_1-C_4**	**Abaixo de 40 ℃**	**Gás combustível, uso doméstico e industrial.**
Gasolina	**C_5-C_{10}**	**40 a 175 ℃**	**Combustível de automóvel, solvente.**
Querosene	**C_{11}-C_{12}**	**175 a 235 ºC**	**Iluminação, combustível de aviões a jato.**
Gasóleo leve	**C_{13}-C_{17}**	**235 a 305 ºC**	**Diesel, fornos**
Gasóleo pesado	**C_{18}-C_{25}**	**305 a 400º C**	**Combustível matéria-prima para lubrificantes**
Lubrificantes	**C_{26}-C_{38}**	**400 a 510ºC**	**Óleos lubrificantes**
Resíduo	**Acima de C_{38}**	**Acima de 510ºC**	**Asfalto, piche, impermeabilizante**

Fonte: THOMAS, 2001

2.2.3 – Poluição causada pelo óleo cru no solo

As conseqüências ambientais são substanciais em todo o processo de desenvolvimento do petróleo. Cada estágio do processo – exploração, perfuração *onshore* (em solo) e *offshore* (em mar), refino, transporte por oleodutos ou outras formas – apresentam sérios riscos ao meio ambiente. A sociedade moderna é dependente do petróleo, porém, o mesmo representa uma das piores fontes de poluição, ao causar efeitos ecológicos de curta e longa duração e trazer prejuízos às atividades sócio-econômicas nos territórios atingidos (La GREGA *et al.,* 1994).

Por serem visíveis e pelas imagens sensacionais que geram as poluições causadas por derrames de navio-tanque de petróleo e derivados ou de rompimentos de oleodutos são as que mais chamam atenção da população. Entretanto, esses tipos de acidentes representam apenas uma parcela do total de óleo derramado no meio ambiente. A poluição crônica causada, principalmente, em ambientes próximos às refinarias, operações rotineiras dos navios ou terminais de reservatório são as grandes vilãs da contaminação de petróleo no meio ambiente (La GREGA *et al.,* 1994).

Em solos os derrames de petróleo podem ocorrer de muitas formas, mas os maiores eventos ocorrem pelo rompimento de oleodutos, explosões de poços ou perfuração ou erosão de tanques combustíveis. As causas de um rompimento de oleoduto podem ser diversas desde um equipamento de bombeamento danificado até mesmo por sabotagem. Contudo, devido ao uso de sensores e mecanismos de interrupção de seções de oleodutos estes eventos são bem menores que a poluição do petróleo causada por acidentes em navios-tanque. Os efeitos diretos do óleo sobre a vegetação de um solo fértil resultam em efeitos físicos e toxicidade química, que dependem das características do óleo e do local contaminado. O impacto físico do óleo sobre a vegetação age primeiramente na folhagem e na superfície do solo. Quando a camada de óleo se deposita na planta, bloqueia o caminho da transpiração, reduzindo a fotossíntese e causa a morte da mesma (BURGER, 1997; PEZESHKI *et al.*, 2000).

2.2.3.1 – Transformação de hidrocarbonetos de petróleo em solo

Ao ser adicionado ao solo, um hidrocarboneto pode sofrer a ação de processos físicos, químicos e biológicos, interagindo com as fases sólidas, líquidas, gasosas e, consequentemente com a microbiota do solo. Um dos exemplos mais importante de uma transformação físico-química de hidrocarbonetos no solo é o que envolve o processo de adsorção da molécula na particulada do solo (matéria orgânica e argila, principalmente), reduzindo a concentração do composto na fase líquida e diminuindo,

dessa forma, a disponibilidade do composto para o ataque microbiano. No solo, todos os tipos de fixação de íons ou moléculas sobre ou dentro da fase sólida é chamada de adsorção. A adsorção é definida como adesão ou atração de uma ou mais compostos iônicos ou moleculares numa superfície. A adsorção pode ser mediada por processos físicos, através de forças de Van der Waals ou por ser processos químicos, por ligações eletrostáticas e pontes de hidrogênio (GROVER,1975). Todavia, há ainda o termo sorção que é definido como o processo em que compostos orgânicos tornam-se associados à fase sólida. Devido à baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção dos compostos hidrofóbicos à fase sólida do solo, a degradação desses compostos pode ser limitada devido à baixa biodisponibilidade aos microrganismos degradadores (JOHNSEN *et al.,* 2005). A matéria orgânica do solo é a que mais influencia na sorção dos compostos hidrofóbicos, sendo ainda que vários autores demonstraram relações lineares positivas entre o teor de C orgânico do solo e a capacidade de sorção de hidrocarbonetos e principalmente dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (CARMICHAEL & PFAENDER, 1997; LUEKING *et al.,* 2000).

O pH do solo tem influência na atividade microbiana atuando na degradação dos hidrocarbonetos. Os demais processos de transformação e degradação desses compostos dependem tanto das características do próprio solo, como das características físico-químicas dos contaminantes, pois moléculas de massa molecular muito alta ou elementos que contêm halogênios e/ou anéis aromáticos altamente condensados são mais persistentes. A persistência depende também da eficiência de processos físicos de transformação, tais como evaporação, lixiviação, erosão, absorção, etc. No caso dos processos biológicos, o conhecimento da biodiversidade dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo é de grande importância para a compreensão dos aspectos ecológicos envolvidos na biodegradação através da ação microbiana (LICHTENSTEIN & SCHULTZ, 1964; ANDRÉA & PETTINELLI, 2000).

Estudos realizados pelo UNEP (1991) demonstram que a velocidade de degradação do petróleo depende das características físicas e químicas do óleo e das condições do tempo e do clima. Nos sedimentos aquáticos, os hidrocarbonetos são degradados muito lentamente na ausência de luz e oxigênio. A degradação microbiológica possui uma seqüência preferencial de compostos a serem degradados. Os hidrocarbonetos alifáticos (alcanos e alcenos) são mais rapidamente e facilmente degradados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos e finalmente cicloalcanos. A degradação do óleo é bem mais lenta no sedimento do que na água, inclusive os compostos mais

leves persistem mais tempo no sedimento, devidos aos vários fatores mencionados anteriormente como o da sorção do óleo no solo.

2.2.3.2 – Compostos persistentes no solo

Compostos persistentes são, por definição, substâncias que têm meia-vida longa, ou seja, lenta taxa de desaparecimento no meio ambiente, devido, principalmente, à sua estabilidade química (BRO-RASMUSSEN, 1986). Muitos xenobióticos persistem por um longo período no solo, e esta persistência pode ser atribuída à toxicidade de certos compostos ou à incapacidade dos microrganismos de crescer e/ou biodegradar tais compostos em determinadas condições. Muitos pesticidas são considerados persistentes no solo, como o dicloro-difenil-tri-cloro-etano (DDT) que demora cerca de 5 a 10 anos para ser degradado (DUA *et al.*, 2002). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são também exemplos de compostos persistentes, que podem contaminar o solo por ocasião de derrames de óleo cru. Muitos estudos têm sido feitos com HPAs devido à natureza carcinogênica e recalcitrante de muitos desses hidrocarbonetos, por isso considerados os compostos mais perigosos presentes no óleo cru. Por serem persistentes na natureza, a presença de HPAs no solo causa grandes danos aos seres vivos, com prejuízos inestimáveis a todo o ecossistema por longo tempo. Atualmente, mais de 100 HPAs são reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), entretanto, somente 16 HPAs são considerados em função de suas importâncias industriais, ambientais e toxicológicas (POTIN, 2004). A metabolização dos HPAs gera compostos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (JACQUES *et al.* 2007).

A estrutura dos HPAs tem efeito significativo sobre a biodegradação, uma vez que compostos com menor número de anéis aromáticos, como antraceno, fenantreno e pireno, são mais rapidamente degradados do que criseno, pirileno e 1,2-benzantraceno, que possuem maior número de anéis (ALAN & FEREK, 1993; ALEXANDER, 1999; LIEBERG & CUTRIGHT, 1999). Em vista da ampla distribuição dos HPAs no ambiente, da possibilidade de ocasionarem problemas à saúde de humanos e animais, e dos limites impostos pela legislação ambiental, sua eliminação do ambiente deve ser buscada, visando à redução da exposição e da absorção por mamíferos. A biorremediação é uma alternativa para a remoção dos HPAs do solo, já que os microrganismos degradadores irão transformá-los em substâncias inertes, CO_2 e água. Porém, a baixa biodisponibilidade de HPAs aos microrganismos

degradadores, devido à sorção na fase sólida orgânica ou mineral do solo, também pode limitar a biorremediação. Uma maneira de minimizar esta baixa solubilidade seria a adição de surfactantes, cujas características serão discutidas mais adiante. A estrutura química de alguns HPAs é dada na Figura 2.4.

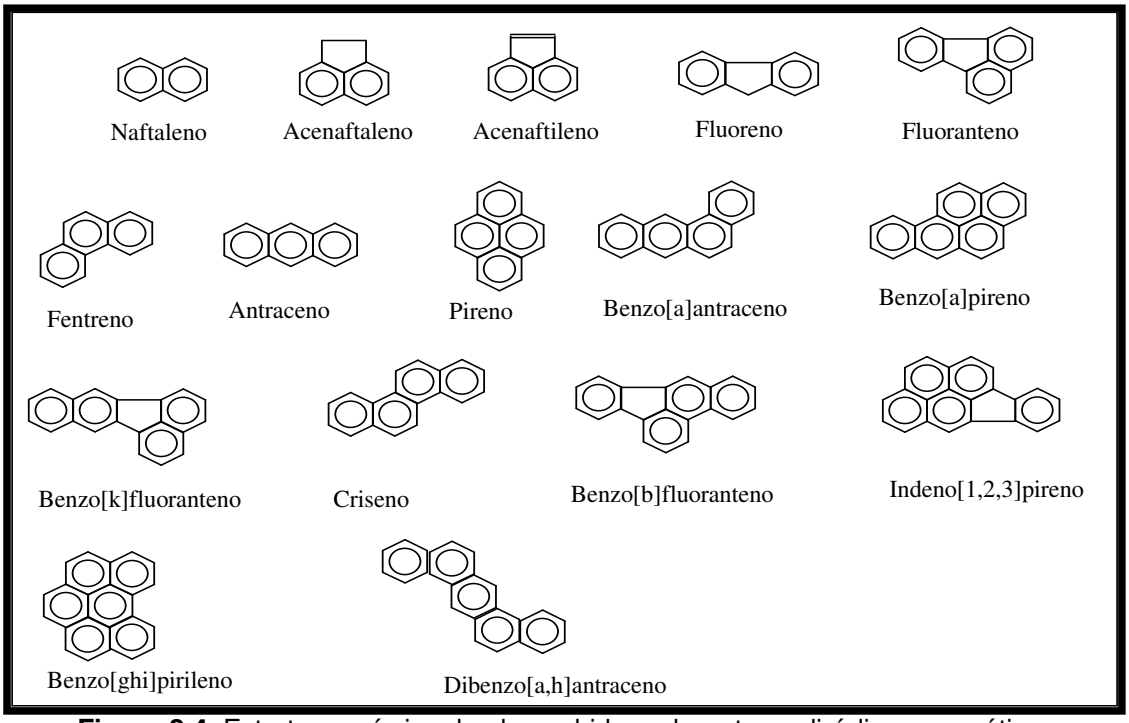


Figura 2.4: Estrutura química de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Fonte: GLASER & POTTER, 1996.

2.3 – SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁREAS IMPACTADAS COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

São vários os sistemas propostos para a remediação de áreas impactadas por petróleo. Contudo, o tratamento a ser adotado deve considerar as condições singulares e intrínsecas da área contaminada. Algumas alternativas de remediação são baseadas em tecnologias como: bombeamento e tratamento ("pump-and-treat"), aeração *in situ* ("air sparging"), lavagem de solo e reinjeção (recarga artificial); barreiras de contenção física pouco permeável, biorremediação *in situ*, processos de oxidação química, processos térmicos, barreiras físicas permeáveis, processo de encapsulamento e solidificação, dentre outros (FURTADO, 2005; NOBRE & NOBRE, 2003; RISER-ROBERTS, 1998). A seguir serão relatadas algumas tecnologias de tratamento de sítios contaminados por petróleo.

2.3.1 – Processos Físicos

2.3.1.1 – Processo de encapsulamento e solidificação

A técnica de microencapsulamento é uma das mais utilizadas para tratamento de solos impactados com altas concentrações de hidrocarbonetos. Nesta técnica utilizam-se dois tipos de produtos à base de água: um emulsificante e um composto à base de sílica. A aplicação do primeiro produto promove a emulsificação do hidrocarboneto, enquanto a sílica reage com o hidrocarboneto emulsionado formando um produto não solúvel, o que garante a redução da mobilidade do hidrocarboneto e da toxicidade (RISER-ROBERTS, 1998).

2.3.1.2 – Lavagem do solo

Estes métodos fundamentam-se no princípio tecnológico da transferência de um contaminante do solo para um seqüestrador (ou captador) na fase líquida ou gasosa. Como resultado do tratamento obtém-se, principalmente, o solo tratado e os contaminantes concentrados. Em geral, as argilas têm uma elevada afinidade por muitos dos compostos orgânicos por mecanismos físicos e químicos. Dessa forma, para separar os contaminantes do solo, será necessário promover a quebra das ligações entre as moléculas orgânicas e as partículas do solo, ou extrair as partículas contaminadas do solo (RISER-ROBERTS, 1998). Uma das técnicas de lavagem de solo utiliza surfactantes para remover o contaminante do solo através de redução da tensão interfacial do óleo/água, fazendo com que o óleo fique em solução na forma coloidal. Existem duas formas de aplicação desta técnica, no próprio local *(in situ*) ou em reatores. A forma *in situ* não é muito aplicada, devido à introdução de mais um contaminante no ambiente, como também pela dificuldade de estabelecer condições operacionais seguras (CETESB, 2007).

Os processos de lavagem de solo com surfactantes apresentam resultados relativamente rápidos e já vêm sendo utilizados há muito tempo. Entretanto, a utilização de biossurfactantes em lavagem de solo é uma prática relativamente nova. URUM *et al.,* (2003) utilizaram o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), e dois biossurfactantes um de origem microbiológica (ramnolipídio) e outro de origem vegetal (saponina) para lavagem de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e observaram que tanto SDS quanto o ramnolipídio contribuíram para maior remoção do óleo. Entretanto, foi observado que os biossurfactantes mostraram certa preferência em remover compostos aromáticos, tendo em vista que tanto a saponina quanto o ramnolipídio foram mais eficientes na remoção do naftaleno, sendo que a saponina foi ainda mais eficiente na remoção de fenantreno.

A lavagem do solo *in situ* ou "*soil flushing*" consiste na extração dos contaminantes do solo fazendo passar água ou uma solução aquosa adequada através das camadas contaminadas, mediante um processo de injeção ou infiltração. Os contaminantes são arrastados até o lençol freático, procedendo-se, depois, ao bombeamento da água subterrânea e respectivo tratamento. Esta tecnologia aplica-se, especialmente, aos contaminantes inorgânicos, incluindo contaminantes radioativos, mas pode ser usada para tratar compostos orgânicos voláteis (VOCs), compostos orgânicos semivoláteis (SVOCs), combustíveis e pesticidas, mas, em geral, não apresenta uma relação custo-benefício tão favorável quanto outras técnicas, no que diz respeito ao tratamento destes contaminantes. A adição de surfactantes compatíveis com as condições ambientais pode aumentar a solubilidade de alguns compostos orgânicos, mas existe a possibilidade da solução de lavagem provocar alterações fisico-químicas do solo; esta tecnologia oferece a possibilidade de recuperação de metais e consegue mobilizar uma grande variedade de contaminantes orgânicos e inorgânicos em solos de granulometria grosseira (RISER-ROBERTS, 1998).

2.3.1.3 - Separação Eletrocinética (Electrokinetic Separation):

O processo de remediação eletrocinética permite tirar partido de processos eletroquímicos e eletrocinéticos para promover a dessorção e remoção de metais e de compostos orgânicos polares. Aplica-se ao solo uma corrente direta de baixa intensidade mediante a introdução de eletrodos. Esta tecnologia de processamento do solo é fundamentalmente um método de extração de contaminantes. Esta técnica aplica-se a solos, sedimentos e lamas contaminados com metais pesados e compostos orgânicos polares. As concentrações de contaminantes que permitem a aplicação desse processo variam de algumas partes por milhão (ppm) a várias dezenas de milhares de ppm (g/L). A separação eletrocinética aplica-se, principalmente, no caso de solos de baixa permeabilidade, tais como solos argilosos saturados ou parcialmente saturados, difíceis de drenar. A eficiência é drasticamente reduzida quando a umidade do material é inferior a 10%. Obtém-se máximo rendimento nos casos em que esta varia entre 14 e 18%. Esta técnica apresenta maior eficácia no tratamento de solos argilosos devido à carga superficial negativa das partículas de argila. No entanto, a carga superficial dessas partículas pode ser alterada quer pela variação do pH da solução do solo quer pela adsorção de contaminantes (RISER-ROBERTS, 1998).

2.3.1.4 – Contenção hidráulica, bombeamento e tratamento (Pump-and-treat)

A remediação de contaminantes em solo ou água subterrânea, pela utilização de barreira hidráulica, é denominada em inglês de *'pump-and-treat'* que significa bombeamento e tratamento. É um processo físico *ex-situ* de extração de águas contaminadas da zona saturada. Nesse procedimento, a água contaminada por poluentes orgânicos é retirada por bombeamento, submetida a um processo de remoção de poluentes e descarregada, às vezes, de volta ao reservatório natural. Apesar de ser eficaz no controle da migração de plumas de contaminação, o *pump-and-treat* possui várias restrições físicas e químicas que limitam a sua eficácia quanto à remediação em longo prazo, especialmente se utilizado de forma isolada, ou no caso de aquíferos contaminados com líquidos não miscíveis com a água (NAPLs - *Non Aqueous Phase Liquids*). Técnicas adicionais e associadas a sistemas de controle de migração de plumas são muitas vezes recomendadas, tendo em vista o lento processo de dissolução natural desses líquidos em águas subterrâneas (NOBRE & NOBRE, 2003).

2.3.2 – Processos químicos

Os processos químicos incluem a extração por solvente, desalogenação química e processos oxidativos avançados, dentre outros.

2.3.2.1 – Processos oxidativos avançados (POAS)

Na utilização dos POAS, em sua grande maioria, há a formação do radical hidroxila (OH•) que é altamente oxidante e capaz de reagir com, praticamente, todas as classes de compostos orgânicos e inorgânicos. O contaminante é degradado através de uma série de reações químicas, tendo como produtos finais CO_2, H_2O e íons inorgânicos. A oxidação química é um processo rápido, quando comparado aos processos biológicos, porém, a matriz do solo é modificada pela ação dos agentes oxidantes, fato que não ocorre nos processos biológicos (WATTS *et al.*, 1993; SCOTT & OLLIS, 1995).

2.3.2.2 – Extração química

A extração química consiste em misturar o solo com um solvente num reator, promovendo-se, assim, a dissolução dos contaminantes. A fase líquida é, então, transportada para um separador, onde se dá a separação dos contaminantes e do solvente, que são, posteriormente, tratados e reutilizados respectivamente. Essa tecnologia não destrói os contaminantes, sendo seu objetivo reduzir a massa de resíduo a ser tratada. A extração química difere da técnica de lavagem do solo, em que a água ou uma solução aquosa é usada como fluído lavador. Existem duas

variantes principais desta técnica, a extração ácida e a extração por solvente. A extração ácida consiste, geralmente, em usar ácido clorídrico para extrair metais pesados do solo. A extração por solvente é uma forma comum de extração química, em que é usado um solvente orgânico para extrair os contaminantes. A extração por solvente tem sido aplicada com eficiência no tratamento de solos contaminados essencialmente com compostos orgânicos tais como, PCBs, VOCs, solventes halogenados e petróleo. A extração ácida é adequada ao tratamento de solos, lamas e sedimentos contaminados com metais pesados. Alguns tipos de solo com elevada umidade afetam negativamente a eficácia do processo de extração (RISER-ROBERTS, 1998).

2.3.3 – Processos térmicos

Neste tipo de tratamento usa-se temperatura na faixa de 870 a 1200 ºC para volatilizar e queimar, na presença de oxigênio, compostos halogenados e outros orgânicos refratários. A incineração é utilizada para descontaminar solos que contenham resíduos perigosos, particularmente hidrocarbonetos clorados, PCBs e dioxinas. As necessidades energéticas dos processos térmicos são, normalmente, bastante elevadas e, ainda, podem ocasionar emissões de substâncias tóxicas. Contudo, em determinados casos, podem ser utilizadas temperaturas relativamente baixas, reduzindo o consumo de energia. Além disso, existe a possibilidade de minimizar a poluição ambiental pelo tratamento das emissões gasosas. Os custos desse processo dependem, não só do processo em si, como também do teor de umidade, tipo de solo e concentração de poluentes, bem como de medidas de segurança e das regulamentações ambientais em vigor (ALAN & FEREK, 1993). O processo térmico mais utilizado no tratamento de resíduos é a incineração, que é considerada por uns uma forma de disposição final de resíduos e consiste na decomposição térmica, via oxidação, com o objetivo de tornar o resíduo menos volumoso, menos tóxico ou não tóxico.

2.3.4 – Processos biológicos

Os processos biológicos podem ser tratados *in situ* (no local) ou *ex situ* (fora do local). A seguir serão relatados alguns desses processos.

2.3.4.1 – Processos biológicos in situ

2.3.4.1.1. – Barreiras reativas permeáveis (BRPs).

As barreiras reativas permeáveis (BRPs) consistem em sistemas de engenharia que favorecem a passagem das águas subterrâneas através de barreiras reativas que

podem ser aeróbicas ou anaeróbicas no caso de reações mediadas biologicamente. A utilização dessas barreiras é uma tentativa de fazer melhor uso das tecnologias naturais, de forma a acelerar o processo de degradação do contaminante. No Brasil há uma unidade de cloro-soda da Braskem, em Camaçari (Bahia), que faz uso dessa tecnologia, pioneira no país, com custo orçado em R$ 2,5 milhões (NOBRE & NOBRE, 2003; FURTADO, 2005). A Figura 2.5 mostra um esquema de tratamento de água subterrânea utilizando uma barreira reativa permeável.

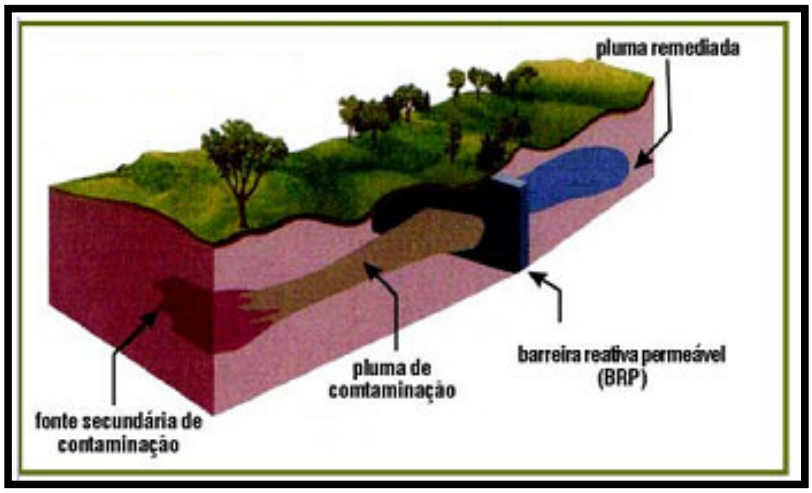


Figura 2.5: Esquema de tratamento de água subterrânea utilizando a técnica de barreira reativa permeável.

Fonte: NOBRE & NOBRE, 2003.

2.3.4.1.2 – Bioventing ou bioventilação

A "bioventing" é uma técnica recente e promissora, que se baseia no estímulo da degradação *in situ* de qualquer composto degradável aerobicamente, através do fornecimento de oxigênio aos microrganismos presentes no solo e, normalmente, consiste no uso de ar atmosférico para aumentar a atividade de microrganismos aeróbicos na remediação de áreas contaminadas. Esta tecnologia tem sido usada no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo, solventes não clorados, alguns pesticidas, conservantes de madeira, entre outros orgânicos. Entretanto, a proximidade da superfície do nível freático, a existência de zonas saturadas, ou a baixa permeabilidade do solo reduzem a eficiência desta técnica. Esta tecnologia é vantajosa por ser um tratamento *in-situ* e, também, por requerer pouca quantidade de equipamentos. Solos com baixa permeabilidade, tais como os argilosos, não se adaptam para a utilização desta tecnologia, pois não se consegue suprimento de ar, rápido e adequado, para atender às necessidades de oxigênio para o metabolismo microbiano (ALEXANDER, 1999).

2.3.4.1.3 – Fitorremediação

Dentre os processos biológicos, insere-se a fitorremediação, que envolve o emprego de plantas utilizadas como agentes despoluidores de solo. Sua utilização tem sido avaliada, principalmente, em solos contaminados com metais pesados (ACICIOLY & SIQUEIRA, 2000) além dos tratamentos em solos contaminados por petróleo e derivados de petróleo e outros compostos orgânicos (ANDERSON & WALTON, 1995; CUNNINGHAM et al., 1996; CORSEUIL & MORENO, 2001). Em geral, é mais difícil trabalhar com contaminantes orgânicos, em razão da diversidade molecular, da complexidade de análise e das constantes transformações a que estão sujeitos. Neste contexto, os metais pesados são mais facilmente quantificados e raramente formam metabólitos intermediários no solo, como ocorre na biodegradação dos contaminantes orgânicos. Assim, as pesquisas com compostos orgânicos contaminantes de solo exigem técnicas especializadas e de custo mais elevado que o tratamento de solos contaminados com metais pesados, envolvendo o uso de elementos marcados e sofisticada instrumentação analítica (PIRES *et al.,* 2005).

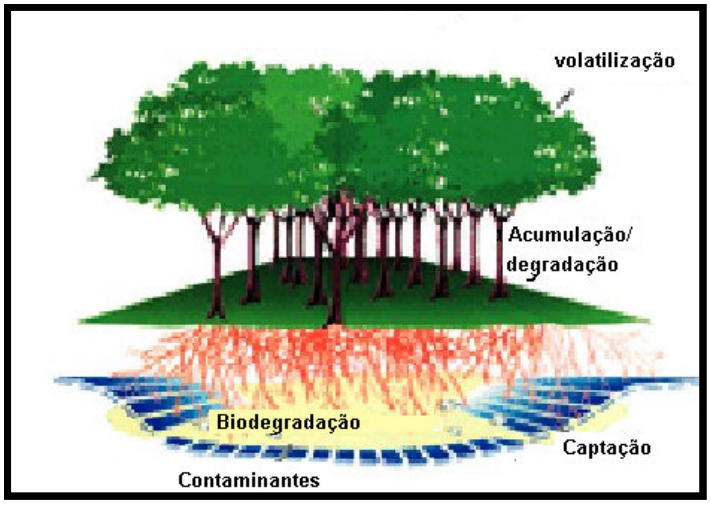


Figura 2.6: Variáveis envolvidas num processo de Fitorremediação
Fonte: http://arabidopsis.info/students/dom/mainpage.html. Abril/2007

2.3.4.1.4 – Atenuação natural monitorada

O processo de atenuação natural monitorada (ANM) é baseado nos princípios naturais de degradação *in-situ* e resulta da interação de uma série de processos químicos, físicos e biológicos. Em condições favoráveis, a biodegradação dos contaminantes ocorre sem intervenção humana para reduzir a massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração desses contaminantes em solos ou aquíferos. Essa tecnologia

demanda, normalmente, um tempo maior para atingir os valores estabelecidos pela lei ambiental (NATIONAL RESEARCH COUCIL, 2000). Quando não há risco que justifique a adoção de tratamento para acelerar a remediação da área, o melhor a fazer é deixar a natureza se autodepurar, ou seja, optar pela chamada Atenuação Natural Monitorada (NOBRE & NOBRE, 2003; FURTADO, 2006). A biodegradação natural pode ser indicada para compostos orgânicos voláteis (VOCs), semivoláteis (SVOCs) e combustíveis à base de hidrocarbonetos (U.S. EPA, 1995, *Apud* BAPTISTA 2007). Algumas desvantagens desse tratamento são: a caracterização (avaliação das condições geológicas e geoquímicas) e o monitoramento do local contaminado por um longo período, elevando, assim, os custos do tratamento; os produtos finais podem ser mais tóxicos que os contaminantes originais; pode haver a migração do contaminante no solo antes da degradação causando, por exemplo, erosão, volatilização e lixiviação (BAPTISTA, 2007).

Em geral, o processo de atenuação natural está diretamente relacionado a cinco mecanismos: a) biodegradação; b) transformação química (hidrólise e desalogenação; c) estabilização dos contaminantes em, por exemplo, argila e materiais húmicos que dificultam e impedem a migração do contaminante; d) volatilização, embora seja um componente de menor intensidade no processo de atenuação natural, a volatilização permite a transferência de compostos orgânicos voláteis para a atmosfera; e) Dispersão. A Figura 2.7 mostra as reações envolvidas num processo de atenuação natural.

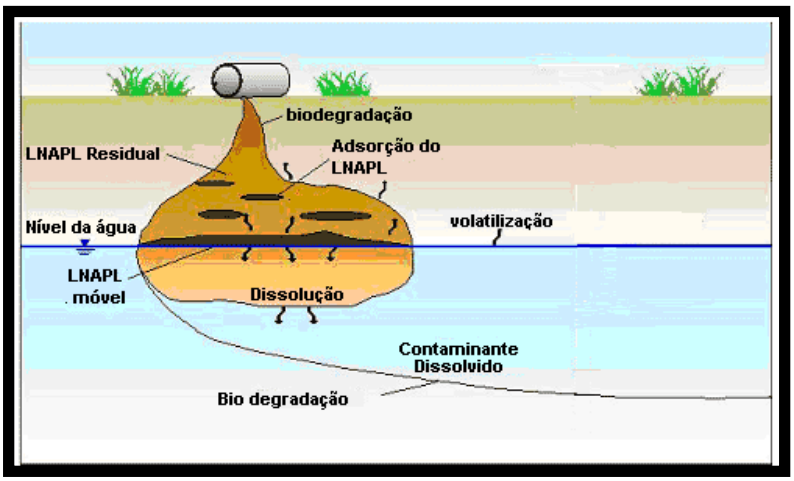


Figura 2.7: Reações envolvidas num processo de atenuação natural após um derrame de petróleo.

Fonte: www.envirotools.org. Abril/2007

2.3.4.2 – Processos biológicos ex situ

2.3.4.2.1 – Biopilhas

A tecnologia de Biopilhas envolve a construção de células ou pilhas de solo contaminado de forma a estimular a atividade microbiana aeróbica dentro da pilha através de uma aeração muito eficiente. A atividade microbiana pode ser aumentada pela adição de água e nutrientes como nitrogênio e fósforo. Os microrganismos degradam os hidrocarbonetos adsorvidos nas partículas de solo, reduzindo, assim, suas concentrações. Tipicamente, as Biopilhas são construídas sobre uma base impermeável para reduzir o potencial de migração dos lixiviados para o ambiente subsuperficial. Uma malha de dutos perfurados instalados na base da pilha e conectados a um compressor garante a perfeita aeração do conjunto. Em alguns casos, constrói-se um sistema de coleta do lixiviado, principalmente, quando se utiliza um sistema de ajuste de umidade. As pilhas são, geralmente, recobertas por plástico para evitar a liberação de contaminantes para a atmosfera, bem como para protegê-la das intempéries. A biopilha necessita de espaço suficiente para o tratamento do solo contaminado e, além disso, ao escavar o solo, pode-se liberar para o ambiente compostos orgânicos voláteis (VOCs) (SEABRA, 1997; PALA, 2002).

2.3.4.2.1 – Landfarming

O "*landfarming*" é uma das tecnologias de remediação que consiste na aplicação do resíduo oleoso na superfície do solo, de modo a reduzir as concentrações dos constituintes de petróleo por meio da biodegradação microbiana. O espalhamento do material oleoso contaminante sobre o solo e a incorporação na camada arável, também denominada camada reativa, pode afetar, diretamente e de modo diferenciado, os microrganismos responsáveis pela biodegradação. A biodegradação microbiana, que é o mecanismo primário de eliminação dos poluentes orgânicos do ambiente, compõe a base deste tratamento, sendo de grande importância a manutenção de uma comunidade microbiana heterotrófica ativa, mas são escassos os estudos relacionados à atividade dos microrganismos em área de tratamento de resíduo petroquímico por "*landfarming*" (DE PAULA *et al.*, 2006).

2.3.4.2.2 – Biorreatores

Os biorreatores facilitam o controle do processo de biodegradação dos poluentes no solo, facilitando a aclimatação da microbiota e seu desenvolvimento. O emprego dos biorreatores vem surgindo como uma tecnologia viável e decisiva para tratamento de solos contaminados com compostos orgânicos (URURAY, 1998). O reator de lama é uma técnica que envolve o tratamento controlado do solo escavado em reator

biológico. O solo é primeiramente processado de modo a separar fisicamente os componentes de maiores dimensões. Em seguida é adicionado água até um volume pré-determinado, dependente da concentração dos contaminantes, da velocidade da degradação biológica e da natureza do solo. A fração arenosa, já limpa, é retirada do sistema, restando a fração de finos e a água de lavagem, que serão tratados biologicamente. O solo é mantido em suspensão no reator e misturado com nutrientes e oxigênio e, se necessário é feita a correção de pH. Após a degradação estar completa procede-se à secagem das lamas (de PAULA *et al.* 2006). BAPTISTA *et al.* (2006) utilizaram reatores de leito fixo para tratamento de solo argiloso contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e verificaram uma remoção de cerca de 45% de Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) após 45 dias de tratamento.

2.3.5 – Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo: o estado da arte

A biorremediação é um método atrativo para tratar solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo devido aos baixos custos relativos ao processo. Conforme descrito anteriormente, os processos biológicos baseiam-se na capacidade dos microrganismos em metabolizar uma grande diversidade de compostos químicos e, ainda, existe a possibilidade deles se adaptarem às fontes de carbono e de energia presentes. Adicionalmente, tanto os solos quanto às águas subterrâneas contêm diferentes espécies microbianas. Por isso, a técnica de biorremediação tem sido amplamente utilizada na recuperação de solos contaminados com óleo cru e seus derivados visto que podem levar à transformação, através de processos naturais, de xenobióticos em substâncias de menor toxicidade, sendo que o solo, como um sistema vivo para o crescimento da planta, não é destruído. No entanto, o grau de descontaminação irá depender da natureza e concentração do poluente presente, assim como das características do solo (AUTRY & ELLIS, 1992; DEL'ARCO, 1999; ADENIYI & AFOLABI, 2002).

2.3.5.1 – Técnicas de biorremediação de solo impactado com hidrocarbonetos de petróleo

Existem basicamente duas técnicas de utilização da biorremediação que podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, dependo das características do contaminante e do solo que são o bioestímulo e o bioaumento.

O bioestímulo consiste na adição de nutrientes para aumentar a atividade microbiana para aumentar a eficácia do processo. O bioaumento consiste na adição de linhagens microbianas para aumentar o potencial de biodegradação dos contaminantes no solo. Em relação à técnica de bioestímulo, o nitrogênio e o fósforo são os nutrientes

principais elementos empregados. O nitrogênio pode ser utilizado para a síntese de material celular (NH_4) e como aceptor final de elétrons (NO_3^-), podendo ser adicionado na forma de uréia, cloreto de amônio ou outro sal de amônio. O fósforo pode ser empregado como fosfato de sódio, fosfato de potássio, sais orto fosfóricos e polifosfatos. Essas fontes são facilmente assimiladas pelos microrganismos e quando em concentrações adequadas vão estimular a biodegradação dos contaminantes (LIEBEG & CUTRIGHT, 1999, *Apud* da CUNHA, 2004).

A técnica de bioaumento que consiste na adição de população microbiana nativa ou não do solo envolve principalmente a aplicação de bactérias e fungos que utilizam os contaminantes orgânicos como fonte de alimento. Uma vez comprovada a capacidade oxidativa de uma determinada cepa, ou ainda da combinação de várias cepas, deve-se adotar modelo de estudo em microcosmo para a verificação do potencial de adaptação/competição com a microbiota nativa do solo.

Os organismos mais comuns isolados em áreas contaminadas por hidrocarbonetos são bactérias heterotróficas dos gêneros: *Pseudomonas, Achromobacter, Artrobacter, Micrococcus, Vibrio, Acinetobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Mycobacterium e Nocardia* (RISER-ROBERTS, 1998).

2.3.5.2 – Fatores que afetam a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

A velocidade da degradação microbiológica dos hidrocarbonetos é influenciada por muitos fatores que direta ou indiretamente têm influência sobre o metabolismo e, por conseguinte, no crescimento das espécies microbianas, conforme será relatado a seguir:

2.3.5.2.1. Temperatura

Muitos microrganismos heterotróficos são capazes de degradar hidrocarbonetos dentro de uma ampla faixa de temperatura. Entretanto, em temperaturas muito baixas como, por exemplo, em climas frios, a biodegradação de muitos substratos orgânicos diminui devido à diminuição da atividade microbiológica. Em temperaturas muito altas, as proteínas microbianas podem ser irreversivelmente danificadas, causando interrupções das funções da célula, embora haja microrganismos termófilos capazes de tolerar estas altas temperaturas, entretanto, estão presentes no solo em menor quantidade que os mesófilos que toleram temperaturas ambientes. Várias pesquisas têm demonstrado uma correlação entre a atividade microbiana e a temperatura do solo que, por sua vez, interfere acentuadamente na velocidade de degradação. A faixa de

30 a 40ºC é considerada ideal na biodegradação dos hidrocarbonetos (MIROSLAV *et al.,* 1996; ALEXANDER, 1999; TSAI *et al.,* 1992; LEAHY &COLWELL, 1990).

2.3.5.2.2 - pH

O pH do solo tem ação direta na atividade metabólica da microbiota nele existente, sendo função da tolerância de cada espécie microbiana. Segundo TSAI *et al.* (1992), em relação ao pH, os microrganismos podem ser distinguidos como:

- Indiferentes - crescem numa faixa ampla de valores de pH. É o caso de um grande número de bactérias, que podem apresentar crescimento entre valores de pH 6 a 9. Para os fungos os valores variam entre 2,0 e 8,0;
- Neutrófilos - preferem pH próximo à neutralidade até ligeiramente alcalino. Em geral, as cianobactérias e diatomáceas preferem ambientes neutros ou pouco alcalinos. Já a maioria dos actinomicetos não apresenta crescimento em valores de pH inferiores a 5,5;
- Acidófilos - preferem ambientes ácidos;
- Basófilos - não suportam valores de pH inferiores a 8,0.

Para a maior parte dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação, a faixa de pH favorável ao seu crescimento é de 6,0 a 8,0, quando a biodegradação tende a ser mais rápida (ATLAS, 1989; ALEXANDER, 1999). Em ambientes de extrema acidez ou alcalinidade, a atividade microbiana decai.

2.3.5.2.3 - Nutrientes

Depois da fonte de carbono, o nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os elementos essenciais ao crescimento celular, como já dito anteriormente, por isso, na maioria das vezes, a velocidade de degradação de alguns hidrocarbonetos é influenciada positivamente pela incorporação de N e P em solos que não os contêm em quantidades adequadas para a atividade microbiana. Geralmente, em ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, as fontes de N e P estão em quantidades insuficientes para atingir o máximo de degradação, tendo em vista a elevada relação de C/N por conta da contaminação (MIROSLAV *et al.,* 1996). Nos microrganismos, o N é constituinte de proteínas, ácidos nucléicos e componentes da parede celular enquanto o P, na forma de fosfatos inorgânicos, é utilizado, sobretudo, na geração de energia (ATP), da qual dependem para realizar as sínteses celulares (NYER, 1992; CUNHA, 1996).

2.3.5.2.3 - Umidade, aeração e salinidade

A umidade é um dos fatores físico-químicos que mais afetam a vida microbiana no solo já que os microrganismos requerem uma quantidade razoável de água para o seu crescimento. Solos argilosos retêm água e garantem a atividade dos microrganismos presentes. Geralmente em solos contaminados com óleo cru a taxa de biodegradação aumenta com o ajuste da umidade entre 30 e 90% do valor da capacidade de retenção de líquido. Porém, o valor ótimo de umidade dependerá das propriedades do solo e do contaminante em questão (ALEXANDER, 1999).

O teor de oxigênio dissolvido é um fator limitante nos processos de biorremediação de petróleo no solo, posto que o catabolismo dos hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos por bactérias e fungos inicia-se a partir de reações catalisadas por enzimas mono e dioxigenases (ATLAS, 1984; BARTHA, 1986; CRAVO JR, 1998).

Alguns solos possuem altos índices de salinidade e, de um modo geral, solos com alto teor de salinidade constituem um meio desfavorável para a maioria dos microrganismos, pois a salinidade inibe parcial ou totalmente a função dos microrganismos telúricos (bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários) (ALEXANDER, 1999).

2.3.5.2.4 – Concentração de hidrocarbonetos versus solubilidade

A biodegradação dos hidrocarbonetos ocorre num sistema multifásico envolvendo gases (O_2/CO_2), material orgânico insolúvel em água, sais dissolvidos e microrganismos. A variada composição dos constituintes do petróleo interfere na atividade dos microrganismos. Alguns hidrocarbonetos alifáticos são considerados insolúveis em meios aquosos e a solubilidade desses compostos é inversamente proporcional a sua massa molecular, ou seja, quanto maior o peso molecular menor a solubilidade, menor a disponibilidade desses compostos para a ação dos microrganismos e menor a taxa de biodegradação (ROSENBERG, 1993 A*pud* DEL'ARCO 1999).

2.3.5.2.5. Características do solo

As características físico-químicas dos solos vão influenciar na adsorção de contaminantes, sendo que quanto maior a adsorção menos disponível estará o contaminante para ação dos microrganismos. Muitos compostos orgânicos são sorvidos pelos constituintes do solo, além do que, diversos são os fatores que influenciam na adsorção como tipo e concentração de solutos, tipo e quantidades de materiais argilosos e matéria orgânica no solo, pH, temperatura etc. O tipo de cátion

no qual a argila está saturada (íons de Fe, Ca, ou H), bem como a capacidade de troca catiônica também é importante no processo de adsorção (ALEXANDER, 1999).

Quanto maior a fração orgânica presente na fase sólida do solo, maior o número de moléculas hidrofóbicas sorvidas e menor a disponibilidade dessas moléculas para ação microbiana. De fato, um dos fatores que limitam a biodegradação de hidrocarbonetos no solo é sua disponibilidade limitada para os microrganismos. Geralmente, os hidrocarbonetos do petróleo se ligam aos componentes do solo, dificultando sua remoção ou degradação. Entretanto, a utilização de surfactantes pode dessorver muitos compostos hidrofóbicos do solo como, por exemplo, antraceno, fenantreno e pireno. Contudo, estas concentrações de surfactantes devem ser bem avaliadas para não serem tóxicas e, ainda, que não sejam degradadas preferencialmente pelos microrganismos em detrimento à degradação dos hidrocarbonetos presentes no solo.

2.4 – SURFACTANTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Os surfactantes são geralmente descritos como aniônicos, não iônicos, catiônicos e anfóteros e podem ser sintetizados química ou biologicamente. A seguir serão relatadas algumas das propriedades e os diferentes tipos de surfactantes.

2.4.1 – Surfactantes Químicos

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, constituídas de um grupo polar (hidrofílico) e um grupo não polar (hidrofóbico). Uma molécula de surfactante pode ser representada conforme visto na Figura 2.8. Devido à sua estrutura, as moléculas de surfactantes se concentram na superfície da água, diminuindo a tensão superficial e, dependendo da sua concentração pode haver interação das moléculas de surfactantes com formação de agregados denominados de micelas (BOGNOLO, 1999; BANAT,2000; MULLIGAN, 2005). Se adicionados a líquidos imiscíveis, como óleo/água, tendem a acumular na interface entre duas fases,causando a redução da tensão interfacial desse sistema.

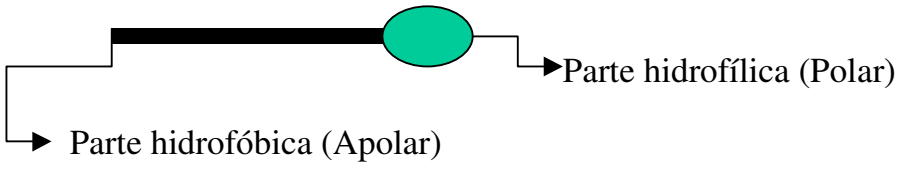


Figura 2.8: Representação esquemática de um surfactante

Um surfactante típico possui uma estrutura do tipo R-X, onde R é o grupo apolar e X é o grupo polar. A parte hidrofóbica é uma cadeia de hidrocarbonetos variando de 8 a 18 átomos de carbono, sendo que a parte hidrofílica é quem determina se um surfactante é não iônico, aniônico, catiônico ou anfótero. Desta forma, os grupos hidrofílicos podem conter sulfonato, sulfato, carboxilato (aniônicos), amônio quaternário (catiônico), ou polioxietileno (não iônico).

Um surfactante catiônico possui, em geral, a fórmula RnX+Y- , onde R_n representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X corresponde a estrutura catiônica e Y é um contra-íon. Em princípio, X pode ser um N, P, S, As, Te, Sb, Bi ou halogênios. Dentre os tensoativos aniônicos mais utilizados, a parte polar pode ser formada por sais de ácidos carboxílicos, sulfúrico, sulfônico e fosfórico e a parte apolar pode ser formada de hidrocarbonetos saturados ou insaturados. Para os anfóteros, os quais possuem ambos os grupos aniônicos e catiônicos e, dependendo da estrutura e do pH da solução, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou neutra (HAIGH, 1996; DESHPANDE *et al*. 1999; OU, 2000; MANIASSO, 2001).

Como já visto anteriormente, o grupo hidrofílico é o que determina a principal diferença entre a maioria dos surfactantes e, dessa forma, é importante conhecer as composições químicas de alguns surfactantes. A Tabela 2.5 apresenta alguns surfactantes classificados conforme a carga iônica.

Tabela 2.5: Estrutura química de alguns surfactantes

TIPO DE SURFACTANTE	AGENTE TENSOATIVO	FÓRMULA
Aniônico	**Dodecil Sulfato de sódio (SDS)**	$CH_3\ (CH_2)_{11}SO_4^-Na^+$
Catiônico	**Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)**	$CH_3(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_3Br$
Não iônico	**Polioxietileno (32) dodecanol (Brij 35)**	$CH_3(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_{23}OH$
Anfótero	**4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)**	$CH_3(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_2(CH_2)_3COO^-$

Fonte: MANIASSO, 2001.

2.4.2 - Surfactantes biológicos ou biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química e sua origem microbiana já que são produtos metabólicos de bactérias e fungos. Essas biomoléculas são principalmente produzidas pelo crescimento de microrganismos

aeróbicos em meio aquoso contendo como fontes de carbono carboidratos e hidrocarbonetos. Em geral, os biossurfactantes são biomoléculas neutras ou aniônicas, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A parte hidrofóbica também é formada por hidrocarbonetos com cerca de 10 a 18 átomos de carbono, mas podem ser encontradas cadeias de ácidos graxos ligadas às proteínas ou peptídeos. A parte hidrofílica é bastante diversificada, podendo ser carboidrato, éster, hidroxila, fosfato ou grupo carboxílico (BOGNOLO, 1999). As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídios, lipossacarídios, lipoproteínas, lipopeptídios, fosfolipídios e ácidos graxos (BANAT, 1995; NITSCHKE & PASTORE, 2002). A Tabela 2.6 a seguir, mostra algumas das principais classes de biossurfactantes e os respectivos microrganismos produtores.

Tabela 2.6: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

TIPO DE BIOSSURFACTANTE	MICRORGANISMOS
Glicolipídios	
- ramnolipídios	***Pseudomonas aeruginosa***
- soforolipídios	***Torulopsis bombicola, T. apicola***
- trehalolipídios	***Rhodococcus erythropolis***
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	***Bacillus licheniformis***
- Serrawetina	***Serratia marcescens***
- Subtilisina	***Bacillus subtilis***
- Viscosina	***Pseudomonas fluorescens***
- Surfactina	***Bacillus subtilis***
- Polimixina	***Bacillus polymyxa***
- Gramicidina	***Bacillus brevis***
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos.	
- Ácidos graxos	***Corynebacterium lepus***
- Lipídeos neutros	***Nocardia erythropolis***
- Fosfolipídios	***Acidithiobacillus thiooxidans***

Fonte: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

2.4.3- Propriedades dos surfactantes químicos e biológicos

Vários estudos têm demonstrado que há uma correlação entre a estrutura química do surfactante e suas propriedades, que podem ser das mais diversas podendo, dessa forma, apresentar aplicação em diferentes setores industriais. Algumas propriedades desses compostos, de origem química ou biológica, são apresentadas a seguir.

2.4.3.1- Adsorção

A maior característica de um surfactante está no fato dele possuir um grupo polar e um grupo não polar, conforme já citado anteriormente. Tal característica faz com que os surfactantes, em solução, se acumulem na superfície de um líquido, diminuindo a sua tensão superficial (PORTER, 1994).

A adsorção do surfactante na superfície (interface líquido/ar) depende da concentração do mesmo na solução. A Figura 2.9 mostra o efeito do aumento da concentração do surfactante em solução hidrofílica ou hidrofóbica. Em baixas concentrações (I e II), as moléculas do surfactante se distribuem na superfície, ficando paralelamente orientadas. Com o aumento da concentração de surfactante (III), diminui a área disponível em relação ao número de moléculas e, conseqüentemente, tem início uma ligeira ordenação das mesmas em relação à superfície. A orientação vai depender da natureza da superfície se hidrofílica ou hidrofóbica. Na concentração IV há formação de uma camada unidirecional; esta concentração é conhecida como concentração micelar crítica (CMC) (PORTER, 1994).

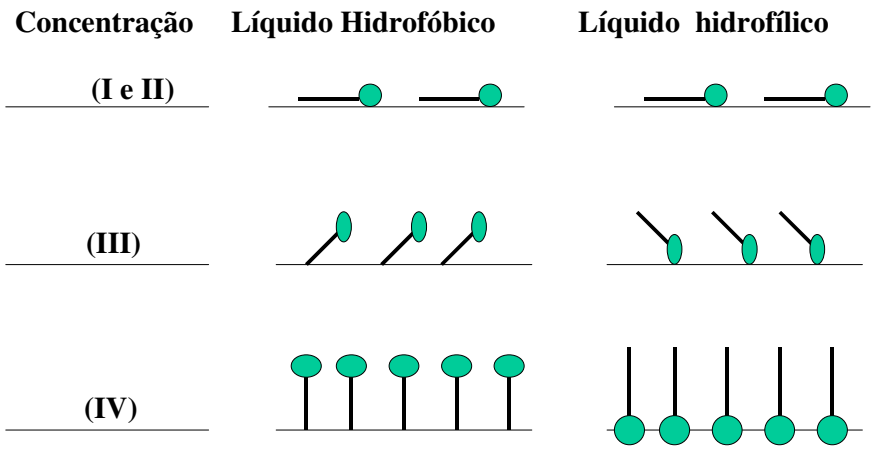


Figura 2.9: Adsorção e concentração de surfactante

PORTER, 1994

2.4.3.2 – Concentração Micelar Crítica (CMC)

Os surfactantes e/ou biossurfactantes possuem como principal característica a formação, em solução, de agregados chamados de micelas. Em água, as micelas formam-se através da associação entre os grupos hidrofóbicos (cauda) das moléculas, formando uma pseudofase termodinamicamente favorável (núcleo hidrofóbico). Portanto, abaixo da CMC, os surfactantes se apresentam como moléculas individuais ou monômeros. Acima da CMC, as concentrações dos monômeros estão em equilíbrio com as micelas (BOGNOLO, 1999; OU, 2000). A Figura 2.10 mostra a formação das micelas num sistema água/surfactante na interface água/ar.

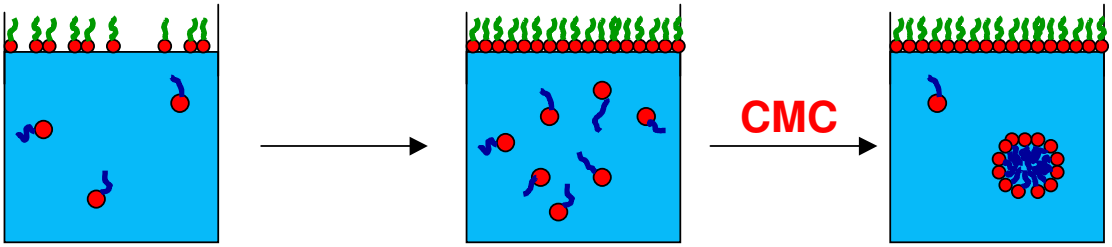


Figura 2.10: Formação da CMC num sistema água/surfactante.

Fonte: PORTER, 1994

A possibilidade de formação dessas micelas, num sistema composto de solo/água/óleo é mostrada na Figura 2.11. Quando pequenas concentrações de surfactantes são adicionadas ao sistema solo/água, parte das moléculas (monômeros) é adsorvida pelas partículas do solo e o restante forma uma monocamada na interface ar/água, resultando na redução da tensão superficial. Quando a concentração está acima da CMC, os monômeros se agregam formando micelas com duplas camadas de moléculas de surfactantes (admicelas) na superfície do solo, sendo que as moléculas de surfactantes que estão na superfície do solo ocasionam, também, a redução da tensão interfacial, melhorando a superfície de contato entre as fases aquosas e sólidas. Quando há compostos orgânicos hidrofóbicos presentes neste meio, dependendo da concentração do surfactante, há, também, a formação de emulsão (HAIGH, 1996; OU, 2000).

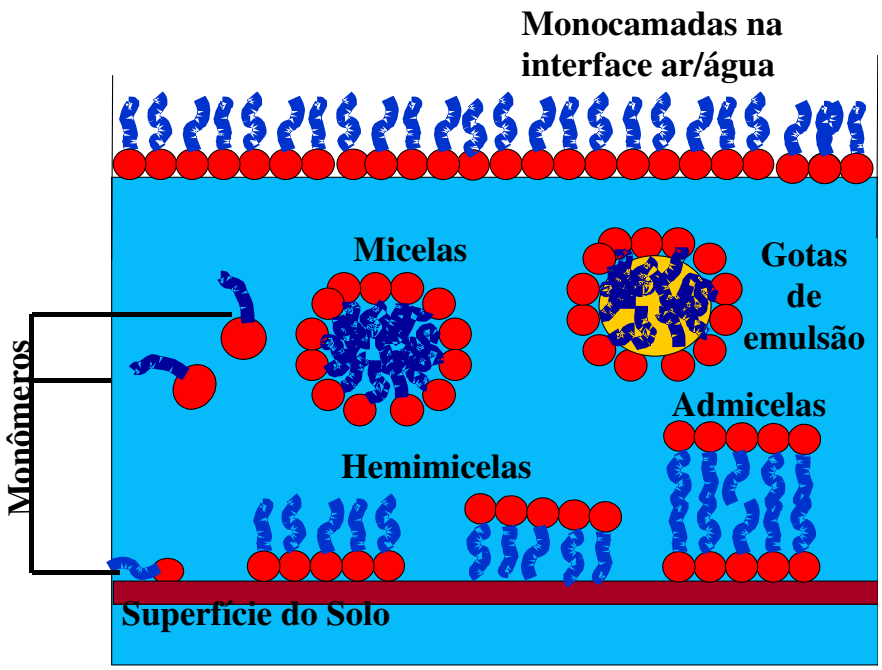


Figura 2.11: Comportamento de um surfactante em sistema solo/água/óleo.

Fonte: OU, 2000

2.4.3.3 – Solubilidade

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes de um surfactante, estando diretamente relacionada com o tamanho do grupo hidrofóbico ou hidrofílico. Para um mesmo grupo hidrofílico, o aumento do grupo hidrofóbico causa o aumento da massa molecular do surfactante que, por sua vez, torna-se menos solúvel em água. Similarmente, à medida que aumenta a quantidade do grupo hidrofílico, para a mesma quantidade do grupo hidrofóbico, o surfactante torna-se mais solúvel em água.

Numa temperatura muito baixa, os surfactantes permanecem, principalmente, na forma cristalina e insolúvel. À medida que a temperatura aumenta cada vez mais moléculas de surfactantes se solubilizam até que a concentração do surfactante alcance a CMC. Neste ponto existe, predominantemente, a forma micelar numa determinada temperatura. Dessa forma, a temperatura na qual um monômero alcança a CMC é chamada de temperatura micelar crítica (TMC). Nesta temperatura todas as três fases, a saber: monômero, cristalina e micelar estão em equilíbrio, correspondendo ao ponto Kraft (BHAIRI, 2001)

O ponto de turvação corresponde à temperatura na qual a solução de surfactante torna-se turva. Este fenômeno ocorre quando surfactantes, não iônicos ou anfóteros, em concentrações acima da CMC são aquecidos. Na temperatura chamada de

temperatura micelar crítica (TMC) ocorre separação das duas fases, uma pobre em surfactante e a outra rica. Conhecer o ponto de turvação é importante para determinar a estabilidade da amostra para seu armazenamento. Características dos surfactantes como agentes molhantes, espumantes, dispersantes, entre outros exemplos, podem ser modificadas quando estes produtos são utilizados em temperaturas muito abaixo ou muito acima do ponto de turvação (NASCENTES *et al.*, 2002). A Figura 2.12 mostra como determinar o ponto Kraft e o ponto de turvação para surfactantes.

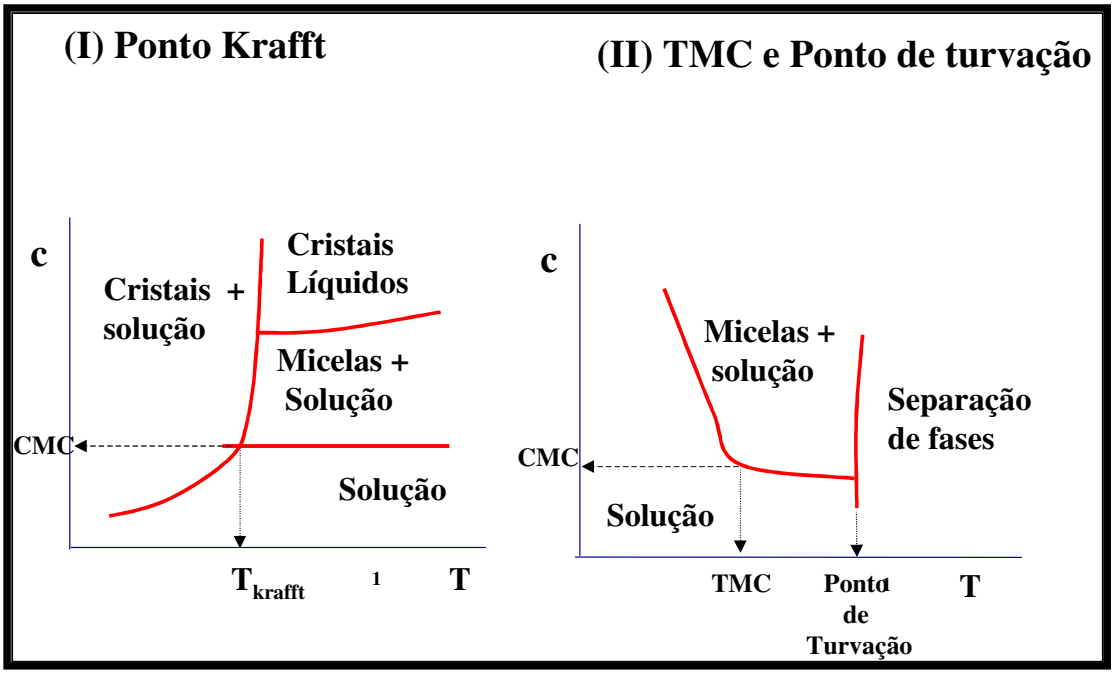


Figura 2.12: Ponto Kraft e ponto de turvação para surfactantes.

Fonte BHAIRI, 2001

2.4.3.4 – Solubilização de substâncias hidrofóbicas e microemulsão

Substâncias orgânicas que são insolúveis em água podem ser solubilizadas através do emprego de surfactantes, formando uma emulsão estável. O tipo de micela formada dependerá da estrutura química do surfactante e dos líquidos a serem misturados. De uma forma geral, a aplicação de surfactantes aumenta a solubilidade dos constituintes do petróleo, sendo que os hidrocarbonetos estarão localizados no núcleo das micelas, enquanto que os compostos fracamente polares, como ácidos graxos, alcoóis e ésteres, estarão na parte externa das micelas (PORTER, 1994; MULLIGAN, 2001). A Figura 2.13 mostra a solubilização de hidrocarboneto em água por intermédio de um surfactante.

A intensidade da solubilização é limitada pelo tamanho e número de micelas presentes. De fato, para que um dado composto seja solubilizado é necessário haver

um excesso de surfactante em solução. Em solução aquosa a quantidade de substâncias orgânicas capazes de serem solubilizadas é pequena, entretanto, numa certa condição, uma grande quantidade de compostos orgânicos pode apresentar uma aparente “dissolução”, resultando em soluções água em óleo ou óleo em água, visivelmente límpidas e estáveis, as quais são denominadas pelo termo microemulsão. Como já mencionado, os surfactantes se acumulam na interface desses sistemas, alcançando uma situação de equilíbrio. Na interface água/óleo, o surfactante orienta-se de maneira que o grupo polar fica na fase aquosa, e o grupo hidrofóbico (lipofílico), na fase oleosa. A estabilidade da camada interfacial depende da natureza do grupo lipofílico e hidrofílico que formam o surfactante (PORTER, 1994).

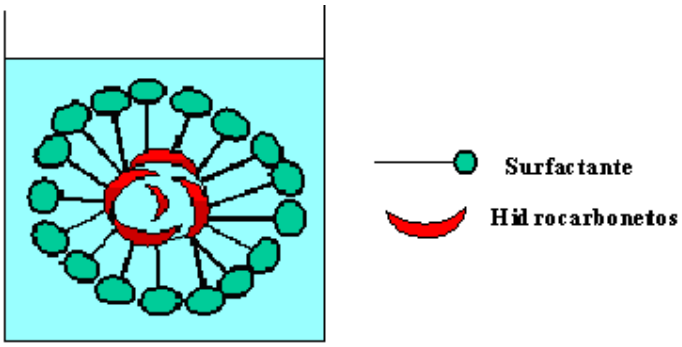


Figura 2.13: Solubilização de hidrocarbonetos em fase aquosa pelo emprego de surfactante.

Fonte: PORTER, 1994

2.4.3.5 – Balanço Hidrofílico/Lipofílico (BHL)

O balanço hidrofílico/lipofílico (Hydrophilic/lipophilic balance - HLB) é a relação entre as partes hidrofílica e hidrofóbica da molécula do surfactante. Os compostos mais hidrofóbicos têm um baixo valor de HBL (1-10), enquanto o aumento no valor de HBL corresponde a um aumento no caráter hidrofílico (HELENIUS & SIMONS, 1975). De acordo com PORTER (1994), além de fatores como caráter iônico, pH em solução, entre outros, o valor de HBL também serve para identificar possíveis aplicações de um surfactante. A Tabela 2.7 mostra uma relação dos valores de HBL e das aplicações e solubilidades correspondentes.

Os surfactantes não iônicos são heterogêneos quanto ao tamanho dos grupos de polioxietileno que constituem a parte hidrofílica da molécula. Por isso, o número de unidades de óxido de etileno por molécula, informado pelo fabricante, é apenas um valor médio. Assim sendo, GRIFFIN (1949) introduziu uma quantidade empírica arbitrária, designada "balanço hidrofílico/lipofílico” (HBL em inglês) para obter uma

medida do balanço das partes hidrofílicas e hidrofóbicas de um agente tensoativo não iônico. Este balanço não é tão eficaz para surfactantes iônicos (aniônicos e catiônicos) e a quantificação desta grandeza pode ser avaliada a partir da estrutura média do surfactante.

Tabela 2.7: Balanço hidrofóbico/lipofílico (HBL) e as respectivas propriedades e aplicações

BHL	APARÊNCIA	APLICAÇÃO	TIPO DE EMULSÃO
1-4	Insolúvel	Emulsionante para água em óleo	Água/óleo
4-7	Dispersão leitosa instável	Emulsionante para água em óleo	Água/óleo
7-9	Dispersão opaca estável	Umectante	---
10-13	Solução escura	Detergente e emulsionante para óleo em água	Óleo/água
13 -	Solução transparente	Solubilizante	Óleo/água

Fonte: PORTER, 1994; SILVA *et al.* 2003.

2.4.4 – Efeitos dos surfactantes

Os surfactantes têm extensa área de aplicação, dependendo das suas características e efeitos. A seguir são relatados alguns efeitos mais importantes na utilização dos surfactantes

2.4.4.1 - Umectante (molhabilidade)

Os umectantes são moléculas anfifílicas, isto é, possuem na mesma estrutura duas regiões de polaridade opostas: uma polar (ou hidrofílica), com afinidade pela água, e outra apolar (ou hidrofóbica) com afinidade por outros solutos, fazendo com que a tensão superficial entre superfícies (água/óleo, água/sólido, água/ar etc.) seja reduzida (FARIAS *et al.,* 2006). Um dos efeitos importantes da utilização dos surfactantes seria o efeito umectante, ou seja, promoção de molhabilidade. A Figura 2.14 ilustra duas situações: (a) uma gota de líquido com pouca afinidade pelo substrato, onde a elevada tensão superficial desfavorece o efeito de molhabilidade, e (b) uma maior área de contato entre a gota e o substrato, indicando uma afinidade elevada, que resulta numa redução substancial da tensão superficial. Dessa forma, pode-se concluir que quanto menor a tensão superficial, maior a facilidade para um líquido se espalhar (SILVA *et*

al., 2003). Os umectantes mais utilizados são os sabões, alquil sulfonados, alquil fosfatos e alquilbenzenosulfatos (aniônicos), ésteres de alquil, alquilfenil polietileno glicol (não iônicos), tetraalquilamônio e cloreto de N-alquipiridina (catiônico) (FARIAS, 2005)

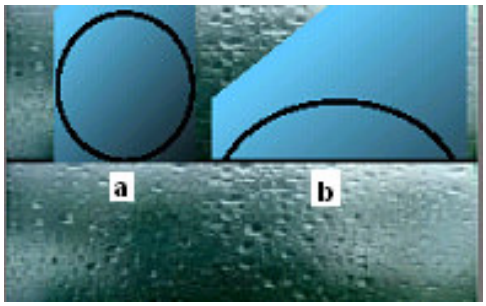


Figura 2.14: Espalhamento de uma gota sobre uma superfície

2.3.4.2 – Agente espumante e antiespumante

A maioria dos surfactantes é capaz de espumar, o que pode ser um efeito desejável ou não, dependendo da aplicação. A espuma consiste em dois sistemas de fases, termodinamicamente instáveis, de bolhas de gás em líquido, ou seja, é uma emulsão presente na superfície ar/água e esta emulsão permanece estável até haver algum fator que a desestabilize como a utilização de agentes antiespumantes. Os agentes antiespumantes contêm uma combinação de partículas sólidas hidrofóbicas (sílica, cera etc.), óleo de silicone e componentes que atuam diretamente na estrutura da espuma, promovendo a perda de elasticidade da espuma. Outros fatores, como aumento ou diminuição de temperatura, causam a perda da elasticidade, levando a emulsão (ar em água) a se romper (PETER & ROUETTE, 1989; SALVINI *et al.* 2006).

2.4.4.3 – Detergência

A detergência é uma das maiores aplicações dos surfactantes e é um processo de remoção de uma substância indesejável de uma superfície sólida, geralmente com aplicação de uma força mecânica na presença de uma substância química como um surfactante (KISSA, 1981; PORTER, 1994). O efeito de detergência envolve uma série de fenômenos que atuam de modo a remover partículas oleosas. Existem muitas condições físico-químicas que se destacam neste processo, tais como: temperatura, presença de eletrólito, dureza da água, ação mecânica e tempo, tipo de substrato, tipo e concentração do surfactante. Além destas, outras condições como solubilidade, HBL, tensão interfacial, CMC, efeito umectante e espumante são decisivas para o processo de detergência. Todas essas propriedades e condições demonstram a complexidade deste processo. Às vezes, por melhor que seja o surfactante

empregado, um destes parâmetros pode impedir que o seu efeito seja destacado, tornando sua utilização inadequada (PORTER, 1994; SILVA *et al.* 2003).

2.4.4.4 - Dispersante

Atualmente definimos dispersante como um tensoativo que mantém uma dispersão de partículas estáveis em um meio em que as partículas não são solúveis e são formulações químicas de natureza orgânica.

No início de séc. XX, os primeiros dispersantes utilizados foram os sabões e depois com o desenvolvimento da tecnologia surgiram o nonilfenol etoxilado e álcoois graxos etoxilados, polímeros de bloco EO/PO (óxidos de etileno e propileno), noneno vinil maleato de sódio e também os poliacrilatos de sódio de diversas massas moleculares. No começo dos anos 90, foram desenvolvidos os dispersantes poliméricos que são os mais aplicados atualmente (QUAGLIO, 2007).

Os dispersantes são muito utilizados após um derrame de petróleo em acidentes marinhos, porém, a utilização dos mesmos deve seguir as normas vigentes da resolução CONAMA nº. 269 de 14/09/2000.

2.4.5- Principais propriedades específicas dos biossurfactantes

Os surfactantes biológicos possuem melhores propriedades que muitos surfactantes químicos. Geralmente, possuem baixos valores de CMC (Concentração Micelar Crítica) e tensão interfacial na solução aquosa (BANAT, 1995). A seguir serão relatadas algumas propriedades dos biossurfactantes, segundo vários autores:

- Atividade na superfície e na interface: os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que alguns surfactantes químicos, pois conduzem a baixos valores de tensão superficial ou interfacial mesmo em baixas concentrações (BANAT, 1995; MULLIGAN *et al.,* 2005).
- Tolerância à temperatura e pH: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e suas atividades de superfície não são afetadas por altas temperaturas (por exemplo, 90°C). Uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa,* isolada de reservatórios de óleo cru na Venezuela, estava adaptada às condições drásticas de temperatura do reservatório, visto que o biossurfactante (ramnolipídio) foi produzido mesmo em temperatura elevada, em altos teores de salinidade, cálcio e magnésio, e em pH ácido, característicos do reservatório (ROCHA *et al.,* 1992;BOGNOLO, 1999).
- Força Iônica: biossurfactantes não precipitam ou saturam em soluções salinas acima de 10%, enquanto 2-3% de sal são suficientes para desativar os

surfactantes químicos. *Bacillus SP018* apresentou crescimento e produção do biossurfactante surfactina em condição de anaerobiose a 50°C e salinidade (NaCl) superior a 10% (LIN, 1996; BOGNOLO, 1999).

- Biodegradabilidade e baixa toxicidade: Os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação, tratamento de efluentes e recuperação de petróleo, entre outras. Sua baixa toxicidade permite o seu uso também em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.,* 2005)
- Alto índice de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água (WEST & HARWELL, 1992; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.4.6 – Aplicação dos surfactantes na remoção, limpeza e recuperação de hidrocarbonetos

2.4.6.1 – Limpeza de reservatórios de petróleo

Em geral, os resíduos e as frações de óleos pesados, devido à sua alta viscosidade, sedimentam no fundo de tanques de estocagem originando a formação de depósitos sólidos que não podem ser removidos através do bombeamento convencional. A remoção desses compostos do fundo dos tanques requer lavagem com solventes ou limpeza manual, onde ambas as técnicas são demoradas e dispendiosas e, inclusive, com alto grau de periculosidade. Além disso, estas técnicas deixam grandes volumes de resíduos sólidos contaminados com óleo a serem dispostos. Um processo alternativo de limpeza consiste no uso de biossurfactantes e/ou surfactantes que promovem a diminuição da viscosidade e a formação de emulsões óleo em água (O/A), facilitando o bombeamento. Ademais, o óleo pode ser recuperado através de quebra de emulsões. (BOGNOLO, 1999; BANAT, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.4.6.2 - Recuperação melhorada do petróleo por ação microbiana (MEOR)

A recuperação melhorada do petróleo por ação microbiana (*Microbial Enhanced Oil Recovery*- MEOR) consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação do óleo residual.

Os microrganismos podem produzir surfactantes, ocasionando a redução da tensão interfacial do sistema óleo/água de produção que, por sua vez, provoca a redução das forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha.

Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo nas rochas (BANAT, 1995). Outra possibilidade é o uso de microrganismos na produção de polímeros, que favorecem a obstrução das zonas de elevada permeabilidade no reservatório, melhorando, assim, a eficiência do arraste do óleo.

Com o propósito de estabelecer a MEOR *in situ,* os microrganismos devem ser capazes de crescer em condições extremas, como alta temperatura, pressão, salinidade e baixa tensão de oxigênio (BANAT, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.4.6.3 – Remediação de áreas impactadas com petróleo

Os acidentes por derramamento de óleo têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. A fim de favorecer a regeneração das áreas impactadas tem sido adotado o emprego de surfactantes químicos e/ou biológicos como auxiliares no tratamento biológico. A utilização destes compostos promove o aumento da interação interfacial de sistemas água/óleo e promove a dessorção de compostos orgânicos em solo acelerando a degradação microbiana de vários hidrocarbonetos em solos ou em águas (MULLIGAN *et al*. 2001; KINGSLEY *et al.* 2004).

Ultimamente, os surfactantes e/ou biossurfactantes vêm sendo muito utilizados na biorremediação de solos impactados por óleo cru para disponibilizar os hidrocarbonetos para ação dos microrganismos. Devido às características de cada solo, os hidrocarbonetos podem adsorver os contaminantes em sua matriz, dificultando a biorremediação. Neste contexto, há uma necessidade de se conhecer um pouco melhor as características de cada solo e como estas podem interferir no processo de biorremediação.

2.4.7 – Efeito da adição de surfactantes na melhora da biodegradação de compostos orgânicos sorvidos no solo

A etapa limitante na biorremediação é o baixo nível de disponibilidade de certos hidrocarbonetos, seja por estarem sorvidos na matriz do solo ou por possuírem baixa solubilidade em sistemas aquosos, ambos impeditivos ao ataque microbiano. Os surfactantes podem aumentar a biodisponibilidade desses compostos pelo aumento da solubilidade em sistemas aquosos e, também, pelo aumento da superfície de contato através da formação de uma emulsão estável. Acima da concentração micelar critica (CMC), os surfactantes permanecem separados dentro do núcleo hidrofóbico micelar, aumentando a solubilidade aparente. Em algumas circunstâncias, esta separação (partição) dentro das micelas pode tornar os hidrocarbonetos mais acessíveis aos microrganismos aumentando a taxa de biodegradação (MORAN *et al.,* 2000).

A melhora na biodegradação em solos contaminados com óleo cru, utilizando-se alguns tipos de surfactantes, pode ser vista, principalmente, através da dessorção do óleo cru sorvido no solo e pelo aumento da solubilidade dos mesmos quando os surfactantes são utilizados em concentrações iguais ou superiores aos valores da CMC (Concentração Micelar Crítica) de cada um (OU, 2000). A seguir serão relatados alguns experimentos com utilização de surfactantes para aumentar a taxa de biodegradação do óleo sorvido no solo.

OBERBREMER e colaboradores (1990) adicionaram 10% Soforolipídio em solo contaminado com 1,35% em peso de hidrocarbonetos e observaram 90% de biodegradação de hidrocarbonetos em 72h enquanto apenas 81% de biodegradação em 114h na ausência do biossurfactante.

ARONSTEIN & ALEXANDER (1993) conduziram ensaios para observar se a adição de um surfactante não iônico (NOVEL II 14212-56) na superfície de um solo contaminado com fenantreno e policlorados (PCBs) aumentaria ou não os índices de biodegradação desses contaminantes. Para este fim, bombearam no solo soluções contendo de 10 a 100 µg/L de surfactante. Dessa forma observaram aumento na biodegradação do fenantreno, porém, não foi verificado aumento na biodegradação dos PCBs. Entretanto, foi verificado, também, que estas concentrações de surfactantes não contribuíram para aumentar a lixiviação desses contaminantes.

ROBINSON e colaboradores (1996) estudaram a aplicação de 4 g/L de um ramnolipídio obtendo a mineralização do 4,4-clorobifenil cerca de 213 vezes maior que o controle (sem biossurfactante)

DESCHÊNES e colaboradores (1996) avaliaram o efeito de 2 surfactantes (um químico - SDS e um biológico - Ramnolipídio) num solo contaminado por um longo período com HPAs. A cada duas semanas eram adicionadas aos experimentos cerca de 10, 100 e 500 mg/g de surfactante em relação a massa do solo. Após 45 dias de ensaios os autores observaram que os HPAs com 3 anéis foram quase que totalmente biodegradados, quando se utilizaram as concentrações de 100 e 500 mg/g, principalmente, quando foi utilizado o SDS. Foi sugerido que acima de quatro anéis houve a degradação preferencial dos surfactantes já que não se observou diminuição na biodegradação desses HPAs.

ROJAS-AVALIZAPA e colaboradores (2000) avaliaram, através de um planejamento experimental, se o ajuste da relação nutricional C:N:P e também a adição de um surfactante não iônico aumentaria os índices de biodegradação de policlorados (PCBs) que estavam presentes num solo em altas concentrações. Após 35 dias de ensaios de

biodegradação observaram que o ajuste da relação nutricional C/N/P serviu para aumentar, consideravelmente, a atividade heterotrófica do solo, porém, a grande melhora na biodegradação foi observada com a presença do Tween-80 que apresentou uma remoção de 39 a 60% dos PCBs.

MAYER & SOBERON-CHAVEZ (2000) verificaram que a adição de um ramnolipídio pôde aumentar a biodegradação de hexadecano, octadecano, n-parafinas e fenantreno em sistemas líquidos e a biodegradação do hexadecano, tetradecano, prístino e misturas de hidrocarbonetos em solo.

NOORMAM e colaboradores (2002) estudaram os efeitos do ramnolipídio e observaram que estes foram úteis quando a taxa de biodegradação era limitada pelos fatores do tamanho dos poros (6 nm). O composto hexadecano ficou aderido ao solo com tamanho de poro de 6 nm e sua disponibilidade foi limitada. A adição do ramnolipídio liberou o substrato e o contaminante para ação dos microrganismos, aumentando os índices de biodegradabilidade.

CUBITTO e colaboradores (2005) conduziram ensaios com adição de um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* O9 em solo contaminado com óleo cru em 3 diferentes concentrações (1,9; 19,5 e 39 mg/kg de solo). O biossurfactante serviu para estimular a atividade microbiana e melhorar a degradação de hidrocarbonetos alifáticos, porém nas concentrações estudadas não foi observado melhora na biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos.

MILLIOLI e colaboradores (2005) estudaram a adição de diferentes concentrações de um biossurfactante do tipo ramnolipídio em solo extremamente argiloso e intemperizado, verificando que a medida que se aumentava a concentração do ramnolipidio a eficiência de biodegradação aumentava, porém até a concetração de 4 mg/g de ramnolipídio em relação a massa do solo. A partir dessa concentração, observaram um decréscimo na eficiência de biodegradação, necessitando de um estudo mais aprofundado para observar se estas concentrações estariam sendo tóxicas ou não processo de biodegradação do óleo.

2.5 – ECOTOXICIDADE

Bioensaios de ecotoxicidade são metodologias analíticas que permitem caracterizar a toxicidade de efluentes e substâncias químicas em geral. A exposição de organismos vivos (bioindicadores) a estas substâncias é uma ferramenta valiosa de análise ambiental. Para testes de toxicidade em solo, as interações entre os compostos químicos e o solo devem ser levadas em consideração para predizer corretamente o impacto químico no ambiente. O solo é um componente-chave do meio ambiente e,

dependendo do tipo de minerais, matéria orgânica, pH, potencial redox, umidade e manejo do solo, os contaminantes podem ser adsorvidos ou liberados, tendo efeitos tóxicos diferentes. Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), o modo do efeito (morte, crescimento, reprodução) ou a resposta do efeito (letal ou sub-letal) (KAPANEN & ITAVAARA, 2001). As respostas de toxicidade aguda podem ser expressas como valores de LC_{50} (concentração letal) ou EC_{50} (concentração efetiva) que significa que a metade dos organismos morre ou uma mudança específica ocorre no seu comportamento normal, respectivamente. A toxicidade aguda é avaliada num período de tempo relativamente curto para o ciclo de vida do organismo testado. Os testes com *Daphnia*, ratos e pássaros são avaliados num período de 24 a 48 h que são tempos suficientes para expressar toxicidade aguda. Já a toxicidade crônica é utilizada para determinar efeitos longos e duradouros que não resultam em morte. Organismos unicelulares com tempo de vida inferior a 24 h podem ser utilizados para avaliar a toxicidade crônica (LANDS & YU, 1995; KAPANEN & ITAVAARA, 2001). Para a utilização de surfactante como agente remediador na técnica de biorremediação de solo impactado com óleo cru, é necessário um estudo mais aprofundado dos seus efeitos no solo. A seguir serão relatados alguns testes de ecotoxicidade.

2.5.1 – Testes enzimáticos

A atividade enzimática pode ser utilizada para descrever os efeitos de compostos tóxicos sobre a população microbiológica do solo. Para tanto, as enzimas de importância são as hidrolases (fosfatases e ureases) e as oxidoredutases (desidrogenases) (RATSEP, 1991). A determinação da atividade desidrogenásica é o método mais comum utilizado para testes de toxicidade enzimática. Esse método se baseia fundamentalmente na taxa de redução de TTC (trifeniletrazolium clorídrico) a TPF (trifenil formazan) nos solos após incubação a 30ºC por 24 h. O TTC funciona como aceptor final de elétrons, sendo, portanto, um dos métodos mais frequentemente usados para tal estimativa (BITTON & KOOPMAN, 1992).

2.5.2 – Testes com minhocas

As minhocas são essencialmente cosmopolitanas e vulneráveis a maioria dos fatores que afetam, especialmente, os ecossistemas do solo. As espécies recomendadas pelo padrão ASTM (1995) e OECD (1984) são *Eisenia fetida* e *E. andrei* que podem ser cultivadas, facilmente, no laboratório. O padrão ASTM (1995) para toxicidade em solo, utilizando *E. fetida*, é usado para avaliar os efeitos tóxicos letais ou subletais das minhocas num curto período de tempo. Os efeitos subletais podem ser o crescimento, comportamento, reprodução e processos fisiológicos. A duração do teste de toxicidade

aguda varia de 7 a 14 dias e o teste de reprodução em torno de 9 semanas (KAPANEN & ITAVAARA, 2001).

Há, também, o teste de fuga de minhocas que permite a avaliação de sítios contaminados com nível de estresse mais baixo dos organismos do que os testes de toxicidade aguda e pode ser aplicado, facilmente, para verificar compostos tóxicos no solo. O teste de fuga pode, em muitos casos, ser um indicador mais sensível do que os testes de toxicidade aguda. Esse teste pode ser avaliado em 24 ou 48 h (YEARDLEY *et al.,* 1996).

KNOKE e colaboradores (1999) avaliaram a toxicidade de solo contaminado com pentaclorofenol (PCP) e hidrocarbonetos de petróleo utilizando técnicas de biorremediação como bioestímulo e bioaumento. A técnica de bioestímulo foi avaliada pela adição de fósforo ao solo e a técnica de bioaumento adicionando-se *Pseudomonas* sp UG30. Os testes de toxicidade foram monitorados usando o Microtox, germinação com semente de alface e mortalidade de minhocas. Após os ensaios de biodegradação, observaram que os testes de toxicidade feitos com minhoca e com alface, a adição de fósforo ao solo aumentou a toxicidade enquanto que os testes com o bioaumento com *Pseudomonas* sp*.* houve redução da toxicidade, sugerindo que dependendo da técnica de biorremediação utilizada a toxicidade pode aumentar ou diminuir.

SAFWAT e colaboradores (2002) conduziram testes de toxicidade com dois tipos de minhocas *Lumbricus terrestris* and *E. fetida* em solo contaminado com concentrações de óleo cru variando de 0,5 a 2,5%. O solo contaminado com 0,5% p/p de óleo cru não causou danos às minhocas mas a partir da concentração de 1,5% houve redução da sobrevivência das minhocas em 40%.

SISINNO e colaboradores (2006) avaliaram a toxicidade de amostras de áreas contaminadas com diferentes concentrações de hidrocarbonetos através de teste de fuga das minhocas e verificaram que 90% dos organismos fugiram da seção que continha a amostra contaminada para a seção onde estava o solo controle, indicando que a amostra pode ser considerada tóxica, apresentando sua função de *habitat* limitada. A toxicidade dessa amostra foi, posteriormente, confirmada pelos ensaios de letalidade e reprodução. Os resultados preliminares indicaram que o ensaio de comportamento foi um indicador rápido da toxicidade da amostra e pode ser aplicado como complemento da avaliação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

2.5.3 – Fitoxicidade

As plantas são consideradas produtores primários em ecossistemas terrestres e, dessa forma, é importante identificar e entender a magnitude de alguns impactos já que as plantas são sensíveis às substâncias tóxicas e podem ser utilizadas como bioindicadores (SCHOWANEK, *et al.*, 2004). De acordo FLETCHER (1991), os testes com plantas podem ser utilizados em 5 categorias diferentes:

Biotransformação: Transformação de compostos causados pelas plantas.

Captação de cadeia alimentar: Quantidade e concentração de elementos tóxicos que podem entrar na cadeia alimentar através da captação das plantas pelas raízes.

Sentinela: Monitoramento de poluentes observando os sintomas de toxicidade exibidos pelas plantas.

Indicadoras: Certas plantas que indicam as características do solo, tanto físicas, quanto químicas.

Fitotoxicidade: Dentre esses testes, o de fitotoxicidade tem recebido maior atenção nos últimos anos e pode ser avaliada pela germinação das sementes, alongamento da raiz e crescimento da muda. A Tabela 2.8 mostra algumas espécies recomendadas pela A OECD (1984b); USEPA e FDA (FLETCHER, 1991).

Tabela 2.8: Espécies recomendadas pela OECD (1984b), USEPA e FDA (FLETCHER, 1991)

Nome comum	Espécie	Nome comum	Espécie	Nome comum	Espécie
Azevém	*Lolium perene*	Rabanete	*Raphanus sativus*	Cenoura	*Daucus carota*
Arroz	*Oryza sativa*	Nabo	*Brassica rapa*	Soja	*Glycine Max*
Aveia	*Avena sativa*	Repolho	*Brassica campestris*	Milho	*Zea mays*
Tomate	*Lycopersicon esculentum*	Feijão	*Phaseolus aureus Phaseulus vulgaris*	Cebola	*Allium cepa*
Sorgo	*Sorghum bicolor*	Alface	*Lactuca sativa*	Trigo	*Triticum aestivum*
Mostarda	*Brassica Alba*	Pepino	*Cucumis sativus*	Agrião	*Lepidium sativum*

Muitos estudos têm demonstrado a eficiência de espécies como pepino e agrião (HELFRICH *et al.,* 1998), alface e soja (GUNDERSSON *et al*., 1997) em testes de toxicidade e esses testes são, também, realizados para verificar a toxicidade do óleo cru. SHERRY e colaboradores (1994) observaram a redução de 15% na eficiência germinativa da semente de *Lactuca sativa* pela presença de óleo cru.

BANKS & SCHULTZ (2005) avaliaram a fitotoxicidade em solo contaminado com óleo cru através de testes de germinação de plantas, como alface (*L. sativa*), milheto (*Panicum miliaceum*), rabanete (*Raphanus sativus*.), trevo vermelho (*Trifolium pratense*) e trigo (*Triticum aestivum*) e observaram que enquanto a maioria das plantas mostrou pouca sensibilidade ao poluente, somente a alface teve uma diferença estatisticamente significativa, sugerindo que a *Lactuca sativa* é uma ótima escolha para avaliar a toxicidade de solo contaminado com petróleo.

A necessidade de medir os riscos ecotoxicológicos aliados ao uso de agentes remediadores ao solo vem chamando atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Entretanto, há a necessidade de padronização por parte dos pesquisadores em relação às metodologias utilizadas, pois há muitos testes sendo avaliados ultimamente, mas poucos são padronizados.

2.6 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A BIBLIOGRAFIA ESTUDADA E O INEDITISMO DO TRABALHO

Estudos demostram que a adição de surfactantes aumenta a disponibilidade dos hidrocarbonetos para permitir a ação dos microrganismos presente no solo, melhorando a biodegradação dos hidrocarbonetos. A melhora na biodegradação pode ser verificada, principalmente, pelo aumento da solubilidade e/ou dessorção dos hidrocarbonetos sorvidos no solo e difusão facilitada dos hidrocarbonetos da fase sólida para a fase líquida. Foi demostrado por muitos autores que os surfactantes aumetam os índices de biodegradabilidade do óleo (BAPTISTA, 2007; CUBITTO et al., 2005;DESCHÊNES, 1996; TIEHM, 1997).

Entretanto, em muitos estudos não foi observado se a adição desses surfactantes seriam tóxicas ou não para o solo. Ressalta-se, ainda, que as interações entre surfactantes e óleo cru; surfactantes e os componentes do solo e entre surfactantes e os microrganismos devem ser bem investigadas, sendo que a investigação da toxicidade da adição destes agentes remediadores ao solo é extremamente importante para prever o impacto da adição dos mesmos ao meio ambiente.

Desta forma, este trabalho serviu para avaliar de que forma os surfactantes devem ser avaliados, respondendo-se as seguintes perguntas:

a) Qual a melhor época de se aplicar um surfactante, ou seja, num contaminação recente ou não?

b) Quais as metodologias que podem ser seguidas para avaliar qual o surfactante a ser utilizado para cada tipo de solo e contaminante?

c) Qual a concentração ótima de surfactante que pode ser utilizada em tempos de contaminação diferentes (recente ou antiga)?

d) Qual o nível de toxicidade de diferentes concentrações de surfactantes em solo não contaminado e contaminado com óleo cru?

e) Qual a melhor forma de aplicação de um surfactante, ou seja, em dose única ou em batelada?

A seguir, a parte de materiais e métodos bem como os resultados e discussão responderão as perguntas acima.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho o solo e o óleo cru, provenientes da região Nordeste do Brasil, foram cedidos pela PETROBRAS/CENPES.

3.1 – ÓLEO CRU

O óleo cru procedente de campo de produção terrestre possui as características apresentadas na Tabela 3.1, e seu perfil cromatográfico é mostrado na Figura 3.1 (dados fornecidos pelo CENPES). De acordo com os dados apresentados este óleo é classificado como parafínico, possuindo baixos teores de nitrogênio (N) e enxofre (S).

Tabela 3.1: Caracterização do óleo cru utilizado.

Componentes	Teor (%)
Enxofre	0,44%
Carbono	86,2%
Hidrogênio	12,3%
Nitrogênio	< 0,3% [1]

[1](Abaixo do limite de detecção)

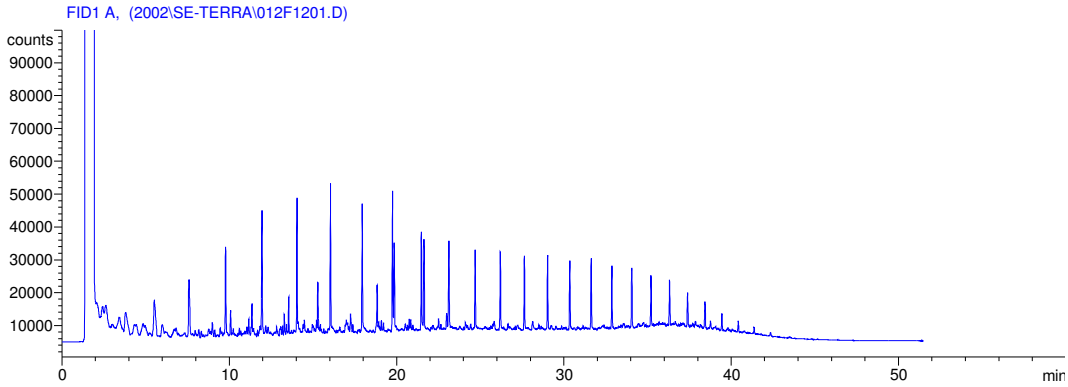


Figura 3.1: Perfil cromatográfico do óleo cru

3.2 – CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

O solo não contaminado foi homogeneizado, peneirado e quarteado, sendo contaminado em laboratório com 5 % v/p do óleo cru. A caracterização do solo foi baseada nos parâmetros normalmente avaliados no processo de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Para tanto, foram feitas determinações de densidade aparente e densidade de partícula, porosidade, pH, capacidade de retenção de líquido, teor de nitrogênio e fósforo assimilável, teor de

matéria orgânica, quantificação de bactérias heterotróficas totais (aerobiose) e hidrocarbonoclásticas. Além desses parâmetros, as frações de silte, areia e argila foram analisadas pela COPPE/GEOTECNIA. As metodologias encontram-se nos item 3.8.

3.3 – SURFACTANTES

Foram utilizados diferentes surfactantes disponíveis no comércio, dos quais dois de origem microbiana (aniônicos) e quatro quimicamente sintetizados (dois não iônicos e dois aniônicos). Estes surfactantes foram escolhidos através de revisão bibliográfica (OBERBREMER, 1990; JAHAN *et al.,* 1999; BECKER, 1999; MAIER & SOBERON-CHAVEZ, 2000; OU, 2000; KINGSLEY *et al*. 2004). Os surfactantes catiônicos não foram escolhidos devido a sua ação tóxica citada na literatura (SIGH *et al.,* 2002). Os surfactantes aniônicos escolhidos foram: BIOSOLVE fabricado pela empresa "The Westford Chemical Corporation®" e o SDS da VETEC. Os surfactantes não iônicos utilizados foram: Biononex produzido pela empresa "Chemcap Milieu Techniek" e o Tween-80 da VETEC.

Os biossurfactantes escolhidos foram do tipo raminolipídio que são amplamente utilizados como auxiliares no processo de biorremediação (NOORDMAN *et al.* 2002; NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.* 2005). Os biossurfactantes usados neste trabalho são produzidos pela empresa JENEIL Company localizada nos Estados Unidos e Alemanha e são denominados de JBR 210 e JBR 425. Ambos são biossurfactantes aniônicos, sendo que o JBR 210 é um biossurfactante não purificado e constituído de apenas 10% de ramnolipídio. Já o JBR 425 é um biossurfactante parcialmente purificado constituído de apenas 25% de ramnolipídio. Melhores informações sobre os surfactantes utilizados, bem como a fórmula de cada um encontra-se no ANEXO 1.

3.4 – CARACTERIZAÇÃO DOS SURFACTANTES

Todos os surfactantes foram caracterizados quanto à eficiência da dessorção do óleo no solo, DMC (diluição micelar crítica), DMCA (diluição micelar crítica aparente), índice de emulsificação, biodegradabilidade no solo e na fase aquosa e atividade desidrogenásica.

3.4.1 – Índice de emulsificação dos surfactantes

O índice de emulsificação foi feito conforme metodologia proposta por COOPER & GOLDENBERG (1987). Foram adicionados 6 mL de querosene de aviação em 4 ml de diferentes concentrações dos surfactantes, variando de 1 a 15 mg/mL em tubo de

ensaio (1,8 x 15 cm) com tampa de rosca. Agitou-se vigorosamente em vórtex por 2 min. Após a agitação os tubos com as amostras ficaram em repouso por 24h. Determinou se a altura de líquido total e a altura da camada emulsionada conforme o cálculo mostrado na Equação 3.1

$$E(24) = \frac{Hemx100}{Ht} \tag{3.1}$$

Onde, Hem = Altura da camada emulsionada e Ht = Altura total de líquido.

3.4.2 – DMC (Diluição Micelar Crítica) e DMCA (Diluição micelar crítica aparente)

Nestes ensaios foram avaliadas a DMC e DMCA para os 6 diferentes surfactantes. A expressão DMC é utilizada para diluições expressas em peso por volume (% p/v) e não leva em consideração o ingrediente ativo de cada surfactante, ou seja, a CMC e CMCA é relativo ao cálculo do ingrediente ativo de cada surfactante e a DMC e DMCA diz respeito a solução utilizada de cada surfactante em % p/v sem calcular a concentração do ingrediente ativo.

A determinação de DMC foi feita a partir da plotagem em gráfico da tensão superficial versus diluições dos surfactantes. As diluições variaram de 0,001 a 10 mg de surfactante por 1mL de água. Dessa forma, o valor da DMC correspondeu à diluição no ponto de inflexão da curva quando é atingido o menor valor da tensão superficial (FOUTAIN et al., 1991). A DMCA também foi avaliada a partir da determinação dos valores de tensão superficial também para diferentes diluições do surfactante analisado (0,01 a 40 mg/mL), porém, em 10g e 50 g de solo para 100 mL de solução de surfactante respectivamente. Para tanto, frascos contendo 10 ou 50g de solo e 100 mL das soluções do surfactante foram agitados em shaker a 150 rpm por 24h para total dessorção do óleo do solo. A seguir, a mistura obtida foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 min, sendo que as amostras do sobrenadante, previamente filtradas, foram avaliadas quanto à tensão superficial. A determinação da DMCA seguiu o mesmo procedimento descrito acima para DMC.

3.4.3 – Lavagem do óleo do solo

Antes dos testes de lavagem, o solo passou por um processo de aquecimento visando à eliminação das frações voláteis. Para este fim, as amostras do solo contaminado foram acondicionadas em recipientes retangulares abertos e mantidas em estufa a

50ºC nas primeiras 24h e 70ºC nas subsequentes horas. A cada 24h foram retiradas amostras das quatro extremidades e ao centro, para analisar o teor de HTP (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo) até que se observou um valor constante.

Estes testes foram realizados de acordo com metodologia proposta por URUN *et al* (2006). O teste de lavagem do óleo do solo foi baseado nos resultados da DMC e DMCA em 10% de solo em solução, já que os testes de lavagem foram realizados utilizando-se 10g de solo contaminado num volume total de 100 mL de solução de cada surfactante. Dessa forma, optou-se por trabalhar com valores abaixo e acima da DMC e DMCA (10%), avaliando-se as concentrações de 0,5xDMC; 1xDMC; 10XDMC; 0,5xDMCA; 1xDMCA e 10xDMCA. Estes ensaios foram realizados em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, onde foram adicionados cerca de 10 g de solo, separadamente, num volume total de 100 mL de solução. Após agitação em shaker na rotação de 150 rpm durante 1h, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min. Após descartado o sobrenadant, o solo foi analisado através da análise de Óleos e Graxas para determinação do teor do óleo residual.

3.4.4 – Avaliação da biodegradabilidade dos surfactantes no solo

A quantificação da emissão de CO_2 possibilita uma estimativa da atividade do consórcio microbiano envolvido no processo de biodegradação de surfactante no solo, já que os microrganismos utilizam o oxigênio em sua cadeia respiratória gerando dióxido de carbono (Ciclo de Krebs). Os ensaios de biodegradabilidade em fase sólida foram baseados na metodologia descrita pela ABNT (NBR 14283/99) que relaciona diretamente a geração do gás carbônico à biodegradabilidade do contaminante. A quantificação de CO_2 foi feita por cromatografia gasosa (HP 5890) através da técnica de Head Space. Para a quantificação do CO_2, em mmols, foi necessária a construção de uma curva de calibração através da realização da reação química: $2\ HCl + Na_2CO_3 \rightarrow 2\ NaCl + CO_2 + H_2O$, relacionando os percentuais obtidos, por cromatografia, para concentrações conhecidas de CO_2 em µmoLs gerados da reação química supracitada. Os ensaios de biodegradabilidade foram conduzidos com 50 g de solo seco adicionando-se cerca de 15 mg de surfactante por cada g de solo seco, em kitasatos com capacidade de 250 mL. A escolha da concentração de 15 mg de surfactante/g do solo se deve ao fato dessa ser a concentração máxima que foi analisada nos testes de toxicidade, sobretudo porque se o surfactante for biodegradado em sua maior concentração também será em quantidade menores. A suplementação das fontes nutricionais foi realizada pela adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4), numa relação C:N:P = 100:15:1 (relação ótima para esse solo conforme planejamento experimental) A umidade foi ajustada em 50% da

capacidade de retenção de líquido pelo solo. Finalmente, os kitasatos foram incubados em estufa a 30ºC durante 42 dias (tempo estipulado pela ABNT - NBR 14283/99) e monitorados periodicamente por análise cromatográfica, sendo aerados por 2 min diariamente (exceto fins de semana) após cada leitura cromatográfica. A umidade foi corrigida a cada perda de massa de aproximadamente 2 g. A Figura 3.2 mostra como foi montado o esquema de respirometria para quantificação do CO_2.

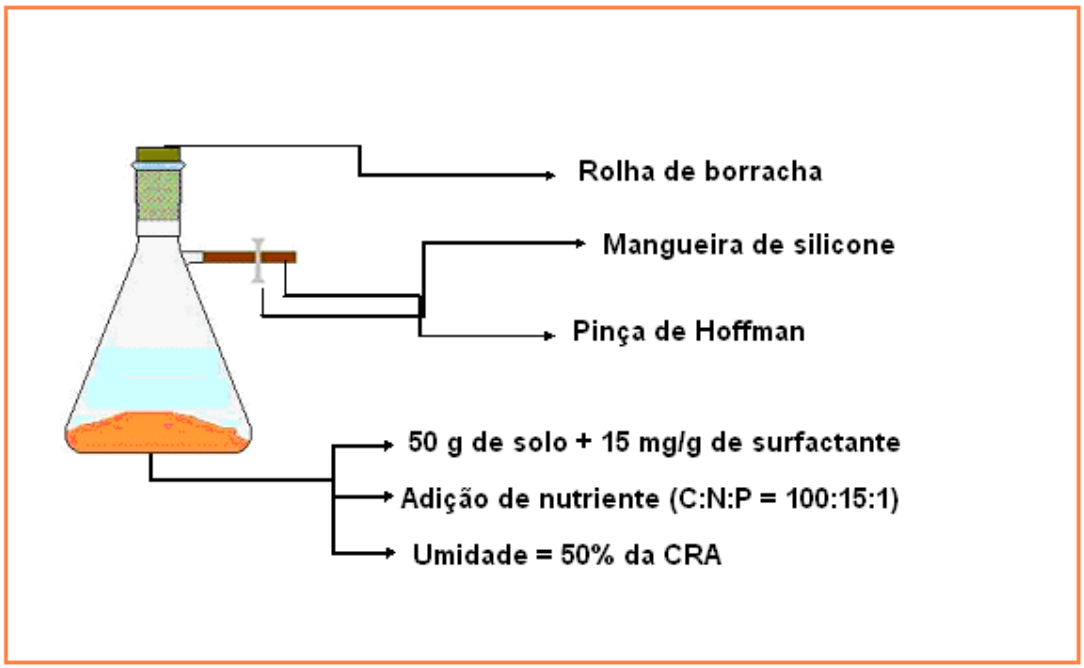


Figura 3.2: Sistema utilizado nos ensaios de biodegradabilidade dos surfactantes em solo.

3.4.5 – Avaliação da biodegradabilidade dos surfactantes em fase líquida

Os surfactantes analisados foram diluídos em solução-nutriente entre 100-200 mg DQO/L, ajustando o pH próximo da neutralidade. Foram transferidos cerca de 450mL dessa solução para uma proveta com capacidade de 1L e posteriormente foram adicionados 50mL de esgoto como inóculo. Os recipientes foram vedados com folha de alumínio a fim de impedir a entrada de materiais particulados do ar e incubados à temperatura ambiente sob aeração através da injeção de ar comprimido filtrado (50-100 mL/min). A cada 24h foram coletadas amostras e filtradas em membrana de 0,22цm para determinação da DQO-solúvel em HACH (EPA, 1985; GLEDHILL, 1975).

3.4.6 – Escolha dos surfactantes a serem utilizados no processo de biorremedição

Através dos testes realizados nos itens 3.4.1 a 3.4.5 foi possível selecionar 2 surfactantes que foram avaliados quanto à toxicidade através de testes de fitotoxicidade (*Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*), mortalidade de minhocas (*Eisenia fetida*) e atividade da desidrogenase. Os testes de toxicidade foram avaliados em diferentes concentrações de surfactantes em solo virgem e em solo contaminado. O fluxograma abaixo mostra as etapas realizadas para a escolha dos surfactantes (Figura 3.3).

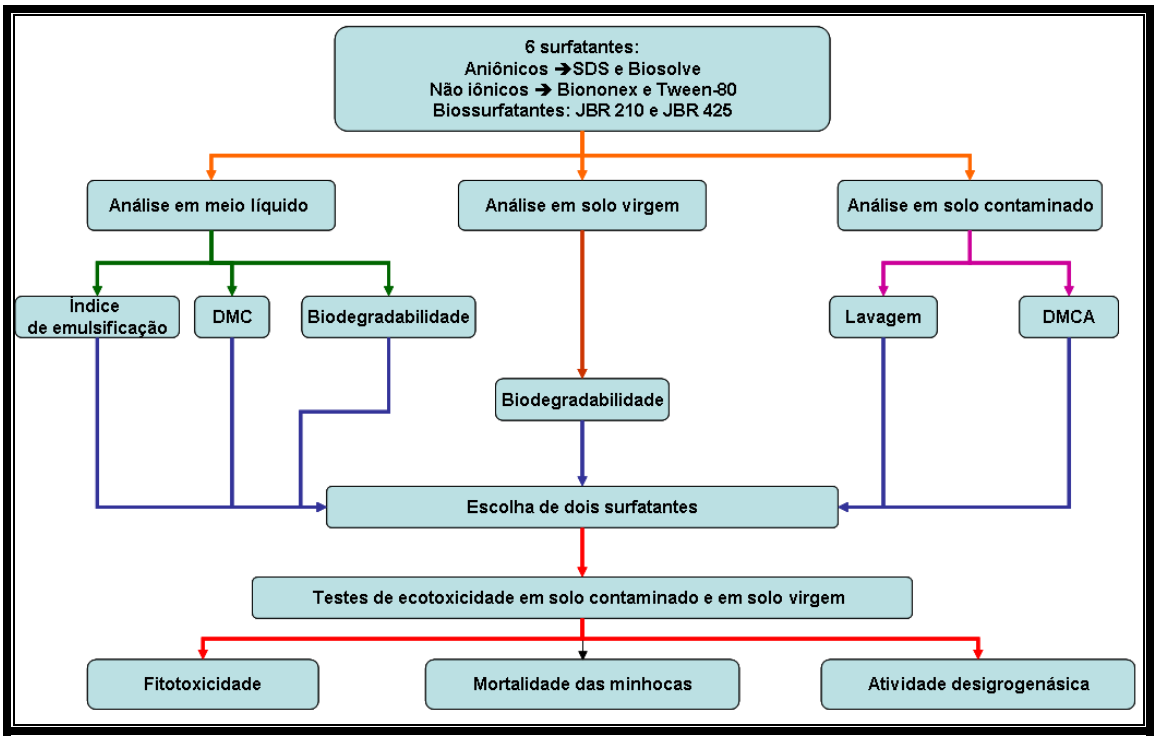


Figura 3.3: Fluxograma da seqüência utilizada para escolha de surfactantes e os testes de ecotoxicidades realizados com os dois surfactantes selecionados.

3.5 – TESTES DE ECOTOXICIDADE

Os testes de ecotoxicidade avaliados foram o de germinação de sementes utilizando a espécie *Lactuca sativa* (alface), crescimento da espécie *Lycopersicon esculentum* (Tomate), mortalidade das minhocas com a espécie *Eisenia fetida* e atividade da enzima desidrogenase.

3.5.1 - Verificação da atividade da desidrogenase em amostras de solo

A técnica envolve a estimativa da taxa de redução de TTC (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio) a TPF (trifenil formazan) nos solos após incubação a 30ºC por 24h. Estes testes foram baseados no método descrito por ALEF & NANNIPIERE (1995) com algumas adaptações, já que foi utilizado metanol como extrator (metodologia já estipulada no laboratório LTA). Estes testes foram realizados tanto para monitorar os ensaios de atenuação natural monitorada e biodegradabilidade em biorreatores, além do teste de toxicidade com os surfactantes.

Para os testes de toxicidade com os surfactantes foram adicionadas diferentes concentrações de surfactantes (ingrediente ativo), que variaram de 1 a 15 mg/g respectivamente, ao solo ainda não contaminado com óleo cru, além de um teste controle (sem adição do biossurfactante). Para tanto, cerca de 5 g de amostra de solo não contaminado foi adicionado em 5 mL de uma solução contendo 1% de TTC. Os testes foram conduzidos em quintuplicata, cujas amostras permaneceram incubadas por 24h em estufa a cerca de 30ºC. Após a incubação, o TPF foi extraído adicionando 40 mL de metanol, sendo que as amostras foram agitadas em shaker a 150 rpm durante 2h. Após a extração, o extrato foi filtrado em papel de filtro de filtração lenta e, posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro na faixa de 485 nm.

Para a determinação da fitotoxicidade nos ensaios de atenuação natural monitorada e para o monitoramento dos ensaios de biodegradabilidade descritos nos itens 4.7.1 e 4.7.4 respectivamente foram retiradas cerca de 5 g de solo e realizada a metodologia de fitotoxicicidade conforme descrito anteriormente, sem adição de surfactante.

A curva de calibração com trifenil formazan (TPF) foi inicialmente preparada a partir de uma solução estoque contendo 0,1g de TPF em 100 mL de metanol. Foram feitas diluições da solução estoque variando de 0,0001 a 0,5 mg/mL que foram lidas no espectrofotômetro SMART SPECTRO (La Motte) num comprimento de onda de 485 nm. A Figura 3.4 mostra como os experimentos com atividade foram conduzidos.

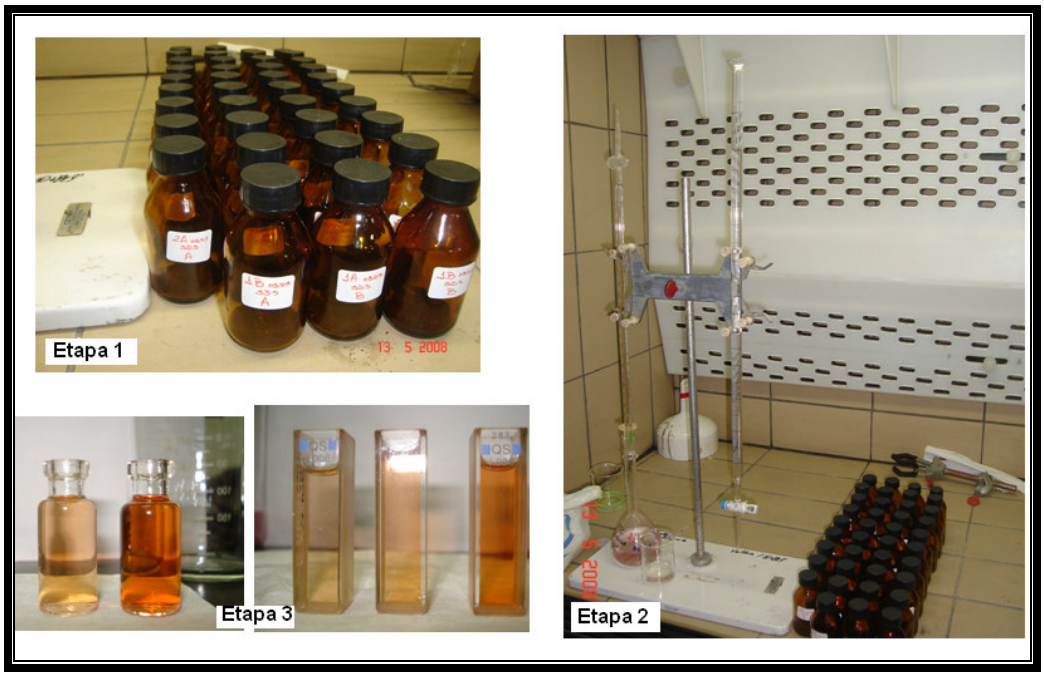


Figura 3.4: Experimentos de atividade da desidrogenase no solo. A) Etapa 1: após a incubação; B) Etapa 2: Adição de 40 mL de metanol com auxílio de bureta; C) Amostras após filtração para serem lidas no espectrofotômetro.

3.5.2 – Fitotoxicidade

3.5.2.1 – Teste de germinação com Lactuca sativa

O método de germinação e crescimento das raízes, sugerido por REIS (2003) foi aplicado utilizando-se sementes de alface da espécie *Lactuca sativa* da marca Isla Pak, isenta de defensivos agrícolas. Inicialmente as sementes foram lavadas em solução contendo 0,1% de NaClO durante 20 min (para evitar crescimento de fungos)., sendo posteriormente colocadas em água destilada por 10 minutos, conforme proposto por WANG *et al* (2002). Estes testes foram realizados tanto para monitorar os ensaios de atenuação natural monitorada e de biodegradabilidade, além do teste de toxicidade com os surfactantes. Para os testes de toxicidade com os surfactantes foram adicionadas diferentes concentrações de surfactantes (ingrediente ativo), que variaram de 1 a 15 mg/g respectivamente, ao solo ainda não contaminado com óleo cru, além de um teste controle (sem adição do surfactante). A seguir, foram preparadas amostras de solo não contaminado adicionando-se diferentes concentrações de surfactantes que variaram de 1 a 15 mg/g em relação à massa do solo seco, respectivamente, além de um teste controle (sem adição de surfactante). Após a adição do surfactante ao solo, pesou-se cerca 10g de desse solo, adicionando-

se água destilada num volume total de 100 mL (solução teste). Colocou-se esta solução em Erlenmeyer de 250 mL agitando-se por 30 min a 150 rpm em shaker. Após a lavagem das sementes com 0,1% de NaClO, foram distribuídas 10 sementes em placa de Petri forrada com papel de filtro e contendo cerca de 2,0 mL de cada solução teste (5 réplicas) a fim de manter o papel umedecido. As placas foram fechadas e incubadas em estufa na ausência de luz e na temperatura de aproximadamente 24ºC durante 120h (5 dias). Após 5 dias, contou-se o número de sementes germinadas, e fez-se medições do comprimento das raízes com auxílio de uma régua e apoiando as sementes numa superfície lisa. As medidas foram feitas do ponto de transição entre o hipocótilo e a raiz, até a extremidade da raiz. Para a determinação da fitotoxicidade nos ensaios de atenuação natural monitorada realizados em lisímetros e para o monitoramento dos ensaios de biodegradabilidade descritos nos itens 3.7.1 e 3.7.4 respectivamente foram retiradas somente 10 g de solo e realizada a metodologia de fitotoxicicidade sem adição de surfactante.

O cálculo do índice de germinação foi feito de acordo com as equações 3.2, 3.3 e 3.4. A Figura 3.5 mostra como foram conduzidos os testes de germinação.

$$\boxed{\%IG = \frac{(\%GS)x(\%CR)}{100}} \qquad (3.2)$$

$$\boxed{\%GS = \left(\frac{\%GE}{\%GC}\right)x100} \qquad (3.3)$$

$$\boxed{\%CR = \left(\frac{MCE}{MCC}\right)x100} \qquad (3.4)$$

Onde: % GS = Germinação de sementes; % CR = Crescimento da raiz; % GE = germinação no extrato; % GC = germinação do controle; MCE = Crescimento no extrato (média) e MCC = Crescimento no controle (média).

O cálculo de EC50 (120h – para diferentes concentrações de surfactantes) que indica a concentração efetiva do agente tóxico que causa o efeito agudo, expresso como concentração que reduz em 50% o IG das sementes em 120h de exposição foi

expresso, plotando-se o gráfico de índice de germinação (%IG) no eixo dos X *versus* a concentração das soluções testes.

Figura 3.5: Montagem dos experimentos de germinação com Lactuca sativa. Etapa 1) colocação de papel de filtro; etapa 2) adição do extrato e colocação das sementes espaçadas; etapa 3) Montagem em quintuplicata; etapa 4) Germinação após 120h; etapa 5) contagem das sementes germinadas; etapa 6) medição do hipocólito a raiz

3.5.2.2 – Teste de crescimento do tomateiro

Trata-se de um teste simples e de baixo custo que pode indicar a ação fitotóxica do composto estudado. O teste consistiu em preencher pequenos vasos de planta com cerca de 150g de solo virgem e 150 g de adubo, conforme descrição do fabricante da marca Isla Pak para o plantio desta espécie para que se possa eliminar o fato de não ter havido germinação em decorrência da baixa fertilidade do solo. Estes testes foram realizados tanto para monitorar os ensaios de biodegradabilidade em escala ampliada (item 3.7.5), além do teste de toxicidade com os surfactantes.

Para os testes de toxicidade com os surfactantes foram adicionadas diferentes concentrações de surfactantes (ingrediente ativo), que variaram de 1 a 15 mg/g. Em cada vaso foram distribuídas, uniformemente, 12 sementes de tomate distribuídas em 4 orifícios (3 sementes para cada orifício). Para manter a umidade do solo, os vasos

foram cobertos com placas de Petri, até inicio da germinação das sementes e sob os vasos foram colocados pratos com areia umedecida. A espécie analisada foi *Lycopersicon esculentum*, conforme recomendado pela OECD (1984) isenta de defensivos agrícolas. No período do ensaio, os vasos ficaram em local arejado, com boa luminosidade natural e, a cada 48h, foram regados por meio de um borrifador para favorecer a germinação e crescimento das sementes. Após 10 dias foi feita a medida do ponto de transição entre o hipocótilo e a raiz, de cada muda e comparado com o experimento controle (sem adição do surfactante).

Para a determinação da fitotoxicidade nos ensaios de biodegradabilidade descritos no item 3.7.5 foram retiradas cerca de 150 g de solo e realizada a metodologia de fitotoxicicidade sem adição de surfactante. A Figura 3.6 mostra como foram procedidos os ensaios com o crescimento do tomateiro. Este teste teve somente a intenção de verificar se o contaminante prejudicaria ou não o crescimento do tomate, não sendo baseado em outros experimentos de toxicidade citados na literatura e sim baseado nas condições ótimas do plantio do tomate.

Para o cálculo da efetividade do crescimento do tomate, tomou-se como parâmetro o teste controle, cujo cálculo de índice de crescimento foi baseado nas Equações 3.2, 3.3 e 3.4 conforme proposto por REIS (2003).

O cálculo de EC50 (10 dias – para diferentes concentrações de surfactantes) que indica a concentração efetiva do agente tóxico que causa o efeito agudo, expresso como concentração que reduz em 50% o crescimento das sementes em 10 dias de exposição foi expresso, plotando-se o gráfico de índice de crescimento (%IC) no eixo dos X *versus* a concentração das soluções testes de surfactantes.

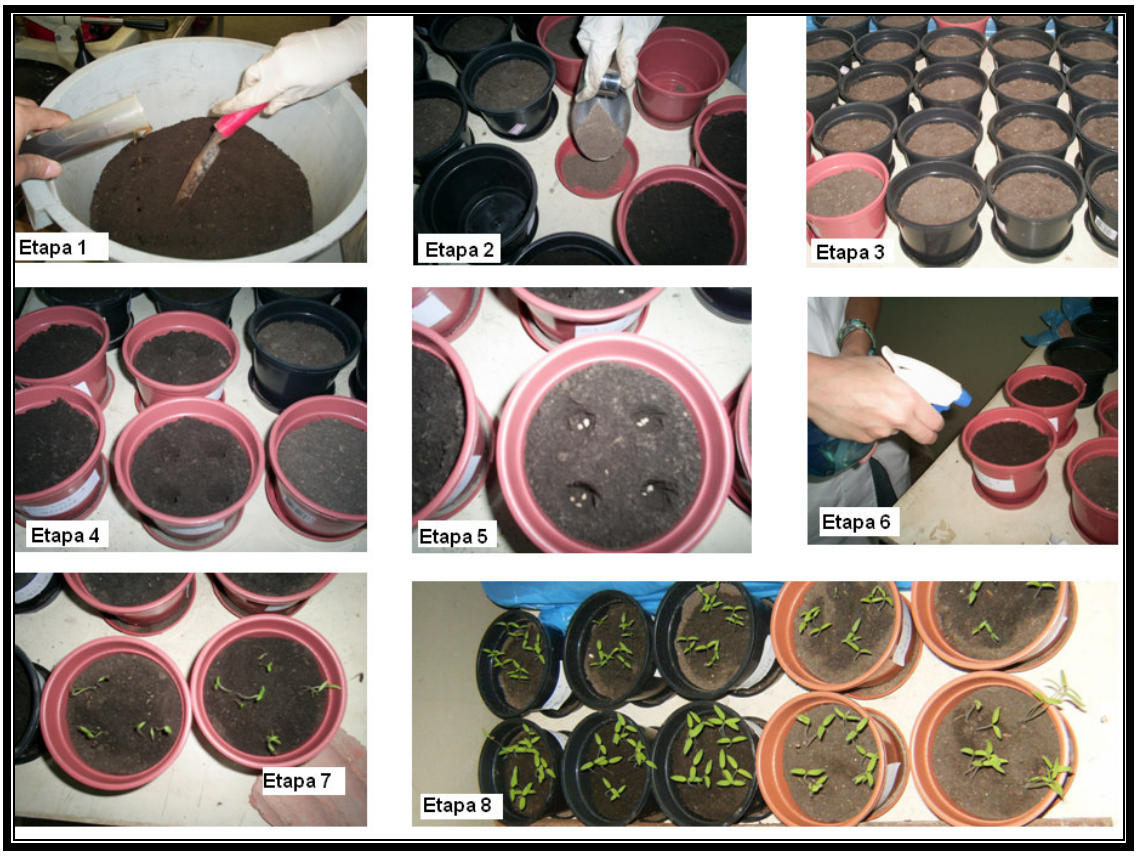


Figura 3.6: Experimentos conduzidos com *Lycopersicon esculentum* para o teste de fitotoxicidade com crescimento. A) Etapa 1: Adição de surfactante ao solo virgem (quando houver); B) Etapa 2: Colocação de areia nos pratos dos vasinhos; C) Etapa 3: Abertura dos orifício para adição das sementes; D) Etapa 5: colocação das sementes nos orifícios; E) Etapa 6:Borrifamento de água nos vasinhos; F) Etapa 7: início do crescimento das sementes; G) Etapa 8: Crescimento do tomate após 10 dias.

3.5.3 – Teste de minhocas

Estes testes foram realizados tanto para monitorar os ensaios de atenuação natural monitorada e biodegradabilidade em escala ampliada, além do teste de toxicidade com os surfactantes. Para os testes de toxicidade com os surfactantes foram adicionadas diferentes concentrações de surfactantes (ingrediente ativo), que variaram de 0,1 a 15 mg/g respectivamente ao solo além de um teste controle (sem adição do surfactante). Foi utilizada a espécie *Eisenia fetida* sendo que a metodologia foi desenvolvida conforme proposto por BAPTISTA (2007). Utilizou-se cerca de 200 g de solo virgem ou contaminado com óleo cru e foram adicionadas diferentes concentrações de

surfactantes variando de 0,1 a 15 mg/g de surfactante em relação a massa do solo (200 g) e também, 20 g de esterco do próprio minhocário. A umidade foi ajustada entorno de 25% em relação à massa total utilizada (220 g). Os experimentos foram conduzidos em recipientes de vidro e tampados com “perfex” (Etapa 6 da Figura 3.7) e após 7 e 14 dias foi feita a enumeração de minhocas vivas, sendo o resultado expresso em termos de percentual de mortalidade. A Figura 3.7 mostra como os experimentos foram conduzidos.

O cálculo de LC50 (14 dias - da concentração do surfactante em solo não contaminado), que indica a concentração efetiva do agente tóxico que causa o efeito letal, expresso como concentração que alcança 50% de mortalidade das minhocas após 14 dias de exposição, foi realizado plotando-se o gráfico do percentual de minhocas vivas X versus a concentração das soluções do surfactante adicionadas ao solo.

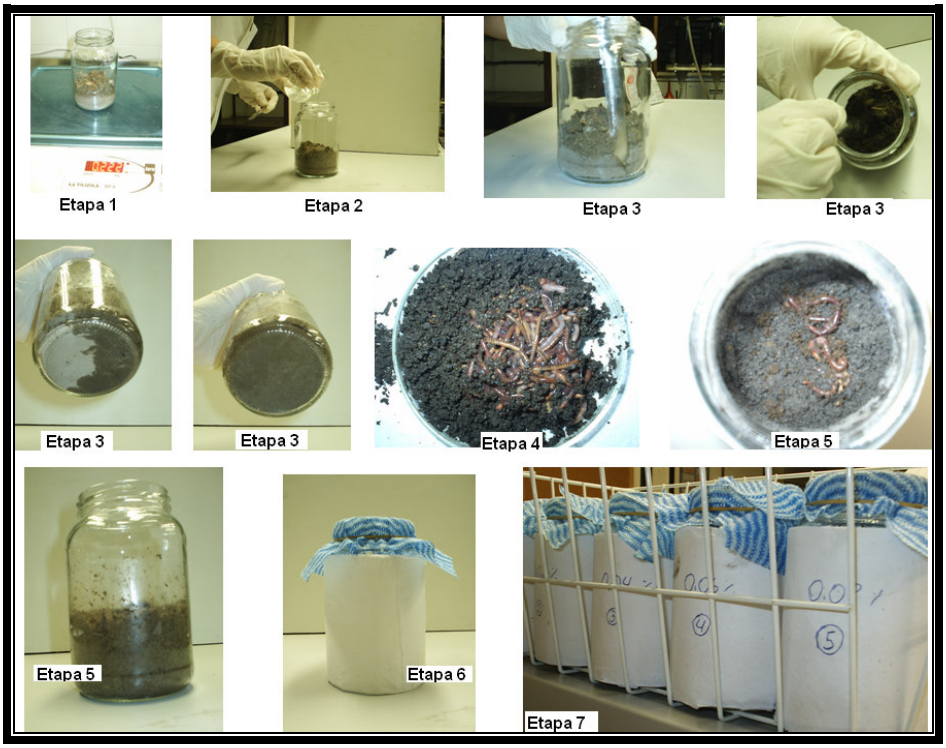


Figura 3.7: Teste de mortalidade das minhocas utilizando a espécie *Eisenia fetida*. A) Etapa 1: Massa final do solo com (200 g de solo + 20 g de esterco); B) Etapa 2: Adição de água (25% em relação a massa total); C) Etapa 3: Homogeneização da água no frasco de vidro; D) Etapa 4: Escolha das minhocas; E) Etapa 5: Adição das minhocas no frasco de vidro; F) Etapa 6 e Etapa 7: montagem dos experimentos sendo mantidos fechados durante os ensaios.

3.6 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO NUTRICIONAL ÓTIMA NOS ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Estes ensaios foram realizados em kitasatos de 250 mL contendo 50 g de solo contaminado com óleo cru.

3.6.1 – Planejamento experimental fatorial 2^3

O planejamento teve como objetivo investigar as adições de nitrogênio e fósforo ao solo, bem como, verificar o teor de umidade ideal a ser adicionada para a biodegradação dos contaminantes do solo. Para tanto, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3, consistindo de 8 experimentos em duplicata, num total de 16 experimentos. A Tabela 3.2 mostra os fatores e os níveis avaliados no planejamento.

Tabela 3.2: Fatores avaliados para otimização da biodegradação do óleo no solo, empregando planejamento fatorial completo 2^3

FATORES	NÍVEIS	
	Nível (+1)	Nível (-1)
Nitrogênio	C:N = 100:10	C:N = 100:5
Fósforo	C:P = 100:1	C:P = 100:2
Umidade	90% da capacidade de retenção de água no solo (CRA)	50% da CRA

3.6.1.1 – Ensaio de biodegradabildade

Os experimentos foram realizados pesando-se 50g de solo contaminado e seco ao ar (temperatura ambiente), em kitasato de volume útil de 250 mL e posteriormente foram adicionados os nutrientes seguindo a relação estipulada no planejamento experimental através da adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e de fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4). A umidade também foi ajustada conforme a matriz experimental apresentada na Tabela 3.3. Após correção da umidade e suplementação com os sais, o conteúdo de cada frasco foi homogeneizado com auxílio de bastão de vidro. Os frascos, tampados com rolha de silicone, e na saída lateral foi colocado um tubo de látex fechado com pinça de Hoffman. Os ensaios foram incubados em estufa a 30 ± 1^0C durante 30 dias e retirados periodicamente para análise cromatográfica e aeração por 2 minutos com ar comprimido. Periodicamente, os frascos foram agitados para proporcionar aeração e a umidade do solo foi corrigida por método gravimétrico

(ajustada a cada perda total de massa de 2 g). Estes ensaios foram monitorados pelo teor de óleos e graxas, analisados no início e ao término do período, bem como pela evolução de CO_2. A Tabela 3.3 mostra a matriz padrão do planejamento experimental e a Figura 3.8 mostra como os ensaios foram conduzidos.

Figura 3.8: Ensaio de biodegradabilidade conduzido em estufa a 30º C com monitoramento de evolução de CO_2.

Tabela 3.3: Matriz padrão do planejamento fatorial completo 2^3.

Experimentos	Níveis dos Fatores		
	Nitrogênio	Fósforo	Umidade
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1

3.6.1.2 – Ensaios de biodegradabilidade realizados após o planejamento experimental

Estes ensaios foram realizados com intuito de confirmar os resultados apontados no planejamento experimental. Estes ensaios foram conduzidos ajustando-se a umidade para 50% da capacidade de retenção de líquido, sendo analisadas as seguintes relações nutricionais: C:N:P = 100:10:1 e 100:15:1, 100:20:1 e 100:25:1 e C:N = 100:15, 100:20 e 100:25 (sem adição de fósforo) e C:P = 100:1 (sem adição de nitrogênio). Os experimentos foram realizados pesando-se 50 g de solo seco contaminado, em kitasato com capacidade de 250 mL. O enriquecimento com nutrientes foi feito através da adição de fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4) e nitrato de amônio (NH_4NO_3). Os ensaios foram conduzidos em duplicata, durante 30 dias em estufa a 30°C e foram monitorados pela redução do teor de óleos e graxas (O&G).

3.7 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU NO SOLO

3.7.1 – Atenuação Natural Monitorada

Antes da montagem dos experimentos em lisímetros, cerca de 120 kg de solo foi contaminado com 5% de óleo cru e seco ao ar. Desses 120 kg já contaminados foram retirados 50 kg de solo para serem feitos os primeiros ensaios de biodegradabilidade além de outros testes realizados com solo de contaminação recente. Os 70 kg restantes foram distribuídos nos dois lisímetros com cerca de 35 kg em cada lisímetro.

A atenuação natural foi avaliada com intuito de verificar a degradação do óleo no solo ao longo do tempo sem intervenção humana. Para este fim, foram montados experimentos com solo contaminado dispostos em recipientes denominados de lisímetros com dimensões de 40x30x25 cm, possuindo, ainda, um orifício para captação de água percolada pela chuva conforme mostra a Figura 3.9. Nestes ensaios o solo foi monitorado mensalmente através de análise de HTP, população microbiana, pH e atividade da desidrogenase (retirando de cerca de 100g de solo de cada lisímetro após homogeneização). Trimestralmente, foram efetuadas análises de caracterização do solo contaminado com matéria orgânica, nitrogênio (N), fósforo (P), densidade aparente (d_{AP}), densidade de partícula (d_P), capacidade de retenção de líquido (CRL) e testes de ecotoxicidade como mortalidade das minhocas e fitotoxicidade (retirando cerca de 1kg de solo de cada lisímetro). Aos 180 dias foram retirados cerca de 10 kg de solo de cada lisímetro para serem realizados testes de biodegradabilidade e ao final do experimento todo o solo foi retirado para os últimos ensaios de biodegradabilidade. Mensalmente foram, também, realizadas as aferições dos teores de óleos e graxas da água percolada pela chuva.

Figura 3.9: Esquema para simulação das intempéries ocorridas no solo após um acidente ambiental.

A amostragem foi realizada nas quatro extremidades e ao centro até o fundo do recipiente, visando obter amostra representativa do solo. A Figura 3.10 mostra o esquema de amostragens do solo. As amostras foram retiradas com auxílio de um tubo com orifício aberto.

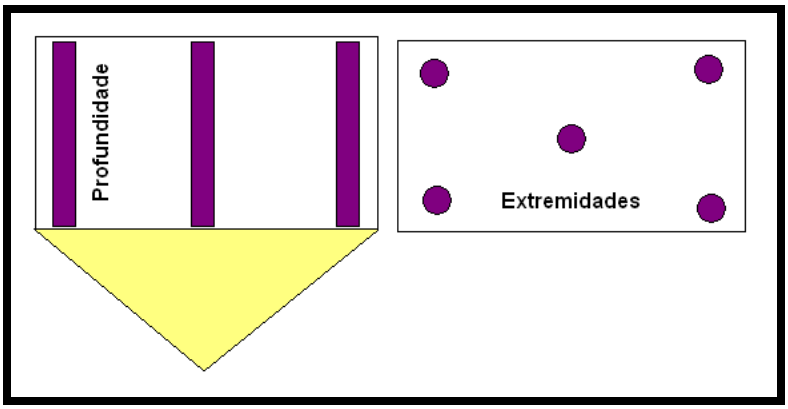


Figura 3.10: Esquema do procedimento adotado para amostragem do solo.

3.7.1.1 – Avaliação da captação de água percolada pela chuva

Durante os experimentos conduzidos em lísimetros, conforme descrito no item 3.7.1, a água da chuva foi captada, sendo acondicionada em recipientes e analisada, mensalmente, pela análise de Óleos e Graxas (metodologia descrita no item 3.7.4). A cada semana era captada cerca de 500 mL de água percolada (caso tivesse) e acondicionada em recipientes. Ao final do mês essas amostras eram misturadas e

analisadas em termos de teor de óleos e graxas. A Figura 3.11 mostra como a água da chuva foi captada e acondicionada para ser lida mensalmente.

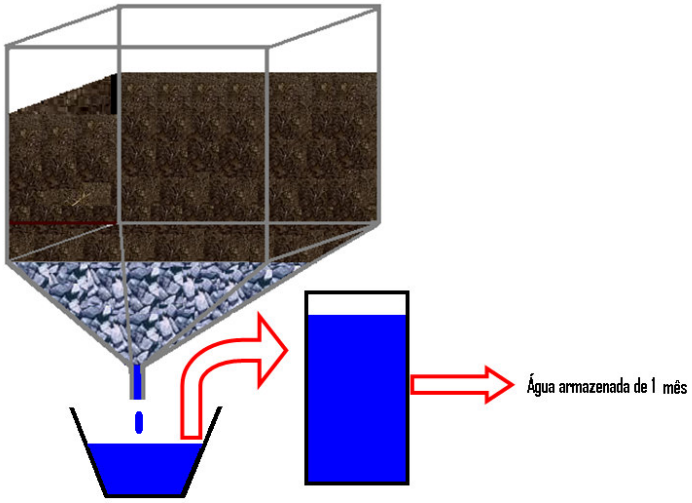


Figura 3.11: Água da chuva captada para análise de Óleos e Graxas

3.7.3 – Avaliação da biodegradabilidade de solo contaminado ao longo do tempo

Estas análises tiveram o intuito de verificar a ação da adição do surfactante escolhido ao longo do tempo. Desta forma, foram retiradas amostras do solo dos lisímetros (Figura 3.10) nos intervalos de tempos 0, 180 e 420 dias para, posteriormente, serem feitos ensaios de biodegradabilidade dessas amostras conforme descrito no item 3.8.4. A Figura 3.12 mostra a seqüência do preparo das amostras ao longo do tempo.

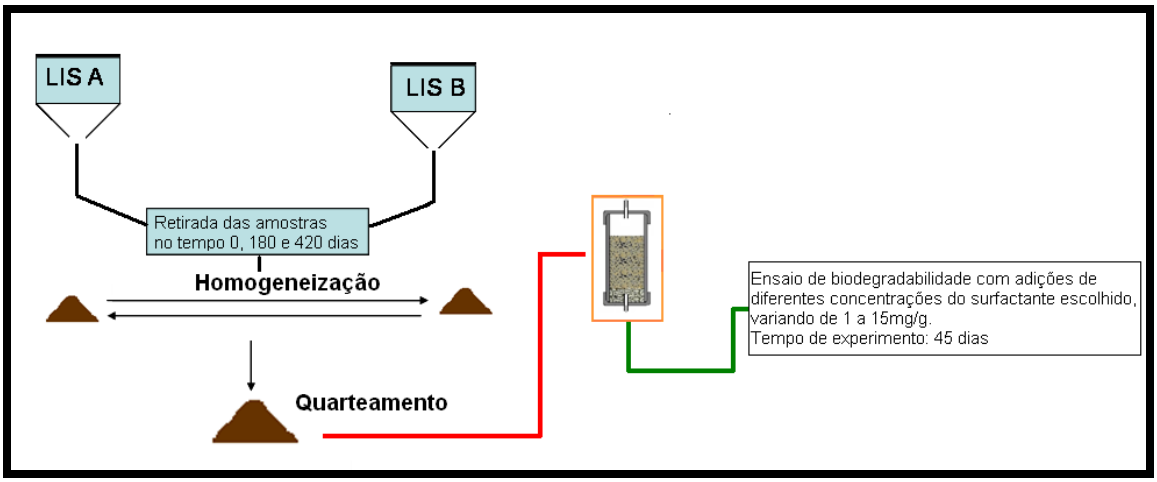


Figura 3.12: Esquema da utilização das amostras do solo retiradas dos lisímetros no tempo 0, 180 e 420 dias

3.7.3 – Ensaios de biodegradabilidade em solo contaminado com óleo cru conduzidos em biorreatores: avaliação da adição de diferentes concentrações de surfactantes e da toxicidade ao longo do tempo

Os experimentos foram realizados em biorreatores feitos de Tubo de .PVC (Policloreto de vinila) constituídos de 20 cm de altura e 5 cm de diâmetro, sendo utilizado 15 cm de leito de solo e 3 cm de camada de brita, ocupando 90% do biorreator. Foram adicionados a estes biorreatores cerca de 400 g de solo contaminado, sendo adicionadas diferentes concentrações de surfactantes que variaram entre 1 e 15 mg para cada grama (g) de solo. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, empregando-se uma vazão de ar úmido de 3L/h conforme estabelecido por PALA (2002) em ensaios anteriores. Os nutrientes foram corrigidos através da adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4) numa relação nutricional C:N:P = 100:15:1 (relação estipulada após realização dos ensaios do item 3.7), sendo a umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção de líquido. Durante o período experimental a umidade foi controlada através de balança termogravimétrica. A umidade foi controlada retirando-se cerca de 10 g de solo, após homogeneização da amostra no biorreator e colocado cerca de 1 g em balança termogravimétrica. A umidade foi ajustada a cada perda de 5 % de água em relação à umidade inicial.

Os ensaios foram realizados durante 45 dias e quinzenalmente foram realizadas as análises de HTP, concentração celular, pH, atividade da desidrogenase e fitotoxicidade com *Lactuca sativa.* Estes ensaios foram conduzidos após a retirada de amostras de solo do lisímetro nos tempos 0, 180 e 420 dias conforme mostrado na Figura 3.12. Estes ensaios foram realizados a fim de se obter uma concentração ótima de surfactante a ser adicionada ao ensaios de biodegradabilidade. A Figura 3.13 mostra como foram conduzidos os ensaios de biodegradabilidade e a Figuras 3.14 mostra as fotos dos experimentos.

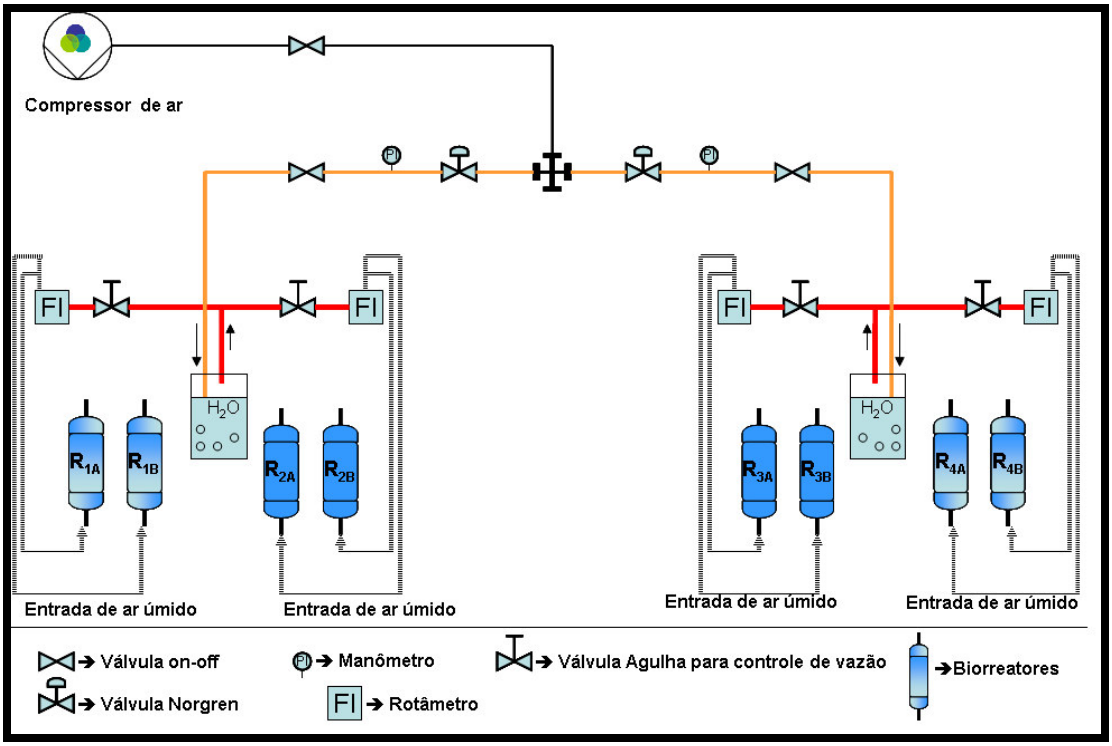


Figura 3.13: Representação esquemática dos ensaios de biodegradabilidade, utilizando biorreatores aeróbicos de leito fixo.

Figura 3.14: Condução dos ensaios de biodegradabilidade. A) Biorreatores; B) Esquema de alimentação de ar úmido.

3.7.4 – Ensaios de biodegradabilidade em solo contaminado com óleo cru conduzidos em biorreatores em escala ampliada: avaliação da melhor condição experimental com ênfase em toxicidade.

Os experimentos foram realizados em biorreatores constituídos de 100 cm de altura e .20 cm de diâmetro, sendo colocados 3 cm de camada de brita grossa, 2 cm de camada de brita de menor diâmetro e 4 kg de solo contaminado com óleo cru acima das camadas de brita. Esses experimentos foram com as mesmas condições realizadas no item 3.7.4, ou seja, mantidos à temperatura ambiente, empregando-se uma vazão de ar úmido de 60 L/h com correção de nutrientes através da adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4) numa relação nutricional C:N:P = 100:15:1 (relação estipulada após realização dos ensaios do item 3.7), tendo a umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção de água. A adição de surfactantes foi de acordo com a concentração ótima estipulada após os ensaios realizados no item 3.7.4. Nesses ensaios foram monitorados, a cada 7 dias, através das análises de HTP (HORIBA), concentração de células, pH e umidade. No início e ao final de cada experimento foram analisados, também, outros indicadores de toxicidade como crescimento da espécie *Lycopersicon esculentum* (Tomate) e mortalidade de minhocas da espécie *Eisenia fetida,* além das análises de HTP por cromatografia gasosa. A Figura 3.15 mostra como esses ensaios foram monitorados, bem como a foto dos biorreatores.

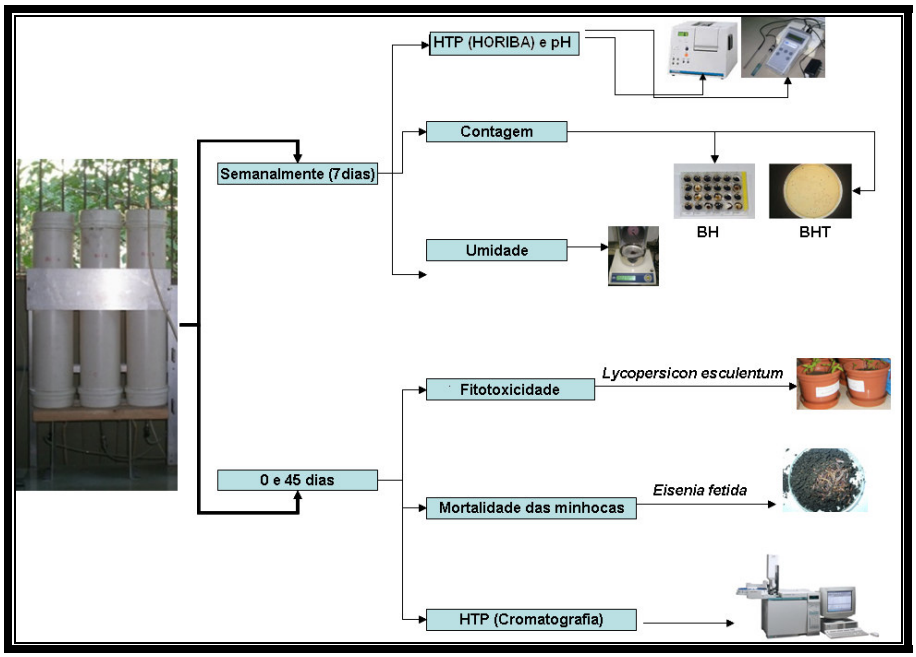


Figura 3.15: Esquema de monitoramento dos ensaios em escala ampliada. BH = bactérias hidrocarbonoclásticas; BHT = bactérias heterotróficas totais; HTP = Hidrocarbonetos totais de petróleo

3.7.5 – Avaliação do efeito da adição do surfactante em duas etapas.

Nestes experimentos foi observado o efeito da adição do surfactante em duas etapas. Para tanto, as concentrações dos surfactantes, utilizadas nas melhores condições experimentais, realizadas no item anterior (item 3.7.4), foram adicionadas em duas etapas, ou seja, metade no início e a outra metade após 22 dias de ensaio de biodegradabilidade, considerando-se somente a massa do solo retida após os 22 dias. Semanalmente foram monitoradas apenas as concentrações de HTP pelo equipamento HORIBA e os testes de toxicidade com *Lycopersicon esculentum* (Tomate) e mortalidade de minhocas da espécie *Eisenia fetida.* Estes experimentos também foram realizados nos biorreatores em escala ampliada. A Figura 3.16 mostra como foram conduzidos os experimentos.

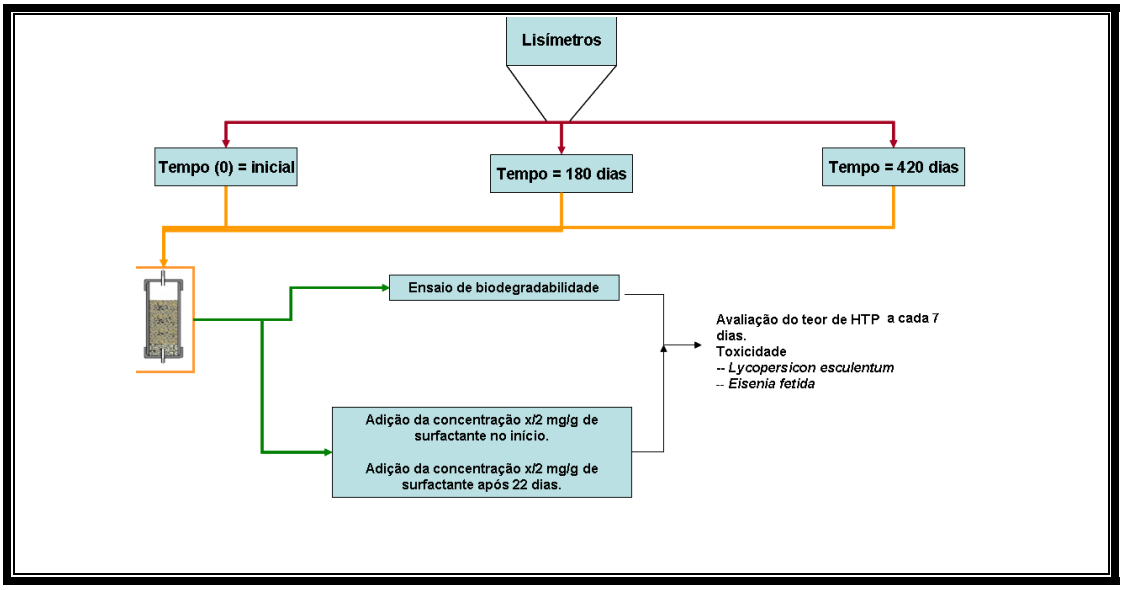


Figura 3.16: Esquema realizado com as melhores concentrações de surfactante obtidas no tempo 0, 180 e 420 dias, com adição em batelada.

3.8 – METODOLOGIAS ANALÍTICAS

3.8.1 – Propriedades físicas do solo

3.8.1.1- Densidade aparente e densidade da partícula

Estes ensaios foram conduzidos conforme metodologia descrita por DEUEL & HOLLIDAY (1997). Antes de realizados estes ensaios, o solo foi macerado em graal e peneirado em peneira com abertura de 2 mm.

Densidade aparente: Pesou-se uma proveta de volume (A) vazia – peso em gramas (g). Adicionou-se à mesma, solo até o volume de 100 mL. Posteriormente, pesou-se a

proveta cheia de solo (B). Com a diferença de peso (B – A) foi possível calcular a densidade do solo através da equação 3.5:

$$D = \frac{(B - A)}{100} \qquad (3.5)$$

D = densidade aparente em g/mL

Densidade de partículas: a densidade das partículas do solo, também conhecida como densidade real, pode ser definida como a massa de sólidos presentes no solo por unidade de volume do mesmo.

Inicialmente, pesou-se um balão volumétrico de capacidade de 100 mL vazio (A), adicionando ao mesmo cerca de 20 g de solo seco, pesando-se novamente o balão (B). Após a pesagem, cerca de 50 mL de água destilada foi adicionada ao balão aquecendo o mesmo até a ebulição para que ocorresse a remoção de ar aprisionado nos poros do solo. Após o aquecimento, o balão foi resfriado, adicionando-se, ao mesmo, água destilada até a aferição de 100 mL, pesando-se novamente o balão (C). A temperatura da água foi anotada para fins de cálculo da densidade da água numa determinada temperatura. Após estes procedimentos, o balão foi esvaziado e lavado sendo cheio com água destilada até o volume de 100 mL e pesado novamente (D). A densidade de partícula (Dp) foi obtida através da equação 3.6:

$$Dp = \frac{Da(B - A)}{(B - A) - (C - D)} \qquad (3.6)$$

Da= densidade da água na temperatura registrada em g/mL
Dp = Densidade da partícula em g/mL

3.8.1.2 - Porosidade

A porosidade é calculada diretamente através da seguinte equação:

Porosidade (%) = [100 – (densidade de aparente / densidade de partícula) * 100]

3.8.1.3 - Capacidade de retenção de água

O ensaio foi realizado segundo metodologia adaptada de ALEF & NANNIPIERE . (1995). Foram pesados 20 g de solo seco e transferidos para um funil com papel de filtro, sendo o conjunto suportado em uma proveta de 100 mL de capacidade que foi previamente pesada. Adicionou-se ao solo cerca de 100 mL de água destilada,

tampando-se a parte superior do funil para que não houvesse evaporação. Deixou-se descansando por 24h ou até que se percebeu que toda a água adicionada tivesse sido percolada à proveta de 100 mL. Após toda percolação da água, pesou-se a proveta com a água percolada e obteve-se a capacidade de retenção de água pela equação 3.7.

$$CRA = [\frac{(P_{in} - P_{fin})}{ms*}] * 100 \quad (3.7)$$

Onde:

CRA = capacidade de retenção de água [%]

P_{in} = Peso inicial da proveta com 100 mL de água [g]

P_{fin}= Peso da final da proveta com água percolada [g]

ms = Peso do solo seco [g]

3.8.1.4 –Teor de umidade

A determinação do teor de umidade total foi realizada através de método gravimétrico, com balança IV2000 Gehaka, que utiliza um sistema de secagem por infravermelho e fornece automaticamente o teor de água presente na amostra.

3.8.2 – Propriedades químicas do solo

3.8.2.1 - Teor de Nitrogênio

A determinação de nitrogênio nas amostras de solo foi feita pelo método descrito por JARAMILLO (1996). Esse método consiste em uma modificação do método de Kjeldahl para que a análise inclua os nitratos presentes na amostra. Através deste ensaio, o nitrogênio orgânico e os nitratos são convertidos em sulfato de amônio, destilados e coletados em ácido bórico. Em seguida, procede-se a titulação com solução de HCl 0,1 N, utilizando-se vermelho de metila como indicador. Um ensaio em branco, sem adição de solo, foi realizado para eliminar a possível interferência causada pela presença de nitrogênio nos reagentes utilizados. O teor de nitrogênio foi calculado de acordo com a Equação 3.8.

$$\%N = (\frac{V_{HCl}^{amostra} - V_{HCl}^{branco}}{m}) * 0{,}1 * 1{,}4 \quad (3.8)$$

Onde:

%N = teor de nitrogênio na amostra [% p/p]

$V_{HCl}^{amostra}$ = volume de HCl gasto para titular as amostras de solo [mL]

V_{HCl}^{branco} = volume de HCl gasto para titular o branco [mL]

m = massa de solo amostrada [g]

0,1 = normalidade de HCl

1,4 = fator de conversão

3.8.2.2- Teor de fósforo assimilável

O teor de fósforo total foi medido segundo metodologia descrita por JARAMILLO (1996), com algumas modificações, visando adequar o método ao tipo de solo estudado. Com isso, pesou-se 13 gramas de solo e adicionou-se 91 mL de solução extratora, contendo fluoreto de amônio 1N em solução ácida diluída (HCl). Esse procedimento tem por finalidade extrair do solo as formas de fósforo facilmente solúveis em meio ácido, assim como grande parte dos fosfatos de cálcio e uma fração dos fosfatos de alumínio e ferro devido à formação de complexos com os íons metálicos quando se encontram em solução ácida. Em geral, esse método permite a obtenção de bons resultados em solos ácidos, neutros e ligeiramente alcalinos (CAJUSTE, 1986 *Apud* JARAMILLO, 1996*)*. Após um período de 24 horas de contato entre o solo estudado e a solução extratora, o extrato obtido foi centrifugado e, posteriormente, filtrado em membrana Millipore (0,45 µm de poro). Em seguida, adicionou-se a 35 mL do extrato, 10 mL de uma solução de molibdato vanadato (1 N) e o volume foi completado para 50 mL. Após 10 minutos, foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro marca HACH modelo DR/2000 no comprimento de onda de 450 nm. A concentração de fósforo total foi obtida de acordo com curva-padrão previamente preparada, empregando-se KH_2PO_4 como padrão. A Equação 3.9 representa a reta obtida na curva-padrão:

$$\boxed{C_{extrato} = 40{,}68 * Abs} \qquad (3.9)$$

Onde:

$C_{extrato}$ = concentração de fósforo total no extrato [µg/L]

Abs = absorbância (450 nm)

Coeficiente de correlação da curva padrão = 0,995

A Equação 3.10 fornece a concentração de fósforo total no extrato, sendo necessário aplicar a Equação 4.10 para se obter o teor de fósforo no solo.

$$P = \left(\frac{C_{extrato} * V_{extratora}}{m_{solo} * 1.000} \right) \quad (3.10)$$

Onde:

P = teor de fósforo no solo [g/Kg]

$C_{extrato}$ = concentração de fósforo total [mg/L]

$V_{extratora}$ = volume utilizado da solução extratora [mL]

m_{solo} = massa de solo [g]

1000 = fator de conversão

3.8.2.3- Teor de matéria orgânica

O teor de matéria orgânica presente nas amostras de solo foi determinado de acordo com o método de WALKEY & BLACK (1934) *Apud* JARAMILLO (1996), que consiste num procedimento indireto por meio do qual se determina o teor de carbono da matéria orgânica. Esta quantificação é realizada por combustão úmida, empregando-se o ácido crômico como oxidante (resultante da reação do dicromato de potássio com o ácido sulfúrico).

O dicromato de potássio residual, que permaneceu após a reação de oxidação, foi titulado com uma solução de sulfato ferroso 0,5 N. Segundo a metodologia, 77% do carbono total da matéria orgânica é oxidado nas condições do ensaio, obtendo-se uma aproximação aceitável do conteúdo de carbono orgânico no solo. Para a conversão de matéria orgânica em carbono, considera-se que 58% da matéria orgânica é formada por carbono orgânico (JARAMILLO, 1996). Um ensaio em branco foi feito sem a adição de solo, para se descontar qualquer carbono orgânico presente nos reagentes. O cálculo do teor de matéria orgânica (% p/p) das amostras de solo foi realizado segundo a Equação 3.11.

$$\%MO = V_{dicromato} * \left(1 - \left(\frac{V_{amostra}}{V_{branco}} \right) \right) * K \quad (3.11)$$

Onde:

$\%MO$ = teor de matéria orgânica

$V_{dicromato}$ = volume de dicromato de potássio utilizado [mL]

$V_{amostra}$ = volume de sulfato ferroso 0,5 N utilizado na titulação da amostra [mL]

V_{branco} = volume de sulfato ferroso 0,5 N utilizado na titulação do branco [mL]

K = N*(0,003/0,77)*(100/m)*1,72

1,72 = fator de conversão do carbono na matéria orgânica

Sendo que: N = normalidade da solução de dicromato de potássio

0,003 = miliequivalente grama do carbono

m = massa da amostra de solo [g]

0,77 = fator de conversão (77% do carbono total da matéria orgânica é oxidado)

3.8.2.4- pH

O pH do solo foi aferido de acordo com a metodologia proposta pela EMBRAPA (1997). Cerca de 20g de solo foi agitada em 50mL de água destilada durante 1h em shaker numa rotação de 150 rpm. A leitura do pH foi feita em equipamento da marca QUIMIS.

3.8.2.4.1 – Curva de calibração do pH

O pH ideal para o processo de biodegradação deve estar próximo da neutralidade. Dessa forma, no início do processo não houve necessidade de ajustar o pH do solo. Entretanto, a partir de 180 dias foi necessário um ajuste do pH do solo para 7,0, através de curvas de neutralização de pH mostrado em anexo.

3.8.3 – Caracterização biológica do solo.

3.8.3.1 - Quantificação de bactérias heterotróficas totais

A quantificação da população microbiana heterotrófica total foi feita a partir do plaqueamento (em duplicata) em meio orgânico sólido (TSA – Trypic Soy Agar), pela técnica de “pour plate”. Foram adicionados 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) e fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1h a 30 ºC. Em seguida, com o sobrenadante foram preparadas diluições em solução salina (0,85% NaCl) variando de 10^{-1} a 10^{-7} e, a partir de cada diluição, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placa de Petri contendo meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar). Após agitação foi feito o plaqueamento, adicionando cerca de 0,2 mL de diluição da suspensão salina nas placas. Incubou-se por 48 horas a 30 ºC e contou–se o número de unidades formadoras de colônias (resultado expresso em UFC/ g de solo) (URURAHY, 1998). A Tabela 3.4 mostra a composição do meio TSA utilizado.

Tabela 3.4: Composição do Meio TSA

Componentes	Conc. (g/L)
Glicose	10,00
Peptona de Carne	5,0
Extrato de Lêvedo	2,0
NaCl	5,0
Agar – Agar	20,0

3.8.3.2 - Quantificação de bactérias hidrocarbonoclásticas

A contagem de bactérias hidrocarbonoclásticas foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (VOLPON *et al.* 1997). Para esse procedimento também foram preparadas diluições de 10^{-1}a 10^{-7} em solução salina (NaCl 0,85%), avaliando-se, somente, as diluições de 10^{-3} a 10^{-7}, sendo que uma alíquota de 0,1 mL de cada solução foi transferida para 5 poços de uma placa com total de 24 poços, contendo 1,8 mL de meio mineral obtido de acordo com VECCHIOLI *et al.* (1990). meio esse utilizado para o crescimento dos microrganismos hidrocarbonoclásticos, cuja composição se encontra na Tabela 3.5 e, finalmente, adicionou-se 10 μL de óleo cru com pipeta automática ou conta-gotas (2 gotas de óleo). Foram ainda reservados 2 poços para o controle sem inóculo e sem óleo e 2 poços para o controle sem inóculo (somente com óleo mineral). Incubou-se em estufa a 30ºC durante 7 dias e o crescimento foi avaliado visualmente. Ao se observar alguma modificação, em relação ao teste em branco, considerava-se o teste como positivo. Os resultados foram expressos em NMP/g de solo seco.

Tabela 3.5: Composição do Meio Mineral

Componentes	Quantidade (g/L)
NaCl	5,0
K_2HPO_4	1,0
*$NH_4H_2PO_4$	1,0
*$(NH_4)_2SO_4$	1,0
*$MgSO_4$.7H2O	0,2

VECCHIOLI et al. (1990)

3.8.4 – Determinação de óleos e graxas (por gravimetria)

Empregou-se o método descrito pelo Standard Methods (APHA, 1992), adaptado para a amostra de solo. Para a análise do solo, a metodologia consistiu na separação de O&G a partir de uma determinada massa do solo (~ 2g). A extração foi conduzida com hexano, por 4 horas a uma velocidade de 20 ciclos por hora. Após este período, os extratos foram concentrados em rotoevaporador e transferidos para tubos com diâmetro de 1cm, sendo o resíduo concentrado em purga de nitrogênio e banho à 45ºC até a secura, conforme descrito por RIZZO e RAIMUNDO (2003). Após a concentração dos extratos estes foram pesados e, por gravimetria, determinou-se o teor de óleos e graxas de cada amostra.

3.8.5 – Hidrocarbonetos totais de petróleo

3.8.5.1 – Por infravermelho

A metodologia consiste em extrair os hidrocarbonetos de petróleo contidos em 0,5 g de solo seco com 20 mL de solvente S-316 específico para HORIBA. Essa extração é feita a frio em ultrassom durante 2 h. Após extração, a solução resultante é filtrada em papel de filtro Whatman nº 40 com 2 gramas de sílica gel (60 a 200 mesh) e as quantidades de CH, CH_2 e CH_3 determinadas em espectrofotômetro de infravermelho (Horiba OCMA-350), nos comprimentos de onda de 3,38, 3,42 e 3,50 µm, respectivamente.

3.8.5.2 – Por cromatografia gasosa

A análise dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) nas amostras de solo foi realizada pela empresa BIOAGRI de acordo com metodologia USEPA 8015B (1996). Foram pesados 5 g de solo seco e o óleo aderido ao solo foi extraído com 10 mL de dicloro metano e foi concentrado até 1 mL. Esse concentrado foi lido em cromatógrafo Agilent 6890 com injetor Agilent 7683 com detector FID, onde o perfil cromatográfico do solo foi determinado. A calibração do método foi feita com o coquetel de calibração que continha os n-alcanos de C8 até C40, incluindo os isoprenóides pristano e fitano e os padrões deuterados (C12, C16, C20, C24 e C36).

3.8.6 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

O perfil cromatográfico do solo foi determinado de acordo com metodologia USEPA 8270c e 8270 d(1996). Foram pesados 5 g de solo seco e o óleo foi extraído do solo, agitando-se em diclorometano, concentrando-se o extrato orgânico até um volume de 1 mL com nitrogênio analítico. A coluna utilizada foi HP-5 (5% de difenil e 95% de dimetilsiloxano) de 30 cm com 53 mm de diâmetro e 1,0 µm de espessura do filme.

Hélio ultrapuro foi usado como gás carreador. A temperatura do forno foi programada inicialmente a 70ºC com taxa de aquecimento de 6ºC/min até 200ºC, seguindo 12ºC/min até 300ºC.

3.8.7 - Demanda química de oxigênio

Utilizou-se o método de refluxo fechado, conforme descrito no Standard Methods - seção 5220 D (APHA, 1992). Para a leitura de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro marca HACH®, modelo DR/2000. A curva de calibração foi feita utilizando biftalato de potássio.

3.8.8 – Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi avaliada pelo método do anel Du Noüy (FOUNTAIN *et al.*, 1991) em tensiômetro K10T da marca KRUSS

3.8.9 – Quantificação do CO_2

Com auxílio de uma seringa cromatográfica foram coletadas 0,5 mL das atmosferas internas dos Kitasatos e em seguida este volume foi injetado no cromatógrafo a Gás HP 5890. As respostas cromatográficas foram dadas em % de área de integração e, desta forma, fez-se necessária a construção de curvas de calibração relacionando estas porcentagens com o número de mmoLs de CO_2 produzido pela reação estequiométrica entre Na_2CO_3 e HCl (em anexo), conforme descrito por URURAHY (1998) . As condições gerais de análise empregadas durante o processo encontram-se listadas a seguir:1) Vazão do gás de arraste (He): 17,89 mL/min; 2) Vazão do gás de referência (He):17,89 mL/min; 3) Temperatura do detector: 220°C; 4) Temperatura do forno auxiliar: 74°C; 5) Temperatura do injetor: 110°C; 6) Coluna de aço inox (3m/3mm) recheada com Chromosorb 102

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

As características físico-químicas dos solos, em especial pH, umidade e disponibilidade de nutrientes, são fatores determinantes na biodegradação de hidrocarbonetos, uma vez que afetam diretamente a atividade metabólica dos microrganismos. A Tabela 4.1 mostra os resultados da caracterização do solo virgem e contaminado, em laboratório, com 5% de óleo cru.

Tabela 4.1: Características do solo

PARÂMETRO	TEOR NO SOLO VIRGEM	TEOR NO SOLO CONTAMINADO
N (g/kg)	3,5	3,5
P (g/kg)	0,1	0,08
Silte*	14%	—
Areia*	75%	—
Argila*	11%	—
Densidade da Partícula (g/cm^3)	2,2	1,6
Densidade Aparente (g/cm^3)	1,2	1,3
Porosidade (%)	43	19
Matéria orgânica (%)	4	9,2
pH	6,8	6,4
Capacidade de retenção de água - CRA (%)	34	28
C orgânico (%)	2,3	5,3
Microrganismos Heterotróficos totais (UFC/g)	$9,8 \times 10^6$	$7,4 \times 10^6$
Microrganismos Hidrocarbonoclásticos (NMP/g)	$3,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$

* Resultados cedidos pelo laboratório de geotecnia ambiental da COPPE.

Em geral, o solo é constituído de mais de uma fração granulométrica. Neste trabalho, o solo virgem apresentou 75% de areia, 14% de silte e 11% de argila, o que permite classificá-lo como franco arenoso de acordo com triângulo de FERET (RESENDE *et al.*, 2002). O termo franco foi proposto para substituir o termo "barro", que corresponde à mistura, em proporções variadas, de partículas de areia, silte e argila (CAPUTO, 1977). Segundo NEDWELL & GRAY (1987) solos com teores de argila próximos a 12% podem manter os microrganismos e substratos dentro do espaço poroso, favorecendo a atividade enzimática. Entretanto, solos com texturas muito finas ou porosidade muito baixa não podem manter um suprimento de água adequado, prejudicando a ação dos microrganismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Segundo KIEHL et al.,(1976) de uma maneira geral, quanto mais elevada for a densidade aparente do solo, mais compacto será o solo e menor a porosidade. Conhecendo-se a densidade aparente (Dap) e a densidade de partículas (Dp), determina-se a porosidade que depende, principalmente, da textura, da estrutura e da matéria orgânica do solo. Os resultados das propriedades físicas iniciais do solo indicam que a densidade de partículas foi de 2,2 e 1,6g/cm^3 e a densidade aparente de 1,2 e 1,3g/cm^3 respectivamente para o solo virgem e contaminado com óleo cru. Consequentemente, com estes valores, obteve-se um valor de porosidade de 43% e 19% para o solo virgem e solo contaminado. Geralmente, solos com menor porosidade são os arenosos e da mesma forma, solos com alto teor de argila apresentam alta porosidade (ARCHER & SMITH, 1972). Segundo OTTONI FILHO, (2002) solos franco arenosos possuem valores médios de densidade de partículas e aparente em torno de 2,6g/cm^3 1,2 g/cm^3 respectivamente. Entretanto, o baixo valor de densidade de partículas no solo contaminado pode ser explicado pelo aumento da hidrofobicidade nos espaços porosos do solo, dificultando a retenção da água já que o óleo cru penetrou nos espaços vazios dos poros no solo. Ademais, a presença do óleo cru ainda contribuiu para o aumento da massa do solo, resultando em aumento de densidade aparente. Segundo ARCHER & SMITH (1972), o limite máximo tolerado da densidade aparente para solos em geral é de 1,2 g/cm^3 , sendo que solos com densidade aparente a partir de 1,3g/cm^3 já começam a apresentar sérias desvantagens quanto à baixa permeabilidade e aeração, interferindo negativamente no metabolismo das bactérias aeróbicas presentes no solo.

Os valores de capacidade de retenção de água (CRA) foram de 34% e 28% para o solo virgem e contaminado, respectivamente. A diminuição do valor da capacidade de retenção de água no solo contaminado foi sobretudo porque a adição do óleo cru além de ter penetrado nos poros vazios do solo, ainda contribuiu para aumentar a

hidrofobicidade impedindo a retenção da água. A CRA está diretamente relacionada à densidade de partículas e à textura do solo. A importância de se medir a CRA está no conhecimento do teor de umidade máximo alcançado pelo solo, o que permite um melhor ajuste de umidade mesmo quando se pretende trabalhar com processos em fase semi-sólida. As ótimas taxas de biodegradação são obtidas quando o teor de umidade do solo se encontra entre 30 e 90% do valor da CRA (RISER-ROBERTS, 1998).

Não houve variação representativa do pH do solo após a adição do óleo cru. Segundo ATLAS (1989), os valores de pH próximos à neutralidade são favoráveis à atividade dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação. O pH tanto do solo virgem quanto do solo contaminado no início do processo foi próximo a netralidade, que é um pH ideal para biorremediação.

De acordo com os resultados de teor de matéria orgânica do solo virgem (4%) pode-se considerar, de acordo com JARAMILLO (1996), que esse solo é altamente rico em matéria orgânica e, devido à adição de 5% de óleo cru ao solo contaminado, o teor de matéria orgânica aumentou para 9,2%, comprovando a precisão da metodologia usada na determinação deste parâmetro.

A determinação dos teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) é necessária para definir a estratégia a ser adotada num processo de biorremediação. Segundo FERGUSON *et al.* (2003), solos contaminados que apresentam baixo teor de N e P necessitam de correção destes elementos para permitir um aumento na degradação de hidrocarbonetos.Em relação ao teor de nitrogênio (N), observou-se que não houve variação de valores comparando-se o solo virgem com o contaminado. De fato, no óleo cru o valor de N encontra-se abaixo do limite de detecção (Tabela 3.1). Contudo, o teor de fósforo no solo contaminado foi ligeiramente inferior ao solo virgem, possivelmente, porque o fósforo presente no solo pode ter interagido com as moléculas hidrofóbicas do óleo cru, dificultando a sua total extração do solo.

A adição do óleo cru ao solo não causou impacto à microbiota nativa pois observou-se que o solo virgem e o solo contaminado apresentaram números com a mesma ordem de grandeza tanto para as bactérias heterotróficas totais e hidrocarbonoclásticas. JORGENSEN *et al.* (2000) contabilizaram um número de bactérias heterotróficas totais e hidrocarbonoclásticas da ordem de $8{,}2 \times 10^7$ UFC/g solo e $5{,}4 \times 10^4$ NMP/g solo, respectivamente e observaram que estes valores foram suficientes para degradar de 50 a 90% de n-alcanos durante 5 meses. Outros autores trabalhando com concentrações celulares na ordem de grandeza de 10^6 UFC/g para heterotróficas

totais e 10^3 NMP/g para hidrocarbonoclásticos obtiveram bons resultados de biodegradabilidade acima de 50% de remoção (BAPTISTA, 2007; RIZZO, 2008; SEABRA *et al.*, 2006).

Os fatores abióticos do solo como temperatura, teor de nutrientes, pH, umidade e textura do solo, porosidade, dentre outros contribuem para o processo de biorremediação. Dessa forma, alguns parâmetros devem ser otimizados para se obter maior biodegradabilidade do óleo no solo.

4.2 - AVALIAÇÃO DA MELHOR RELAÇÃO NUTRICIONAL PARA TRATAMENTO DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU.

Com a finalidade de encontrar a melhor relação nutricional (C:N:P) e o teor ideal de umidade para a biodegradação dos hidrocarbonetos no solo estudado fez-se necessária a análise da matriz do planejamento fatorial completo 2^3. Nesta etapa foram analisados 8 experimentos em duplicatas e os resultados mostraram diferentes percentuais de biodegradação que variaram de 9 a 27,7% (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2^3 e os respectivos percentuais de biodegradação (PB) para 30 dias.

Condições	FATORES			PB (%)*
	Nitrogênio	Fósforo	Umidade	
1	1	1	1	26,7 ± 2,4
2	1	1	-1	27,6± 3,9
3	1	-1	1	26,6 ± 3,9
4	1	-1	-1	27,7 ± 0,14
5	-1	1	1	13,4 ± 2,1
6	-1	1	-1	9 ± 0,07
7	-1	-1	1	14,4 ± 2,7
8	-1	-1	-1	10,3 ± 0,07

* Resultados de acordo com a determinação de óleos e graxas antes e ao final dos experimentos

O *software* Statistica gerou uma curva de regressão linear com um fator de correlação de 0,94 para um intervalo de confiança de 95%, cujos resultados foram obtidos através

das análises de O&G (Óleos e Graxas). Assumindo um valor de 6 graus de liberdade, foi fornecido pelo *software* um valor de t = 2,447. Com base no valor de t de student, os efeitos significativos no processo de biodegradação do óleo foram analisados. Para que um efeito ou interação fosse considerado importante, o valor de t calculado deveria ser maior que o tabelado.

Essas análises são melhores visualizadas num gráfico de Pareto (Figura 4.1), no qual a linha vertical (para p=0,05 o valor de t de Student tabelado) indica a mínima magnitude dos efeitos estatisticamente significativos na análise em questão. Os efeitos positivos indicam que os fatores devem ser usados no nível mais alto (+1) para que se obtenha melhor resposta do sistema. Os efeitos negativos indicam que os fatores devem ser usados no nível mais baixo (–1). Assim, através do gráfico de Pareto, observa-se que o fator principal para o percentual de biodegradação foi o nitrogênio, sendo que este valor foi estatisticamente positivo, o que indica que o aumento na concentração de nitrogênio favorece a biodegradação dos hidrocarbonetos. Os fatores umidade e fósforos ou suas interações não foram estatisticamente significativos para um intervalo de confiança de 95% na distribuição t de "Student".

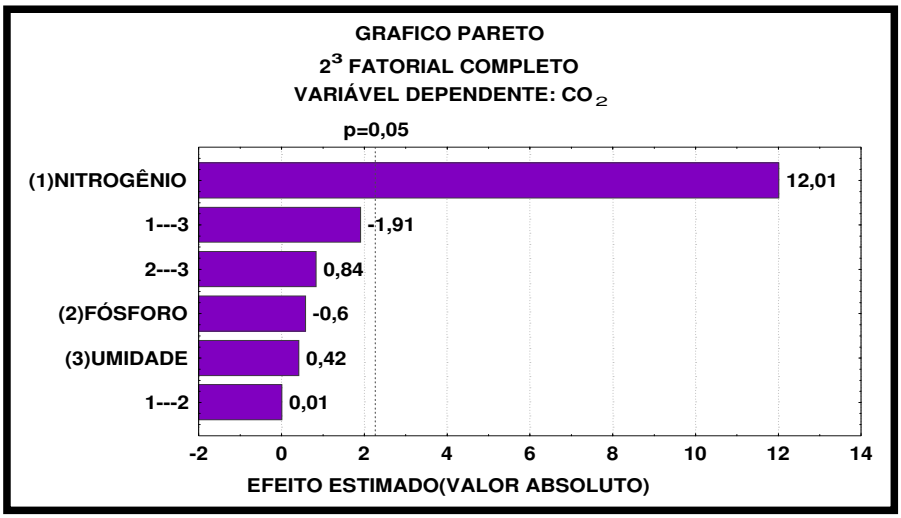


Figura 4.1: Gráfico de Pareto para a eficiência de degradação do contaminante de acordo com a geração de CO_2 produzida ao longo dos 30 dias de experimentos.

A Figura 4.2 mostra as interações entre os fatores umidade---nitrogênio---fósforo. Pode-se observar que para a relação nutricional C:N:P = 100:10:1 e umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção de líquido do solo pode-se obter, estatisticamente, maior percentual de biodegradação (27%).

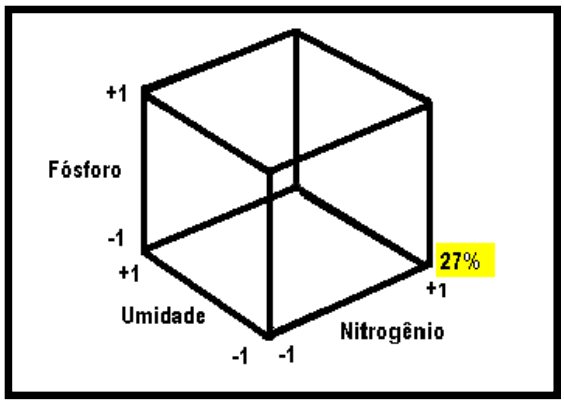


Figura 4.2: Interação entre os fatores nitrogênio, fósforo e umidade

4.2.1 - Análise do CO_2 produzido ao longo do ensaio de biodegradação

A medida da taxa de mineralização através da evolução de CO_2 podem avaliar a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos, sendo um dos mais antigos parâmetros para quantificar a atividade microbiana. Representa a oxidação da matéria orgânica e/ou hidrocarbonetos por microrganismos aeróbicos do solo, que, portanto utilizam O_2 como aceptor final de elétrons, até CO_2. Assim pode ser avaliada tanto pelo consumo de O_2 quanto pelo consumo de CO_2 (MORAIS, 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, nestes ensaios foram também avaliadas a evolução de CO_2 ao longo de 30 dias. A Figura 4.3 mostra a curva de evolução de CO_2 das oito condições avaliadas no planejamento experimental, destacando-se que as condições 1, 3 e 4 apresentaram maior evolução de CO_2 e uma leve tendência de crescimento após 30 dias de ensaio de biodegradabilidade. Entretanto, a condição 4 (C:N:P = 100:10:1) foi a que apresentou maior evolução de CO_2, sendo que a amostra 8 apresentou pouca evolução de CO_2, caracterizando-se como a pior condição de relação nutricional para o solo (C:N:P = 100:5:1). A condição 5 não foi possível ser A atribuição de valores ótimos de relação C:N tem sido discutida amplamente por diversos autores. ALEXANDER (1999) reporta valores ideais entre 100:0,25 a 100:2, enquanto BAKER & HERSON (1994) propuseram relações de C:N na faixa de 100:0,5 e 100:10 para a biodegradabilidade do óleo cru em solo argiloso. Contudo, as relações entre C:N e C:P que irão beneficiar a biodegradação dos contaminantes tem que ser avaliada caso a caso para diferentes tipos de solos.

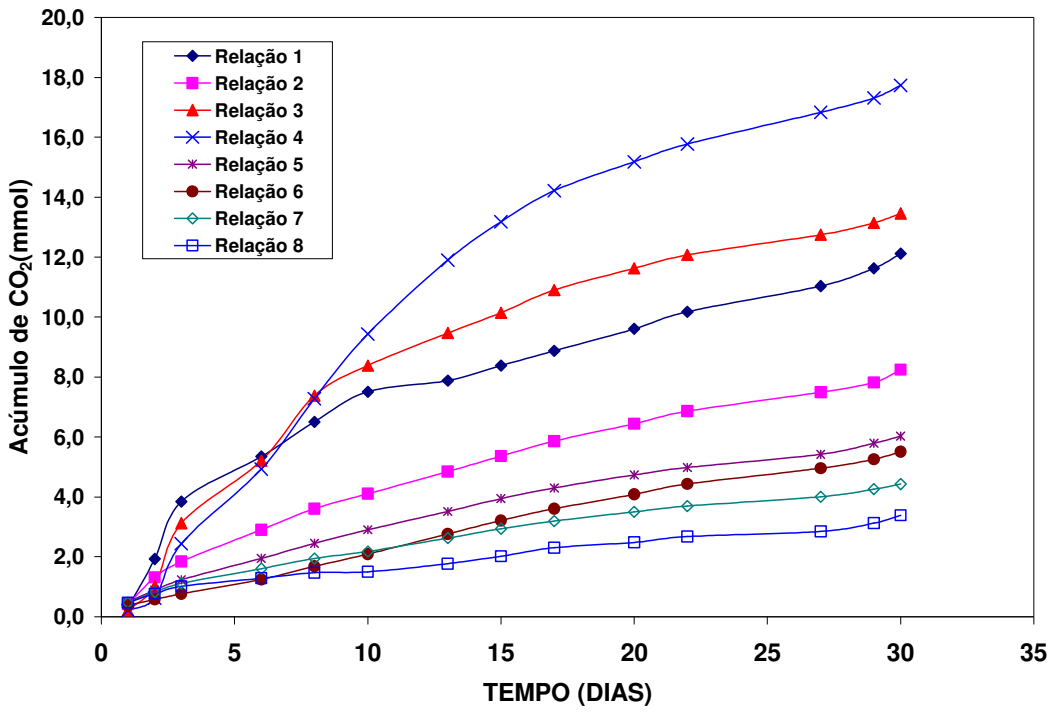


Figura 4.3: Curvas de acúmulo de CO_2 nos diferentes tratamentos do solo. As Condições 1 a 8 estão listadas na Tabela 5.2.

4.2.2– Análise da relação nutricional ótima

Estes ensaios foram refeitos após o resultado do planejamento experimental e foram monitorados por remoção de óleos e graxas (O&G). Foram analisadas 7 diferentes relações nutricionais, conforme apresentado na Tabela 4.3. Os resultados demonstraram que a adição do nitrogênio ao solo foi fundamental para que houvesse maior percentual de biodegradação até a relação C:N:P = 100:15:1(25,2% de remoção) e adições de maiores concentrações de nitrogênio tiveram efeito contrário, sendo o percentual de biodegradação inversamente proporcional a concentração de nitrogênio nas relações 100:20:1 e 100:25:1 com cerca de 15,6% e 10,7% de remoção do óleo cru. Altas concentrações de nitrogênio podem impedir a biodegradação dos contaminantes devido a toxicidade da amônia e aumento do pH (RISER-ROBERTS, 1998). Contudo, quando o nitrogênio não foi adicionado ao solo (experimento 5) houve também baixo percentual de biodegradação (11,7%) indicando a necessidade da adição desse macronutriente. A relação C:N:P de 100:10:1, no solo a ser biorremediado, tem sido normalmente recomendada (CHENG & MULLA, 1999); entretanto, as pesquisas que avaliaram os efeitos da adição de N e P ao solo demonstraram resultados muito conflitantes, o que provavelmente se deve às

especificidades de cada ambiente, no que se refere aos teores de nutrientes no solo, tipo de contaminante e população microbiana envolvida (LEYS *et al.*, 2005). Às vezes na adição de fosfato como sais de potássio KH_2PO_4 e K_2HPO_4 não apresenta qualquer efeito, provavelmente, devido a rápida precipitação de fosfato na presença de cálcio e magnésio (ALEXANDER, 1999). Dessa forma, cada caso deve ser analisado individualmente**,** determinando-se qual a melhor relação nutricional a ser aplicada ao solo para ensaios de biodegradabilidade. Nestes experimentos pôde-se observar que a relação nutricional ótima para os ensaios de biodegradabilidade foi a relação C:N:P = 100:15:1 com umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção de água.

Tabela 4.3: Percentual de biodegradação (PB) para as diferentes relações nutricionais

Experimentos	Relação nutricional	PB (%)
1	C:N:P = 100:10:1	18,5
2	C:N:P = 100:15:1	25,2
3	C:N = 100:10	19,1
4	C:N:P = 100:20:1	15,6
5	C:N:P = 100:25:1	10,7
6	C:N = 100:15	22,6
7	C:P = 100:1	11,7

4.3 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU ADERIDO AO SOLO POR ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA

4.3.1 – Avaliação das características fisicas, químicas e biológicas do solo ao longo de tempo em conjunto com a remoção de HTP (hidrocarbonetos totais de petróleo)

Atenuação natural monitorada (ANM) é uma alternativa de tratamento que ocorre sem a intervenção humana e baseia-se na diminuição de concentração em massa dos contaminantes por interações de agentes químicos, físicos e biológicos (USEPA, 1999), podendo ser aplicada tanto em solo como em águas subterrâneas. Contudo, a aplicação desta técnica depende da localização e do nível de toxicidade do poluente (YU *et al.*2005). Assim sendo, foi realizado um ensaio com o propósito de avaliar a atenuação natural monitorada como forma de tratamento de solo franco arenoso. A

Tabela 4.4 mostra os resultados expressos em valores médios do monitoramento periódico durante 420 dias.

Tabela 4.4: Características físicas, químicas e biológicas do solo ao longo de 420 dias

Parâmetros	Tempo (dias)					
	0	90	180	270	360	420
N (g/kg)	3,5	3,4	3,0	2,7	2,9	2,5
P (g/kg)	0,08	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04
HTP (mg/g)	47	40	37	30	25	23
pH	6,8	5,8	5,7	5,9	5,7	5,6
Densidade de partículas (g/cm^3)	1,6	2,2	2,2	2,3	2,2	2,2
Densidade aparente (g/cm^3)	1,3	1,15	1,1	1,12	1,16	1,2
Porosidade (%)	19	49	49	51	47	45
CRA (%)	28	35	40	53	52	52
BHT (UFC/g de solo)	$7,4x10^6$	$5,25x10^6$	$5,4x10^7$	$7,5x10^7$	$5x10^8$	$1,2x10^7$
MH (NMP/g de solo)	$2,0x10^3$	$2,1x10^3$	$2,3x10^4$	$3,2x10^4$	$1,4x10^5$	$1,1x10^5$

CRA = Capacidade de retenção de água; BHT= bactérias heterotróficas totais; MH = Microrganismos hidrocarbonoclásticos; HTP = Hidrocarbonetos totais de petróleo

Os hidrocarbonetos quando lançados no solo estão sujeitos a processos de intemperização através de reações bióticas e abióticas estando sua degradação e transformação diretamente relacionada com a sua estrutura química e fatores ambientais, incluindo temperatura, umidade do solo e disponibilidade de nutrientes e oxigênio. A biodegradação é o principal processo de diminuição da massa do contaminante, sendo que a granulometria do solo e também um importante parâmetro para controlar os processos de intemperização do óleo no solo (SINGER & FINNERTY, 1984; KAPLAN, *et. al.* 1997). Para contaminações de solo os parâmetros mais relevantes a serem considerados são: a capacidade de retenção de água e porosidade, sendo que qualquer variação desses parâmetros vai interferir nas reações químicas e biológicas necessárias para degradação e imobilização dos contaminantes presentes no solo (HORNICK, 1983; RISER-ROBERTS, 1998). No início da contaminação com óleo cru os valores de CRA, Dap e porosidade estavam abaixo do valor do solo sem contaminação, conforme visto anteriormente na Tabela 4.1 e da mesma forma a adição do óleo no solo também contribuiu para o aumento da Dp. Porém, após 90 dias houve aumento dos valores da CRA, Dp e porosidade e

diminuição da Dap, sendo que esses valores se mantiveram praticamente constantes até o final do processo.

Paralelamente, após 90 dias também se observou diminuição de cerca de 15% de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) e esta diminuição em massa contribuiu para os parâmetros com CRA, Dap, Dp e porosidade se aproximassem dos valores do solo sem contaminação. No entanto, durante os primeiros 90 dias, a redução do teor de HTP parece estar mais relacionada com os processos abióticos do que com os processos bióticos, sendo que três fatores podem justificar esta alternativa. O primeiro é que neste período houve pouco ou nenhum crescimento da população microbiana e, de fato, algumas condições são necessárias para o crescimento de microrganismos aeróbicos como aeração e capacidade de retenção máxima de umidade no solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), entretanto, estes parâmetros foram prejudicados pela adição do óleo ao solo, dificultando a ação dos microrganismos. O segundo fator é que o teor de nitrogênio também não foi reduzido neste período e segundo RISER-ROBERTS (1998) o nitrogênio estimula a biodegradação de hidrocarbonetos saturados. O terceiro e último fator é que neste período houve intensa lixiviação dos contaminantes conforme apresentado na Figura 4.4. O óleo no solo pode seguir vários caminhos podendo percolar para outros compartimentos, ser lixiviado ou permanecer aderido à matriz do solo (CHAGAS-SPINELLI, 2007; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Contudo, não deve ser descartada a possibilidade a atuação dos microrganismos na redução do teor de HTP, já que houve queda do pH e diminuição do teor de fósforo, sendo que a população de microrganismos pode não ter sido alterada pois se encontrava neste período em fase “lag”.

A faixa de pH ótima para biodegradação se encontra entre 6 e 8, o que favorece a atividade microbiana, entretanto, alguns microrganismos têm maior tolerância às variações de pH (RISER-ROBERTS, 1998). Foi observado que no início do processo o valor do pH estava próximo a neutralidade, no entanto, após 90 dias já se observou diminuição do valor do pH e este se manteve constante até o final do processo. Contudo, a diminuição do pH não foi impactante para a microbiota do solo já que se observou aumento da população microbiana em até duas ordens de grandeza durante o processo de atenuação natural.

A biodegradação de certos contaminantes necessita da presença de nitrogênio (N) e fósforo (P) e nestes ensaios de atenuação natural foi observado que a diminuição do N começou a ocorrer mais intensamente após 180 dias, apresentando diminuição gradual até o final do tratamento. No entanto foi observado que até os 270 dias houve

diminuição gradual do teor de fósforo mantendo-se o mesmo valor até o final do processo.

Geralmente, num solo a ocorrência natural de microrganismos hidrocarbonoclásticos está na faixa entre 10^2 a 10^5 NMP/g de solo e de heterotróficos totais em torno de 10^2 a 10^6 UFC/g de solo (RISER-ROBERT, 1998). Investigando-se os resultados de remoção de HTP com a população microbiana pode-se observar que entre 0 e 90 dias houve redução de 15% de HTP e pouco ou nenhum crescimento da população de microrganismos. Conforme relatado anteriormente, a redução de HTP pode não está diretamente relacionada com processos biológicos, justificando o não crescimento da população microbiana. Contudo, não se pode descartar que esta redução de pH nada tem haver com a ação dos microrganismos já que foi observado pequena diminuição dos teores de nitrogênio e fósforo, além da diminuição do pH. Entre 90 e 180 dias houve remoção de 8% de HTP, bem como crescimento da população microbiana, configurando maior atuação dos processos biológicos. Esta remoção de HTP ainda é maior entre 180 e 270 e entre 270 e 360 dias reduzindo em 18 e 16% o teor dos hidrocarbonetos respectivamente e nestes períodos a população microbiana aumentou em mais uma ordem de grandeza, caracterizando maior atuação dos microrganismos neste período. Entre 360 e 420 houve remoção de apenas 8% de HTP observando-se também uma queda da população de heterotróficos totais. Contudo, os microrganismos hidrocarbonoclásticos mantiveram-se na mesma ordem de grandeza.

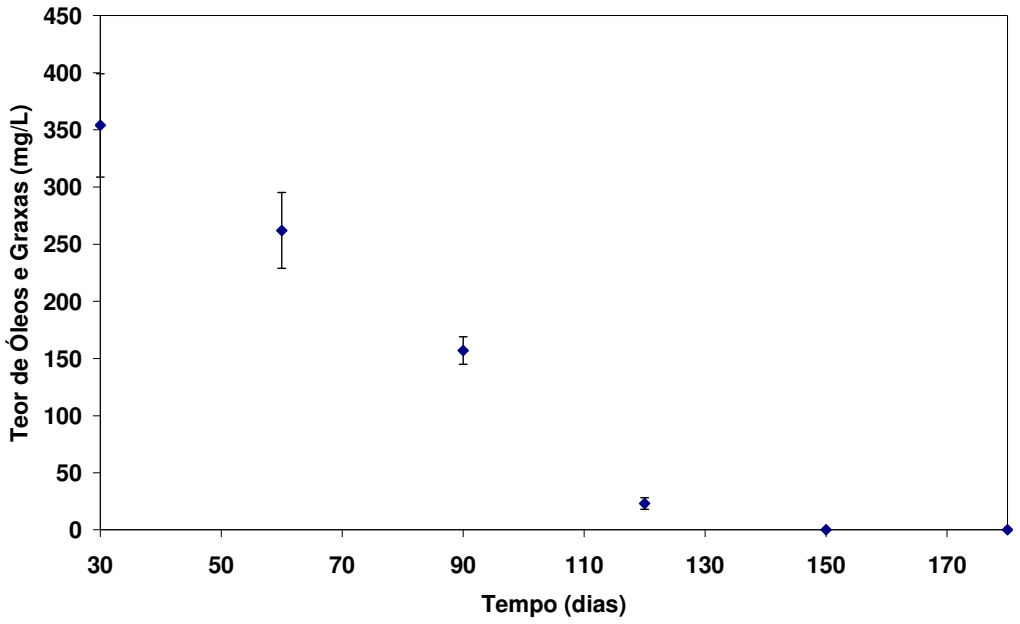


Figura 4.4: Avaliação do teor de Óleos e Graxas na água da chuva percolada no solo durante a atenuação natural em lisímetros

Para melhor visualizar a remoção de HTP, a Figura 4.5 mostra a remoção acumulada de HTP além da quantificação da atividade da desidrogenase ao longo dos 420 dias de ensaio de atenuação natural. A curva de biodegradabilidade de remoção acumulada de HTP apresentou uma regressão linear R^2 de aproximadamente 0,97, indicando que óleo foi se degradando ao longo do tempo. Ao final dos 420 dias de ensaio de atenuação natural em lisímetros houve redução de 52% de HTP, podendo se estimar que houve uma redução de HTP de aproximadamente 0,12 % ao dia. CHAINEAU *et al.* (2003) estudaram o processo de atenuação natural de um solo argiloso durante 480 dias e verificaram que houve degradação de 56% de HTP à semelhança dos resultados aqui apresentados.

São bem conhecidos os efeitos que uma contaminação com óleo cru pode causar numa população microbiana, podendo se correlacionar a biodegradabilidade do óleo cru com a atividade biológica (SONG & BARTHA, 1990). Neste contexto, o estudo da atividade da desidrogenase em amostras ambientais reflete a melhor correlação entre a remoção de hidrocarbonetos e a produção de CO_2, já que essas enzimas indicam a atividade oxidativa total da microbiota do solo (VOSJAN, 1982; RISER-ROBERTS, 1998). Nos ensaios de atenuação natural verificou-se que em alguns períodos houve uma forte correlação entre a remoção de HTP e atividade da desidrogenase, sobretudo, entre os períodos de 90 e 210 dias onde a remoção de HTP praticamente dobrou e o valor da atividade da desidrogenase também dobrou. O valor máximo de atividade da desidrogenase encontrado durante todo o tempo do experimento (total de 420 dias) de atenuação natural foi observado aos 210 dias com aproximadamente 55 µg/g. Entre 210 e 300 dias também foi observado que a remoção de HTP também dobrou, entretanto, os valores da atividade da desidrogenase permaneceram praticamente constante até os 300 dias, indicando que o valor máximo de atividade desidrogenásica alcançado aos 210 dias foi o suficiente para que a remoção de HTP dobrasse até os 300 dias. No entanto, a partir dos 330 dias houve decréscimo da atividade desidrogenásica e uma redução muito tênue de HTP até o final do experimento (420 dias), possivelmente, pela presença de compostos mais recalcitrantes e mais difíceis de serem biodegradados pelos microrganismos. Contudo, os valores da atividade ao final do processo ainda eram superiores ao encontrado no início do tratamento.

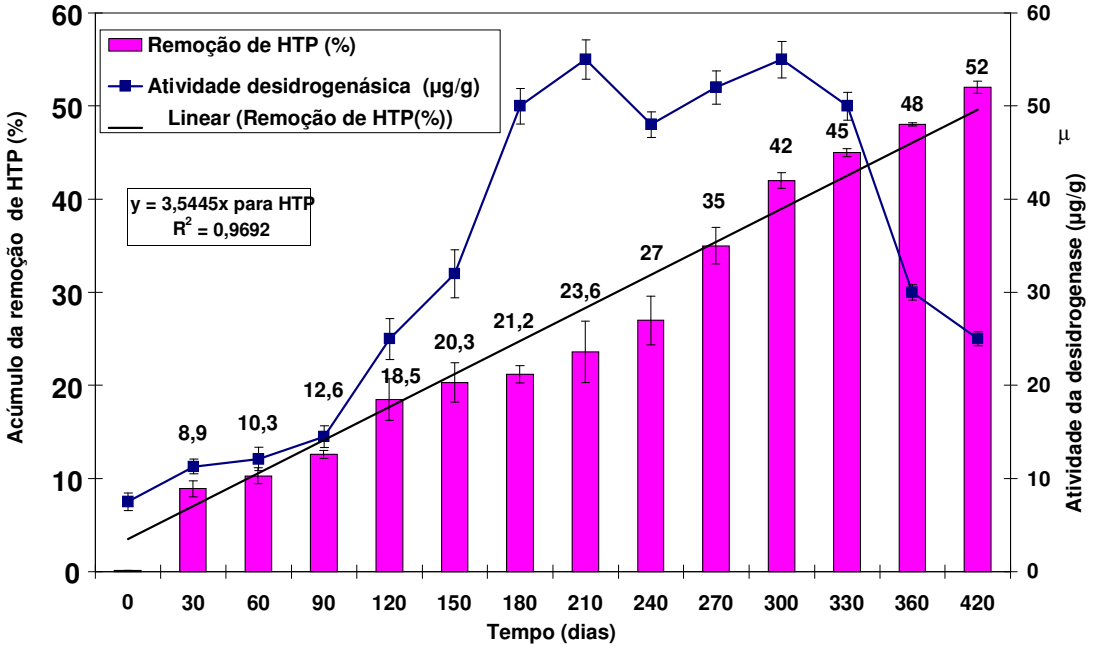


Figura 4.5: Acúmulo da remoção de HTP ao longo da atenuação natural do solo ( ) e valores de atividade desidrogenásica (µg/g) no solo ( )

4.3.2 – Avaliação dos testes de ecotoxicidade no processo de atenuação natural monitorada

Dentre os testes de ecotoxicidade, a germinação de sementes com a espécie *Lactuca sativa* e o teste de mortalidade das minhocas com a espécie *Eisenia fetida* são muito utilizados como indicativo de toxicidade (KAPANEN & ITAVAARA, 2001, SAFWAT *et al.* 2002). A Tabela 4.5 mostra a redução de toxicidade do solo ao longo do tempo, sendo observado que após 180 dias, ocorreu, sensivelmente, uma diminuição da toxicidade, embora tenha sido observada pouca remoção de HTP (21,2 % de remoção). Ao longo dos 180 dias, possivelmente, houve maior sorção do óleo no solo, tornando-o menos acessível para as minhocas e para absorção das plantas e neste mesmo período houve aumento da porosidade, densidade de partículas e da capacidade de retenção de água (CRA). Dessa forma, a diminuição da toxicidade para as espécies *Eisenia fetida* e *L. sativa* pode estar aliada ao fato de que houve aumento da capacidade de penetração da água que é um fator altamente positivo para sobrevivência das minhocas e para nutrição das plantas e também devido a baixa disponibilidade dos contaminantes para estas espécies.

Tabela 4.5: Avaliação da toxicidade do solo ao longo do tempo

Dias	Índice de Germinação de sementes (%) (*Lactuca sativa*)	Mortalidade de minhocas (*Eisenia fetida*) - (%)
0	65 ± 3,55	100
90	87 ± 2,62	30
180	94 ± 3,12	0
270	95 ± 2,54	0
330	96 ± 1,36	0
420	95 ± 2,96	0

4.3.3 – Avaliação da remoção de HTP e HPA por cromatografia gasosa

4.3.3.1 – Remoção de HTP (HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO)

A Tabela 4.6 mostra os resultados de HTP nos tempos 0, 180 e 420 dias por cromatografia gasosa, bem como a remoção total de HTP. Aos 180 dias houve remoção total de HTP de cerca de 20% à semelhança do resultado de HTP por infravermelho que foi de 21, 2%. Aos 420 dias houve uma pequena diferença, já que pela análise de infravermelho houve remoção de 52% (Figura 4.5) e por cromatografia 59,4% de remoção (Tabela 4.6). Em relação às diferentes frações do petróleo não foram detectadas frações entre C_8-C_{11} que provavelmente foram facilmente volatilizadas logo assim que o solo foi contaminado. Aos 180 dias foi observado que teor de HTP na faixa entre C_{11}-C_{14} dobrou, pois passou de 0,6 mg/g no início do tratamento para 1,2 mg/g aos 180 dias, entretanto foi observado que o teor de HTP entre C_{20}-C_{40} diminuiu de 39,9 mg/g para 29,9 mg/g ao final aos 180 dias, sugerindo que ocorreu uma biotransformação das frações mais pesadas para frações mais leves, além da biodegradação do óleo cru. Aos 420 dias as frações entre C_{11}-C_{14} foram totalmente biodegradadas, sendo observado ainda que dos 180 para os 420 dias houve remoção de cerca de 60 e 43 % para as frações entre C_{14}-C_{20} e C_{20}-C_{40}, respectivamente.

Tabela 4.6: Avaliação da degradação das frações do óleo ao longo do tempo

Tempo (dias)	Faixas de HTP (mg/g)					Remoção de HTP (%)
	C_8-C_{11}	C_{11}-C_{14}	C_{14}-C_{20}	C_{20}-C_{40}	HTP_{Total}	
0	ND	0,6	10,5	39,9	51	0
180	ND	1,2	9,4	29,9	40,5	20,5
420	ND	ND	3,7	17	20,7	59,4

4.3.3.2 – Remoção de HPAs

Os HPAs foram monitorados nestes experimentos nos tempos 0, 180 e 420 dias para verificar se os mesmos podiam ser degradados pelos microrganismos presentes no solo por atenuação natural. Aparentemente, a capacidade de microrganismos em degradar os HPAs é em função do número de anéis aromáticos presentes no composto. Muitos microrganismos são capazes de utilizar naftaleno, antraceno e fenantreno como única fonte de carbono (CERNIGLIA, 1981). No entanto, alguns HPAs não são metabolizados por muitos microrganismos, o que não quer dizer que os que possuem mais anéis não possam ser biodegradados (BUMPUS, 1989).

Há uma grande diversidade de organismos capazes de degradar HPAs de baixo peso molecular com até três anéis aromáticos como naftaleno, acenafteno, fenantreno, antraceno e fluoreno (MESQUITA, 2004). Isto explica o fato de ter havido alta biodegradabilidade de compostos como naftaleno (96%) e fluoranteno (93%) e média biodegradabilidade de Fenantreno (57,5%) e Fluoreno (43,6%). Entretanto, há certa limitação da atividade microbiológica sobre os HPAs de alto peso molecular que pode estar atrelada a baixa biodisponibilidade destes contaminantes (BOOPATHY, 2000; BENTO *et al.* 2003; CHAGA-SPINELLI, 2007) e dessa forma, os compostos de maiores pesos moleculares como dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno não foram biodegradados ao longo do tempo. Alguns erros experimentais, tempo ou modo de extração do óleo no solo, além da heterogeneidade da amostragem do solo podem explicar o fato das remoções dos HPAs pireno e benzo[b]fluoranteno terem sido maiores aos 180 dias e menores aos 420 dias.

A Tabela 4.7 mostra os 16 principais HPAs, a quantidade de anéis de cada um, a degradação dos mesmos ao longo do tempo, bem como se os mesmos são considerados carcinogênicos ou não.

Tabela 4.7: Avaliação da degradação de 16 HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) ao longo do tempo por processo de atenuação natural monitorada.

PAH	***PM***	***Carcinogênico***	***Anéis benzênicos***	***Tempo (dias)***			***Remoção***		
				0	***180***	***420***	***0***	***180***	***420***
	(g)			***(mg/g)***			***(%)***		
Naftaleno	128,2	PoC	2	2,1	0,33	0,08	0	84,3	96,2
Acenafitileno	152,2	NCi	2	ND	ND	ND	0	-----	-----
Acenafteno	154,2	NCi	2	ND	ND	ND	0	-----	-----
Fluoreno	166,2	NC	2	1,1	0,66	0,62	0	40	43,6
Antraceno	178,2	NC	3	0,51	0,3	0,29	0	41,2	43,1
Fenantreno	178,2	NC	3	4	2,9	1,7	0	27,5	57,5
Fluoranteno	202,3	NC	3	0,14	0,08	ND	0	42,8	>92,8
Pireno	202,1	NC	4	0,42	0,22	0,31	0	47,6	26,2
Benzo[a]antraceno	228,3	PC	4	0,45	0,31	0,13	0	31,1	71,1
Criseno	228,3	NC	4	0,3	0,2	0,1	0	33,3	66,7
Benzo[b]fluoranteno	252,3	PoC	4	0,21	0,08	0,10	0	52,4	61,9
Benzo[k]fluoranteno	252,3	PoC	4	ND	ND	ND	0	-----	-----
Benzo[a]pireno	252,3	PoC	5	0,31	0,15	0,08	0	51,6	74,2
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276,3	PC	5	ND	ND	ND	0	-----	-----
Dibenz[a,h]antraceno	278,3	PoC	5	0,05	0,05	0,05	0	0	0
Benzo[ghi]perileno	276,4	NC	6	0,04	0,04	0,04	0	0	0

FONTE: Tabela adaptada de CHAGAS-SPINELLI (2007) e IARC (2006).
IARC – International Agency for Research on câncer. PC = provável carcinogênico em humanos – limitada evidência em humanos e suficientes em animais; PoC = possível carcinogênico em humanos – Limitada evidência em humanos e insuficiente em animais; NC = Não carcinogênico para humanos;NCi = Não citado; ND =Não Detectado

Existem algumas espécies de microrganismos que são capazes de degradar vários HPAs como Criseno (*Rhodococcus sp., Penicilluim sp.*), Benzo[a]antraceno (*Alcaligenes denitrificans, Beijernikia SP, P. putida, P. janthinellum, Penicillium sp*) e Benzo[a] pireno (*Beijernckia SP., Mycobacterium sp, Aspergillus ocharaceus, Penicillium sp.*)(CERNIGLIA, 1992). Muitos desses microrganismos estão presentes

naturalmente no solo e, dessa forma, a biodegradabilidade desses compostos por processo de atenuação natural pode ocorrer, sendo apresentadas as seguintes remoções: criseno (66,7%), benzo[a]antraceno (71,1%) e benzo[a]pireno (74,2%).

4.4 – SELEÇÃO DE SURFACTANTES PARA APLICAÇÃO EM PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO

Seis surfactantes foram analisados quanto à capacidade de emulsificação, Concentração Micelar Crítica (CMC), Concentração Micelar Crítica Aparente (CMCA), dessorção do óleo no solo, biodegradabilidade em fase líquida e biodegradabilidade no solo.

4.4.1 – Índice de emulsificação (IE)

A emulsificação é uma propriedade que alguns compostos anfifílicos apresentam em promover a dispersão de um líquido em outro, através da formação de gotículas ou emulsões (VALPUESTA, 2008, *apud* ZAJIC & SEFFENS, 1994). As propriedades emulsificantes são comumente discutidas em termos de atividade emulsificante, estabilidade da emulsão e capacidade emulsificante ou índice de emulsificação. A correlação entre capacidade emulsificante e a solubilidade é controversa, já que as propriedades emulsificantes estão relacionadas à estrutura da molécula, especificamente, com as propriedades de superfície e a efetividade dos compostos anfifílicos em diminuir a tensão superficial entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos (SGARBIERI & PACHECO, 2002). Segundo KITAMOTO *et al.* (2008), os tensoativos que apresentam características como alto índice de emulsificação ou solubilização podem auxiliar na liberação de contaminantes que estão adsorvidos no solo, favorecendo a sua biodisponibilidade e, consequentemente, a sua biodegradação.

Dessa forma, foi avaliado o índice de emulsificação (IE) de seis surfactantes descritos anteriormente na seção de matérias e métodos. A Figura 4.6 (A e B) mostra o IE de dois biossurfactantes do tipo ramnolipídio em diferentes concentrações e ambos alcançaram valores máximos de IE de aproximadamente 67%, sendo que no caso do JBR 210 foi a partir da concentração de 2 mg/g, enquanto o JBR 425 foi a partir e 6 mg/g. Contudo, para fins econômicos dentre estes dois biossurfactantes, o melhor foi o JBR 210 já que alcançou maior índice de emulsificação numa concentração menor.

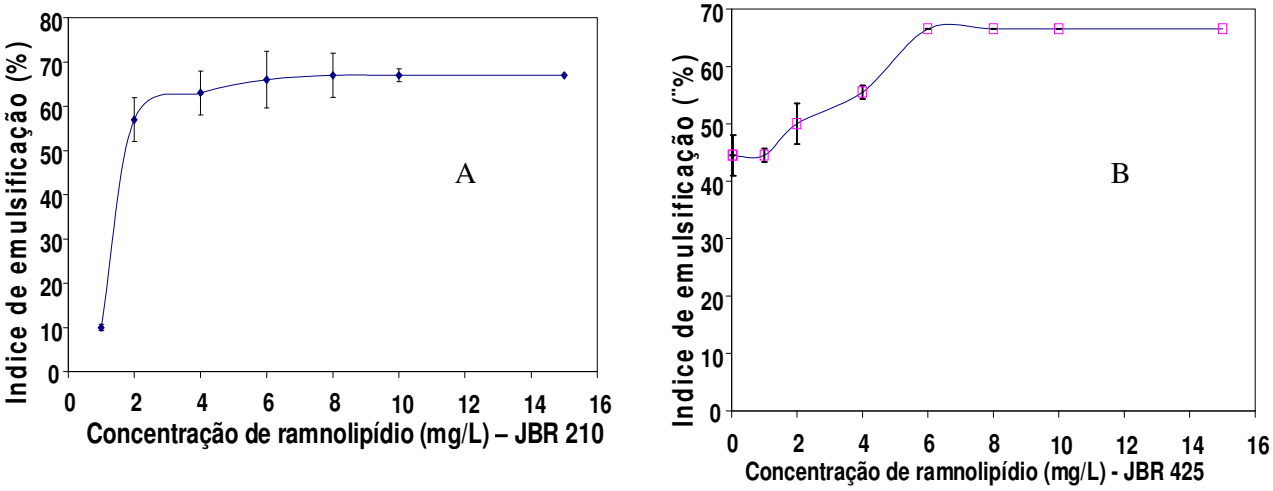


Figura 4.6: índice de emulsificação dos biossurfactantes. A) JBR 210 e B) JBR 425.

Ao se avaliar os surfactantes não iônicos, tanto o Biononex quanto o Tween-80 apresentaram valores máximos de IE a partir de 4 mg/L alcançando valores de 83% e 80% respectivamente (Figura 4.7 - A e B).

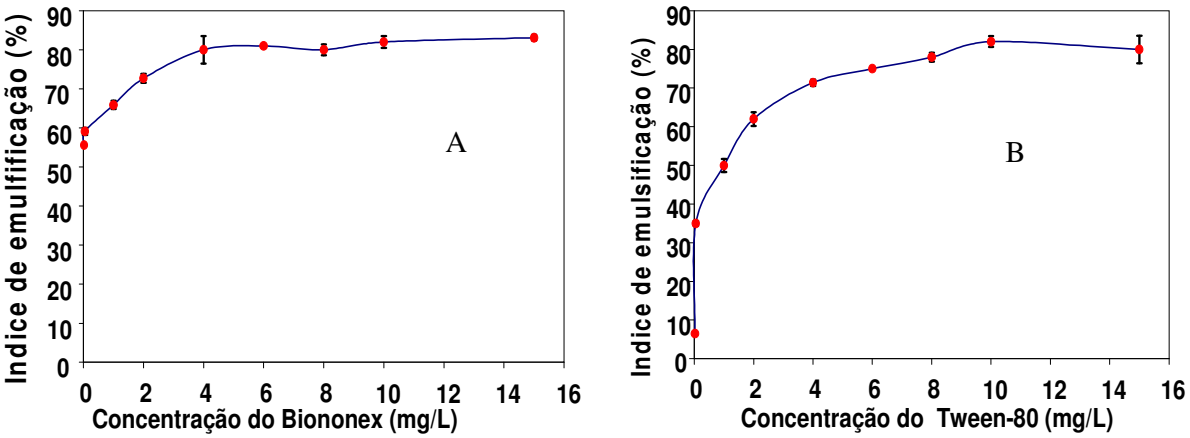


Figura 4.7: índice de emulsificação dos surfactantes não iônicos. A) Biononex; B) Tween-80.

Em relação aos surfactantes aniônicos, o SDS apresentou IE de cerca de 30% nas concentrações de 1 a 6 mg/L, sendo que a partir de 8 mg/L houve um salto do índice de emulsificação, atingindo cerca de 72%. A partir da concentração de 4 mg/L o Biosolve alcançou 73% de índice de emulsificação (Figura 4.8 A e B).

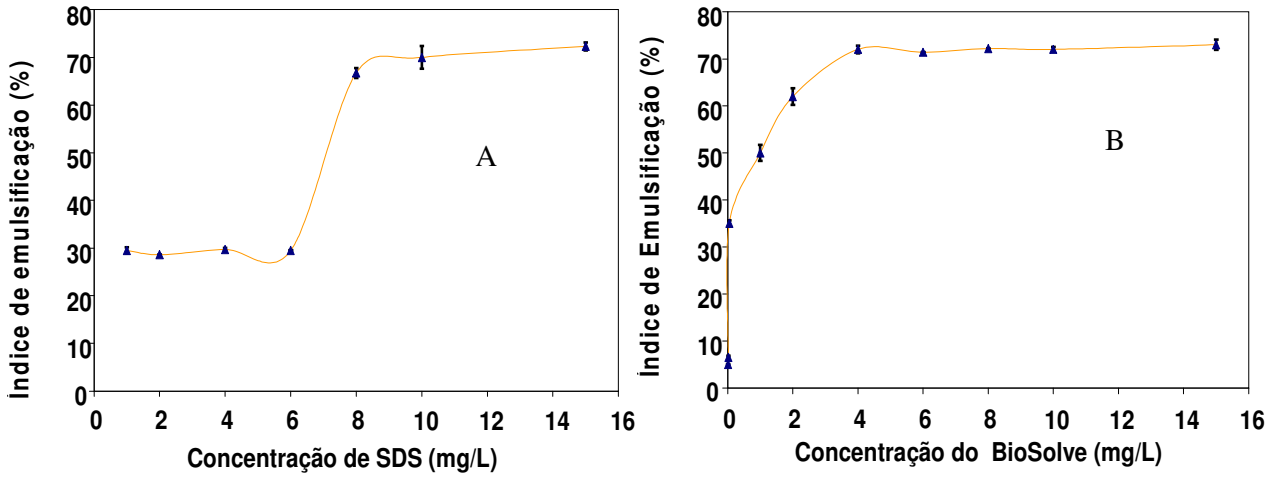


Figura 4.8: Índice de emulsificação dos surfactantes não iônicos. A) SDS (Dodecil Sulfato de Sódio; B) Biosolve.

A Tabela 4.8 resume os resultados dos valores de maior índice de emulsificação com suas respectivas concentrações. Fazendo-se uma análise crítica sobre a capacidade emulsificante de cada surfactante, visando baixo custo, optou-se por avaliar em primeiro lugar quais apresentaram maior índice de emulsificação e em segundo, quais alcançaram o IE em menor concentração. Dessa forma, neste item os surfactantes que melhor se encaixaram nestes perfis foram o Biononex e o Tween-80 que alcançaram maiores índices de emulsificação a partir de uma pequena concentração. Destaca-se ainda que o JBR 210 atingiu o máximo de índice de emulsificação numa menor concentração em relação aos outros surfactantes.

Tabela 4.8: Valores de IE e concentrações de surfactantes

SURFACTATES	CONCENTRAÇÃO (mg/L)	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)
JBR 210	2	67
JBR 425	6	67
BIOSOLVE	4	72
SDS	8	72
TWEEN-80	4	80
BIONONEX	4	83

4.4.2 - Avaliação da DMC (diluição micelar crítica) e DCMA (diluição micelar crítica aparente)

A Diluição Micelar Crítica (DMC) é definida como o volume a partir do qual ocorre a primeira micela, aumentando a solubilidade de um composto inicialmente insolúvel. Contudo, a DMC pode ser afetada pela estrutura do surfactante; presença de eletrólitos na solução; presença de aditivos orgânicos ou pela adição de um segundo líquido. O valor da DMC é de grande importância para a indústria do petróleo, pois possibilita melhorias na recuperação de óleo (ROSEN, 1988; SHCRAMM, 2000, BAPTISTA, 2007). A DMC é determinada pelo ponto de inflexão na curva de abaixamento da tensão superficial em função da diluição da solução (MÓRAN *et al.* 2000; MANIASSO, 2001). No entanto, em sistemas onde há a presença de solo contaminado a formação da primeira micela é denominada de Diluição Micelar Crítica Aparente (DMCA) (SUN & PLURI, 1999). Diante do exposto neste trabalho foi avaliada a DMC e DMCA para os seis surfactantes cujos valores são apresentados na Tabela 4.9. Investigando-se a DMC de cada surfactante, verificou-se que os valores foram praticamente iguais para os surfactantes [1], [3], [4] e [6], sendo que os surfactantes [2] e [5] apresentaram diluições micelares um pouco maiores.

Tabela 4.9: Valores da DMC e DMCA dos surfactantes

SURFACTANTES	DMC (mg/L)	DMCA (mg/L)–10(*)	DMCA (mg/L) –50(**)
Tween-80 [1]	0,2	5	10
JBR 425 [2]	0,8	4	20
JBR 210 [3]	0,3	1	15
Biononex [4]	0,3	4	10
SDS [5]	1	2	2
Biosolve [6]	0,1	3	5

(*) Mistura 1:10 de solo:solução surfactante
(**) Mistura 1:2 de solo:solução de surfactante

Para os sistemas contendo solo-água-óleo, com 10 e 50% de solo em suspensão, foram observados valores de DMCA bem acima da DMC, destacando-se que para 50% de solo em suspensão os valores apresentaram-se bem acima dos obtidos com apenas 10% de solo, o que indica que quanto maior a quantidade de solo, maior a necessidade de se adicionar surfactante para que se alcance a DMCA neste sistema.

De fato, segundo OU (2000), a adição de surfactantes num sistema solo/água faz com que parte das moléculas (monômeros) sejam adsorvidas pelas partículas do solo e o restante forme uma monocamada na interface ar/água, resultando na redução da tensão superficial, necessitando de mais surfactante para se atingir a DMCA. Ainda segundo HAIGH (1996), quando há compostos hidrofóbicos presentes, dependendo da quantidade e da característica do surfactante, há, também, a formação de gotas de emulsão.

Avaliando-se os surfactantes separadamente, destaca-se que o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), apesar de ter apresentado maior valor de DMC, foi o que menos variou o valor da DMCA (Diluição micelar crítica aparente), tanto para 10% quanto para 50% de solo em suspensão, provavelmente, por não ter sido totalmente solubilizado no sistema solo-água-surfactante.

A DMC e DMCA são as principais características de um surfactante. Quanto menor a DMC mais eficaz é o surfactante, ou seja, se um surfactante consegue formar as primeiras micelas numa concentração menor, será muito mais econômico do que os que atingirem esta primeira micela em altas concentrações. Dessa forma, as escolhas dos surfactantes neste item foram feitas em relação ao menor valor de DMC que foi o do Biosolve (0,1 mg/L) e menor valor de DMCA que foram JBR 210 (1 mg/L) para 10% e SDS (2 mg/L) para 50% de solo em suspensão.

4.4.3 – Lavagem de solo contaminado com óleo cru

Antes de serem conduzidos os testes de dessorção do óleo no solo foi feita uma simulação da intemperização do óleo em laboratório. Estes ensaios serviram para avaliar o tempo que as frações mais leves do óleo seriam evaporadas do solo, permanecendo somente as frações mais pesadas. A Figura 4.9 mostra que a partir do quarto dia a remoção de Óleos & Graxas (O&G) permaneceu praticamente constante, sendo este o tempo utilizado para os ensaios de lavagem de solo. KINGSLEY *et al.* (2006) observaram a remoção do óleo no solo pelo mesmo procedimento e verificaram que já a partir de 24 h houve uma redução significativa da massa do óleo no solo e da mesma forma utilizaram este tempo para fazerem os testes de lavagem do solo contaminado com óleo cru.

O processo de lavagem do solo é considerado de baixo custo, eficaz e relativamente rápido, e tem o potencial para tratar e recuperar grandes quantidades de contaminantes em solo (USEPA, 1995). As diferentes classes de surfactantes são empregadas para a lavagem do solo em função da natureza dos contaminantes a serem removidos. Por exemplo, temos que os pesticidas são geralmente removidos

por surfactantes não iônicos como Triton x-100 e por biossurfactantes do tipo ramnolipídio (NOORDMAN *et al.*, 2000; MATA-SANDOVAL *et al.*, 2002). Em sequencia, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) podem ser lavados por surfactantes aniônicos como SDS (CHUN *et al.* 2002). No entanto, a utilização de surfactantes pode ser limitada pela textura do solo, já que solo com elevado teor de partículas finas e médias (argila e silte) reduz a capacidade de lavagem do solo (KUHLMAN & GREENFIELD, 1999; LEE *et al.*, 2002). Dessa forma, a capacidade de lavagem do solo franco arenoso, contaminado com óleo cru, foi verificada pelos seis surfactantes.

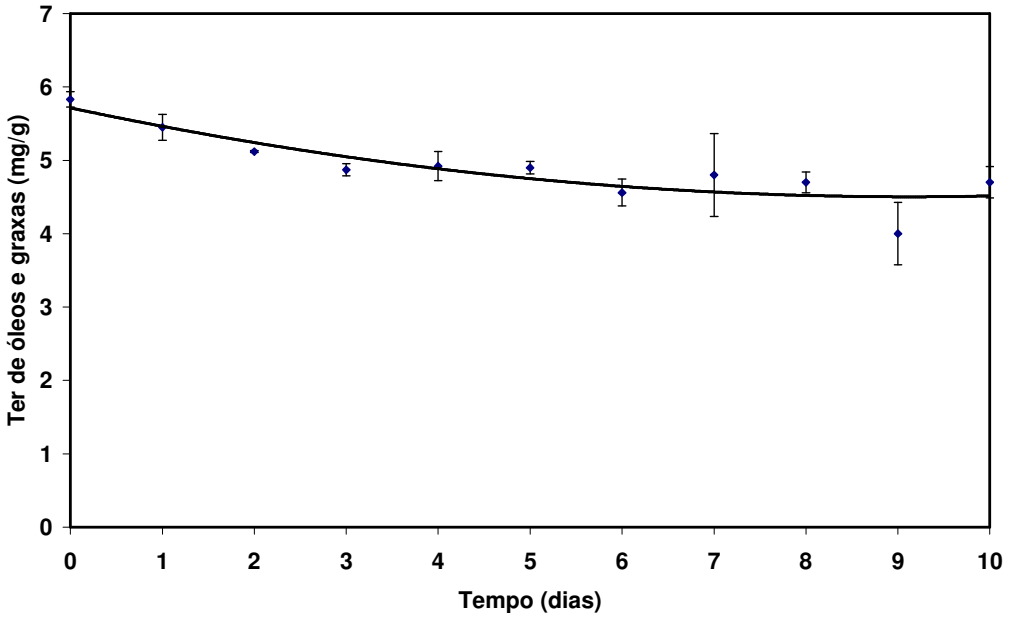


Figura 4.9 Redução do teor de Óleos e Graxas (O&G) no solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo durante a intemperização química do óleo no solo a 60ºC durante 10 dias.

A Figura 4.10 mostra a remoção do teor de óleos e graxas após a lavagem do solo contaminado com óleo cru, utilizando seis diferentes tipos de surfactantes. Na legenda A e B encontram-se os biossurfactantes do tipo ramnolipídio, observando-se que mesmo em concentrações abaixo da DMC houve remoção significativa do óleo no solo removendo cerca de 50% do óleo no solo. Esta alta remoção em concentrações abaixo da DMC pode ser explicada pelo fato de que em sistemas Solo-Água-Óleo, os surfactantes que estão abaixo da DMC existem como monômeros que se acumulam no solo contaminado e na interface solo-água aumentando o ângulo de contato entre o solo e os contaminantes, causando a repulsão entre o grupo cabeça da molécula do surfactante e as partículas do solo, promovendo a separação dos contaminantes

(DESPHANDE, 1998), dessa forma, além dos biossurfactantes, na maioria dos experimentos, à exceção do SDS, o valor de 0,5xDMC teve remoção maior do óleo do que em relação ao valor de 1xDMC.

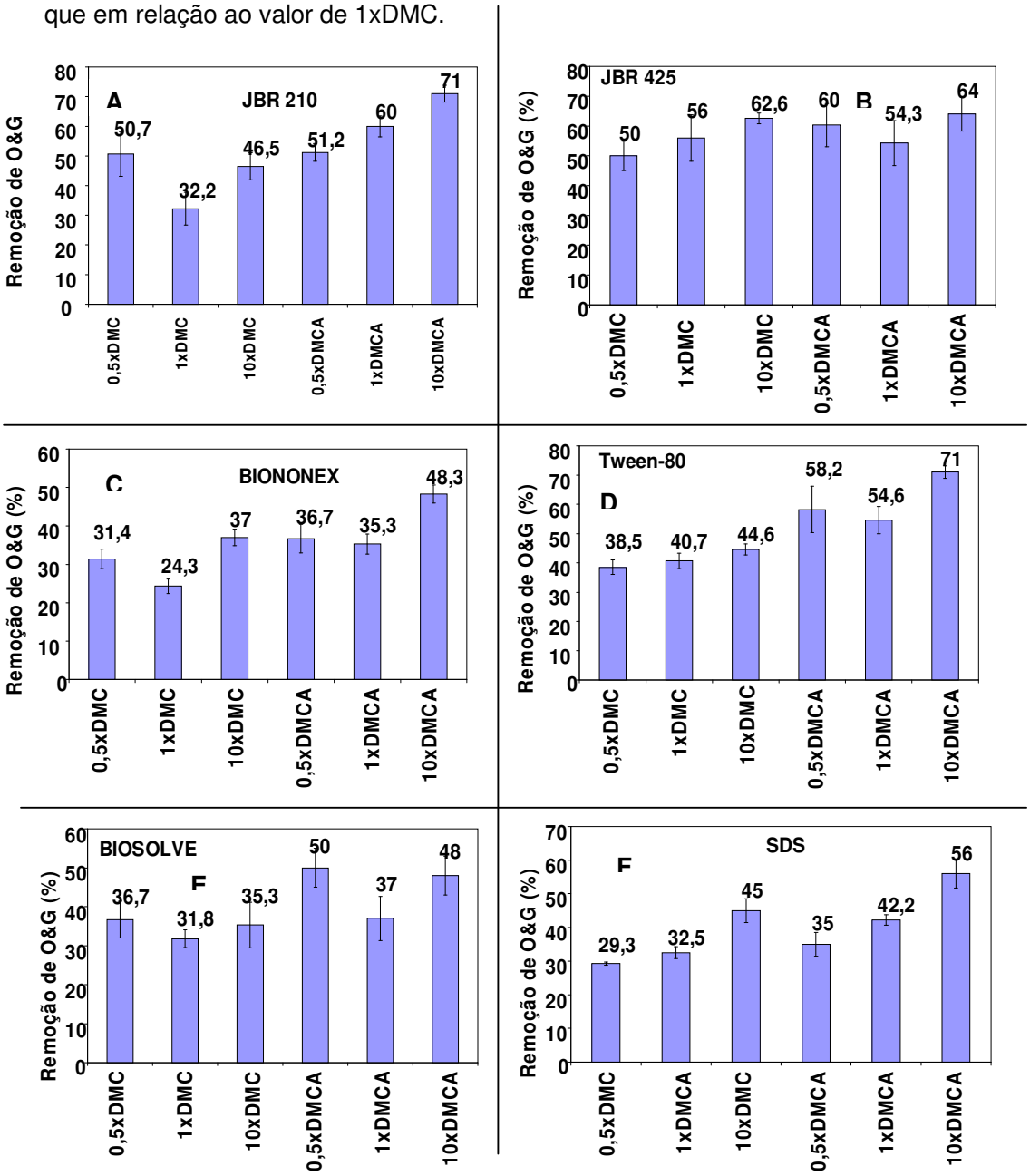


Figura 4.10: Dessorção do óleo do solo para diferentes concentrações de surfactantes. A) JBR 210; B)JBR 425; C)Biononex; D)Tween-80; E)Biolsolve; F)SDS

A formação de micelas aumenta a solubilidade do contaminante, promovendo a remoção do óleo das partículas do solo pela formação de uma emulsão estável (BANAT, 1995; HAIGH, 1996; CONTE *et al.* 2005). Dessa forma, foi observado que para valores acima da DMCA (10xDMCA) houve maior remoção do óleo do solo em quase todos os surfactantes, à exceção do Biosolve que a remoção foi um puco menor

em relação a 1xDMCA. Entretanto, observou-se que em todos os surfactantes houve uma pequena diferença entre 0,5xDMC e 10xDMCA, caracterizando a eficácia dos seis surfactantes na lavagem de solo mesmo em concentrações abaixo da DMCA . URUM *et al.* (2006) utilizaram dois surfactantes sintéticos (SDS – aniônico e TX100 – não iônico) e um surfactante natural em lavagem de solo contaminado com óleo cru e verificaram que tanto os surfactantes sintéticos como o biossurfactante promoveram a dessorção do óleo no solo, removendo cerca de 80% do contaminante, indicando que não houve diferença significativa pelo uso de surfactantes distintos. Dentre os seis surfactantes os que apresentaram maior remoção do óleo no solo foram o JBR 210 e Tween-80 com 71% de remoção do óleo do solo.

4.4.4 – Biodegradabilidade dos surfactantes

4.4.4.1 – Biodegradabilidade em solo

A avaliação da biodegradação de surfactantes no meio ambiente por atividade microbiana é de extrema importância para prevenir o impacto dos mesmos no meio ambiente. Muitos microrganismos podem utilizar surfactantes como substratos como fontes de energia e nutrientes ou substrato. Existem muitos produtos químicos e fatores ambientais que afetam a biodegradabilidade de um surfactante no meio ambiente e os mais importantes são a estrutura química e as condições ambientais. Entretanto, diferentes classes de surfactantes possuem diferentes comportamentos no meio ambiente (YING, 2006). Neste trabalho foi avaliada a biodegradabilidade de seis diferentes surfactantes em solo.

A respiração é um dos parâmetros mais antigos utilizados na quantificação da atividade microbiana e representa a oxidação total da matéria orgânica por organismos aeróbios do solo, que, portanto, utilizam O_2 como aceptor final de elétrons, convertendo compostos orgânicos em CO_2 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A Figura 4.11 mostra as curvas evolução de CO_2 obtida nos testes de biodegradabilidade dos seis surfactantes conduzidos por 42 dias. Destaca-se, ainda, que a concentração inicial de todos os surfactantes era de 15 mg/g de ingrediente ativo e a evolução de CO_2 seguiu a seguinte ordem decrescente: SDS > JBR 210 > TWEEN-80 > JBR 425 > BIONONEX > BIOSOLVE. O SDS apresentou maior atividade microbiana que os biossurfactantes e vários autores relatam que o SDS pode ser prontamente biodegradado e rapidamente metabolizado por bactérias aeróbicas e não se acumulam no solo (BERNA *et al.*, 1989; FIGGE & SCHO¨BERL, 1989; HOLT *et al.*, 1989 ; MARCOMINI *et al.*, 1989; WATERS *et al.*, 1989). Entretanto, o Biosolve que é o

outro surfactante aniônico, caracterizou-se como persistente no solo, apresentando o pior resultado de evolução de CO_2.

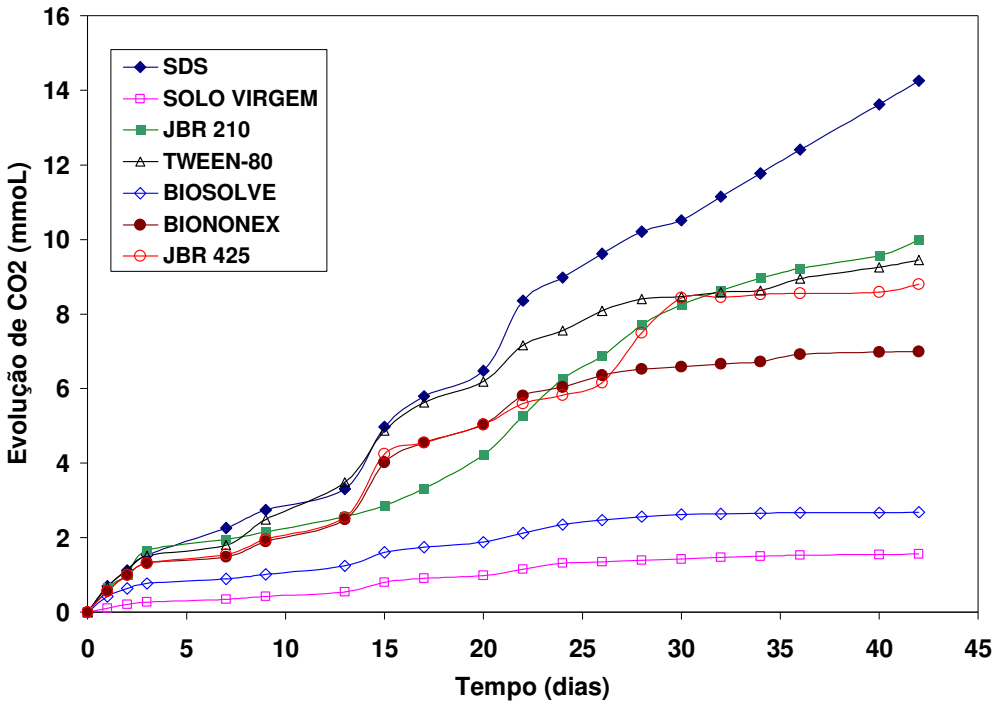


Figura 4.11: Desprendimento de CO_2 ao longo do tempo

Os tensoativos não iônicos do tipo polietóxido, constituídos por uma cadeia de polioxietileno como porção hidrofílica, formam uma grande família de tensoativos cuja constituição química da porção hidrófoba dão origem a séries de compostos com diferentes nomes comerciais como Tween, BRIJ, TRITON, etc. (HELENIUS & SIMONS, 1975; LICHTENBERG *et al.*, 1983). Estes surfactantes etoxilados, como o Tween-80, são facilmente biodegradáveis em condições aeróbias e anaeróbias, alcançando biodegradabilidade em torno de 95% (YING, 2006). KNAEL *et al.* (1990) mostraram que os surfactantes etoxilados são facilmente biodegradados em vários tipos de solo, sugerindo que os mesmos não se acumulam no solo. Os resultados da Figura 4.11 demonstram que o Tween-80 apresentou boa atividade no solo liberando cerca de 8 mmoL de CO_2, sendo que o Biononex, outro surfactante não iônico, apresentou atividade um pouco abaixo que o Tween-80 com cerca de 6 mmoL de evolução de CO_2 aos 42 dias de ensaio. Os surfactantes que se destacaram com maior evolução de CO_2 foram o SDS, JBR 210, Tween-80 e JBR 425. Embora, os surfactantes que apresentaram maior evolução de CO_2 foram o SDS e JBR 210.

4.4.4.2. Biodegradabilidade em fase líquida

Para a avaliação da biodegradabilidade de certos compostos existem vários métodos disponíveis e normatizados, que utilizam diferentes parâmetros para quantificação de carbono orgânico dissolvido (COD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e evolução de CO_2. De acordo com o órgão americano OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) um composto é considerado prontamente bidegradável se alcançar uma biodegradabilidade de 70% em 28 dias (OECD [301D], 1992). Por exemplo, se 70% do COD for removida no prazo de 28 dias, conclui-se que os restantes 30% são degradáveis também (NYHOLM, 1991).

A Figura 4.12 mostra a biodegradabilidade dos seis surfactantes através da redução de DQO. Pode-se observar que a ordem de biodegradabilidade foi JBR 210 > SDS > JBR 425 > Biosolve > Biononex > Tween-80. Comparativamente, o Tween-80 foi o menos biodegradável. Entretanto, como alcançou o máximo de biodegradabilidade em 5 dias com 60% de redução de DQO, este como os demais podem ser considerado como biodegradável. Geralmente, os biossurfactantes são facilmente biodegradáveis e, dessa forma, a maior biodegradabilidade foi observada para o JBR 210 (não purificado). O SDS e o JBR 425 também apresentaram alta biodegradabilidade após 5 dias alcançando cerca de 87% de redução de DQO. Segundo os autores WHITE & RUSSELL (1994) e VAN GINKEL (1996) o SDS pode ser biodegradado, principalmente, na presença de um consórcio bacteriano, como no caso aqui estudado o lodo ativado. URANO & SAITO (1985) avaliaram a biodegradabilidade de nove surfactantes, sendo que quatro eram aniônicos, três não iônicos e dois catiônicos. Os autores supracitados avaliaram a biodegradabilidade em termos de DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e observaram que em concentrações muito altas (≥ 100mg/L) houve inibição da biodegradação para alguns surfactantes e para concentrações baixas ou médias (3 a 30 mg/L) a biodegradabilidade foi maior de 60 % em apenas 7 dias para os surfactantes não iônicos. No presente estudo os seis surfactantes podem ser considerados como biodegradáveis; entretanto, os que mais se destacaram foram o JBR 210, SDS e JBR 425. A seguir será apresentado um resumo dos seis surfactantes estudados e quais se destacaram em cada uma das análises efetuadas (Tabela 4.11).

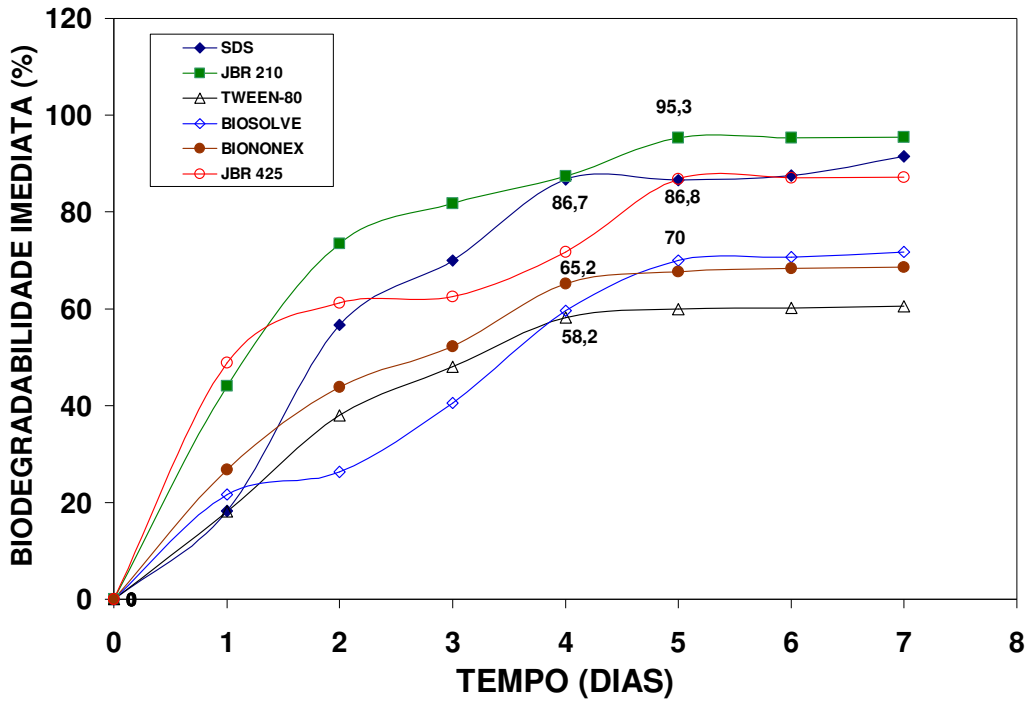


Figura 4.12: Biodegradabilidade dos surfactantes em fase líquida por redução de DQO.

A Tabela 4.11: Surfactantes que se destacaram em cada ensaio

Ensaio	Surfactante 1	Surfactante 2
IE (índice de emulsificação)	Biononex	Biosolve
DMC(Diluição micelar crítica)	Tween-80	Biosolve
$DMCA_{10}$ (Diluição micelar crítica aparente) em 10% de solo em suspensão	SDS	JBR 210
$DMCA_{50}$ (Diluição micelar crítica aparente) em 50% de solo em suspensão	SDS	Biosolve
Lavagem	JBR 210	Tween-80
Biodegradabilidade em solo	SDS	JBR 210
Biodegradabilidade em fase aquosa	JBR 210	SDS

Os resultados indicaram os surfactantes a serem investigados quanto à toxicidade e como auxiliares na técnica de biorremediação sejam o SDS e o JBR 210 já que os mesmos se destacaram em quatro dos sete ensaios avaliados. A seguir serão

demonstrados os testes de toxicidade de ambos os surfactantes em solo não contaminado e contaminado com 5% de óleo cru.

4.5 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS SURFACTANTES SDS E JBR 210

Os bioensaios de ecotoxicidade permitem caracterizar a toxicidade de substâncias químicas no meio ambiente, pela exposição de organismos vivos (bioindicadores) a estas substâncias em função da elevada sensibilidade a efeitos tóxicos em seu ambiente. Essas análises, apenas recentemente introduzidas no Brasil, são indicados em países desenvolvidos, sendo que a ecotoxicologia é um dos novos campos da ciência que busca compreender a forma como os ecossistemas metabolizam, transformam, degradam, eliminam, acumulam e sofrem ação da toxicidade das diversas substâncias químicas neles introduzidas (MELLO, 1981; AZEVEDO & CHASIN, 2003). A seguir serão investigados testes ecotoxicológicos utilizando como bioindicadores a enzima desidrogenase e as espécies *Lactuca sativa; Lycopersicon esculentum e Eisenia fetida.*

4.5.1 – Avaliação da atividade da desidrogenase (AD) em diferentes concentrações dos surfactantes SDS e JBR 210

A atividade da desidrogenase está relacionada à qualidade do solo e serve como bioindicador de toxicidade de compostos químicos adicionados ao solo. A determinação da atividade de enzimas no solo é uma maneira simples de se medir a atividade microbiana, indicando mudanças ocorridas na microbiota do solo sem, entretanto, relacioná-las a algum grupo específico de organismos (ANDRADE & SILVEIRA, 2004). A Figura 4.13 mostra a atividade da desidrogenase (AD) em termos de µg de TPF por g de solo em 24 h. O JBR 210 teve sua AD aumentada até a concentração de 4 mg de biossurfactante/ g de solo, alcançando valor superior a 70 µg/g. Entretanto, a partir de 6 mg/g a atividade foi diminuindo até o valor de 7 µg/g, contudo, mesmo tendo sua AD desestimulada com o aumento da concentração do biossurfactante, a crescente adição de JBR 210 não reduziu a atividade da desidrogenase em valores inferiores ao observado no solo virgem que foi de 6,5 µg/g de solo. Isso mostra a tolerância dos microrganismos a este biossurfactante analisado. À medida que se aumentou a concentração de SDS houve também aumento da AD. No entanto, até o valor de 6 mg/g o JBR 210 alcançou maior atividade que o SDS e entre 10 e 15 mg/g o SDS apresentou maior atividade e na concentração de 8 mg/g ambos os surfactantes apresentaram mesmo valor de atividade.

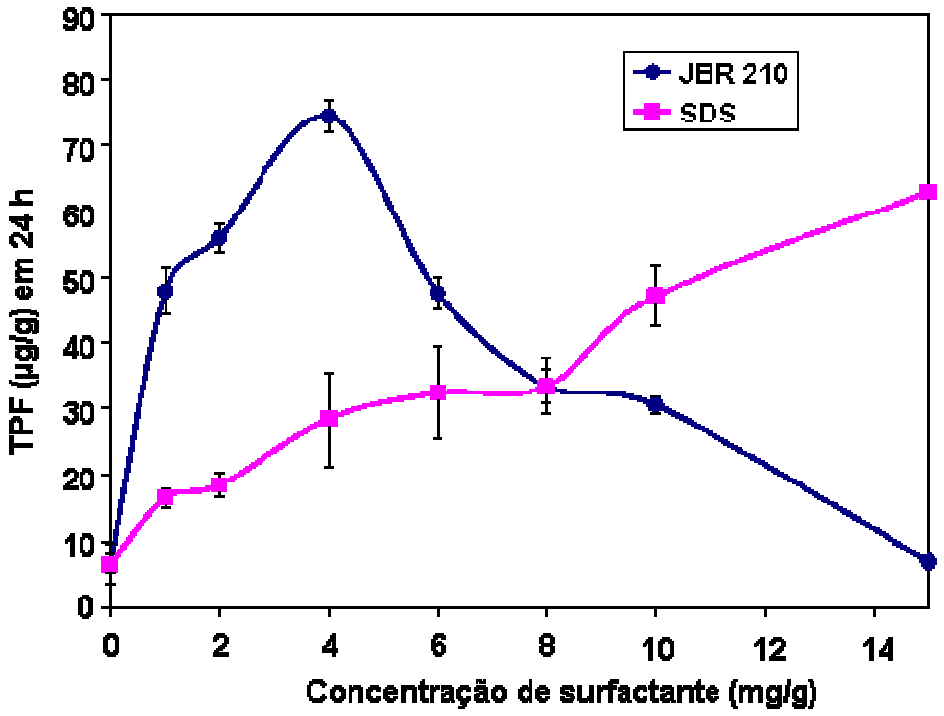


Figura 4.13: Atividade da desidrogenase do JBR 210 e SDS em termos de µg/g de TPF em 24h

A atividade da desidrogenase foi um indicador sensível à adição de ambos os surfactantes ao solo, sendo possível detectá-la mesmo sem a adição dos mesmos ao solo (solo virgem). Entretanto, embora a atividade do solo virgem seja baixa (6,5 µg/g de TPF/24h), alguns autores como TEIXEIRA (2004) e RIBEIRO (2005) encontraram, também, valores baixos da atividade da desidrogenase em solos virgens em torno de 10 µg/g de TPF/24h. Conforme discutido anteriormente, a adição do JBR 210 indicou uma concentração ótima de 4 mg/g de ramnolipídio e a curva de atividade do SDS indicou que quanto maior a concentração de SDS maior a atividade enzimática do solo. Entretanto, cabe ressaltar que por questões de custo/benefício, se um surfactante consegue atingir um alto valor de atividade em baixas concentrações, este pode ser considerado mais eficaz do que outro cuja maior atividade é alcançada em altas concentrações. Neste contexto, o JBR 210 foi considerado melhor que o SDS.

4.5.2 - Teste de germinação com Lactuca sativa

O teste de toxicidade utilizando a espécie *Lactuca sativa* como bioindicador mostrou que a adição de ambos os surfactantes apresentaram efeitos tóxicos à medida que a concentração desses surfactantes aumentava (Figura 4.14). Percebe-se, ainda, que o SDS tendeu a uma constância nas diluições a partir de 8 mg/g. Ainda vale a pena

salvaguardar que na concentração de 1 mg/g houve incremento no índice de germinação para ambos os surfactantes em relação ao solo virgem. Isso pode ter ocorrido pela possibilidade de que baixas concentrações desses surfactantes possam contribuir para aumentar a fertilidade do solo e, consequentemente, o índice de germinação da *L. sativa.* Todavia, ressalta-se que, exceto nesta concentração de 1 mg/g , a adição das demais concentrações foram inibitórias à germinação da *L. sativa* conforme dito acima.

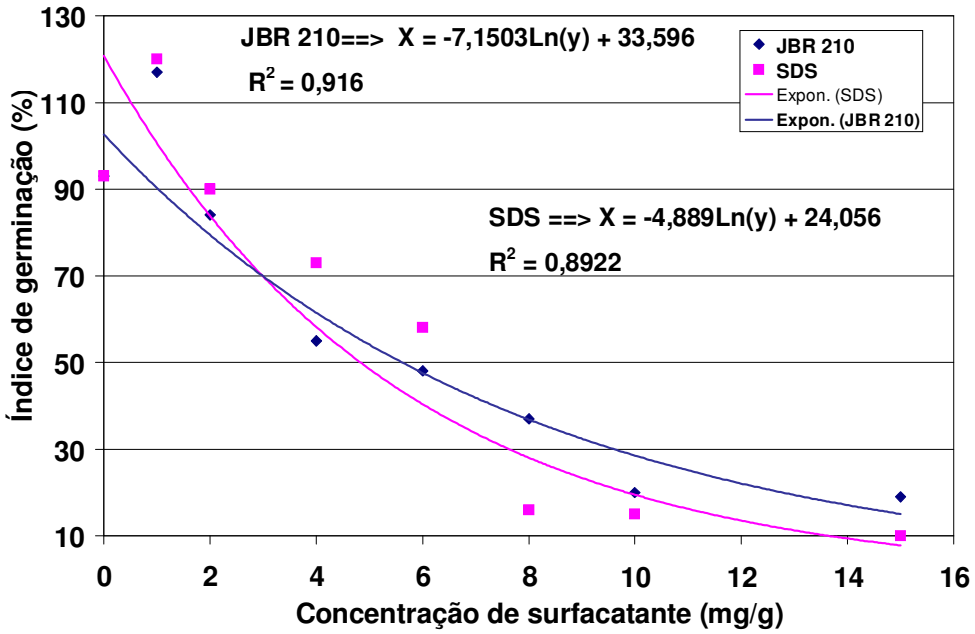


Figura 4.14: Índice de germinação (IG) da espécie Lactuca sativa em diferentes concentrações de surfactantes.

No entanto, os dados plotados geraram uma curva logarítimica tanto pra o JBR 210 quanto para o SDS e, de acordo com a equação de cada curva, pode-se estimar a concentração efetiva do agente tóxico EC50 (120 h – 5 dias) que é a concentração que reduz em 50% o índice de germinação das sementes. Dessa forma, pode-se substituir y por 50 (50% de redução) em cada curva, obtendo-se as seguintes concentrações:

JBR 210 ➔ X = -7,1703Ln(50) + 33,596 ➔ EC50 = 5,54 mg/g (4.1)

SDS ➔ X = -4,889Ln(50) + 24,056 ➔ EC50 = 4,93 mg/g (4.2)

Dessa forma, podemos observar que não houve uma diferença muito grande em relação a EC50 de cada surfactante que foi entre 4 e 6 mg/g, sendo que o JBR 210 foi um pouco menos impactante que o SDS.

4.5.3 - Teste de germinação com Lycopersicon esculentum

A Figura 4.15 mostra o índice de germinação do tomate da espécie *Lycopersicon esculentum*. Pôde-se verificar que houve, também, efeito negativo, pois à medida que a concentração dos surfactantes foi aumentando, houve diminuição do índice de germinação da espécie analisada. A partir da concentração 8 mg/g de ramnolipídio não houve crescimento da espécie, devido à presença de fungo na superfície dos vasinhos que inibiu a germinação. Para o SDS a presença de fungo foi observada a partir de 10 mg/g. As curvas de ambos os surfactantes geraram uma regressão linear com suas respectivas equações e R^2.

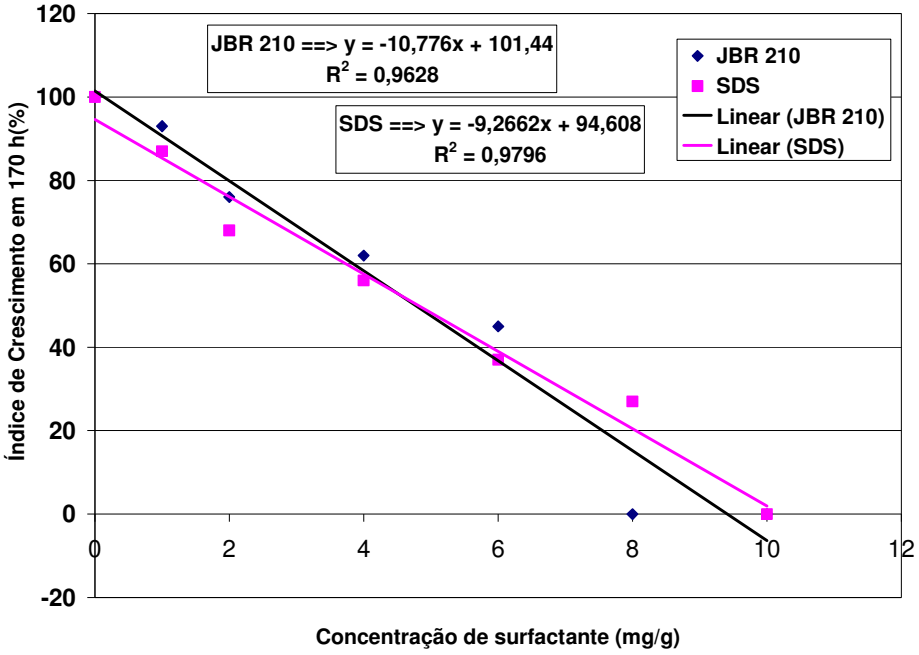


Figura 4.15: Índice de crescimento da espécie Lycopersicon esculentum em concentrações diferentes de surfactantes

A concentração efetiva do agente tóxico EC50 (170 h) pode ser calculada também pelas equações geradas pelas curvas de cada surfactante. Dessa forma, pode-se estimar a concentração EC50 de cada surfactante de acordo com as equações 4.3 e 4.4.

JBR 210 ➔ X = - 0,0893x50 + 9,2276 = 4,76 mg/g (4.3)

SDS ➔ X = - 0,1057x50 + 10,092 = 4,81 mg/g (4.4)

Pode-se novamente observar que não houve diferença entre ambos os surfactantes em relação à toxicidade.

4.5.4 - Teste de mortalidade de minhoca da espécie Eisenia fetida

As minhocas estão associadas a um solo saudável e a sua ausência indica a má qualidade do solo (DOUBE & SCHMIDT, 1997; EDWARDS & SHIPITALO, 1998; PARMELEE *et al.* 1998). Algumas espécies de minhocas são utilizadas na avaliação do risco ambiental como bom bioindicadores de toxicidade (CALLAHAN *et al.*, 1998; DORN & SALANITRO, 2000). Segundo DORN *et al.* (1998) um parâmetro importante para o teste de mortalidade de minhocas é a determinação da concentração letal para 50% da população (CL50) e os dados demonstrados na Figura 4.16 mostram o índice de mortalidade das minhocas da espécie Eisenia fétida após a exposição em diferentes concentrações de ramnolipídio (biossurfactante JBR 210). Foi possível observar que houve 100% de mortalidade em concentrações acima de 8 mg/g. No entanto, entre 0,1 e 1 mg/g não houve índice de mortalidade à exceção da concentração de 0,2 mg/g que apresentou 10 % de mortalidade. Na concentração de 2 mg/g começou a se observar uma redução da população de minhocas sobreviventes com índice de mortalidade em torno de 50 %. A curva que gerou a concentração LC50 (14 dias) foi feita entre as concentração de 1 e 8 mg/g de ramnolipídio conforme mostra a Figura 4.17

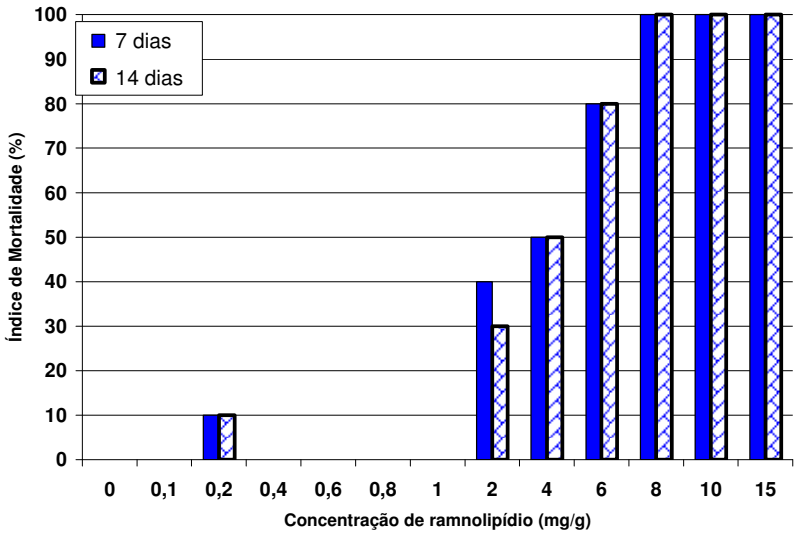


Figura 4.16: índice de mortalidade das minhocas em diferentes concentrações de ramnolipídio.

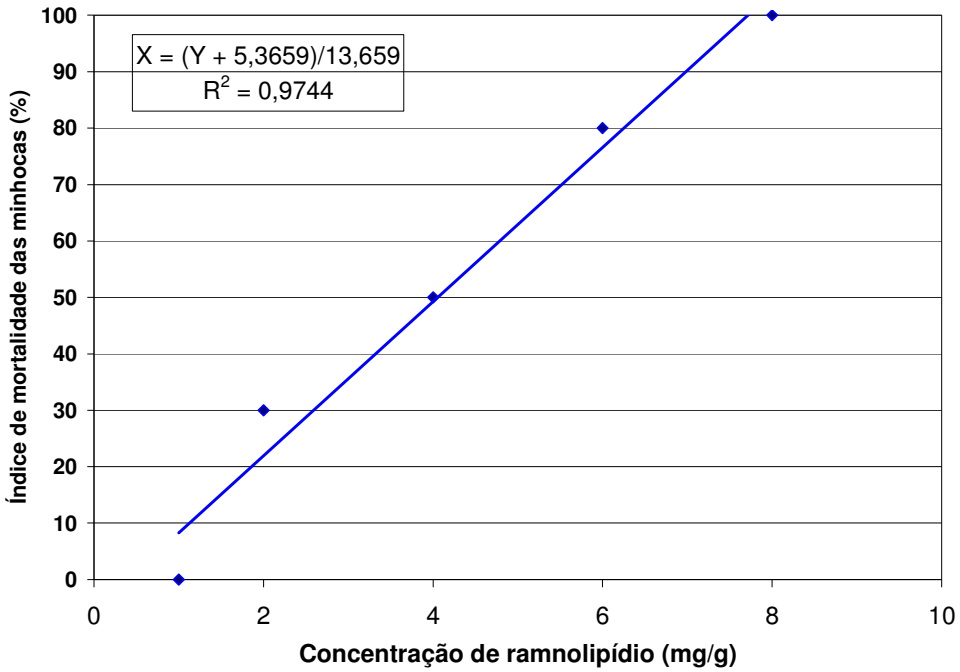


Figura 4.17: Equação da curva para determinação de LC50 em diferentes concentrações de ramnolipídio.

A concentração Letal do agente tóxico LC50 (14 dias) pode ser calculada pela equação gerada pela curva de índice de mortalidade versus concentração de ramnolipídio. Dessa forma, de acordo com as equações 4.5 pode-se calcular a concentração de ramnolipídio, substituindo-se y por 50 que significa 50 % de índice de mortalidade das minhocas

JBR 210 (ramnolipídio) ➔ X = (Y + 5,3659) / 13,659 ➔ Y = 4 mg/g (4.5)

Na Figura 4.18 apresenta a análise das diferentes concentrações de SDS em 7 e 14 dias de experimento, verificando-se que até 0,4 mg/g não houve mortalidade das minhocas, sendo observado os primeiros índice de mortalidade na concentração de 6 mg/g de SDS com 20 e 30 % de mortalidade para 7 e 14 dias respectivamente. A concentração letal para 50% da população (LC50) para o SDS foi observada na em 0,8 mg/g não sendo necessária, neste caso, a equação da curva.

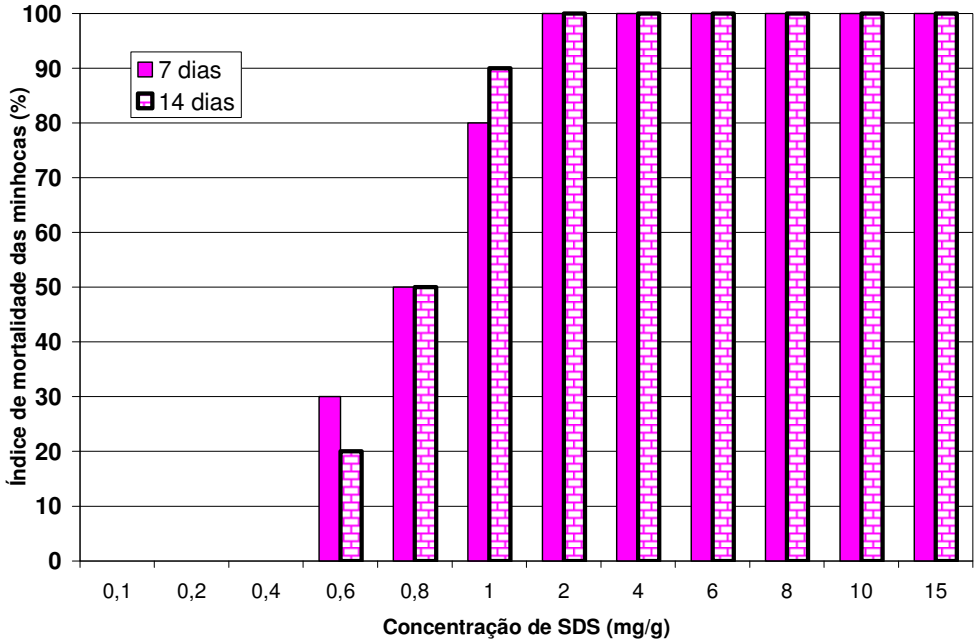


Figura 4.18: Índice de mortalidade das minhocas da espécie Eisenia fétida em diferentes concentrações de SDS

Avaliando-se os resultados dos 4 testes de toxicidade, pôde-se verificar que as minhocas são os organismos mais sensíveis à adição dos surfactantes no solo, seguido pela germinação com *L. sativa* (120h), a espécie *L. esculentum* (170h) e, por último, a atividade enzimática do solo, ressaltando-se que somente no teste de atividade da desidrogenase houve efeito positivo à medida que se adicionaram os surfactantes. Entretanto, para o JBR 210 o efeito foi positivo até 4mg/g, ressaltando-se que em concentrações superiores a esta não houve atividade abaixo do solo natural (solo virgem). Comparando-se a toxicidade do biossurfactante JBR 210 com um surfactante SDS, conclui-se que ambos apresentaram toxicidades semelhantes na maioria dos testes, sendo que no caso das minhocas o SDS apresentou alta toxicidade em concentrações acima de 1 mg/g e o JBR 210 em concentrações acima de 6 mg/g, verificando-se que o SDS foi bem mais tóxico que o JBR 210. Contudo, a literatura tem mostrado que os biossurfactantes são bem menos tóxicos que os sintéticos, embora alguns biossurfactantes apresentem também alta toxicidade (LAHA *et al.* 2009). Apesar da adição de ambos os surfactantes terem apresentado toxicidade na maioria das concentrações avaliadas, optou-se por investigar a eficácia da utilização dos mesmos como auxiliares na técnica de biorremediação com essas mesmas concentrações uma vez que existe um consenso de que a utilização de surfactantes na técnica de biorremediação aumenta a biodegradabilidade em solo

contaminado com óleo cru (DESCHENES *et al.* 1996; ROJAS-AVALIZAPA *et al.*, 2000; CUBITTO *et al.*, 2005; MILLIOLI *et al.*, 2005; PARIA, 2008).

O intuito dos ensaios a seguir do item 4.5 foi comparar os surfactantes JBR 210 e SDS como auxiliares na técnica de biorremediação a fim de escolher um único surfactante para ser avaliado quanto à toxicidade e biodegradabilidade em testes posteriores. Os testes a seguir mostram apenas os resultados de biodegradabilidade com a adição de diferentes concentrações dos surfactantes SDS e JBR 210 bem como a população de microrganismos ao longo do tratamento.

4.5 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU ATRAVÉS DA ADIÇÃO DO JBR 210 (RAMNOLIPÍDIO) E SDS

As Figuras 4.19 e 4.20 mostram os resultados de remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) durante 45 dias. Conforme observado na Figura 4.19, a adição de 4 mg/g do ramnolipídio resultou em maior remoção de HTP (50%) com tendência a um aumento com o prolongamento do tempo dos experimentos. Em quase todos os resultados, a adição de ramnolipídio apresentou remoção acima do controle, exceto para o tratamentos com a adição de 15 mg/g, que foi inferior ao controle. Ainda a concentração de 10 mg/g não apresentou resultados acima do controle nos primeiros 30 dias de ensaio, sendo que aos 45 dias alcançou valores um pouco acima alcançando cerca de 25 % de remoção de HTP. De fato, nessas concentrações foi observado alta toxicidade para as espécies *L. sativa, L. esculentum e E. fetida.* Comparando-se o melhor resultado de remoção de HTP com os testes de toxicidade, pode-se observar que a maior remoção de HTP ocorreu com a adição de 4 mg/g de ramnolipídio que foi justamente a concentração que apresentou maior atividade da desidrogenase (Figura 4.13). Em relação aos testes de toxicidade com *L. sativa e L. esculentum a* concentração efetiva (EC50) do ramnolipídio foi um pouco acima de 4 m/g e para a concentração Letal (LC50) para a espécie *Eisenia fetida* foi justamente nesta concentração de 4 mg/g de ramnolipídio.

A adição de SDS ao solo contaminado não melhorou os índices de biodegradação em relação ao controle, apresentando remoção de HTP entre 20 e 26 % (Figura 4.20),sugerindo que a microbiota do solo não foi capaz de se adaptar a adição do SDS ao óleo cru. No entanto, alguns autores sugerem que a adição do SDS pode aumentar a biodegradabilidade do óleo cru (SUCHANEK *et al.*, 2000). Alguns fatores podem ter prejudicado a remoção do óleo cru como, alta sorção do SDS ao solo, indisponibilizando-o para a ação dos microrganismos; outro fator seria que a presença de SDS no solo pode sofrer hidrólise, gerando o íon HSO_4^- que aumenta a acidificação

do solo, afetando a atividade da microbiota nativa (RON & ROSENBERG, 2002) ou pode ter ocorrido a degradação preferencial do SDS retardando a degradação do óleo cru.

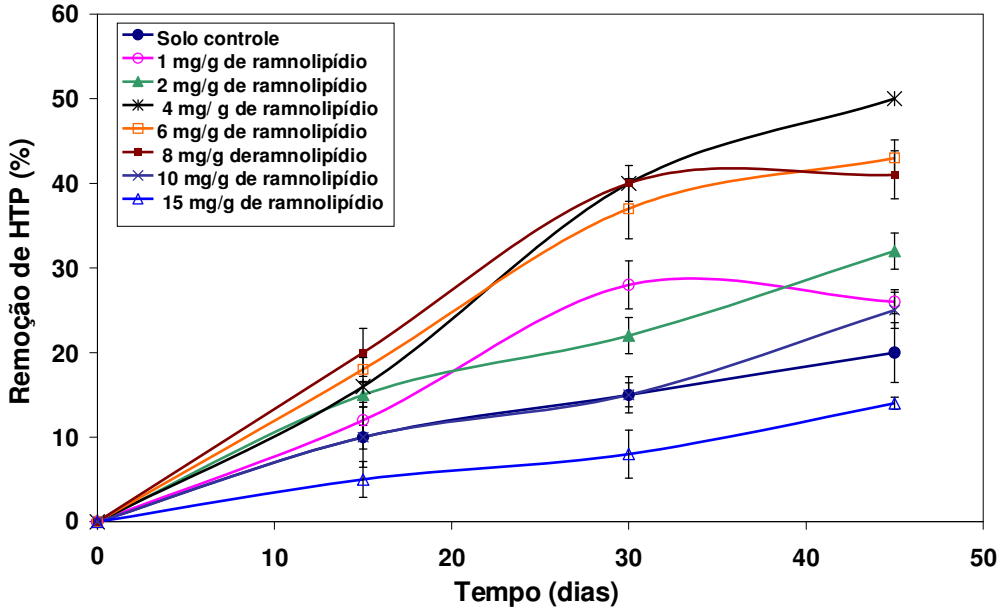


Figura 4.19: Remoção de HTP ao longo do tempo através da adição de diferentes concentrações de ramnolipídio à técnica de biorremedição

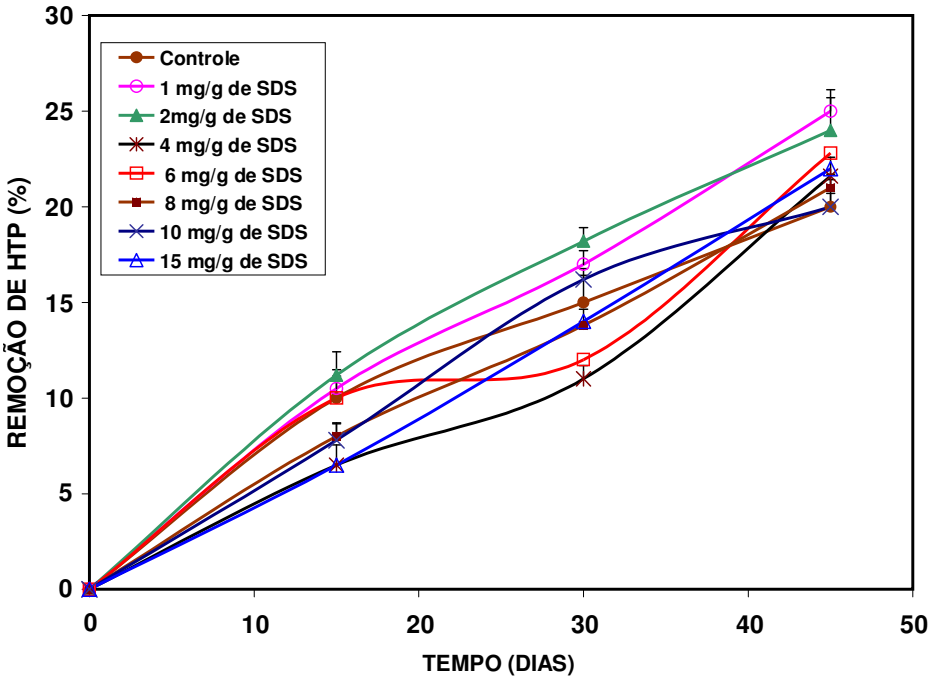


Figura 4.20: Remoção de HTP ao longo do tempo através da adição de diferentes concentrações de SDS à técnica de biorremedição

A Tabela 4.11 mostra o número de microrganismos heterotróficos totais e hidrocarbonoclásticos ao longo dos 45 dias de experimentos com adição do ramnolipídio JBR 210. De acordo com a Tabela 4.11, os experimentos aos quais foram adicionados 4 e 6 mg/g de ramnolipídio, respectivamente, apresentaram maior crescimento populacional da microbiota, sendo estas também as condições que apresentaram maior remoção de HTP. A população microbiana foi diminuindo ao longo do tempo para adição de 10 mg/g e para a concentração de 15 mg/g de ramnolipídio houve um pequeno aumento aos 30 e 45 dias de ensaio. Além da toxicidade dessas concentrações, conforme discutido anteriormente, outro fator que pode ter prejudicado o crescimento populacional seria a sorção do biossurfactante ao solo ou alta solubilidade do óleo que se tornou muito tóxico para os microrganismos, prejudicando o crescimento populacional. O controle manteve a mesma ordem de grandeza ao longo do tempo tanto para os microrganismos heterotróficos totais quanto para os hidrocarbonoclásticos.

Tabela 4.11: População microbiana em diferentes concentrações de ramnolipídio ao longo dos 45 dias de experimentos

	MICRORGANISMOS							
	MHT(1) - UFC/g de solo				MH(2) - NMP/g de solo			
CONDIÇÕES	TEMPO				TEMPO			
	0	15	30	45	0	15	30	45
Controle	$7,4X10^6$	$2,3X10^6$	$6,7x10^6$	$5,3x10^6$	$6,2X10^3$	$1,5X10^3$	$4x10^3$	$1,7x10^3$
1 mg/g de ramnolipídio	$2,8x10^6$	$1,5x10^6$	$6,1x10^5$	$2,3x10^6$	$3,3x10^3$	$1,1x10^4$	$2,3x10^3$	$1,9x10^3$
2 mg/g de ramnolipídio	$1x10^6$	$1,7x10^6$	$2,4x10^7$	$5x10^8$	$2,3x10^3$	$7,3x10^3$	$8,2x10^5$	$6,8x10^5$
4 mg/g de ramnolipídio	$8,2x10^6$	$1x10^6$	$1,5x10^9$	$6,2x10^{10}$	$2,3x10^3$	$7,3x10^3$	$8,2x10^5$	$6,8x10^5$
6 mg/g de ramnolipídio	$7,8x10^6$	$2x10^7$	$4,6x10^9$	$1,3x10^{10}$	$8,6x10^3$	$6,1x10^5$	$4,2x10^5$	$3,3x10^5$
8 mg/g de ramnolipídio	$7,3x10^6$	$1,1x10^6$	$2,1x10^8$	$3,1x10^7$	$2,4x10^3$	$1,1x10^3$	$3,1x10^4$	$8,2x10^4$
10 mg/g de ramnolipídio	$5,1X10^6$	$3X10^6$	$1x10^5$	$5x10^5$	$6,2X10^3$	$2,1X10^3$	$4,2x10^3$	$2,7x10^3$
15mg/g de ramnolipídio	$3,1x10^5$	$1,6x10^6$	$4,1x10^5$	$3x10^6$	$3,2x10^3$	$1,5x10^3$	$8,2x10^2$	$8,5x10^2$

MHT = Microrganismos heterotróficos totais; MH = microrganismos hidrocarbonoclásticos

A Tabela 4.12 mostra a população microbiana para os diferentes ensaios de biodegradabilidade em concentrações diferentes de SDS como auxiliares à técnica de biorremediação. Pode-se observar que a adição do mesmo resultou no aumento da população de heterotróficos totais apenas parar a concentração 6mg/g de SDS aos ensaios de biodegradabilidade. Com estes resultados sugere-se, ainda mais, que o SDS juntamente com o óleo cru foram adsorvidos pela matriz do solo, não sendo ambos os contaminantes disponíveis para o metabolismo e crescimento dos

microrganismos. Ainda com estes resultados pode-se, até mesmo, descartar a possibilidade de ter havido degradação preferencial do surfactante em detrimento do óleo cru, justamente por não ter sido observado aumento significativo da população microbiana.

Tabela 4.12: População microbiana em diferentes concentrações de SDS ao longo dos 45 dias de experimentos

	MICRORGANISMOS							
	MHT(1) - UFC/g de solo				MH(2) - NMP/g de solo			
CONDIÇÕES	TEMPO				TEMPO			
	0	15	30	45	0	15	30	45
Controle	$7,4X10^6$	$2,3X10^6$	$6,7x10^6$	$5,3x10^6$	$6,2X10^3$	$1,5X10^3$	$4x10^3$	$1,7x10^3$
1 mg/g de SDS	$2,3x10^6$	$4,5\ x10^6$	$5,7x10^5$	$2,7x10^6$	$1,7x10^3$	$2,1x10^4$	$1,3x10^3$	$2,9x10^3$
2 mg/g de SDS	$3,0x10^6$	$2,8x10^6$	$3,4x10^6$	$5x10^6$	$3,3x10^3$	$2,4x10^3$	$4,2x10^3$	$4,8x10^3$
4 mg/g de SDS	$2,2x10^6$	$1,7x10^6$	$1,9x10^6$	$5,1x10^6$	$3,1x10^3$	$4,2x10^3$	$3,5x10^3$	$3,1x10^3$
6 mg/g de SDS	$2,6x10^6$	$9,5x10^6$	$2,6x10^7$	$1,5x10^7$	$8,6x10^3$	$9,1x10^3$	$1,6x10^4$	$3,1x10^3$
8 mg/g de SDS	$4,3x10^6$	$1,8x10^6$	$2,9x10^6$	$8,5x10^6$	$2,9x10^3$	$3,1x10^3$	$9,1x10^3$	$8,5x10^3$
10 mg/g de SDS	$4,7X10^6$	$3,5X10^6$	$5,3x10^6$	$5,8x10^6$	$2,2X10^3$	$2,9X10^3$	$8,2x10^3$	$7,5x10^3$
15mg/g de SDS	$3,3x10^5$	$3,4x10^6$	$3,5x10^6$	$3,6x10^6$	$3,2x10^3$	$1,8x10^3$	$2,7x10^3$	$7,6x10^3$

MHT = Microrganismos heterotróficos totais; MH = microrganismos hidrocarbonoclásticos

Avaliando-se os dois surfactantes, até o momento, observou-se que ambos são tóxicos em altas concentrações; contudo, o ramnolipídio como auxiliar à técnica de biorremediação parece não ser danoso ao metabolismo dos microrganismos, sobretudo, porque sua adição foi positiva à degradação do contaminante nas concentrações de 4 e 6 mg/g. Foi ainda observado crescimento da população microbiana, inclusive dos microrganismos hidrocarbonoclásticos e um efeito inibitório na concentração de 15 mg/g, onde foi observada queda da população de microrganismos hidrocarbonoclásticos. Nenhum efeito negativo foi observado através da adição do SDS ao solo, todavia não foi observado efeito significativo em relação ao controle já que todos os resultados foram semelhantes ao controle e, dessa forma, optou-se por se avaliar daqui por diante somente o efeito da adição do ramnolipídio JBR 210 ao longo do tempo. As discussões a seguir são referentes ao efeito da adição do ramnolipídio logo no início de uma contaminação e com 180 e 420 dias de exposição do solo contaminado aos efeitos bióticos e abióticos de uma atenuação natural do contaminante. Nestes experimentos serão avaliadas a remoção de HTP, população de microrganismos hidrocarbonoclásticos e atividade da desidrogenase ao longo de 45 dias de ensaio de biodegradabilidade. Para efeito de comparação os

experimentos iniciais foram refeitos para que se determinassem os parâmetros citados acima.

4.6 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ÓLEO CRU ATRAVÉS DA ADIÇÃO DO BIOSSURFACTANTE DO TIPO RAMNOLIPÍDIO

4.6.1. Ensaio de Biodegradabilidade Inicial

Os primeiros ensaios de biodegradabilidade foram feitos num solo com contaminação recente de óleo cru cuja concentração inicial de HTP era de 47 mg/g. A Figura 4.21 mostra a remoção de HTP ao longo do tempo, observando-se que, logo nos primeiros 15 dias, houve, praticamente, a mesma remoção de HTP para todos os experimentos que foi entre 15 a 20 % de remoção, excetuando-se os experimentos com 10 e 15 mg/g, que apresentaram valores abaixo do experimento controle (sem adição de ramnolipídio). Entretanto, decorridos 30 dias de teste, verificou-se que a adição da concentração de 4 mg/g de ramnolipídio foi a que melhor removeu o óleo do solo em temos de HTP, sendo este resultado confirmado aos 45 dias de ensaios de biodegradabilidade, alcançando cerca de 60% de remoção de HTP com quase o dobro de remoção em relação ao controle. A adição das concentrações de 6 e 8 mg/g de ramnolipídio também apresentou bons resultados com cerca de 45% de remoção de HTP. Porém, os tratamentos com 10 e 15 mg/g de ramnolipídio obtiveram valores de biodegradabilidade inferiores ao controle com cerca de 10 e 15% de remoção, respectivamente. Vale à pena destacar que a adição de 2 mg/g de ramnolipídio apresentou bom resultado ao término dos experimentos com 40% de remoção de HTP, sendo que a concentração de 1 mg/g de HTP pouco influenciou em relação ao controle com apenas 33,7% de remoção em relação a 33% do controle. Com a repetição dos experimentos, verificou-se mais uma vez que o melhor resultado foi obtido pela adição de 4 mg/g de ramnolipídio, sendo que alguns resultados de algumas concentrações atingiram valores maiores ou menores em relação ao primeiro ensaio. Mais uma vez foi verificado que a adição das concentrações 10 e 15mg/g não foram benéficas aos ensaios de biodegradabilidade já que em alguns casos, os surfactantes apresentam efeitos inibitórios sobre a biodegradação, pois à medida que se aumenta a solubilidade do óleo aumenta-se, também, a toxicidade (SINGH *et al.* 2007). Outro fator que pode ter inibido a degradação dos HTP é a degradação preferencial do biossurfactante em detrimento da degradação dos hidrocarbonetos (TIEHM, 1997; YU *et al.* 2005).

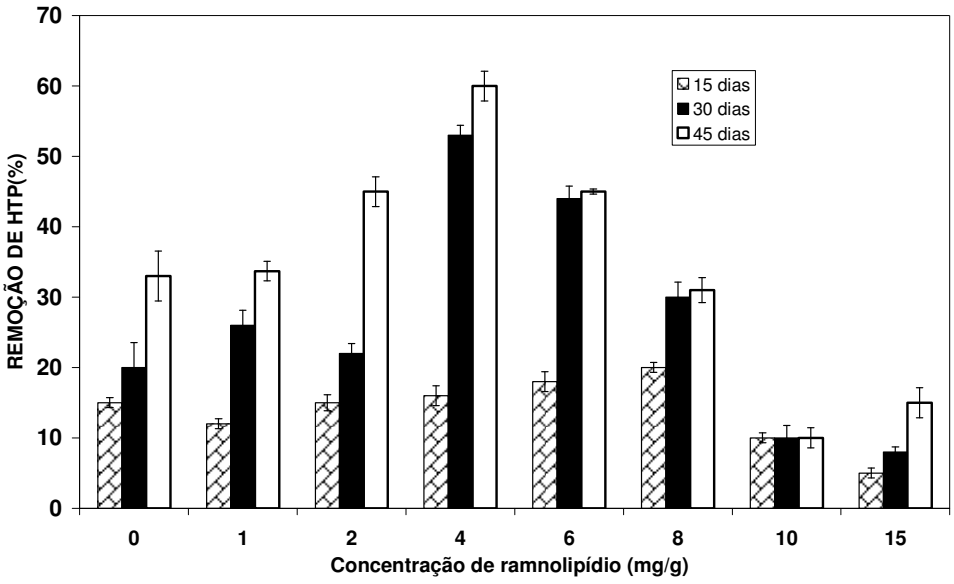


Figura 4.21: Remoção quinzenal de HTP ao longo de 45 dias para diferentes concentrações de ramnolipídio

A Figura 4.22 mostra a atividade enzimática do solo através da adição de diferentes concentrações, destacando-se que a adição de ramnolipídio entre as concentrações 1 e 15 mg/g ao solo contaminado com óleo cru foi extremamente impactante à atividade da desidrogenase, pois a medida que a concentração do ramnolipídio aumentava, a atividade diminuía. Este efeito impactante logo no início do tratamento pode ser explicado devido a alta solubilidade do óleo, sobretudo, porque à medida que se aumenta a concentração de ramnolipídio, aumenta-se, também, a solubilidade do óleo cru, disponibilizando mais óleo a ser metabolizado, dificultando a ação dos microrganismos. O controle (0 mg/g de ramnolipídio) também apresentou baixa atividade com cerca de 4,5 µg/g, indicando que somente a adição do óleo cru ao solo já apresentou efeito tóxico à atividade inicial. No entanto, no 15º dia houve considerável aumento da atividade enzimática, atingindo cerca de 30 µg/g entre os tratamentos de 2 a 6 mg/g de ramnolipídio, o que indica que apesar do início do tratamento a mistura entre ramnolipídio e óleo cru ter sido altamente impactante à atividade da desidrogenase, houve uma adaptação da microbiota que conseguiu se restabelecer nos primeiros 15 dias. Aos 30 e 45 dias a concentração de 4 mg/g de ramnolipídio foi a que apresentou maior atividade, alcançando cerca de 60 µg/g. Ao 45º dia foi observada uma queda brusca na atividade em relação 30º dia para as concentrações de 0 a 2 mg/g de ramnolipídio e uma pequena queda entre as concentrações de 6 a 15 mg/g

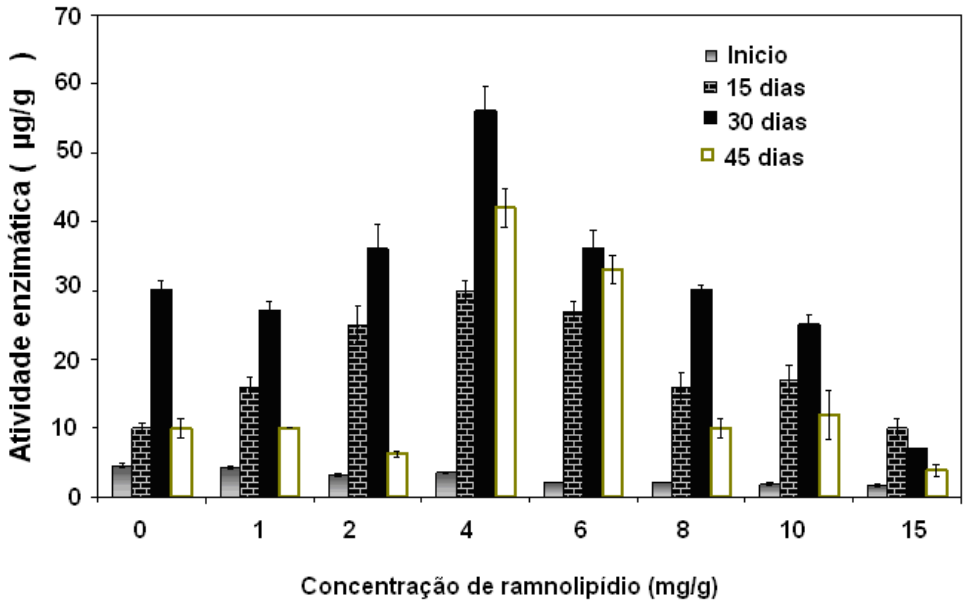


Figura 4.22: Atividade enzimática em solo para diferentes concentrações de ramnolipídio

Através da Figura 4.23 pode-se observar que nos primeiros 15 dias não houve crescimento significativo dos microrganismos hidrocarbonoclásticos e houve praticamente a mesma remoção de HTP para todos os experimentos que foi em torno de 15 a 20 %(Figura 4.21) conforme discutido anteriormente, entretanto, houve aumento acentuado da atividade enzimática podendo-se, atribuir este aumento da atividade a uma degradação preferencial do ramnolipídio e pouca degradação do óleo cru. No final do tratamento houve maior crescimento dos microrganismos hidrocarbonoclásticos entre as concentrações 2 a 8 mg/g de ramnolipídio, verificando-se que nestas concentrações também houve remoção de HTP dos 30 aos 45 dias.

A toxicidade também foi avaliada ao através do teste de germinação de sementes da espécie *Lactuca sativa* e no início dos experimentos foi observado que quanto maior a concentração do ramnolipídio menor o índice de germinação (Figura 4.24); porém, com o passar do tempo a toxicidade foi diminuindo, destacando-se que aos 45 dias, com as concentrações de 1 a 4 mg/g, houve um índice de germinação em torno de 80% e a partir de 6 mg/g o índice de germinação foi diminuindo, o que indica que maiores concentrações de ramnolipídio acarretam alta solubilidade do óleo cru, resultando em maior toxicidade, além da toxicidade do próprio surfactante observada anteriormente na Figura 4.14.

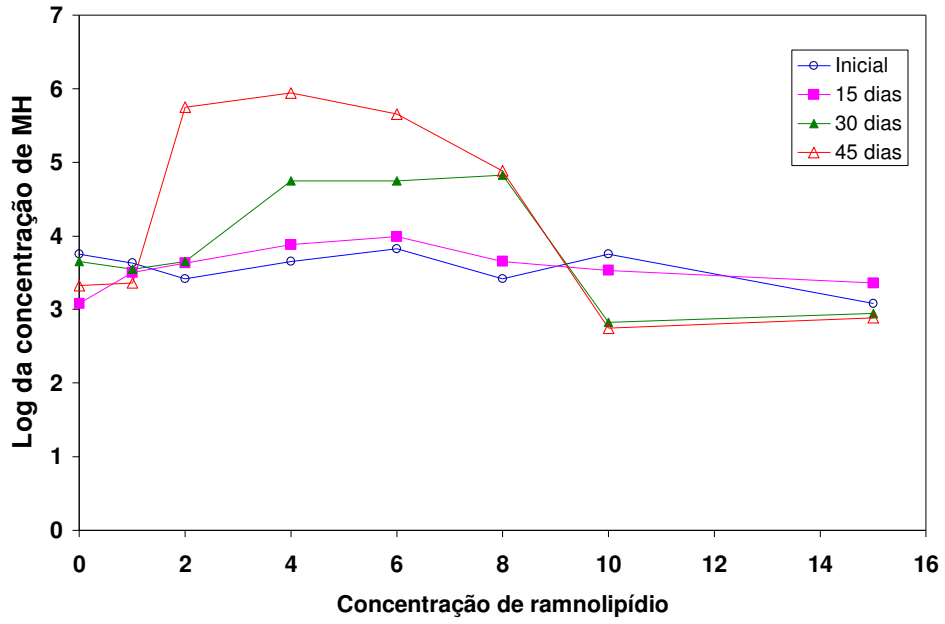


Figura 4.23: Log da concentração de microrganismos hidrocarbonoclásticos (MH) em diferentes concentrações de ramnolipídio aos ensaios de biodegradabilidade. Unidade NMP/ g de solo

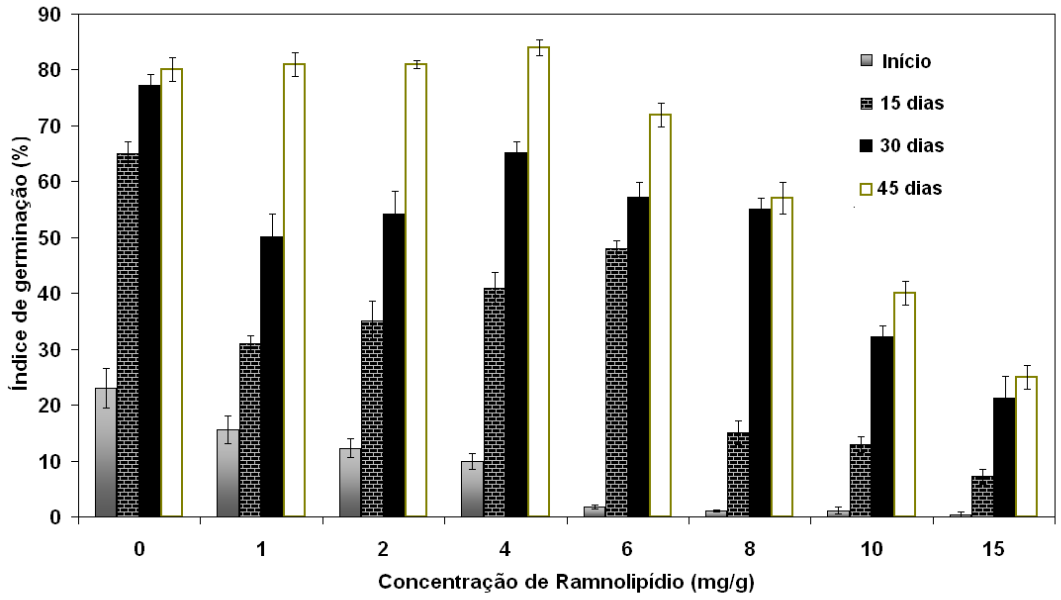


Figura 4.24: Índice de germinação através da adição de diferentes concentrações de ramnolipídio os ensaios de biodegradabilidade, utilizando a espécie *Lactuca sativa.*

Relacionando-se a remoção de HTP com a atividade da desidrogenase e com o índice de germinação, percebeu-se que a melhor concentração para se obter maior remoção de HTP foi a adição de 4 mg/g de ramnolipídio e esta concentração também apresentou maior atividade, maior população de microrganismos hidrocarbonoclásticos e alto índice de germinação. Paralelamente, os piores resultados de remoção de HTP foram os que apresentaram menor atividade, menor população de microrganismos hidrocarbonoclásticos e menor índice de germinação ao final dos experimentos

4.6.2. Ensaio de Biodegradabilidade aos 180 dias de Intemperização do Óleo

O segundo teste de biodegradabilidade foi referente às amostras retiradas aos 180 dias de exposição do óleo aos processos bióticos e abióticos relacionados à atenuação natural do contaminante, sendo que concentração inicial de HTP neste período de 180 dias era de 37 mg/g de solo. Conforme descrito anteriormente aos 180 dias a contagem de bactérias heterotróficas totais e hidrocarbonoclásticas foi de 5,4 $x10^7$ e $2,3x10^4$, respectivamente, o que indicou um crescimento em relação à contaminação inicial, sendo observada uma remoção de 21,3 % de HTP em relação ao início do tratamento cujo teor era de 47 mg de HTP /g de solo. Nesses próximos resultados também foram avaliadas as concentrações de ramnolipídio entre 1 a 15 mg/g.

Conforme demonstrado na Figura 4.25, após 15 dias houve resposta rápida de biodegradabilidade nos experimentos com as adições de 4, 6 e 8 mg/g de ramnolipídio alcançando entre 20 e 30% de remoção do óleo. Entretanto, ao final dos experimentos foi evidenciado que o tratamento com a adição de 6 mg/g apresentou mais de 40% de remoção de HTP, destacando-se como melhor tratamento.

A adição das concentrações 1 a 4 e 8 mg/g apresentaram resultados semelhantes de remoção de HTP em torno de 30 %, sendo que o controle atingiu somente 15% de remoção. Vale a pena ressaltar que as menores concentrações de ramnolipídio (1 e 2 mg/g) devem ser levadas em consideração no custo final do processo de biorremediação já que atingiram praticamente o dobro de remoção em relação ao controle. Destaca-se ainda, que as condições 10 e 15 mg/g apresentaram também resultados superiores ao controle no final do tratamento, sugerindo que a adição

dessas concentrações num teor inicial de TPH abaixo de 40 mg/g e numa microbiota mais adaptada e crescida, pode ser menos impactante à biodegradabilidade.

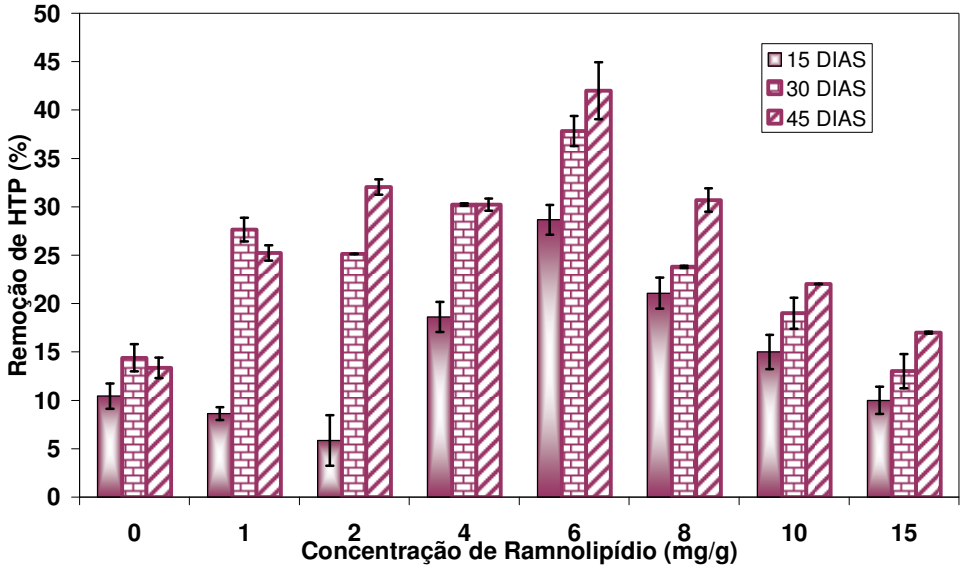


Figura 4.25: Remoção de HTP ao longo do tempo em 7 diferentes ensaios de biodegradabilidade após 180 dias de exposição do solo às intempéries

Em relação à atividade do solo, observou-se, na Figura 4.26, que logo no início, a adição do ramnolipídio ao solo contaminado com óleo cru foi extremamente impactante na atividade do solo, pois à medida que a concentração do ramnolipídio era maior a atividade microbiana do solo foi diminuindo. A partir dos 15 dias houve considerável aumento da atividade microbiana, destacando-se que aos 30 e 45 dias a concentração de 6 mg/g de ramnolipídio foi a que apresentou maior atividade alcançando cerca de 100 µg/g de atividade enzimática. Para o tratamento denominado controle, a atividade enzimática foi diminuindo ao longo do tempo e, paralelamente, ao final de todos os tratamentos a atividade estava abaixo do inicial, configurando o óleo cru presente no solo poderia estar numa fração mais recalcitrantes e difíceis de serem biodegradadas mesmo na presença do biossurfactante. No entanto, a adição das diferentes concentrações do biossurfactante contribuíram para aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos evidenciada pelo aumento da remoção de HTP em relação ao controle. Segundo BANAT (1995) um dos fatores limitantes ao processo de biorremediação é a baixa disponibilidade de alguns contaminantes para que se configure a ação dos microrganismos e esta baixa solubilidade pode ser aumentada

pela adição de biossurfactantes. Adicionalmente, a Figura 4.27 mostra a contagem de microrganismos hidrocarbonoclásticos em diferentes concentrações do ramnolipídio, observando-se que a população de microrganismos cresceu consideravelmente aos 15 dias permanecendo praticamente a mesma entre as concentrações de 1 a 15 mg/g. Entretanto, aos 30 e 45 dias houve queda da população dos microrganismos hidrocarbonoclásticos, sugerindo falta de fontes de nutrientes essencial ao metabolismo das bactérias ou a presença de frações mais recalcitrantes ao final do processo conforme mencionado anteriormente.

A Figura 4.28 mostra o índice de germinação ao longo dos 45 dias de ensaio de biodegradabilidade. Observou-se que logo no início e aos 15 dias de biodegradabilidade, foi possível avaliar que a adição de 1 e 2 mg/g contribui para um aumento do índice de germinação, tomando-se como base o controle, porém, a medida que a concentração de ramnolipídio foi aumentando, foi observado diminuição do índice de germinação também em relação ao controle. Entretanto, no final dos experimentos, todos os tratamentos apresentaram bons índices de germinação entre 70 e 85%, apresentando baixa toxicidade ao final de todos os tratamentos.

Novamente, relacionando-se a remoção de HTP com a atividade da desidrogenase, contagem de microrganismos hidrocarbonoclásticos e índice de germinação, percebeu-se que o melhor resultado de remoção de HTP foi a adição de 6 mg/g de ramnolipídio que foi o que apresentou maior atividade da desidrogenase, apresentando bons índices de germinação.

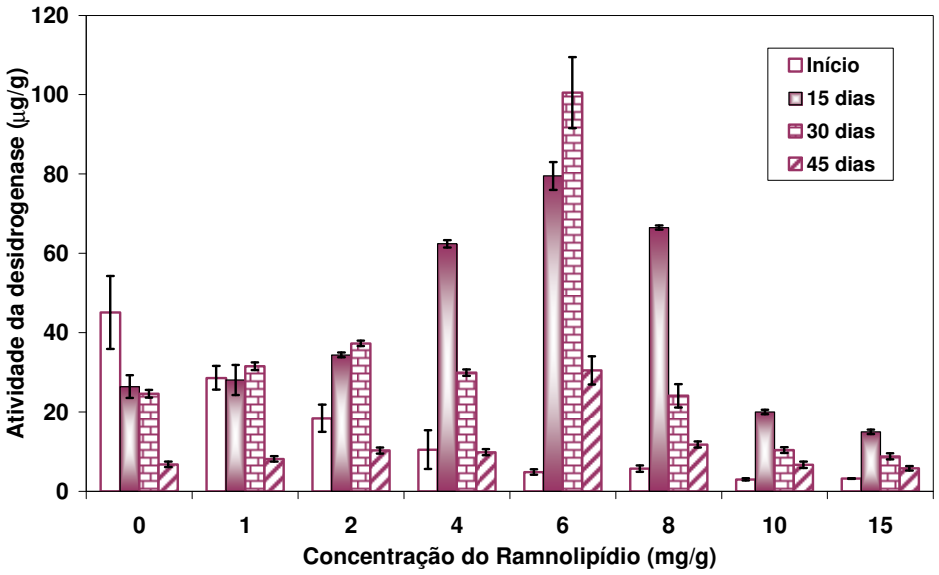


Figura 4.26: atividade enzimática em termos de µg de TPF (Trifenilformazan) por g de solo em 24h.

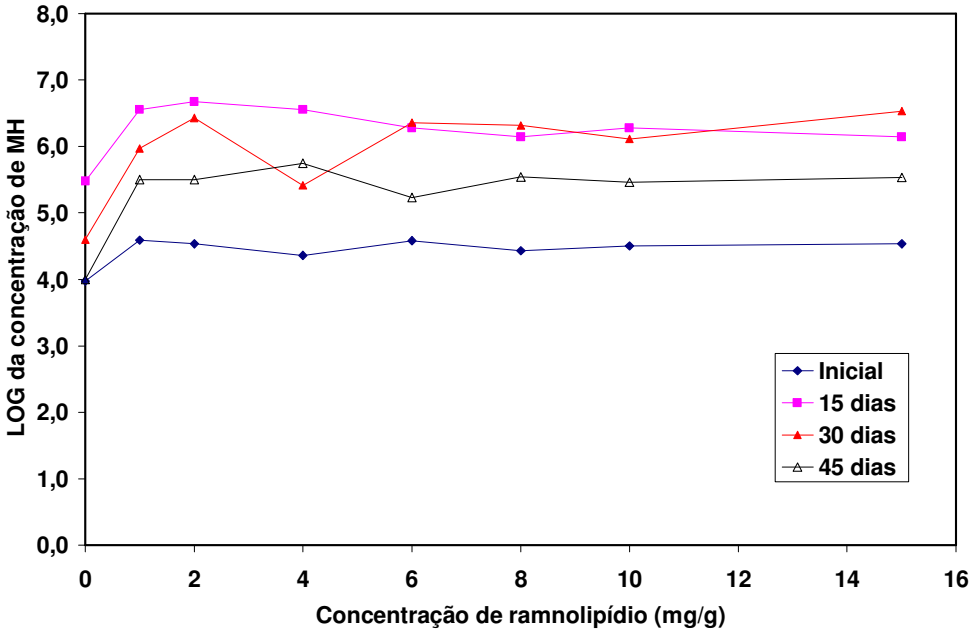


Figura 4.27: Log da concentração de microrganismos hidrocarbonoclásticos (MH) em diferentes concentrações de ramnolipídio nos ensaios de biodegradabilidade. Unidade: NMP/ g de solo

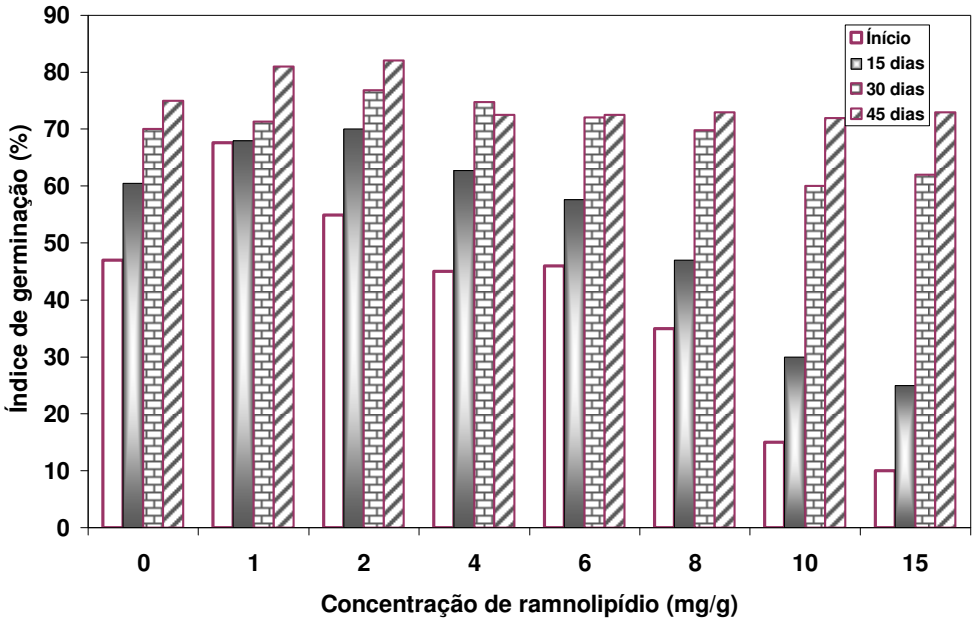


Figura 4.28: Índice de germinação através da adição de diferentes concentrações de ramnolipídio nos ensaios de biodegradabilidade, utilizando a espécie *Lactuca sativa.*

4.6.3. Ensaio de Biodegradabilidade aos 420 dias de Intemperização do Óleo Aderido ao Solo

O terceiro teste de biodegradabilidade foi referente às amostras retiradas aos 420 dias de exposição do óleo aos processos bióticos e abióticos apresentando aproximadamente 23 mg/g de HTP. Aos 420 dias a contagem de bactérias heterotróficas totais e hidrocarbonoclásticas foram de 1,2 $x10^7$ e $1,1x10^5$ respectivamente, o que indicou crescimento em relação à contaminação inicial e ainda foi observada que neste tempo houve remoção de HTP em torno de 50%. Nestes ensaios foram avaliadas as mesmas condições experimentais da contaminação inicial e aos 180 dias. A Figura 4.29 mostra a remoção de HTP em diferentes concentrações de ramnolipídio, podendo-se observar que os tratamentos com adição de 1 a 4 mg/g foram os que apresentaram maior remoção de HTP (entre 64 a 76,5 % de remoção), sendo que a maior remoção foi com a adição de 2 mg/g. A partir da concentração de 6 mg/g não houve praticamente diferença entre as diferentes adições de ramnolipídio que apresentaram remoções entre 40 e 45%, entretanto, todas bem acima do controle que removeu apenas 12% de HTP.

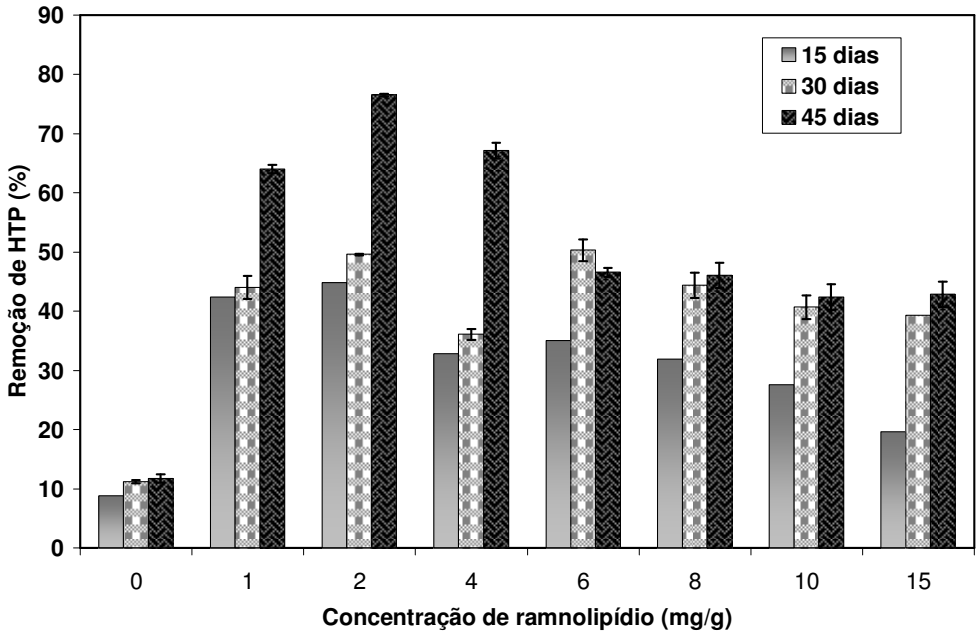


Figura 4.29: Remoção de HTP ao longo do tempo em 7 diferentes ensaios de biodegradabilidade após 420 dias de exposição do solo às intempéries.

Analisando-se a Figura 4.30, observa-se que a adição do ramnolipídio no início do tratamento não foi prejudicial à atividade da desidrogenase conforme observado anteriormente através nos outros ensaios que foram discutidos nas Figuras 4.22 e 4.26. Entretanto, alguns fatores podem explicar esse fato como o teor de óleo cru que nos experimentos atual já havia diminuído cerca de 50% em relação à contaminação inicial, não sendo tão tóxico ao solo. Outra explicação seria o fato que a microbiota do solo aumentou em uma ordem de grandeza em relação ao inicio da contaminação conforme mostrado anteriormente na Tabela 4.4. Aos 180 dias já se observava aumento da população microbiana, mas como havia ainda uma concentração alta de óleo no solo (≈ 37 mg/g) neste período, a adição do ramnolipídio acarretou o aumento da solubilidade do óleo e, consequentemente, o aumento da toxicidade e diminuição da atividade enzimática, conforme discutido anteriormente. Dessa forma, com pouco teor de óleo cru e com o aumento da população microbiana, pode-se adicionar concentrações maiores de ramnolipídio sem que esta adição cause um impacto muito negativo à atividade da desidrogenase. Observa-se que a atividade da desidrogenase pouco aumentou até os 30 dias, observando-se ainda que em algumas concentrações (2,6,8,10 e 15 mg/g) aos 15 dias houve pequena diminuição da atividade em relação ao início, o que pode ser um indício de que as frações removidas pela ação do ramnolipídio eram mais tóxica à microbiota do solo, entretanto, ao final do tratamento

entre as concentrações 1 e 6 mg/g de ramnolipídio houve aumento da atividade da desidrogenase e são justamente os tratamentos que mais influenciaram na remoção de http, sendo que a concentração de 2 mg/g foi a que apresentou maior remoção de HTP. Entretanto, este aumento da atividade nos ensaios anteriores de biodegradabilidade (0 e 180 dias) não foi observado após 45 dias, sugerindo que ao se tratar um solo contaminado com baixo teor de óleo residual a adição de nutrientes no início do tratamento é suficiente para manter a atividade dos microrganismos do solo em períodos superiores a 45 dias.

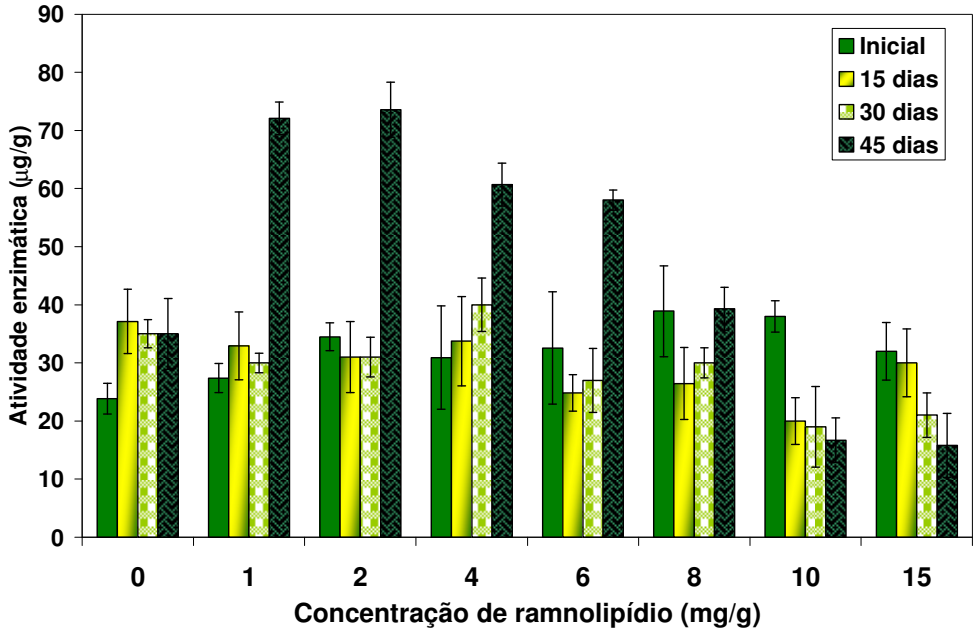


Figura 4.30: atividade enzimática em termos µg de TPF (Trifenilformazan) por g de solo em 24h.

Através da contagem de microrganismos hidrocarbonoclásticos mostrada na Figura 4.31 foi observado que aos 30 dias de ensaio de biodegradabilidade os tratamentos que se destacaram com maior população de microrganismos hidrocarbonoclásticos foram a adição das concentrações 1, 2, 4 e 6 mg/g de ramnolipídio e aos 45 dias o maior crescimento ocorreu para as concentrações 1, 2 e 4 mg/g de ramnolipídio. Relacionando estes tratamentos com a remoção de HTP, observou-se que as concentrações 1,2,4 mg/g de ramnolipídio apresentaram maior remoção de HTP em relação aos outros tratamentos. Não houve crescimento significativo para os

tratamentos com adição de 8 a 15 mg/g de ramnolipídio ao longo dos 45 dias, da mesma forma que a remoção de HTP não foi acentuada nestes tratamentos.

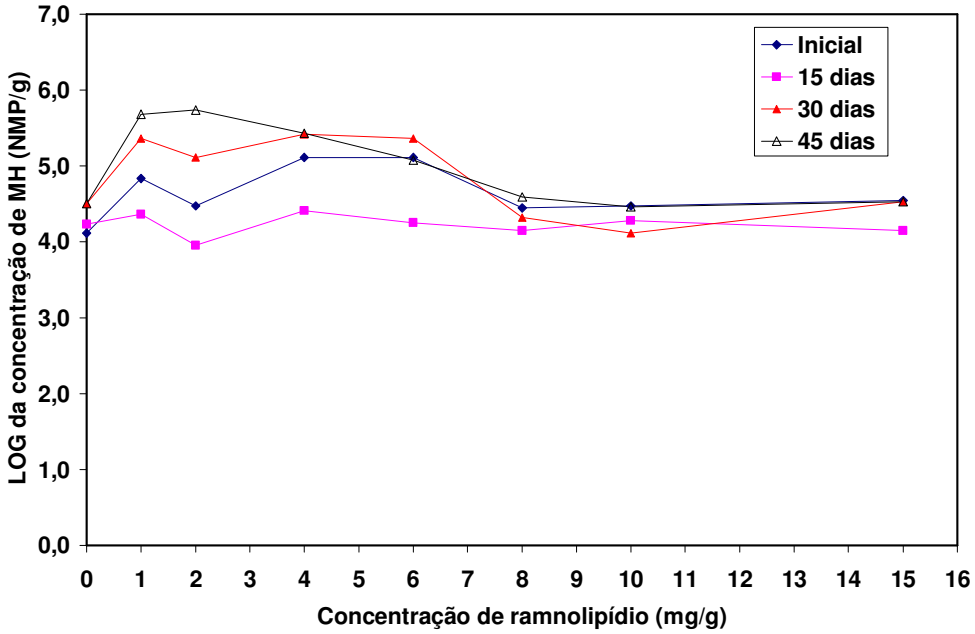


Figura 4.31: Log da concentração de microrganismos hidrocarbonoclásticos (MH) em diferentes concentrações de ramnolipídio aos ensaios de biodegradabilidade

Observou-se, pela Figura 4.32, que houve pequena diminuição do índice de germinação à medida que se aumentou a concentração do ramnolipídio, cujas razões já foram intensamente discutidas anteriormente nos experimentos anteriores. Aos 45 dias de ensaio de biodegradabilidade o índice de germinação alcançou cerca de 70% até a adição de 6 mg/g de ramnolipídio; entretanto, a partir desta concentração foi observado um decréscimo no índice de germinação, provavelmente pela toxicidade do ramnolipídio e pela alta solubilidade do óleo. Contudo, o índice de germinação ainda foi superior ao do início dos ensaios de biodegradabilidade, acarretando a diminuição da toxicidade ao final do tratamento.

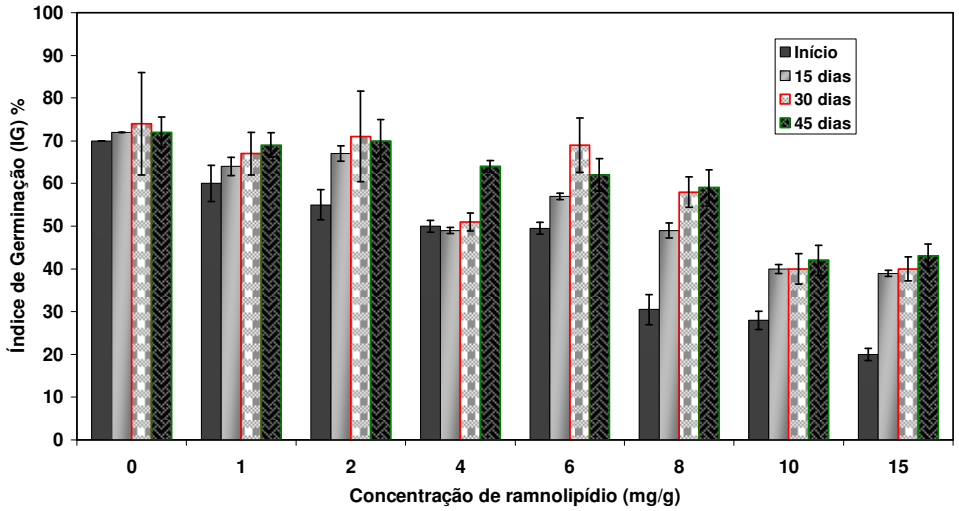


Figura 4.32: Índice de germinação através da adição de diferentes concentrações de ramnolipídio nos ensaios de biodegradabilidade, utilizando a espécie *Lactuca sativa.*

4.6.4. Relacionando o tempo de exposição do solo contaminado aos processos bióticos e abióticos de atenuação natural com a aplicação do ramnolipídio nos ensaios de biodegradabilidade

Investigando-se a adição do ramnolipídio logo no início de uma contaminação, após 180 dias e após 420 dias foi possível observar que no início, provavelmente, pelo impacto causado pelo óleo cru ao solo, a adição do ramnolipídio não foi totalmente benéfica ao tratamento do solo já que em alguns tratamentos houve pouco ou nenhum incremento em relação ao tratamento controle. A remoção de HTP em relação ao controle foi entre 1,02 a 1,82 vezes maior até a concentração de 8 mg/g de ramnolipídio, sendo que os tratamentos com 10 e 15 mg/g tiveram efeito negativo, conforme discutido anteriormente. O impacto negativo causado no início de todos os tratamentos foi consideravelmente reduzido ao final dos experimentos até a concentração 8 mg/g, indicando que com a otimização do processo de biorremediação pode-se chegar a bons resultados de biodegradabilidade até uma certa concentração de ramnolipídio com pouca toxicidade.

Entretanto, após 180 dias de atenuação natural houve um crescimento da microbiota onde se observou aumento da população de 2,3 x 10^6 para 5,4 x 10^7 nos heterotróficos totais e de 2,0x10^3 para 2,3x10^4 para os hidrocarbonoclásticos, ou seja, aumentou uma ordem de grandeza. Paralelamente, com o passar do tempo, o óleo

tendeu a ficar mais sorvido à matriz do solo, causando diminuição da disponibilidade deste contaminante para ação dos microrganismos. As frações mais leves e mais solúveis do óleo tendem a serem lixiviadas, permanecendo no solo as frações mais insolúveis que são mais facilmente aderidas ao solo (RISER-ROBERT, 1998). Neste contexto, a adição do ramnolipídio teve papel fundamental para aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos e a eficácia do processo de biorremediação. A importância da adição do ramnolipídio pode ser evidenciada quando se compara todos os tratamentos em relação ao controle, verificando-se que em todos eles o efeito positivo da remoção de HTP foi de 1,2 a 3,2 vezes maior que o controle. Em relação à concentração ótima de ramnolipídio a ser adicionada, precisou-se, no início, de apenas 4 mg/g e aos 180 dias a de 6 mg/g de ramnolipídio, sugerindo que quanto maior a sorção do óleo no solo, maior a quantidade de ramnolipídio a ser adicionada ao solo para se obter melhores resultados de remoção de TPH.

Após 420 dias de atenuação natural do óleo foi verificado que todos os tratamentos estão bem acima do controle, evidenciando-se, mais uma vez, a necessidade da adição do ramnolipídio que aumentou que apresentou remoções de HTP cerca de 3,5 a 6,5 vezes maior que o controle. Contudo, com relação à concentração ótima a ser adicionada de ramnolipídio, foi verificado que baixas concentrações de ramnolipídio foram suficientes para remover maior concentração de óleo aderido ao solo. No entanto, entende-se que com o passar do tempo o óleo tende a ficar mais sorvido ao solo necessitando de uma concentração maior de surfactante para solubilizá-lo e dessorvê-lo para disponibilizá-lo para o metabolismo dos microrganismos; porém, como o teor de óleo no solo no início do tratamento foi relativamente baixo (~ 23 mg/g de HTP no solo), não houve necessidade de se adicionar altas concentrações de ramnolipídio para solubilizar e/ou dessorver o óleo aderido ao solo. Dessa forma, sugere-se que pode haver uma relação entre teor de óleo no solo e a concentração do ramnolipídio. A Tabela 4.13 mostra o teor de óleo no inicio do tratamento, o teor de ramnolipídio e a razão entre óleo cru e ramnolipídio.

Dessa forma, sugere que logo no início da contaminação a adição do ramnolipídio pode ser cerca de 10 vezes menor que o teor de óleo no solo. Entretanto, numa contaminação intermediária (cerca de 6 meses) esta relação cai para cerca de 5 a 6 vezes menor que o teor de óleo no solo. Uma justificativa para este fato seria que o alto teor de ramnolipídio foi necessário, devido ao fato do óleo ter sido pouco degradado durante os seis primeiros meses de exposição aos processos bióticos e abióticos e, ainda, com o passar do tempo o óleo foi sendo adsorvido, cada vez mais ao solo, limitando a ação dos microrganismos para degradá-lo e, dessa forma, como o

óleo tende a ser extremamente adsorvido à matriz do solo (FINE *et al.*, 1997; SINGH *et al.* 2007) limitou-se a taxa de biodegradação (NOORMAM *et al.* 2002), necessitando-se de um teor maior de ramnolipídio em relação ao teor de óleo no solo. No entanto, com cerca de 50% de remoção de HTP, observada após 420 dias, necessitou-se de pouca concentração de ramnolipídio até mesmo para dessorver o óleo do solo.

Dessa forma, em termos de biodegradabilidade e de custos, sugere-se deixar o óleo autodepurar-se, se as condições ambientais e de riscos permitirem, até certo tempo, observando-se, sempre, o crescimento, a atividade da microbiota, a remoção de HTP e os testes de ecotoxicidade. Assim, após a degradação natural de cerca de 50% do óleo cru pode-se alcançar cerca de 90% de remoção de HTP com adição de baixo teor de ramnolipídio.

A seguir as três principais condições de remoção de HTP em diferentes tempos e com as diferentes concentrações de ramnolipídio mostradas na Tabela 4.13 serão refeitas em escala ampliada para serem observados outros parâmetros não verificados anteriormente como toxicidade com *Eisenia fetida, Lycopersicon esculentum,* pH, umidade e HTP por cromatografia gasosa.

Tabela 4.13: Teor de óleo no inicio e no final em relação à concentração ótima de ramnolipídio.

Teor de óleo no início (mg/g)	Teor de ramnolipídio (mg/g)	Teor de óleo no final (mg/g) após 45 dias	Razão (óleo/ramnolipídio)
47	4	19	11,75
37	6	21	6,2
23	2	5,4	11,5

.

4.6.5. Investigação dos três principais tratamentos através da adição de ramnolipídio

A seguir serão relatados alguns parâmetros fundamentais para o sucesso da técnica de biorremediação, através dos principais tratamentos observados como condição ótima nos ensaios de biodegradabilidade para cada tempo diferente. Nos textos

subsequentes, serão utilizados termos como SOLO INICIAL que indica o tratamento de solo numa contaminação recente com adição de 4mg/g de ramnolipídio; o termo SOLO 180 DIAS que indica solo com contaminação de óleo cru após 180 dias de atenuação natural e com adição de 6mg/g de ramnolipídio e por último o termo SOLO 420 DIAS que indica, da mesma forma, a atenuação natural do solo após 420 dias, sendo que a adição de ramnolipídio utilizada foi de 2 mg/g nos ensaios de biodegradabilidade. Esses ensaios foram conduzidos em biorreatores em escala ampliada durante 45 dias e foram refeitos conforme relatado anteriormente para serem analisados outros testes de toxicidade com *Eisenia fétida e Lycopersicon esculentum,* além de pH, umidade e HTP por cromatografia gasosa.

4.6.5.1 – perfil da remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) nos três diferentes tratamentos.

O perfil da remoção de HTP foi obtida através da avaliação do percentual de HTP no solo no intervalo de 7 em 7 dias. A Figura 5.33 mostra que o percentual de HTP foi, praticamente, constante a partir do 20º dia para os três experimentos. De fato, nos experimentos anteriores em escala reduzida, foi observada pouca diferença de remoção dos 30 aos 45 dias, exceto para os ensaios de biodegradabilidade após 420 dias de atenuação natural onde foi observado um aumento acentuado de remoção de HTP após os 30 dias. Nos experimentos atuais como havia maior quantidade de solo, a aeração por ar úmido pode ter sido prejudicada pelo maior caminho a ser percorrido do ar através do solo, limitando a remoção de HTP em até 20 ou 30 dias. Essa limitação da biodegradabilidade pode ser evidenciada através da quantificação de microrganismos heterotróficos totais que apresentaram uma tendência à estabilização ou redução entre 14 e 20 dias de experimento (Figura 4.34) e para os microrganismos hidrocarbonoclásticos entre 20 e 27 dias (Figura 4.35). Dessa forma sugere-se que os experimentos conduzidos numa escala ampliada devem ser conduzidos em no máximo 30 dias para manter as condições ótimas do processo. Nos experimentos atuais, todos os três tratamentos denominados de SOLO INICIAL, SOLO 180 DIAS E SOLO 420 DIAS apresentaram uma remoção de HTP em torno de 50%, diferentemente dos 60 e 75% observados nos ensaios de biodegradabilidade conduzidos no início e aos 420 dias de atenuação natural, provavelmente porque numa escala ampliada, a homogeneização da amostragem do solo a ser avaliado pode ser prejudicada e embora tenha se tentado o máximo de homogeneização, foi observado que os resultados aqui obtidos estão um pouco diferentes dos ensaios anteriores, conduzidos em biorreatores em escala reduzida.

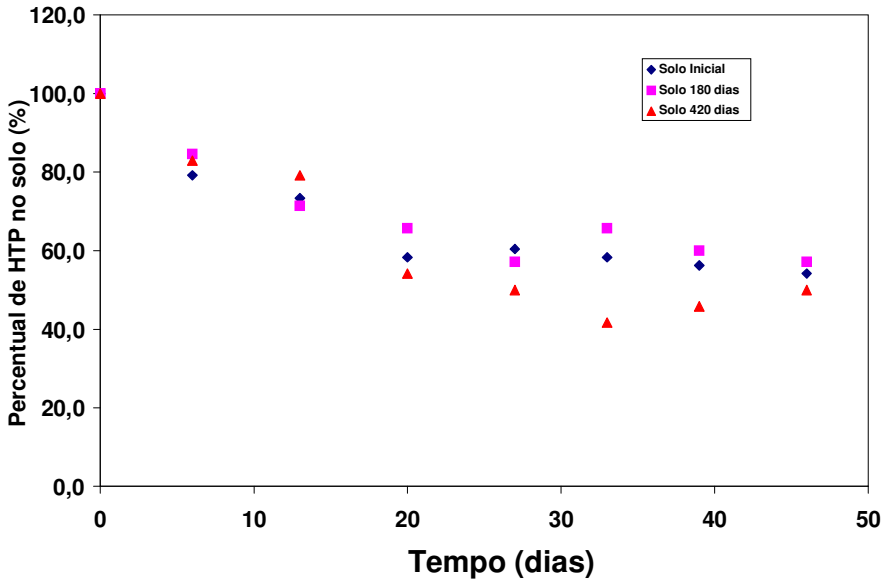


Figura 4.33: Percentual de HTP em três diferentes tratamentos em solo contaminado em tempos diferentes.

4.6.5.2 – Outros parâmetros analisados durante os ensaios de biodegradabilidade.

A Figura 4.34 apresenta a quantificação da população de bactérias heterotróficas totais aeróbias (BHT) nos diferentes experimentos. Ressalta-se que essa população manteve-se elevada entre o 20º e 27º dia e a partir dessa data houve queda brusca da população, principalmente, para o SOLO INICIAL e SOLO 420 DIAS, sendo recuperada nas duas últimas semanas. Em relação às bactérias hidrocarbonoclásticas (Figura 4.35) o maior crescimento foi observado entre 14 e 20 dias para o SOLO INICIAL, entre 20 e 27 dias para o para o SOLO 180 DIAS e SOLO 420 DIAS, também se observando uma queda da população entre 27º e 34º dia. Dentre vários fatores que podem afetar a população de microrganismos está a diminuição de pH e a redução da umidade e dessa forma, esses dois parâmetros foram, também, avaliados.

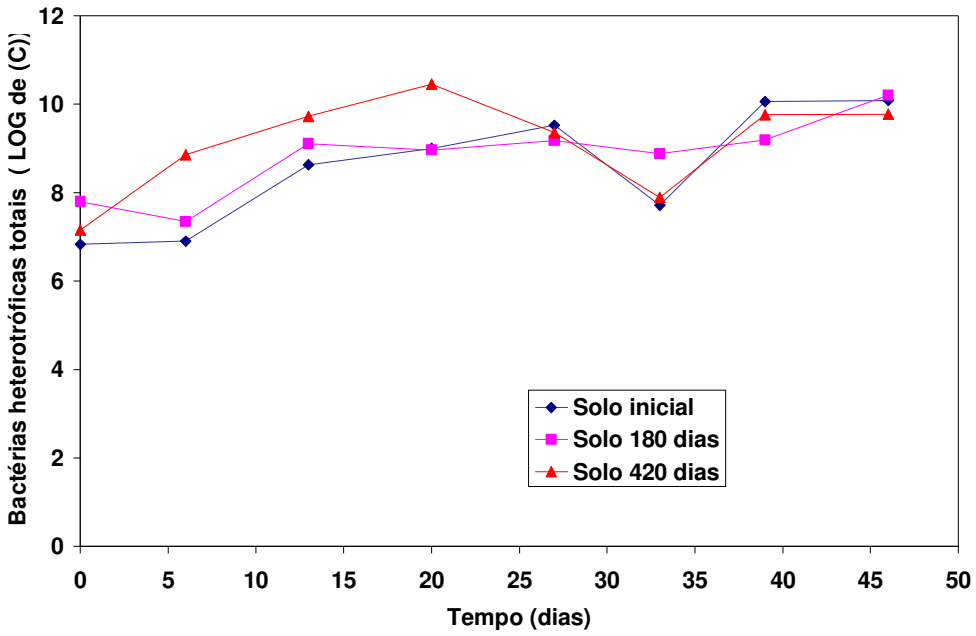


Figura 4.34: LOG da concentração das bactérias heterotróficas totais. (C) = unidade formadora de colônia (UFC) por grama de solo.

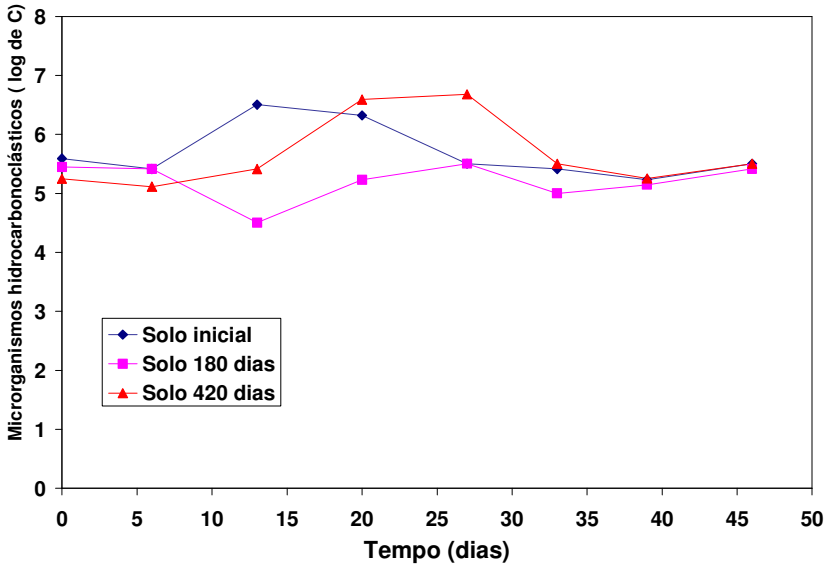


Figura 4.35: LOG da concentração das bactérias hidrocarbonoclásticas. (C) = número mais provável (NMP) por grama de solo.

A Figura 4.36 mostra o controle da umidade ao longo do tempo, verificando-se que houve queda brusca da umidade ao 34º dia de ensaios de biodegradabilidade em todos os experimentos, devido ao fato da água que alimenta o ar úmido ter acabado

durante um feriado prolongado. Segundo LI *et al.* (2000) o fator umidade pode ser limitante para o crescimento microbiano e para a biodegradação e, embora esta falha no processo tenha prejudicado a população microbiana, conforme observado nas Figuras anteriores 4.34 e 4.35, esta diminuição da população não prejudicou os resultados de remoção de HTP, pois foi verificado que a degradação ocorreu até o 20º dia. Contudo, a umidade foi ajustada ocorrendo, após 7 dias, um certo crescimento para as bactérias heterotróficas totais para os três experimentos (Figura 5.34); no entanto, não foi observado crescimento das bactérias hidrocarbonoclásticas (Figura 5.35)

Nos experimentos SOLO 180 E 420 DIAS, o pH do solo foi ajustado inicialmente para próximo da neutralidade, entretanto foi observado que a adição de ramnolipídio diminuiu o valor do pH (Figura 4.37), sendo observada uma queda entre 14 e 20 dias e outra mais acentuada entre 27 e 34º dia, o que também contribuiu para a diminuição da população microbiana. Alguns microrganismos podem sobreviver em ampla faixa de pH, enquanto outros podem tolerar somente pequenas variações. O pH ótimo para mineralização de hidrocarbonetos se encontra na faixa de 6,5 a 8,0 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, a pequena queda de pH observada a partir do 20º dia não afetou a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos; entretanto, ao 34º dia os valores de pH abaixo de 6,0 prejudicaram a população microbiana e a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos. Foi observado, ainda, que houve crescimento de fungos pela queda brusca da umidade. Os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como em meios com baixos valores de pH, por exemplo, e, ainda, suportar meios pobres em nutrientes e ainda apresentam uma capacidade de sobrevivência, em meios com baixa atividade de água, maior do que as bactérias (LEMOS *et al.* 2008). Dessa forma, devido à queda brusca da umidade houve intensificação do crescimento de fungos e tal crescimento pode ter contribuído para a diminuição do pH do solo. A Figura 4.38 mostra o crescimento de fungos nas placas de contagem de bactérias heterotróficas totais, o que acarretou a impossibilidade de contar as colônias de bactérias em concentrações elevadas.

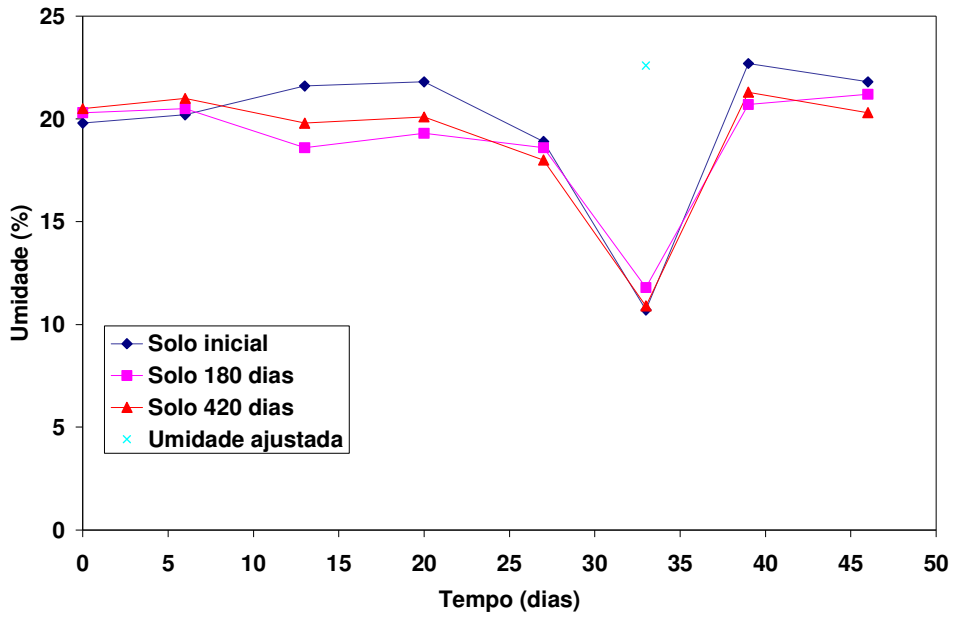


Figura 4.36: Umidade do solo após ajuste dos experimentos em 50% da capacidade de retenção de água no solo em três diferentes experimentos.

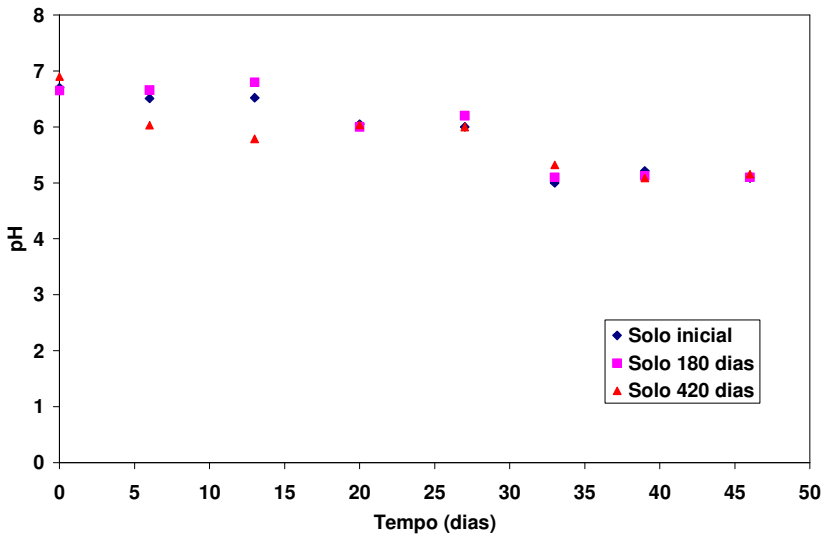


Figura 4.37: pH do solo ao longo do tempo em três diferentes tratamentos

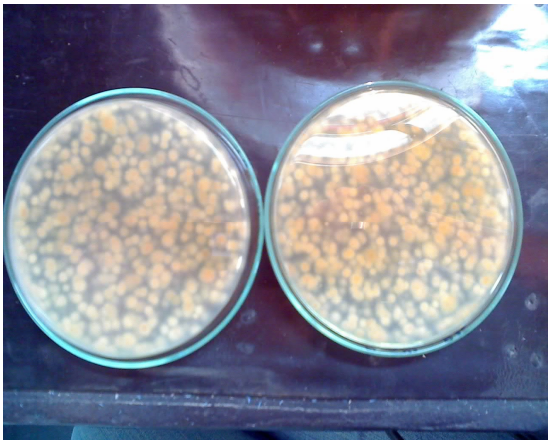


Figura 4.38: Crescimento de fungos ao 34º dia de ensaio de biodegradabilidade devido à baixa umidade do solo.

A seguir serão demonstrados alguns parâmetros avaliados no início e ao final dos experimentos como toxicidade com *Eisenia fetida e Lycopersicon esculentum,* e HTP por cromatografia gasosa.

Testes ecotoxicológicos são realizados para quantificar os efeitos de contaminantes em organismos, comunidades e ecossistemas para melhorar a precisão da avaliação dos riscos ecológicos, sendo uma ferramenta utilizada para monitorar a eficácia da biorremediação *versus* contaminação de hidrocarbonetos tanto no laboratório quanto no campo (SHIN & KIM, 2001). Dentre estes ensaios destacam-se a fitotoxicidade e mortalidade de minhocas que serão investigados a seguir.

A Figura 4.39 mostra as minhocas que conseguiram sobreviver após à exposição das mesmas ao solo contaminado nos três experimentos antes e após os ensaios de biodegradabilidade. Pode-se verificar que no início dos experimentos não houve sobreviventes para o SOLO INICIAL, SOLO 180 DIAS, no entanto, para o solo SOLO 420 DIAS foi observado 70% de mortalidade no início do tratamento. Ao final do tratamento do solo houve diminuição da toxicidade, pois o índice de mortalidade das minhocas diminuiu para 80, 50 e 30% para os experimentos SOLO INICIAL, SOLO 180 e SOLO 420 DIAS, respectivamente. Vários relatos indicam que a espécie *E. fetida* tolera bem até 1,5% de óleo cru (SAFWAT, *et al.*, 2002; CONTREAS-RAMOS *et al.*, 2006). Dessa forma, como os experimentos continham, inicialmente, entre 2 e 5% de óleo cru e ainda houve adição do biossurfactante, os resultados apresentados são coerentes; entretanto, ao final dos experimentos, com a diminuição do óleo cru e do ramnolipídio, as populações de sobreviventes aumentou.

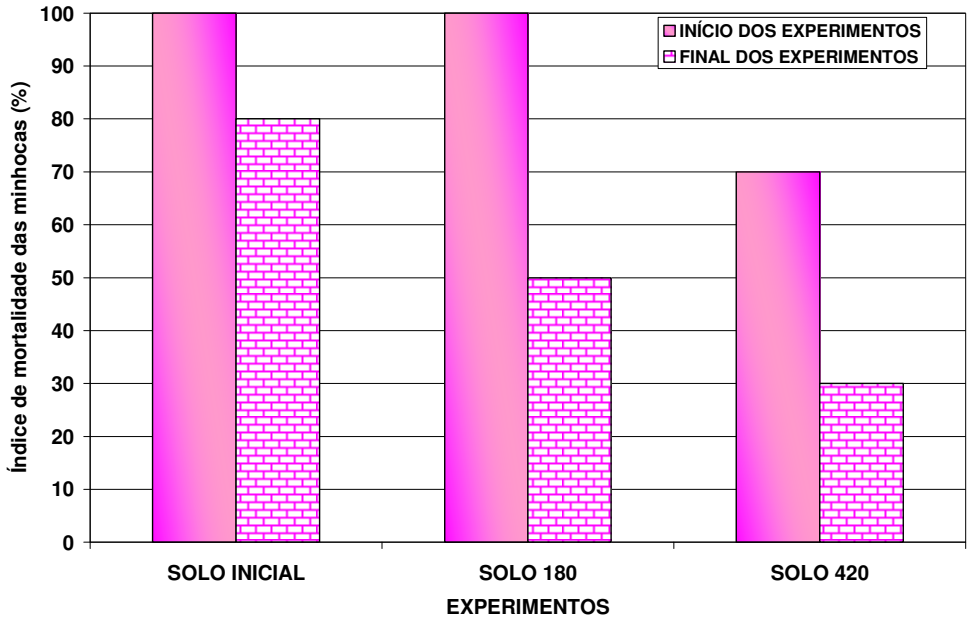


Figura 4.39: Índice de mortalidade das minhocas antes e após os ensaios de biodegradabilidade em três experimentos. Ensaios realizados com 14 dias de exposição das minhocas no solo.

A toxicidade através da espécie *Lycopersicon esculentum* (tomate) foi verificada e apresentada na Figura 4.40, verificando-se que esta espécie é extremamente sensível a altas concentrações de óleo cru, já que no BIO 1 (SOLO INICIAL) nenhuma semente germinou e, embora tenha ocorrido esta alta toxicidade no início do tratamento, no final dos ensaios, após a diminuição de cerca de 50% do óleo cru, já se observou um índice de germinação em torno de 60%. No entanto, com o passar do tempo e com a diminuição do teor de óleo cru, tanto o BIO 2 (SOLO 180 DIAS) quanto o BIO 3 (SOLO 420 DIAS) apresentaram maior tolerância para o crescimento desta espécie no início dos experimentos e, ao final, a toxicidade diminuiu ou não foi observada toxicidade.

Para corroborar com os resultados até aqui apresentados foram avaliados os perfis cromatográficos da remoção de HTP para os três experimentos. A análise dos cromatogramas obtidos permitiu verificar as diferentes mudanças ocorridas nos cromatogramas no início e no final dos experimentos. Dessa forma, esta discussão destina-se a comparar os cromatogramas qualitativamente verificando os picos dos n-alcanos e a fração não resolvida.

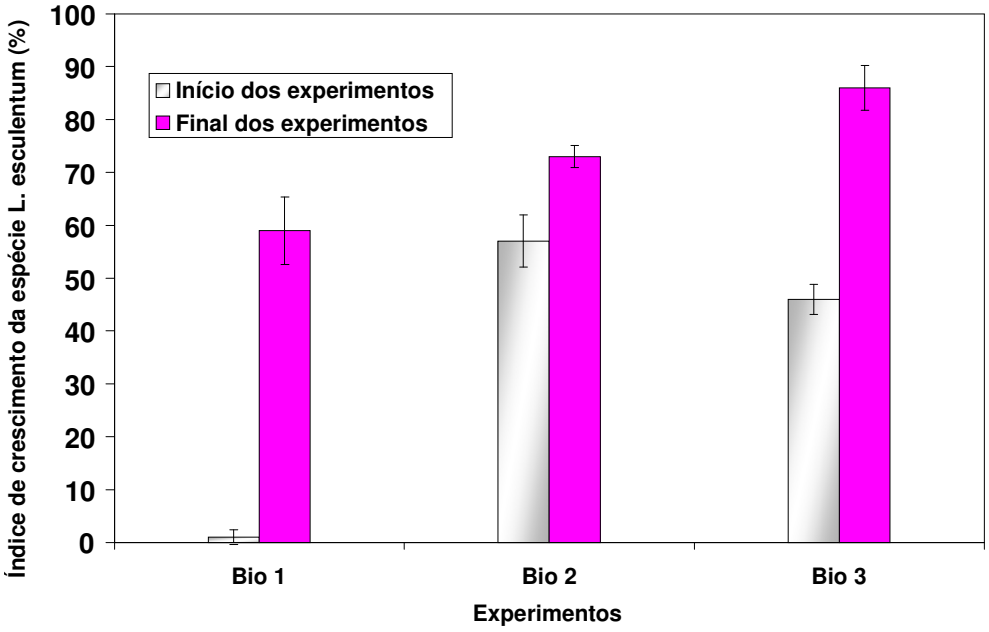


Figura 4.40: Índice de germinação da espécie *Lycopersicon esculentum* antes e após os ensaios de biodegradabilidade em três experimentos. A) BIO 1: Solo inicial; B) Solo 180 dias; C) Solo 420 dias.

As Figuras 4.41, 4.42 e 4.43 apresentam os cromatogramas relativos às amostras iniciais e finais dos experimentos do SOLO INICIAL, SOLO 180 DIAS e SOLO 420 DIAS, respectivamente, sendo possível evidenciar uma acentuada redução na concentração de HTP, por meio da diminuição da abundância dos picos característicos dos n-alcanos presentes na amostra contaminada, bem como na fração não resolvida.

Através dos cromatogramas da Figura 4.41 foi possível verificar a redução tanto dos picos característicos dos n-alcanos quanto da fração não resolvida.

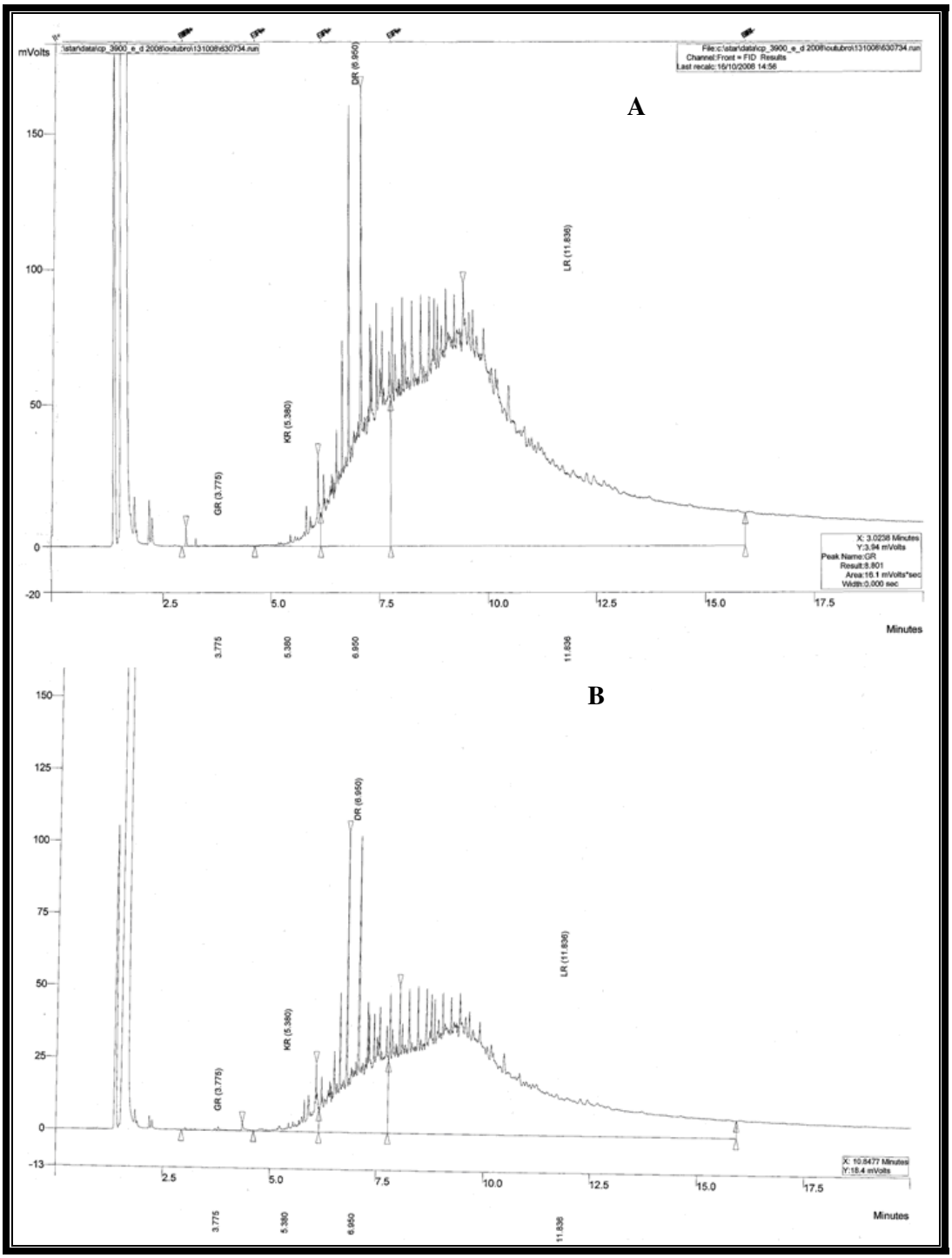


Figura 4.41: Cromatogramas do experimento do solo inicial com adição de 4mg/g de ramnolipídio. (A) início dos experimentos; (B) final dos experimentos após 45 dias de ensaio de biodegradabilidade.

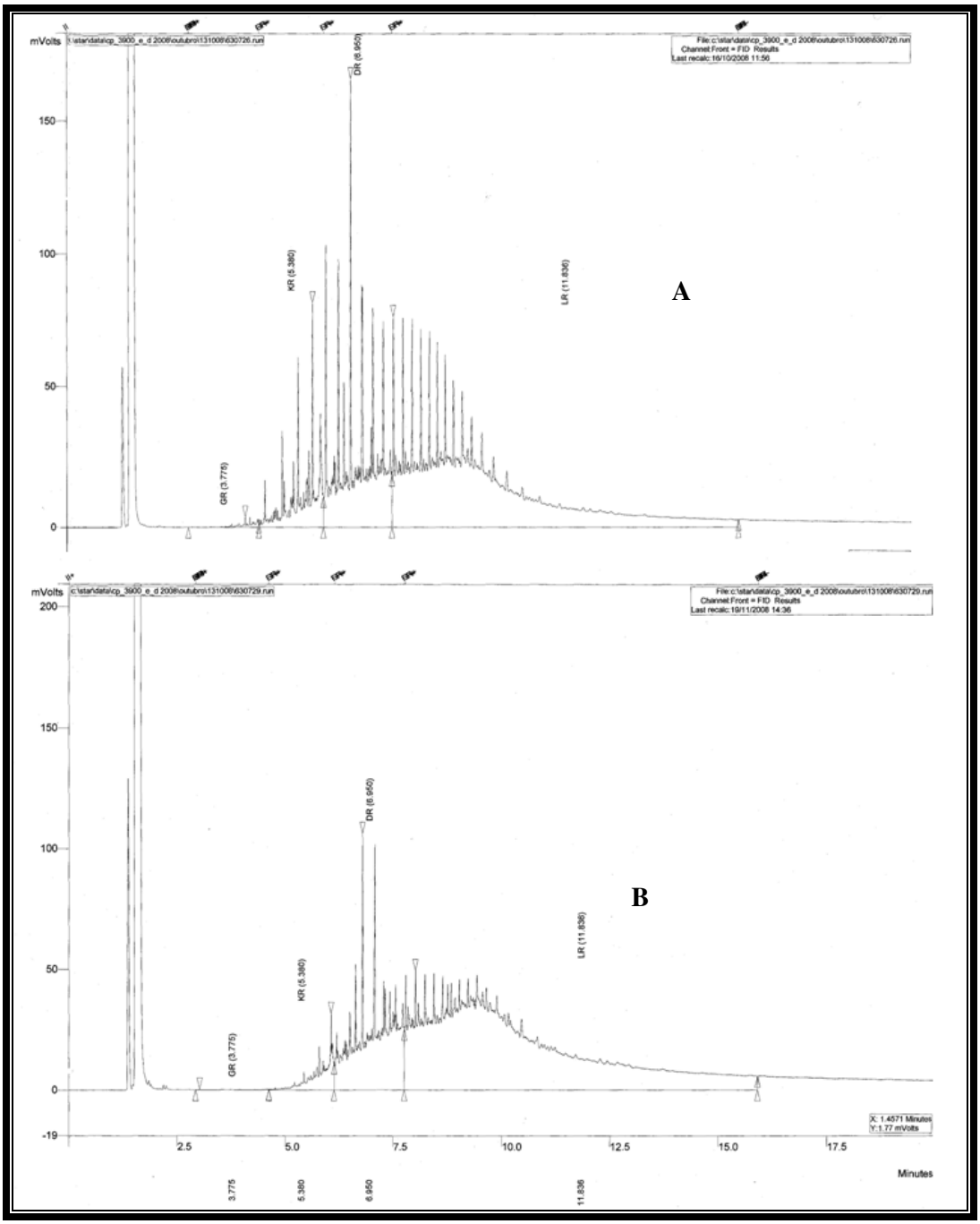


Figura 5.42: Cromatogramas do experimento do solo 180 dias com adição de 6mg/g de ramnolipídio. (A) início dos experimentos; (B) final dos experimentos após 45 dias de ensaio de biodegradabilidade.

Através dos cromatogramas da Figura 4.42 foi possível verificar maior redução nos picos característicos dos n-alcanos, no entanto a fração não resolvida foi pouco reduzida.

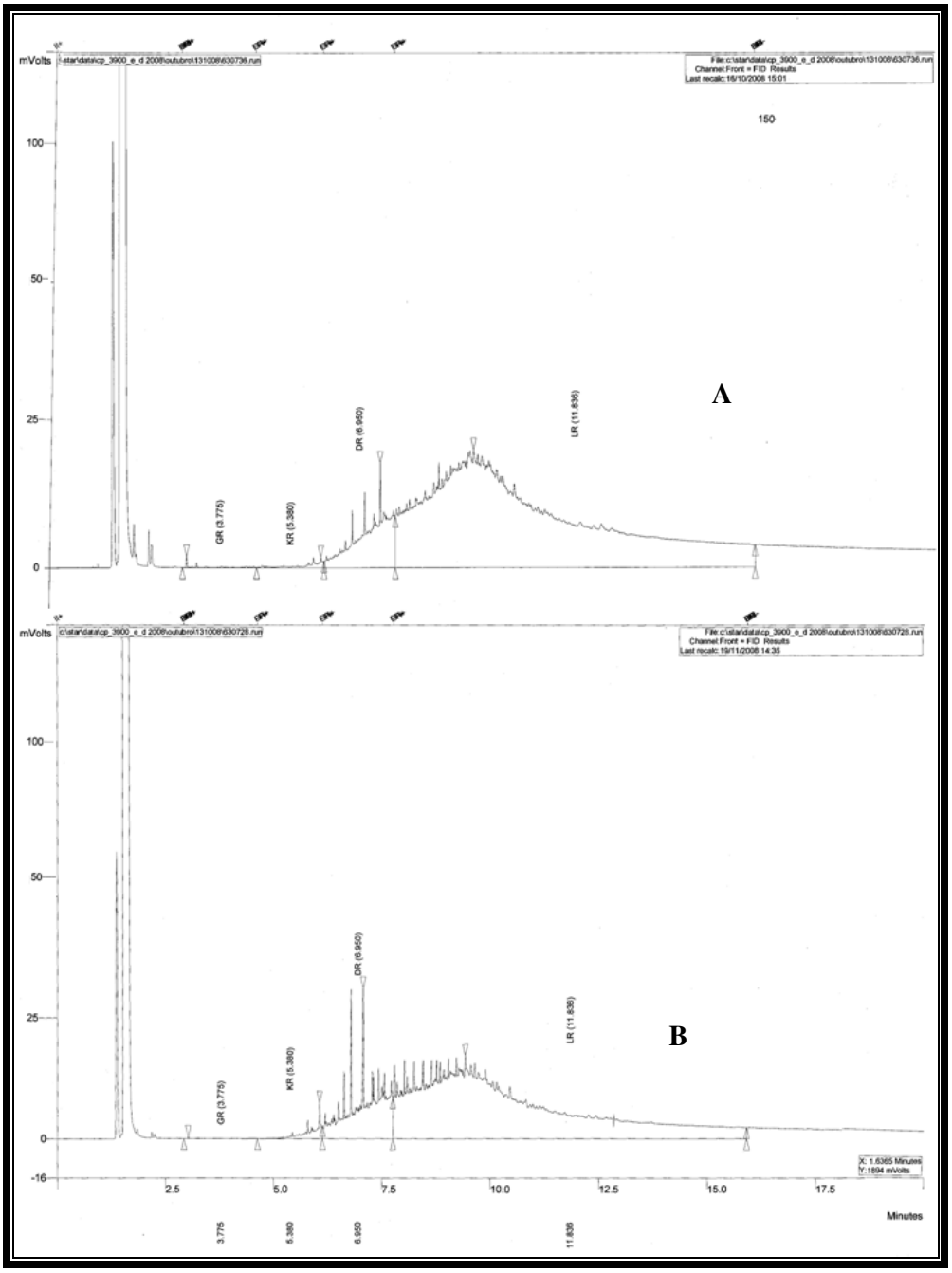


Figura 4.43: Cromatogramas do experimento do solo 420 dias com adição de 2mg/g de ramnolipídio. (A) início dos experimentos; (B) final dos experimentos após 45 dias de ensaio de biodegradabilidade.

Através dos cromatogramas da Figura 4.43 foi possível verificar maior redução da fração não resolvida e aumento dos picos característicos dos n-alcanos, sugerindo uma transformação das frações mais pesadas e recalcitrantes em frações mais leves e fáceis de serem biodegradadas caso houvesse período maior de tratamento do solo.

Apesar desses resultados serem satisfatórios, quanto a biodegradabilidade do óleo cru, foi investigado se a reaplicação do ramnolipídio após 20 dias de ensaio de biodegradabilidade seria mais vantajoso em termos de remoção de HTP e de toxicidade. A seguir serão discutidos novamente os três tratamentos onde foi adicionada, inicialmente, a metade da concentração do ramnolipídio necessária para cada tempo do solo e após 22 dias a outra metade. Nestes ensaios foram avaliados a cinética de remoção de HTP ao longo do tempo e somente os resultados finais e iniciais de toxicidade com *Eisenia fetida* e *Lycopersicon esculentum* serão discutidos, já que o intuito desses ensaios foi avaliar somente se haveria ou não maior remoção de HTP e se esses ensaios seriam mais tóxicos ou não.

O perfil da remoção de HTP foi definida através da avaliação do decaimento de HTP de 7 em 7 dias, exatamente como conduzido na aplicação única de ramnolipídio (Figura 5.31). A Figura 4.44 mostra que o houve decaimento do HTP até o final do processo, não sendo observada uma tendência a estabilidade na remoção durante os 45 dias de ensaio de biodegradabilidade, obtendo-se, ao final do processo, aproximadamente 55, 62 e 68 % de remoção de HTP para os tratamentos com SOLO INICIAL, SOLO 180 DIAS e SOLO 420 DIAS. Em termos de comparação, a remoção de HTP para esses tratamentos não foi bem acima da verificada com adição única, apesar da curva de decaimento tenha mostrado um declínio ao longo do tempo. A seguir serão avaliados alguns parâmetros para corroborar os esses resultados em termos de toxicidade para espécie *E. fetida* quanto e *L. esculentum.*

A Figura 4.45 mostra o teste de toxicidade utilizando a espécie *E. fetida,* sendo quantificados como índice de mortalidade. Nesses experimentos foi observado que o SOLO INICIAL apresentou 100 % de mortalidade, pois não houve sobreviventes no início e no final do tratamento. Entretanto, numa dose única, apesar do início do tratamento também não ter apresentado sobreviventes, no final houve 80% de mortalidade, ou seja, 20% de minhocas sobreviventes (Figura 5. 39). Indicando que em termos de toxicidade a adição em batelada de ramnolipídio pode ser mais tóxica que em dose única no caso de uma contaminação recente. A realimentação com ramnolipídio foi menos tóxica para as minhocas em relação ao SOLO 180 DIAS, pois foi observada 70 % de índice de mortalidade da espécie *E. fetida* no início do

tratamento e apenas 20% de mortalidade no final dos experimentos. Quando se compara estes resultados com a aplicação em dose única, observa-se que no início do tratamento não houve sobreviventes (100% de mortalidade) e ao final apenas 50% das minhocas sobreviveram. Para o SOLO 420 DIAS, esta realimentação foi, ainda, mais benéfica, pois não se observou mortalidade (100% de sobrevivência) nem no início e nem no final dos experimentos, entretanto conforme observado anteriormente na Figura 4.39 a adição de uma única dose de ramnolipídio apresentou 70% de índice de mortalidade no início do tratamento e 30% de mortalidade no final dos ensaios de biodegradabilidade.

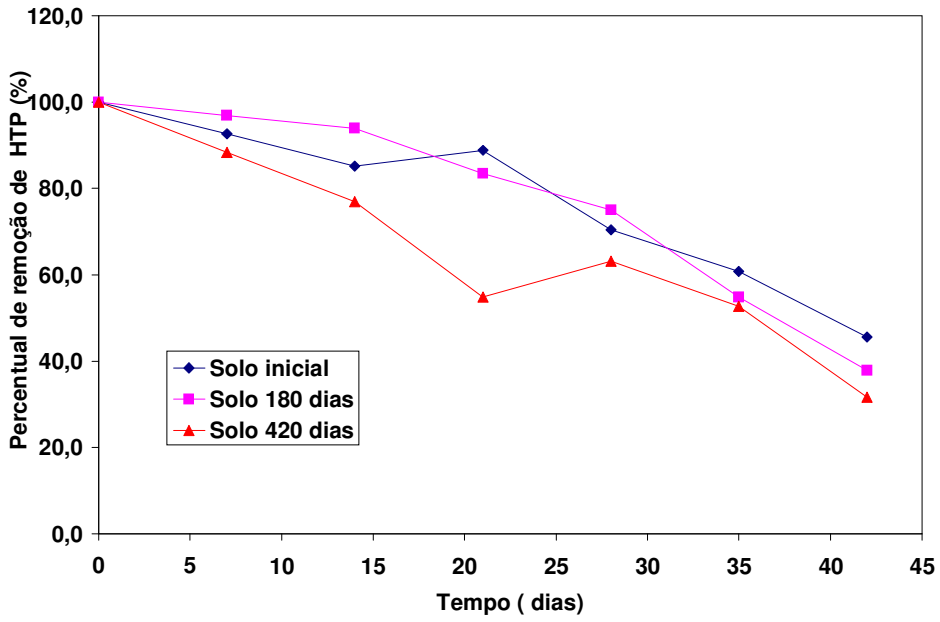


Figura 4.44: Percentual de remoção de HTP em três diferentes tratamentos em solo contaminado em tempos diferentes. Adição de metade do ramnolipídio no início do tratamento e a outra metade após 20 dias de ensaio de biodegradabilidade

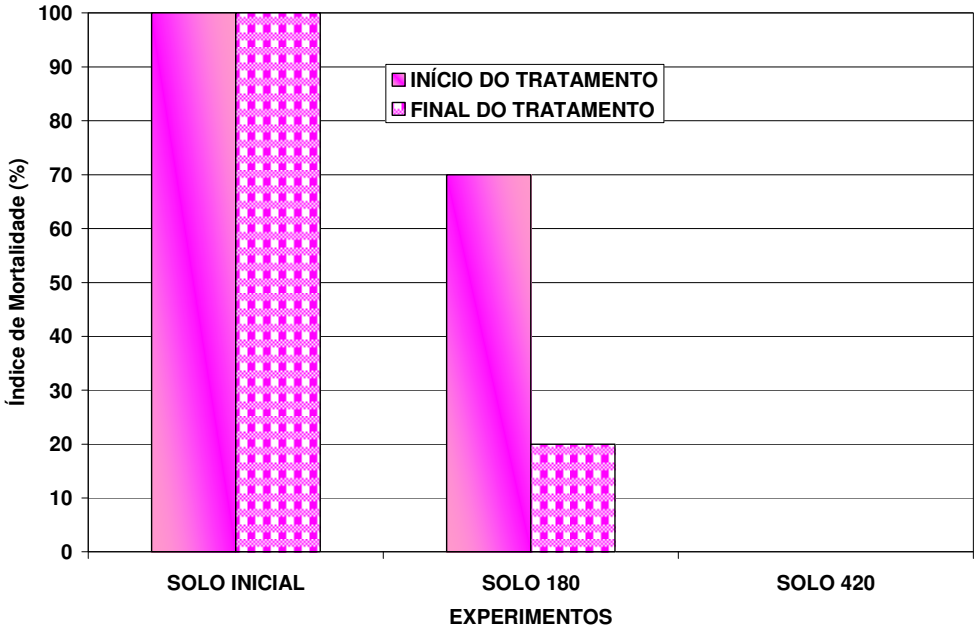


Figura 4.45: Índice de mortalidade das minhocas da espécie *E. fetida* após 14 dias. Testes realizados antes e após os ensaios de biodegradabilidade nos três experimentos com aplicação em batelada .

Os testes de toxicidade com tomates da espécie *L. esculentum* não apresentaram uma diferença significativa em relação aos experimentos anteriores com adição única de ramnolipídio; contudo, com uma pequena diminuição do índice de germinação ao final dos experimentos. A Figura 4.46 mostra que da mesma forma com a adição única de ramnolipídio, no início do tratamento com o BIO 1 (SOLO INICIAL), nenhuma semente de tomate cresceu, caracterizando que a alta toxicidade foi em decorrência da alta solubilidade do óleo cru pela adição do ramnolipídio. Houve aumento do índice de germinação para o crescimento da espécie *L. esculentum* para o tratamento BIO 3 (SOLO 420 DIAS) que passou de 45% para 60 % em comparação com o BIO 3 numa única aplicação. Entretanto, ao final do tratamento com o BIO 3 (SOLO 420 DIAS) houve diminuição do índice de germinação que passou de 90% numa única aplicação para 63% (aplicação em batelada).

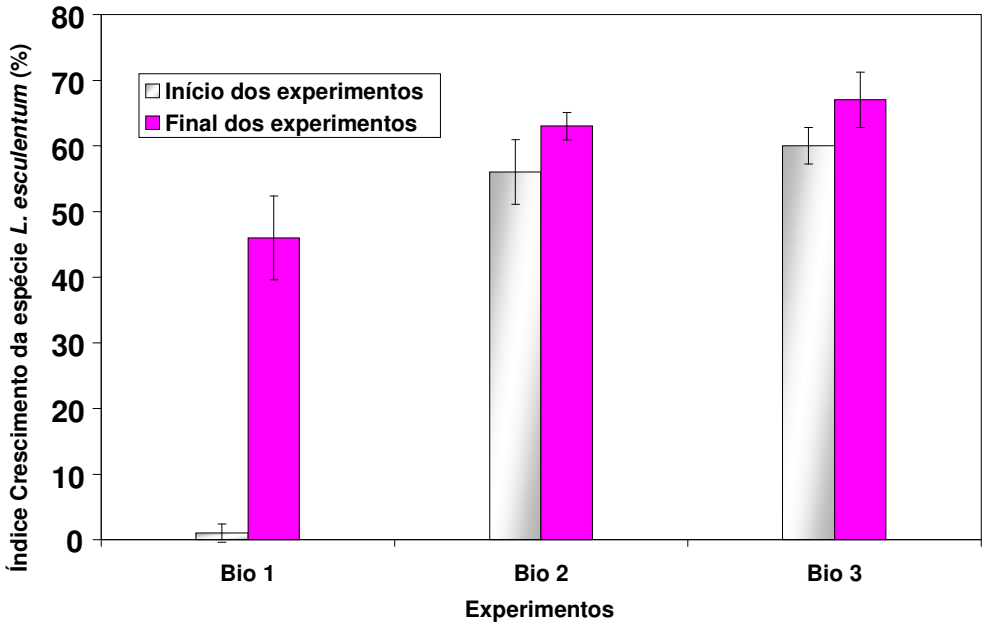


Figura 4.44: Índice de germinação da espécie *Lycopersicon esculentum* antes e após os ensaios de biodegradabilidade em três experimentos. A) BIO 1: Solo inicial; B) BIO 2: Solo 180 dias; C) BIO 3: Solo 420 dias.

Diante dos experimentos avaliados foi possível concluir algumas vantagens e desvantagem da adição do ramnolipídio no processo de biorremediação. Esses resultados e outros relacionados a todos os experimentos até aqui apresentados serão mostrados nas conclusões.

5 - CONCLUSÕES

O solo estudado neste trabalho é contituido de 75% de areia, 14% de silte e 11% de argila, o que permitiu classificá-lo como franco arenoso de acordo com o triângulo de FERET. Os resultados das propriedades físicas iniciais do solo contaminado indicaram que a densidade de partículas para o solo virgem e contaminado foram 2,2 e 1,6g/cm^3 e a densidade aparente de 1,2 e 1,3g/cm^3, respectivamente. Consequentemente obteve-se um valor de porosidade de 43% para o solo virgem e 19% para o solo contaminado. A CRA (capacidade de retenção de água foi de 34% e 28% para solo virgem e contaminado, respectivamente.

Em relação à condição ótima nutricional foi feito um planejamento experimental 2^3, onde se observou que o fator que mais influenciou o percentual de biodegradação foi o NITROGÊNIO no seu maior nível (C:N = 100:10). Posteriormente, com base no planejamento experimental, a melhor relação nutricional para o processo de biodegradação do foi a relação C:N:P = 100:15:1.

O processo de atenuação natural monitorada indicou redução de HTP de 52% pela técnica de infravermelho e 59,4% por cromatografia gasosa após 420 dias. A taxa de biodegradabilidade por dia variou entre 0,12 e 0,14 % ao dia respectivamente. Foi observado, ainda, que o óleo mais leve foi lixiviado do solo até os três primeiros meses. Em relação à toxicidade, observou-se que após 90 dias, o solo contaminado não foi nocivo para a germinação da *Lactuca sativa* (alface) e para mortalidade das minhocas (*Eisenia fetida*).

Foi observado que em relação aos valores de DMC e DMCA oque os surfactantes que apresentaram menor valor de DMC foi o do Biosolve (0,1mg/L) e menor valor de DMCA foi o JBR 210 (1mg/L) para 10% e SDS (2 mg/L) para 50% de solo em suspensão. Os surfactantes que propiciaram um maior índice de germinação com menor concentração foram o Biononex (72%) e o Biosolve (73%). Para lavagem do solo, os surfactantes que apresentaram maior remoção do óleo no solo foram o JBR 210 e Tween-80 com 71% de remoção de óleo cru. Em relação ao teste de respirometria, os surfactantes que apresentaram maior evolução de CO_2 foram SDS seguido do JBR 210. Na biodegradabilidade em fase líquida, os surfactantes que apresentaram maior biodegradabilidade foram o JBR10 e SDS.

Através dos testes de toxicidade pôde-se verificar que as minhocas são os organismos mais sensíveis à adição dos surfactantes SDS e JBR 210 (ramnolipídio), seguido pela germinação com *L. sativa* (120h), a espécie *L. esculentum* (170h) e, por último, a

atividade enzimática do solo. Através desses ensaios pode-se concluir que ambos apresentaram toxicidades bem semelhantes.

Em relação à utilização do SDS e JBR 210, como auxiliares no processo de biorremediação, verificou-se para o JBR 210 a adição de 4 mg/g de ramnolipídio apresentou maior remoção de HTP (50%), sendo, ainda, observada uma tendência em se alcançar uma remoção ainda maior num período superior a 45 dias de tratamento. A adição de SDS ao solo contaminado não melhorou os índices de biodegradação em relação ao controle, apresentando remoção de HTP entre 20 e 26 % em todos os experimentos.

Ao se investigar a adição do ramnolipídio no início de uma contaminação, após 180 e 420 dias foi possível observar que no início, provavelmente, pelo impacto causado pelo óleo cru no solo, a adição do ramnolipídio não foi totalmente benéfica ao tratamento do solo já que em alguns tratamentos houve pouco ou nenhum incremento em relação ao tratamento controle, verificando-se ainda nos experimentos que apresentaram resultados superiores ao controle a remoção de HTP foi 1 a 2 vezes maior. Após 180 dias esta remoção foi entre 1,2 a 3,5 vezes maior e todos os tratamentos foram superiores ao controle. Aos 420 dias esta remoção foi de 3,5 a 6,5 vezes maior que o controle, sendo também verificado que todos os experimentos forma superiores ao controle. Em relação à concentração ótima de ramnolipídio, no início do tratamento foi de 4 mg/g, aos 180 dias de 6 mg/g e aos 420 dias foi de 2 mg/g de ramnolipídio.

Observou-se, ainda, que há relação entre teor de óleo no solo e a concentração do ramnolipídio, pois logo no início da contaminação necessitou-se da adição de ramnolipídio cerca de 10 vezes menor que o teor de óleo no solo. Aos 180 dias esta relação pode ser cerca de 5 a 6 vezes menor que o teor de óleo no solo. Após 420 dias e esta relação volta a ser novamente 10 vezes menor que o teor de óleo no solo. Dessa forma, em termos de biodegradabilidade e de custos, sugere-se deixar o óleo se autodepurar, se as condições ambientais e de riscos permitirem, para que se possa aplicar o ramnolipído e obter cerca de 90% de remoção do óleo no solo.

Em termos de remoção de HTP não foi observada diferença significativa entre a biodegradabilidade do óleo cru, utilizando o ramnolipídio numa dose única ou em batelada. Em termos de toxicidade quando há alto teor de óleo no solo numa contaminação recente, a adição em batelada de ramnolipídio pode causar maior toxicidade ao final do tratamento.

Diante do exposto pode-se seguir algumas metodologias para aplicação de surfactantes ao solo contaminado com óleo cru.

1) Avaliar o solo a ser testado em termos de granulometria para avaliar se há possibilidade de sorção do óleo ao longo do tempo;
2) Verificar os surfactantes possíveis de serem utilizados quanto:
    a. Ao valor de DMC (Diluição Micelar Crítica) e DMCA (Diluição Micelar Critica Aparente), tendo-se em mente que quanto menor a concentração da DMC ou DMCA mais econômico será o surfactante;
    b. Quanto à capacidade de emulsificação, levando-se em consideração que surfactantes com alto índice de emulsificação em baixas concentrações são mais eficazes;
    c. Quanto à capacidade de dessorção do óleo do solo, pois surfactantes que são capazes de dessorver o óleo do solo em baixas concentrações são mais eficazes do que os que têm esse poder em altas concentrações e essas concentrações podem estar diretamente relacionadas com o valor da DMC e DMCA de cada um;
    d. Avaliar a biodegradabilidade dos surfactantes, pois numa contaminação do solo, o uso de surfactantes em técnicas *in-situ* podem lixiviar o surfactante, sendo necessário o conhecimento se os mesmo são biodegradáveis tanto no solo como na água.

3) Deve-se estipular uma faixa de concentração a ser avaliada dos surfactantes e analisá-las quanto à toxicidade, determinando-se o EC50, ou LC50, conforme cada teste de toxicidade avaliado.
4) Avaliar a possibilidade de uma contaminação com óleo cru poder se autodepurar sem causar riscos ambientais. Dessa forma, se houver esta capacidade de autodepuração deve-se:
    a. Deixar o óleo autodepurar-se até observar-se que a curva de biodegradabilidade do óleo está se tornando constante e, a partir dessa concentração (aproximadamente 50% do teor inicial do óleo cru), utilizar o surfactante para que este tenha capacidade de dessorver o óleo do solo e solubilizá-lo, utilizando-se baixas concentrações de surfactantes.

5) Se os riscos não permitirem que o solo contaminado tenha o óleo biodegradado por processo de atenuação natural, deve-se tratá-lo imediatamente, levando-se em conta que altas concentrações de surfactante

pode levar a alta solubilidade do óleo cru, causando alta toxicidade, prejudicando a biodegradabilidade do óleo no solo.

6) Em termos de adição única de surfactante ou em doses em batelada, deve-se levar em consideração que no início da contaminação, as doses em bateladas podem causam maior toxicidade que as com dose única no final do tratamento, já que o surfactante pode causar um impacto negativo ao ser adicionado no meio do tratamento, devido a sua toxicidade.

5- SUGESTÕES

Avaliar a toxicidade de vários surfactantes e não somente dos que se destacaram a fim de que se tenha mais parâmetros para escolhê-los.

Avaliar outros tipos de biossurfactantes diferentes do ramnolipídio.

Verificar se a metodologia proposta pode ser aplicada em solo extremamente argiloso e/ou outro tipo de óleo cru.

Verificar a aplicação desta metodologia proposta em contaminações somente de HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e/ou contaminações com metais pesados

BIBLIOGRAFIA

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) – NBR 14283 – Resíduos em solo: determinação pelo método respirométrico. 1999.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.) Tópicos em ciência do solo. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, vol. 1. pp. 299-352. 2000

ADENIYI, A. A. & AFOLABI, J. A. Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in Lagos metropolis. *Environmental International*, vol. 28, pp. 79-82. 2002

ALAN, A.A & FEREK, J.R. Advantage and disadvantages of burning oil In: International Oil Spill Conference. API, Washington. pp. 765–772. 1993.

ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press. California. 302p. 1999.

ALEF, K. & NANNIPIERE, P. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press. 576p. 1995

AMARANTE JUNIOR, O. P., de; dos SANTOS, T.C.R. Lifasato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. Quím. Nova vol.25 Nº.4 São Paulo Julho 2002.

ANDERSON, T. A.; WALTON, B. T. Fate of 14C trichloroethilene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. Environ. Toxicol. Chem., vol. Nº 14, pp. 2041-2047, 1995.

ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. Pesq. agropec. bras., Brasília, vol.39, Nº 12, pp.1191-1198. 2004

ANDREA, M.M.; PETTINELLI, Jr. Efeitos de aplicação de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arq. Inst. Biol.*, vol.67, Nº 2, pp.223-228. 2000.

APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th edition, New York. 1992.

ARCHER, J.R. & SMITH, P.D. The relation between bulk density, available water capacity, and air capacity of soils. J. Soil Sci.,vol. 23, pp. 475-480, 1972.

ARONSTEIN, B. N. & ALEXANDER, M. "Effect of Non-ionic Surfactant Added to the Soil Surface on the Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons Within the Soil". Applied Microbiology & Biotechnology vol. 39. pp. 386-390.1993.

ASSIS, E.P.M.; CORDEIRO, M.A.S.; PAULINO, H.P. CARNEIRO, M.A.C. Efeito da aplicação de nitrogênio na atividade microbiana e na decomposição da palhada de sorgo em solo de cerrado sob plantio direto. Pesquisa Agropecuária Tropical, vol. 33 Nº 2, pp. 107-112. 2003.

ASTM(Standard Guide for Conducting a Laboratory Soil Toxicity Test with Lubricity Earthworm Eisenia fetida.

ATLAS, R. M. Petroleum Microbiology. New York: Macmillan Publishing Company, 1984. 632p.

AUTRY, A.R. AND ELLIS, G.M., Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Progress*, vol. 11, n.4, pp. 318-323. 1992.

AZEVEDO, F.A. CHASIN, A.A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo RIMA, Intertox. 2003.

BHAIRI, S.M. Detergents: A guide of properties and uses of detergents in biology and biochemistry. Ed. Calbiochem Novabiochem Corparation. 2001.

BAKER, K. H.; HERSON, S.; Bioremediation. New York McGraw-Hill, INC, 357p. 1994

BANAT, I.M. Biosurfactants prodution and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*. vol. 51. pp. 1-12. 1995.

BANAT, I.M. Pontential commercial application of microbial surfactants. *Appl. Microbiol Biotechnology.* vol. 53, pp. 495-508. 2000.

BANKS, M.K. SCHULTZ, K.E.; Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum contaminated soil. Water, air & soil pollution, vol. 167, Nº 4, pp. 211-219. 2005.

BAPTISTA, S.J. FREIRE, D.D.C.; SERVULO, E.F.C. Evaluation of biostimulation and use of biosurfactant as treatment technique of clay soil contaminated with diesel oil. Environmental Engineering and manangement journal. vol. 5, pp. 1325-1332. 2006.

BAPTISTA, S.J. Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel. Tese de doutorado. EQ/UFRJ. Rio de Janeiro. 146. 2007.

BARTHA, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology*. vol. 12, pp. 155-172. 1986

BEKER, K.H. HERSON, D.S. Bioremesiation os surfac and subsurface soils. In Bioremediation. McGraw Hill. Inc. USA, pp. 203-259. 1994

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER-JUNIOR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 34, pp. 229-249. 2003.

BERGER, T.M.; Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo – Enfoque na aplicação do processo TERRAFERM. Orientadora: Maria Teresa Raya Rodriguez. Porto Alegre. UFRS. 2005. 86.p Tese de doutorado *(Doutorado em ciências).*

BERNA, J.L.; FERNER, J.; MORENO, A. PRATS, D.; BEVIA, F.R.; The fate of LAS in the environment. Tenside Surfactants Deterg. vol. 26, pp. 101– 117.1989.

BIOTTON, G.; KOOPMAN, B. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. Rev. Environ. Contam. Toxicol. vol. 125, pp. 1-22. 1991.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*. vol. 152. pp. 41-52. 1999.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technology. vol. 74, pp. 63-67. 2000.

BRO-RASMUSSEN, F. Hexachlorobenzene: na ecological profile of na organochlorine compounds. In: MORRIS, C.R.; CABRAL, C.R. Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on cancer. 1986.

BUENO, B. de S.; VILAR, O.M. “Mecânica dos solos”. Universidade de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, departamento de Engenharia Civil. Minas Gerais, Brasil. 129p, 1980.

BUMPUS, J.A. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology. vol. 55, Nº 1, pp. 154-158. 1989.

BURGER, R.M.H. Oil Spill. Rutgers University Press. New Jersey. 261p. 1997

CALLAHAN, C. A. Earthworms as ecotoxicological assessment tools. In: EDWARDS, C.A.; NEUHAUSER, E.F. Earthworms in waste and environmental management, spb academic, The Hague, pp. 295-301. 1998.

CARMICHAEL, L.M.; PFAENDER, F.K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. Biodegradation, Dordrecht, vol.8, Nº, pp.1-13, 1997.

CARRARO, F.L. Enciclopédia Globo para cursos fundamental e médio. Editora Globo. Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil. 1977.

CERNIGLIA, C. E. Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae. Rev. Biochem. Toxicol. vol. 3, pp. 321-361.1981.

CERNIGLIA, C.E., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. biodegradation, vol. 3, pp. 351-368. 1992.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos proveniente de derrame de óleo diesel. Tese de doutorado. Orientadores: Edmilson Santos de Lima e Sávia Gavassa. Recife 2007. Universidade Federal de Pernambuco/Centro de Tecnologia e Geociências, 174p. 2007.

CHANEAU, C.H., YEPREMIAN, C., VIDALE, J.F., DUCREAUX, J. and BALLERINE, D. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. Water Air Soil Pollut. Vol. 144, pp. 419–440. 2003

CHENG, H.H.; MULLA, D.J. The soil environment. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA, pp.1-13.1999.

CHUN, C.L.; LEE, J.-J.; PARK, J.-W. Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. Environ. Poll. vol. 118, pp. 307–313. 2002.

CONTREAS-RAMOS, S.M., ALVAREZ-BERNAL, D. & DENDOOVEN, L. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, Environmental Pollution, vol. 141, pp. 396–401.2006.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species Appl Environ Microbiol. February; vol. 53, Nº 2, pp. 224-229, 1987.

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

CORSEUIL, H.X. & MORENO, F.N. Phytoremediation potencial of willow trees for aquifers contaminated with ethanol-blended gasoline. Water Research, Londres, UK, vol. 35, Nº 12, pp. 3013-3017. 2001.

COUPLAND, J.N.; CLEMENTS, J.P. Physical properties of whey protein stabilizes emulsions as related to pH and NaCl. Journal of food Science, vol. 62, nº 2, pp. 342-347. 1997.

CRAVO Jr, W. B. Biodegradação de querosene de aviação(QVA) por culturas mistas e por Pseudomas aeroginosas. Orientador: Francisca Pessôa de França. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 1998. 68p. *Dissertação.(Mestrado em ciências).*

CUBITTO, M.A.; MÓRAN, A.C.; COMMENDATORE,M. CHIARELLO, M.N.; BALDINI, M.D.; SINERIZ, F. Effects of Bacillus subtilis O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soil. Biodegradation. vol.15, Nº 5, pp. 281-287. 2005.

CUNHA, C.D. Avaliação de biodegradação de gasolina em solo. Orientador: Selma Gomes Leite. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 1996. 97p. *Dissertação.*(Mestrado em ciências).

CUNHA, C. D. Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. Orientador: Selma Gomes Leite. EQ/UFRJ, 2004, 176p. Tese Doutorado.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Advances in Agronomy, San Diego, vol.56, Nº .56, pp55-114. 1996.

DAVIS,J.W. MANDSEN, S. Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere,* vol. 33, N^{O} 1, pp. 107-130.1996.

DEOTTI, O.G. Controle de pH na técnica de biorremediação e eletrocinética. COPPE/UFRJ. Dissertação de Mestrado. Programa de Engenharia Civil. 126p. 2005

DE PAULA, A. M. ; SOARES, C.R.F.; SIQUEIRA, J.O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. vol.10, Nº .2, pp.448–455, 2006

DEL’ARCO, J. P. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso. Orientador: Francisca Pessôa de França. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 1999. 171p. *Dissertação.(Mestrado em ciências).*

DESCHÊNES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J. P.; SAMSOM, R. Adding sodium dodecyl sulfate and Pseudomonas aeruginosa UG2 biosurfactant inhibits polycyclic

aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote contaminated soil. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 46. Nº 5-6, pp. 638-646. 1996.

DESHPANDE, S. SHIAU, B.J.; WADE, D.; SABATINI, D.A. and HARWELL, J.H. Surfactants selection for enhancing ex situ soil washing. *Pergamon*. vol. 33, N.° 2, pp. 551-360. 1999.

DEUEL, L. E. e HOLLIDAY, G. H. Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry . PennWell, 2nd. Ed., TULSA, U.S.A., 242p.1997.

DOM, P.B. & SALANITO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. Chemosphere, vol. 40, pp. 419–426. 2000

DOUBLE, B. M. and SCHMIDTH, O. Can the abundance or activity of soil macrofauna be used to indicate the biological health of soils? In Biological Indicators of Soil Health. Eds. CAB International, New York. pp 265–295. 1997

DOUGLAS, L.E; HEFFNER, D.A. Process for in situ biodegradation of soil hydrocarbon contaminated soil. *Patent number US 5017289,* 1991.

DRAGUN, J. The soil chemistry of hazardous Materials. *Amherst Scientific Publishers Ed.*; Massachusetts, 1998.

DORN, P.B., VIPOND, T.E., SALANITRO, J.P, WISNIEWSKI, H.L. Assessment oh the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere,* vol. 37 (37) pp. 845-860. 1998.

DORN, P.H & SALANITRO, J. Temporal ecology assessment of oil contaminated soil before and after bioremediation. Chemosphere, 40, pp. 419-426. 2000.

DUA,M.;SINGH,A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Apply Microbiology Biotechnology. vol. 59, pp.143-152. 2002.

EDWARDS, W.M.; and SHIPITALO, M.J. Consequences of earthworms in agricultural soils: Aggregation and porosity. In Earthworm Ecology. Ed. C A Edwards. St. Lucie Press, New York. pp 147–161. 1998.

ELEKTOROWICZ, M. Bioremediation of petroleum- contaminated clayey soil with pretreatment. *Environmental Technology*. vol. 15. pp. 373-380. 1994.

EMBRAPA. Manual de Métodos de análise de solo. 2ª edição, Rio de janeiro. 1997.

EPA. In situ remediation technology status report: surfactant enhancements. Washington, EPA 542-K94-oo3. 1995.

EPA. Innovative technology verification report. Fiel measurement technologies for TPH in soil. Horiba ibtruments incorporated – OCMA-350 oil content analyzer. Washington D. C.EPA/600/R-01/089. 2001.

FARIAS, K. V. Influência de umectante aniônico na reologia e espessura do reboco de fluidos hidroargilosos. Orientadores: Heber Ferreira e Luciana Amorim. Campina Grande, 68p. Dissertação de mestrado. 2005.

FARIAS, K. V.;AMORIM, L. V.; FERREIRA, H. C.; FERREIRAS, E,. PEREIRA, E.Estudo da reologia e espessura do reboco de fluidos de perfuração: influência de dispersantes e umectante aniônicos Cerâmica vol. 52, pp. . 307-314. 2006.

FERGUSON, S.H., FRANZMANN, P.D., REVILL, A.T., SNAPE, I., RAYNER, J.L. The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. Cold Regions Science and Technology, vol. 37, pp.197-212. 2003.

FIGGE, K & SCHO¨BERL, P. LAS and the application of sewage sludge in agriculture. Tenside Surfactants Detergent. vol. 26, pp. 122–128. 1989.

FINE, P., GRABER, E.R., YARON, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. Soil Technology. vol.10, pp.133-153. 1997

FLETCHER, J. A brief overview of plant toxicity testing. In: GORUCH, J.W.; LOWER, W.R.; LEWIS, M.A.; WANG, W. Plants for toxicity Assessment. Astm, Philadelphia, PA. ASTM Publication code number (PCN) 04011150-16. pp. 1-11. 1991.

FOUNTAIN, J.C.; KLIMEK, A.; BEIKIRCH, M.G.; and MIDDLETON, M.T. (1991)The use of surfactants for in situ extraction of organic pollutants from a contaminated aquifer. Journal of Harzardous Materials. 28.pp 295-311.

FURTADO, M. Remediação de solos: Para afastar o perigo que se esconde nos subterrâneos das grandes cidades, meios legais e econômicos devem fomentar obras de descontaminação. IN: Química e Derivados, edição 437 de maio de 2005.

FURTADO, M. Remediação de solos: Hidrogeologia define concepção do projeto - Estudo das condições naturais do solo define técnica ideal para recuperar área contaminada. IN: Química e Derivados, Edição 446 de fevereiro de 2006.

GLASER, J. A; POTTER. C.L. Soil bioremediation research EPA. Biocycle. pp. 50–54. Jan. 1996.

GLEDHILL, W.E. Screening test for assesscement of ultimate biodegradability linear alkylbenzene sulfonates. Applied Microbiology, vol. 30, pp. 41-56. 1975.

GRIFFIN, W.C., Classification of surface active agents by “HLB”., *J. Soc. Cosmetic Chem*., vol. 1, pp. 311-326. 1949.

GROVER, R. Adsorption and desorption of urea herbicides in soils. *Canadian Journal of Soil Science,* vol.35, Nº.2, pp.127-135. 1975.

GUNDERSSON, C.A.; KOSTUK, J.M.; MITCELL, H.G.; NAPOLITANO, G.E.; WICKER, L.F.; RICHMOND, J.E.; STEWART, A.J. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. Environmental Toxicology and Chemistry, v.16, p.2529-2537, 1997.

HAIG, S.D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*. vol. 185. pp. 161-170. 1996.

HELENIUS, A. and SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents., Biochim.Biophys. Acta, vol. 415, pp. 29-79. 1975.

HELFRICH, P.; CHEFETZ, B.; HADAR, Y.; CHEN, Y.; SCHNABL, H. A novel method for determining phytotoxicity in compost. Compost Science and Utilization, v.6, p.6-13, 1998.

HOLT, M.S; FOX, K.K.BURFORD, M.; DANIEL, M; BUCKLAND, H. Monitoring study on the removal of linear alkylbenzene sulphonate in trickling filter type sewage treatment plants Contribution to GREAT-ER project #2. Sci Total Environ vol. 210/211, pp. 255– 269. 1998.

HORNICK, S.B., 1983, “The interaction of soils with waste constituints”. In *LandTreatment of Hazardous Waste*. Parr, J.F., Marsh, P.B., and Kla, J.M. (eds). Noyes Data Corp , New Jersey, pp. 321-337.

INOUE, A.; YAMAMOTO, M.; HORIKOSHI, K. *Pseudomas putida* which can grow in the presence of toluene. *Application Environmental Microbiology*, vol. 57, N^0.5. pp. 1560-1562.1991.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com idrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural, vol. 37, Nº 004, pp. 1192-1201. 2007

JAHAN, K., AHMED, T. and MAIER, W.J. Modeling the influence of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene, *Wat. Res*. vol 33. pp. 2181-2193. 1999.

JARAMILLO, I.R. Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciencia del suelo. Parte 1 Universidad Autónoma Metropolitana, México. 1996.

JENKINSON, D.S. & LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds., Soil Biol. Biochem., 5:415-471, 1981.

JOHNSEN, A.R. Principles of microbial PAH-degradationin soil. Environmental Pollution, Oxford, vol.133, Nº 1, pp.71- 84, 2005.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 49, pp. 1-16.2001.

KAPLAN, I.R..; GALPERIN, Y.; LU, S.; LEE, R. Forensic environmental geochemistry: differentiation of fuel sources and realease time. Organic Geochemical. vol. 27, pp. 289-317. 1997.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant and Soil, vol. 170, pp. 75-86, 1995.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; ENDO, M.; NAKANE, T.; AKIVA, T.; Remarkable Antiagglomeration Effect of a Yeast Biosurfactant, Diacylmannosylerythritol, on Ice-Water Slurry for Cold Thermal Storage. Biotechnology Progress. vol. 17, pp. 362-365. 2008.

KINGSLEY, U.; PEKDEMIR, T. MEHMET, Ç. Surfactant treatment of crude oil contaminated soil. *Journal of Colloid and Interface Science*. vol. 276, pp. 456–464. 2004.

KISSA, E. Wetting and Detergency - Pure & Appl. Chem., vol. 53, pp. 2255, 1981.

KNAEBEL, D.B.; FEDERLE, T.W.; VESTAL, J.R. Mineralisation of dodecyl sulface sodium and linear alcohol ethoxylate (LAE) in 11 contrasting soils. Environ Toxicol Chem, vol. 9, pp. 981–98 8. 1990.

KNOKE, K.L.; MARWOOD, T. M.; CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T.; LIU, D.; SEECH, A. A Comparison of Five Bioassays to Monitor Toxicity During Bioremediation of Pentachlorophenol-Contaminated Soil. Water, Air, & Soil Pollution. vol. 10 Nº 1-2, pp. 157-169. 1999.

KUHLMAN, M.I., GREENFIELD, T.M., Simplified soil washing processes for a variety of soils. Journal of Hazardous. Materials, vol. 66, pp. 31–45. 1999.

LA GREGA, M.D. et al. The Environment resource management group: hazardous waste management. 1 ed. Singapore: Mc Graw- Hill, 1146 p. 1994

LAHA, S.; TANSEL, B.; USSAWARUJIKULCHAI, A. Surfactant–soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic

compounds: A review. Journal of Environmental Management, vol. 90, pp. 95–100. 2009.

LANDIS, G. W.; YU, M.-H. Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems, CRC press (Lewis), Boca Raton, FL. 328p. 1995.

LAWRENCE, M.J. Surfactants Systems: microemulsions and vesicles as vesicles for drug delivery. Eur. *J. Drug Metab. Pharmacobined*. vol. 19, pp. 257-270. 1994

LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the *environmental. Microbiological* Reviews. vol. 54, N°.3. pp. 305-315, 1990.

LEE, D. H., CODY, R.D., KIM, D.-J., CHOI, S. Effect of soil texture on surfactant-based Remediation of hydrophobic organic contaminated soil. Environ. Int. vol. 27, pp. 681–688. 2002.

LEMOS, J.L.S.; OLIVEIRA, S.D.; BARROS, C.A.; REICHE, A.P. Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). Série de Tecnologia ambiental. CETEM , vol. 46. 2008.

LEYS, N.M. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by Mycobacterium and Sphingomonas in soil. Applied Microbiology and Biotechnology, New York, vol.66, Nº.6, pp.726–736, 2005.

LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N.; ZHANG, X.; Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. Water Research vol. 15, pp. 3845-3853. 2000.

LICHTENBERG, D.; ROBSON, R. J.; DENNIS, E.A., Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects., Biochim. Biophys. Acta, vol. 737,pp. 285-304.1983.

LICHTENSTEIN, E.P., SCHULTZ, K.R. The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorus insecticides in soils, with special emphases on parathion. *Journal of Economic Entomology,* vol.57, pp.618-627. 1964.

LIEBERG,E.W. & CUTRIGHT, T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in PAHs contaminated soil. Biodeteorization and biodegradation, vol 44, pp. 55-64. 1999.

LIN, S-C. Biosurfactants:recent advances. Journal chem. Tech. Biotechnol. vol. 66, pp. 109-120. 1996.

LUCHESE, E.B.; FAVERO, L.O.B.; LENZI, E. Fundamentos da química do solo.Livraria Freitas bastos Editora S.A. Rio de Janeiro. 182p. 2001.

LUEKING, A.D. Relationship of soil organic mattercharacteristics to organic contaminant sequestration and bioavailability. Journal of Environmental Quality, Madison, vol.29, Nº1, pp.317-323, 2000.

MADGAN, M.T. MARTINO, J.M.; PARKER, J. Brook: Biology of microorganisms, Prentice Hall Ed., New Jersey. 2000.

MAYER. R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential application. *Applied Microbiology and biotechnology*, vol. 54, pp. 625-633. 2000.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, vol. 24, No 1., pp. 87-93.2001.

MARCOMINI, A; CAPEL, P.D.; LICHTENSEIGER, T.H.; BRUNNER, P.H.; GIGER, W. Behaviour of aromatic surfactants and PCBs in sludge-treated soil and landfills. J Environ Qual vol. 18, pp. 523– 528.1989.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A.; Influence of Rhamnolipids and Triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. Environ. Sci. Technol. vol. 36, pp. 4669–4675. 2002

MATSUOKA,M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). Rev. Bras. Ciênc. Solo, vol. 27 Nº3, pp. 425 -433. 2003.

MELLO, D. Ecotoxicologia: introdução, conceito, principais ramos. In: Jornada Brasileira de Ecologia, vol.2., 1981, Campinas. Anais... Campinas, pp. 127-131.1981.

'MENDELSSOHN, Q.L.I.A.; HENRY Jr,C.B.;ROBERTS, P. O.;WALSH, M.M.; OVERTON, E.B. AND PORTIER, R.J. Effects of bioremediation agents on soil degradation in mineral and sandy salt marsh sediments. *Environmental Technology*. vol. 20,pp. 825-837. 1999.

MESQUITA, A.C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. Tese de doutorado. Pos graduação COPPE/UFRJ. 158p, 2004.

MILLANI, E.J.; BRANDÃO, A.S.L.; ZALÁN, GAMBOA, P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. Rev. Bras. Geof. vol.18 No.3 São Paulo. 2000

MILLIOLI, V. S.; SANTOS, L. C.; RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R. L. C.; SORIANO, A. U. Evaluation of optimum concentration of two anionic surfactant in the biodegradation of crude oil contaminated soil. In: CONSOIL, 3-7 outubro, Bordeaux, França, 2005. Proceedings of the 9th International FZK/TNQ Conference on Soil-Water Systems, 1 CD-ROM, 2005.

MIROSLAV, N.;HORAKOVA, D. Mixture of microorganisms, its use for biodegradation of hydrocarbons, as well as process for its application. Patent Number: US 5575998. 1996.

MORAIS, E. B. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas, 150 p, 2005. Dissertação de mestrado

MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M. ESTEVES, J.L. & SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus* subtilis: *Biodegradation* vol. 11, pp. 65-71. 2000.

MOREIRA, M.S.F.; SIQUEIRA, J.O.; Microbiologia e bioquímica do solo. Editora UFLA. 626p. 2002.

MORENO, C.M.; BECERRA, A.G.; SANTOS, M.J.B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev Iberoam Micol, vol. 21, pp. 103-120. 2004

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contend soil. *Environmental Progress*. vol.18, pp. 50-54. 1999.

MULLIGAN, C.N.; YONG, N.R.; GIBBS, F.B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* ,vol. 60 , pp 271-380. 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biossurfactants. *Environmental Pollution.* vol.133, pp.183-198. 2005.

NAKAGAWA, L.E.; ANDREA, M.M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Rev. Bras. Ciência do Solo. vol.30 N° 3, Viçosa May/June 2006.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA, A.Z.; MANIASSO, N. Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração. *Química Nova*, vol. 25. No 3. pp. 483-489. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Natural attenuation for groundwater remediation. National Academy of Sciences, Washington, 274p. 2000.

NEDWELL, D.B. & GRAY, T.R.G. Soil and sediment as matrices for microbial growth. In: Ecological of Microbial Communities. Cambridge University Press, U.K, pp. 21-54. 1987.

NEIVA,J. Conheça o petróleo 5ª Edição. Rio de Janeiro: ao livro técnico e científico. 1986.

NIELSEN, M.N. & WINDING, A. Microorganisms as indicators of soil health. Denmark, National Environmental Research Institute, (Technical Report, n.388). 84p. 2002.

NITSCHKE, M. PASTORE,G.M. "Biossurfactantes: propriedades e aplicações". *Quimica Nova,* vol. 25, No. 5, pp. 772-776.2002.

NOORDMAN, W.H., BRUNING, J.-W.; WIETZES, P.; JANSSEN, D.B. Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid biosurfactant in porous silica matrices. J. Contam. Hydr. vol. 44, pp. 119–140. 2000.

NOORDMAN, W.H.;WACHER, J.J.J.;BOER, G.L. de; JANSSEN,D.B. The enhancement by biosurfactants of hexacadene degrade by Pseudomonas aeruginosa varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*, vol. 94; pp. 195-121. 2002.

NOBRE, M.M; NOBRE, R.C.; Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho. In: Química e Derivados, Edição de 417 de julho de 2003.

NOVA, V.N. A.; BACCHI, O.O.S.; REICHARDT, K. Potencial da água no sistema solo-planta estimado através da fase vapor. *Science Agricultural*. vol. 53 N^0. 1, Piracicaba Jan/Abril. 1996.

NYER, E. Groundwater treatment technology. New York Van Nostrand Reinhold. 306p.1992.

NYHOLM, N. The european system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. Env Tox Chem, vol. 10, pp. 237-246.1991.

OBERBREMER, A. MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of addition of microbial surfactans on hydrocarbon degradation in soil population in a stirred reactor. *Applied Microbiology and biotechnology,* vol. 32, pp. 485-489. 1990.

OBLINGER, J. L. e KOBURGER, J. A. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. *Journal of Mik Food Tecnology.* 1975

OECD(Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for testing of chemical. OECD Paris. (1984a)

OECD(Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 208: Terrestrial Plants, Growth Test. OECD Guidelines for testing of chemical. OECD Paris. (1984b).

OTTONI FILHO, T.B. Uma classificação físico – hídrica do solo. Revista de ciência do solo, Campinas, vol. 27, PP. 211-222. 2003.

OU, Z,Q. (2000). "Separate and combinate environmental behavior of surfactants and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)" In: http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2000/ou.pdf. Acessado em março 2002.

PALA, D.M. (2002). "Estudo da biorremediação de solo impactado por óleo cru". Orientadores: Geraldo Lippel Sant'Anna Jr. e Denize Dias de Carvalho Freire. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 114p. Dissertação (Mestrado em ciências).

PARAMELEE, R W.; BOHLEN, P.J and BLAIR, J. M. Earthworms and nutrient cycling processes: Integrating across the ecological hierarchy. Earthworm Ecology. Ed. CA Edwards. St. Lucie Press, New York.pp 123–143. 1998

PETER, M.; ROUETTE, H.K. Grundlagen der Textilveredlung, Frankfurt am Main, pp.285-301.1989.

PINTO, C.S. Curso básico de mecânica dos solos em 10 aulas. 2 ed. São Paulo- SP-Brasil. Editora: Ofina de textos. 2002.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A; CECON, P.R.; PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. Planta daninha, vol. 23, Nº 4, pp. 711-717. 2005.

PRADO, H. Solos tropicais -potencialidade, limitações, manejo e capacidade de uso. Piracicaba, 166p. 1995.

PREVEDELLO, C.L. Física do solo. Editora SAEAFS; Curitiba, 250p. 1996.

PORTER, M.R.; Handbook of surfactants. Blackie Academic & Professional. Second Edition. 324p. 1994.

POTIN, O. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS)-contaminated soil by filamentous fungi isolated fraom soil. International Biodeterioration and Biodegradation, Oxford. vol. 54, Nº 1, pp. 45-52. 2004.

QUAGLIO, C.L. A teoria do DLVO e a função dos dispersantes. In: Química e derivados. Edição nº 459, Março. 2007.

RATSEP, R. Biological variables for monitoring the effects of pollution in a small catchments areas. A Literature survey. Environmental. Monitory. Nord. vol. 8, pp. 6-21. 1991.

REIS, J.L.R. Estudo dos efluentes líquidos na indústria de borracha sintética com objetivo de avaliação da toxicicidade. COPPE/UFRJ. Tese de doutorado, Rio de Janeiro. 383p. 2003.

RESENDE, M. CURI, N. RESENDE, S.B. CORRÊA, G.F. Pedologia – Base para distinção de ambientes. Viçosa: NEPUT, 2002. 338p.

RISER-ROBERTS, V. Remediation of petroleum contaminated soil: biological, physical, and chemical process. Lewis Publishers. 542p. 1998.

RIZZO, A.C.L. Desenvolvimento de Biorreator Não Convencional para o Tratamento de Solos Contaminados por Petróleo Tese de doutorado. EQ/UFRJ. Rio de janeiro. 188p. 2008

RIZZO,A.C.L; RAIMUNDO,R. (2003). Determinação de óleos e graxas, em solo, por gravimetria empregando método de extração com ultrassom. IT2003-001-00 – Instrução de Trabalho elaborada para o CETEM.

ROBINSON, K.G.; GHOSH, M.M.; SHI,Z. Mineralization enhanced of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. *Water Science and Technology*, vol. 34. pp. 303-309. 1996.

ROCHA, J.M.S.; Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia. In: http://dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pdf/agentes_tensioactivos.pdf (2003). Acessado em Janeiro de 2004.

ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.;SAN-BLAS, G.; and VIERMA, L. Biosurfatants production by two isolates of Pseudomas aeruginosa. *World J. Microbil. Biotech*., vol. 8, pp. 125-128. 1992.

ROJAS-AVELIZAPA, N.G.; RODRIGUEZ-VALQUEZ, R.; SAVAL-BOHORQUEZ, S. ALVAREZ, P.J.J.; Effect of C/N/P ratio and nonionic surfactant on polychlorinated

biphenyl biodegradation. Would Journal of Microbiology and Biotechnology. vol 16, Nº 4, pp. 319-324. 2000.

ROMO, L. “Coloideofísica –Coloide oquímica – Fenómenos de Superficie”, d.Universitaria, Quito 1981. 639p.

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology. vol. 3 (4), pp. 229-236.2002

ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena. 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1988. 431p.

ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. Trends biotechnol, vol. 11, pp. 419-424. 1993.

SAFWAT, H.; SHAKIR, H.; WEAVER, R.W. Earthworm survival in oil contaminated soil. Plant and soil. vol. 240, Nº1, pp. 127-132. 2002.

SALVINI, V.R.; GARCIA, J.R.; OLIVEIRA, I.R.; PANDOLFELLI, V.C. Agente espumante e seus efeitos nas propriedades físicas de alumina porosa Cerâmica vol.52 no.321 São Paulo Jan./Mar. 2006

SCHOWANEK, D., CARR, R., DAVID, H., DOUBEN, P., HALL, J., KIRCHMANN, H., PATRIA, L., SEQUI, P., SMITH, S., WEBB, S., A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture — conceptual framework. Regul. Toxicol. Pharm. vol 40, pp. 227–251. 2004.

SCHRAMM, L.L. Surfactants: fundamentals and applications in the petroleum industry. Cambridge University Press. United Kingdom, 2000.

SCOTT, J.P.; OLLIS, D.F. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: Review and recomendations. Environmental Progress. vol. 14. n° 2. pp.88–103. May.1995.

SEABRA, P. N. C. Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro. COPPE/UFRJ. 1997

SEABRA P.; SANT´ANNA JR. G.; CARVALHO. D.; RIZZO A. Bioremediation of crude oilcontaminated tropical soil in bench-scale piles. Environmental Engineering and Managment Journal, vol. 5, pp. 399-406. 2006.

SHERRY, J.P. SCOTT, B.F. NAGY,E. DUTKA, B.J. Investigation of the sublethal effects of some petroleum refinery effluents. Journal of aquatic ecosystem stress and recovery. Vol 3, Nº 2, pp. 129-137. 1994.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 36, Nº.2, pp.83-94, 2002.

SILVA, A.L.C.; PONSETTO, E.; ROSA, F. Tensoativos: conceitos gerais e aplicações em tintas. ART TV007 – 08/03. Oxiteno S/A Indústria e Comércio. 2003. Disponível em: http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/mercados/doc/. Acessado em Janeiro/2006.

SINGER, M.E. FINNERTY, W.R. Microbial metabolism of satrigt-cahin and branched alkanes. In Petroleum Microbiology. ed R. Atlas, McMillan Publishaing Co., NY, pp. 1-60. 1984.

SINGH, R.P. GUPTA, N.; SINGH, S.; SINGH, A. SUMAN, R. ANNEI, K. Toxicicity of ionic and nonionic surfactants to six microbes found in Angra, India. Bull Environmente contam. Toxicol. vol. 69, pp. 265-270. 2002.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R. M.; RIZZO, A. C. ; MOREIRA J. C. Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos. Journal. Braz. Soc. Ecotoxicol., vol. 1, Nº. 2, pp.137-140. 2006

SUCHANEK, M.; KOSTAL, J.; DEMNEROVA, K. KRALOVA, B. Use of sodium dodecyl sulphate for stimulation of biodegradation of n-alkanes without residual contamination by the surfactant. International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 45, PP. 27- 33. 2000.

SUN, X. & PURI, R.K. Surfatant-enhanced solubility and mobility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Proceedings of the 12th Annual Conference on Hazardous Waste Research. 1999.

TIEHM, A., M. STIEBER, P. WEBER, D.; and FRIMEL, F. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. Environ. Sci. Technol. Vol. 31 2570–2576. 1997

THOMAS, J. E. Fundamentos de engenharia de petróleo. Editora Interciência, Rio de Janeiro. 2001.

TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L.; ROMANI, V.L.M.. Efeitos de fatores físicos e químicos sobre os microrganismos do solo: umidade e aeração. In CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI,S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de ciência do solo. Campinas. 1992.

TREVORS, J.T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.*, vol.16, pp. .673-674, 1984.

TRINDADE, P. V. O. Avaliação das Técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, 127p, 2002. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.

URURAHY, A. F. P. Biodegradação de resíduos oleosos proveniente de refinaria de Petróleo. *Dissertação Tese de D. Sc.,* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p. 1998.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference methods for marine pollution studies, Nº 20, pp. 97. 1991.

URANO, K.; SAITO, M.; Biodegradability of surfactants and inhibition of surfactants to biodegradation of other pollutants. Chemosphere, vol. 14, Nº 9. 1985.

USEPA, Cost and performance report: soil washing at the King of Prussia technical corporation superfund site, New Jersey, USA. 1995.

USEPA8015B. Nonhalogenated organics using CG/FID. EPA, revision 2, 28p. 1996.

U.S. EPA. Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons, EPA 600 – F 98 021. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. 1999.

VALPUESTA, R.R.F. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-prima renovável e de baixo custo. Dissertação de Mestrado- EQ/UFRJ. 104p. 2008.

VAN GINKEL, C.G. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. Biodegradation, vol. 7, pp. 151-164. 1996

VECCHIOLI, G.L.; Del PANNO, M.T.; PAINCEIRA, M.T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*, vol. 67, pp. 249-258.1990.

VOLPON, A.G.T.; VITAL,R.L.; CASELLA,R.C. Método NMP em microescala para contagem de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos. Comunicação técnica SEBIO N. 06/98.

VOSJAN, J.H. Respiratory electron transport system activities in marine environments. Hydrobiology Bulletim. vol.16, pp.61-68, 1982.

WANG, X.; JIANZHEN, Y.; WANG. Y. Quantitative structure – activity relationships for the inhibition toxicity to root elongation of *Cucumis sativus* of selected phenols and interspecieis correlation with Tetrahymera pyriforms. Chemosphere, vol 46. pp. 153-161. 2002.

WATERS, J. J.; HOLT, M.S.; MATTIJS, E. Fate of LAS in sludge amended soils. Tenside Surfactants Deterg 6:129– 135. 1989.

WATTS, R.J.; UDELL, M.D.; MONSEN, R.M. Use of iron minerals in optimizing the peroxide treatment of contaminated soil. Water Environmental Research. vol. 65. n° 7. pp. 839–844. Nov/Dec. 1993.

WALKLEY, A.& BLACK, L.A Na examination of the Detjareff mathod for determining soil organic matter and propose modification of the chromic titration methods. Soil Scince. vol. 37 pp. 29–38. 1934. *Apud* JARAMILLO, I.R. Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciencia del suelo. Parte 1 Universidad Autónoma Metropolitana, México. 1996.

WEBER, W. J., CORSEUIL, H.X. Inoculation of contaminates subfurface soil with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Research*. vol. 28, N^0 6, pp. 1407-1414, 1994.

WEST, C.C.; HARWELL, J.H. Surfactant and surface remediation. *Environm. Sci. Techonol.* vol. 26, pp. 2324-2330. 1992.

WHITE, G. F.; RUSSEL, N.J. Biodegradation of anionic surfactants and related molecules. In Biochemistry of Microbial Degradation, ed. C. Ratledge, pp. 143-175. 1994.

WILSON, S.C. and JONES, K.C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review, *Environ. Pollut.* vol. 81, pp. 229-249. 1993.

YEARDLEY, R. B., LAZORCHAK, J. M. & GAST, L. C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, pp. 1532-1537. 1996

YERUSHALMI, L. ROCHELEAU, S. CIMPOIA, R. SARRAZIN, M. SUNAHARA, G. PEISAJOVICH, A. LECLAIR, G. GUIOT, S.R. Enhsnced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. Bioremediation Journal, vol 7, pp. 37-51, 2003.

YING, G-G; Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Environment International, vol. 32, pp. 417 – 431. 2006.

YU, H. ZHU, L.; ZHOU, W. . J Hazard Mater , pp. 1vol. 42, pp. 354-356.2005

ANEXOS

Anexo 1: Especificações sobre os surfactantes a serem avaliados no trabalho

1 – Não iônicos

- Bio nonex

O BIO NONEX é um surfactante não iônico desenvolvido para proteger e prevenir incêndios e explosões após um acidente ambiental com petróleo ou outra substância inflável, sendo também utilizado em refinaria de petróleo, limpeza de tanques de petróleo, remediação de solo, etc. http://chemcap.com/. A fórmula do Bio Nonex não está disponível para os consumidores.

- Tween-80

O Tween é um surfactante não iônico derivado do sorbitol que é obtido por vários tipos de fruta e é composto por ésteres de sorbitan etoxilados que são tensoativos hidrófilos que exibem valores de HLB (Balanço Hidrofílico e Lipofílico) elevados. A presença da cadeia de polioxietileno faz com que os produtos da linha Tween sejam solúveis ou dispersíveis em água, o que favorece sua aplicação em emulsões do tipo óleo em água (O/A). Também é conhecido como polisorbato http://www.wellnaturally.ca/ingredients/tween80.html; A fórmula do Tween-80 ou Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO é mostrada na Figura 1.

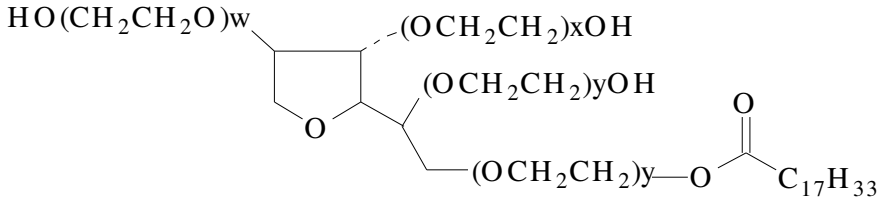


Figura 1: Fórmula molecular do Tween-80 – Soma de w+x+y+z = 20

Fonte: http://www.wcaslab.com/tech/Tween80.htm

2 - Aniônicos

- Biosolve

O Biosolve é um surfactante aniônico que pode ser utilizado no tratamento de aqüíferos e solos contaminados por líquidos de fase não aquosa (NAPLs) e líquidos de fase não aquosa densas (DNAPLs), reduzindo a tensão interfacial e encapsulando os contaminantes em microemulsões, tornando a cadeia carbônica disponível para ação das bactérias, aumentando, significativamente, a biodegradação do NAPL e DNAPL residual. Também é compatível com várias tecnologias existentes de remediação ("pump end treat", "air sparging", "soil flushing" etc) www.biosolve.com. A fórmula do Biosolve não se encontra disponível aos consumidores também.

- SDS (dodecil sulfato de sódio)

O dodecil sulfato de sódio é também conhecido como lauril sulfato de sódio e é um surfactante aniônico que é usado em produtos domésticos como pastas de dentes, xampus, devido a sua facilidade em criar espumas. Sua molécula tem um grupo calda com 12 átomos de carbono. Como todos os surfactantes (inclusive sabões), removem gorduras da pele, podendo causar irritação na pele e nos olhos. Em laboratórios, SDS é geralmente usado na preparação de proteínas para eletroforese em gel de poliacrilamida. Utilizado para provocar a desintegração das membranas celulares na extração de proteínas e ácidos nucléicos http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate. A Figura 2 mostra a fórmula molecular do SDS.

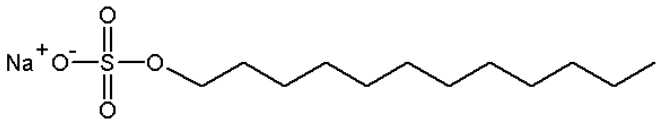


Figura 2: Fórmula molecular do SDS

3 – Biológico

- JBR 210 e JBR 425

O JBR 210 e o JBR 425 são biossurfactantes aniônicos do tipo ramnolipídio. O JBR 210 é concentrado com apenas 10% de ramnolipídio e é um biossurfactante que não sofreu processos de purificação. Já o JBR 425 sofreu um processo de purificação possuindo 25% de ramnolipídio. Estes biossurfactantes são produzidos pela empresa JENEIL Company localizada nos Estados Unidos e Alemanha. Possuem propriedades emulsificantes e de molhabilidade (www.biosurfactant.com). Estes biossurfactantes vêm sendo muito utilizados em remediação de solos impactados com óleo cru (MILLIOLI *et al.* 2005; URUN *et al.* 2006). Figura 3 mostra a fórmula do biossurfactante.

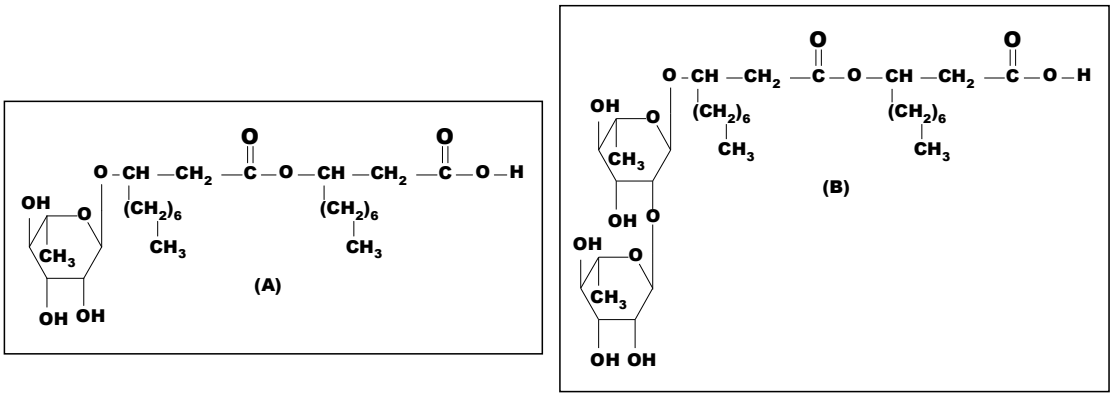


Figura 3: Estrutura de biossurfactante fabricado pela JENEIL Company.

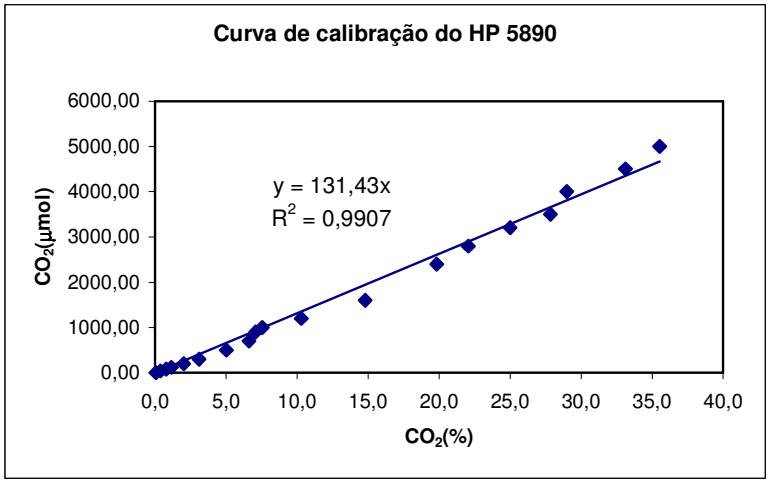
A) α - L – ramnopiranosil - β - hidroxidecanoil - β - hidroxidecanoato. $C_{26}H_{48}O_9$

B)2 – O - α - L-ramnopiranosil- α - L – ramnopiranosil - β - hidroxidecanoil - β - hidroxidecanoato. $C_{32}H_{58}O_{13}$

ANEXO 2: CURVAS DE CALIBRAÇÃO

HP 5890 - INTEGRADOR 3395

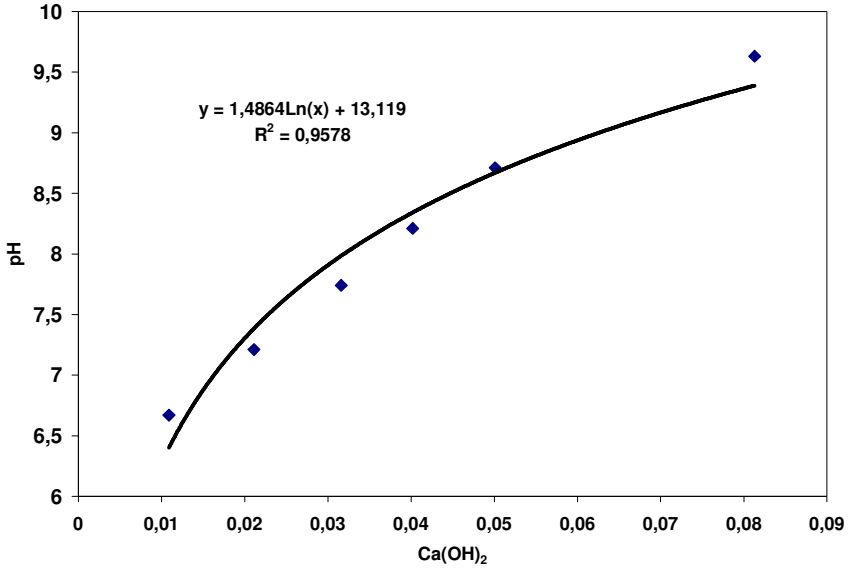
CO_2(□mol)	CO_2(%)
0	0,0585
40	0,3893
80	0,7914
120	1,1421
200	2,0215
300	3,0947
500	5,0112
700	6,6145
900	7,0859
1.000	7,5436
1.200	10,2933
1.600	14,7807
2.400	19,8363
2.800	22,0638
3.200	25,004
3.500	27,8367
4.000	28,9784
4.500	33,121
5.000	35,534



CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AJUSTE DE pH DO SOLO APÓS REDUÇÃO DE pH

Amostra	Ca(OH)2 - teórico (g)	Ca(OH)2 - pesado - (g)	pH
1	0	0	5,8
2	0,01	0,0109	6,67
3	0,02	0,0211	7,21
4	0,03	0,0316	7,74
5	0,04	0,0402	8,21
6	0,05	0,0501	8,71
7	0,06	0,0612	9,66
8	0,07	0,0813	9,63
9	0,1	0,1011	9,23

pH do solo contaminado = 5,8


y = 1,4864Ln(x) + 13,119
R2 = 0,9578
pH
10
9,5
9
8,5
8
7,5
7
6,5
6
0
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
0,07
0,08
0,09
Ca(OH)2

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA TESE

TRABALHOS COMPLETOS EM EVENTOS

Eventos Internacionais

MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F.C.; SOBRAL, L.G.S. CARVALHO, D.D. Bioremediation of crude oil-bearing soil: Evaluation of rhamnolipid addition as for the toxicity and crude oil biodegradation efficiency. 2nd International Conference on Engineering for Waste Valorisation, held in Greece/Patras Greece on June 3-5, **2008.**

MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F.C.; SOBRAL, L.G.S. CARVALHO, D.D. Monitored natural attenuation for crude oil-bearing soil: evaluation of oil biodegradability and toxicity for long term contamination UFZ/TNO International Conference on Soil-Water Systems (CONSOIL 2008), Milano/Italy on 3-6 June **2008.**

MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F.C.; SOBRAL, L.G.S. CARVALHO, D.D. Bioremediation of crude oil – bearing soil: comparative analysis of the addition of two anionic surfactants as for the toxicity, and crude oil biodegradation. UFZ/TNO International Conference on Soil-Water Systems (CONSOIL 2008), Milano/Italy on 3-6 June **2008.**

MILLIOLI, V.S.; SANTOS, L.C. dos; RIZZO, A.D.C.; SANTOS, R.L.C. dos; SORIANO, A. U. Evaluation of optimum concentration of two anionic surfactants in the biodegradation of crude oil contaminated soil. Comunicação técnica elaborada para o CONSOIL **2005** de 3-7 outubro 2005, Bordeaux - França. CT2005-075-00

Eventos Nacionais

MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F; CARVALHO, D.D; SOBRAL, L.G.S.; Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de ramnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. Comunicação Técnica para o 4. Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 21-24 de outubro de **2007**, Campinas -SP. 12p. Artigo em Anais de Congresso/Evento - Completo – Nacional. CT2007-031-00

MILLIOLI, V.S. CARVALHO, P.G.C.A.; OLIVEIRA, F.R. Avaliação da potecialidade da utulização de dois surfactantes em solo co-contaminado com óleo cru e metais pesados Cu^{2+} e Zn^{2+}. VII Meeting of the southern hemisphere on mineral technology and XXII encontro de tratamento de minério e metalurfia extrativa held in Ouro Preto, Brasil, de 20 a 24 de novembro de **2007**.

MILLIOLI, Valéria Souza; SÉRVULO, Eliana Flávia;CARVALHO, Denize Dias de; SOBRAL, Luiz G. S. Utilização de surfactantes no processo de biorremediação de solo contaminado com óleo cru. I UFRJ AMBIENTÁVEL - Rio de Janeiro 24 a 27 de Outubro de **2005TRABALHOS RESUMIDOS EM EVENTOS**

Eventos Internacionais

LABRE, J. C. C.; PEREIRA, S.D; MILLIOLI, V. S, CARVALHO, D.D.; Atenuação monitorada de solo contaminado com óleo cru: avaliação da toxicidade e degradação do óleo cru. X CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA de 30 de abril a 03 de maio de **2008** – Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil

MILLIOLI, V. S. ; LEMOS, J. L. S. ; SANTOS, L. C. ; RIZZO, A. C. L. ; SORIANO, A. U. ; SANTOS, R. . Biorremediation: Assessing the addtion of biosurfactant in the presence of fungi on biodegradation of clay soil impacted by petroleum. In: surfactant in solution symposium, **2004**, Fortaleza. surfactant in solution symposium, 2004.

Eventos Nacionais

Resumos expandidos em congressos nacionais

OLIVEIRA, F.R.; SOBRAL, L.G.S.; MILLIOLI, V.S.; Avaliação da relação nutrional (C:N:P) e da umidade na técnica de biorremediação de solo contaminado por petróleo. VIII congresso Brasileiro de defesa do meio ambiente, na sede do Clube de engenharia, de 20 a 22 de junho de **2005**

MILLIOLI, Valéria Souza; SÉRVULO, Eliana Fávia;CARVALHO, Denize Dias de; SOBRAL, Luiz G. S. Utilização de surfactantes no processo de biorremediação de solo contaminado com óleo cru. I UFRJ AMBIENTÁVEL - Rio de Janeiro 24 a 27 de Outubro de **2005**

SANTOS, Letícia Cotia, RIBEIRO, Vanessa Monteiro, MILLIOLI, Valéria Souza. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: estudo comparativo da utilização de surfactantes associados ou não à técnica de bioaumento .In: 27º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Calda (MG), Maio, **2004**.

Resumos expandidos em congressos internacionais

RIZZO, A. C.L.; SANTOS, R. L. C.; MILLIOLI, V.S.; Selenium removal from oil refinery wastewater, a critical review. Comunicação técnica elaborada para o XIII Int. Conference on Heavy Metals in the Environment, junho **2005** - RJ. Artigo em Anais de Congresso/Evento - Resumo Expandido – Internacional. CT2005-036-00

Artigos completos publicados em periódicos

MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F; CARVALHO, D.D; SOBRAL, L.G.S.; Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfactantes. STA – 50. ISSN: 0103-7374. STA Nº 50. **2008**

MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F; CARVALHO, D.D; SOBRAL Bioremediation of crude oil-bearing soil: Evaluating the effect of rhamnolipidaddition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. ISSN 1108-4006. Revista Global Nest journal. **Aceite.**

RIZZO, A.C.L.; MILLIOLI, V.S.; LEMOS, J.L.S.; VALDMAN, E.; SANTOS, R.C.dos. Processos biológicos de remoção de selênio de efluentes: revisão crítica. Série de Tecnologia ambiental . Vol.42. 56p.**2007**. ISSN 0103-7374 ISBN 978-85-61121-10-5

MILLIOLI,V.S.; FREIRE, D.D.C.; CAMMAROTA, Tratamento de areia de praia contaminada com óleo cru utilizando reagente de Fenton. Série de Tecnologia ambiental . Vol.31. 37p.**2004**. ISBN 85-7227-202-X e ISSN 0103-7374.

RELATÓRIOS TÉCNICOS (CONFIDENCIAL)

PT = PROPOSTA DE TRABALHO, RT = RELATÓRIO TÉCNICO,
RI = RELATÓRIOINTERNO. RE = RELATÓRIO EXTERNO

MILLIOLI, V.S. SANTOS, R.L.S.; SANTOS, E.G.dos; Avaliação da potencialidade da utilização surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Relatório de Estágio elaborado para o IME e para o CETEM/MCT. **2007**. RE2007-003-00

RIZZO, Andrea Camardella de Lima; SANTOS, Ronaldo Luiz Correa dos, , LEMOS, Judith Liliana , Solórzano, MILLIOLI, Valéria Souza, LEITE, Selma Gomes Ferreira. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo. **2006**. Ação N. 310219. RT2006-026-00

MILLIOLI, V.S.; RIZZO, A. C.L.; SANTOS, R.L.C.dos; Avaliação de uso de um agente remediador no auxílio à técnica de biorremediação aplicada a uma amostra de

solo contaminado com óleo cru. Proposta de trabalho elaborada para BFU do Brasil.**2005**. PT2005-034-00

SANTOS, L.C. dos; MILLIOLI, V.S.; Avaliação da concentração ótima de biossurfactante no processo de biorremediação de solo contaminado por óleo cru. Relatório de Estágio elaborado a Universidade Federal do Rio de Janeiro - Escola de Química. **2005** RE2005-001-00

SANTOS, Ronaldo Luiz Correa dos, RIZZO, Andrea Camardella de Lima, LEMOS, Judith Liliana , Solórzano, MILLIOLI, Valéria Souza, LEITE, Selma Gomes Ferreira. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo 1. **2005**. RI2005-006-00

SANTOS, Ronaldo Luiz Correa dos, RIZZO, Andrea Camardella de Lima, LEMOS, Judith Liliana , Solórzano, MILLIOLI, Valéria Souza, LEITE, Selma Gomes Ferreira. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo 2. **2005**. RI2005-019-00

SANTOS, Ronaldo Luiz Correa dos, RIZZO, Andrea Camardella de Lima, LEMOS, Judith Liliana , Solórzano, MILLIOLI, Valéria Souza, LEITE, Selma Gomes Ferreira. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo 3 . **2005**. RI2005-033-00

SANTOS, Ronaldo Luiz Correa dos, RIZZO, Andrea Camardella de Lima, LEMOS, Judith Liliana , Solórzano, MILLIOLI, Valéria Souza, LEITE, Selma Gomes Ferreira. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo 4. **2005**. RI2005-044-00

SANTOS, Ronaldo Luiz Correa dos, MILLIOLI, Valéria Souza; RIZZO, Andrea Camardella de Lima. Avaliação comparativa preliminar do biossurfactante produzido pelo CENPES com dois biossurfactantes comerciais no tratamanto de solo contamiando com hidrocarbonetos de petróleo. **2004**. RT2004-027-00

RIZZO, A. C. L. ; SANTOS, R. ; MILLIOLI, V. S. Ensaios em escala Piloto Para Remediação Química de Resíduos Oleosos.1 **2004**.RI 2004-017-00

MILLIOLI, V. S. ; RIZZO, A. C. L. ; SANTOS, R. Ensaios em escala piloto para remediação de resíduos oleosos 2. **2004**. RI 2004-012-00

Ensino

ORIENTAÇÕES E CO-ORIENTAÇÕES DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA CONCLUÍDAS

PEREIRA, Débora Sanchez; Avaliação da adição de ramnolipídio em tempos diferentes de contaminação. **2009**. – Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: orientador: Valéria Souza Millioli .

PEREIRA, Débora Sanchez; Atenuação natural monitorada de solo contaminado com óleo cru: avaliação da toxicidade e degradação do óleo cru. **2008**. – Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: orientador: Valéria Souza Millioli .

SILVA, Jamile de Almeida Marques da Análise comparativa de dois surfactantes aniônicos para fins de biorremediação de solo contaminado com óleo cru avaliação da adição de surfactantes em diferentes tempos de contaminação de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. **2007**. – Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: orientador: Valéria Souza Millioli . **Aluna destaque dos destaques 1º LUGAR**

CARVALHO, Paula Geandra, de; Biorremediação: avaliação da adição de surfactantes em diferentes tempos de contaminação de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. **2006**. – Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: orientador: Valéria Souza Millioli

CRESCENTE, Diego, Valente Avaliação da toxicidade de Biossurfactantes e surfactantes químicos. **2005**. – Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: orientador: Valéria Souza Millioli

OLIVEIRA, Flávia Romero, de. Avaliação da relação nutricional (C:N:P) e da umidade na técnica de biorremediação de solo contaminado por petróleo. In VIII Congresso Brasileiro de defesa do meio ambiente. **2005**. Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: orientador: Valéria Souza Millioli .

SANTOS, Leticia Cotia dos, MILLIOLI, Valéria Souza. Avaliação da concentração ótima de biossurfactante no processo de biorremediação de solo impactado com óleo cru. **2004**. XII Jornada de Iniciação científica (Pesquisa) - Centro de

Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Valéria Souza Millioli. **Aluna Destaque.**

Orientação em projeto final em curso de graduação

OLIVEIRA, Flávia Romero de; Souza. Avaliação da relação nutricional e da umidade na técnica de biorremediação de solo contaminado com óleo cru. Monografia para obtenção de graduação em biologia na UNIVERSIDADE DA CIDADE. 2006. Orientadores: SOBRAL, Luiz Gonzaga Santos e MILLIOLI, Valéria Souza

Banca examinadora: Andrea Carmadella de Lima Rizzo (DSc)

Luzia Alice de Moraes (DSc)

Orientação em curso de pós graduação Lato sensu

MEDEIROS, Andréa Moreira de Araújo;. Lavagem de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Monografia para obtenção de título de Pós-graduação em Química Ambiental na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2008. Orientadores: RUSSO, Carlos e MILLIOLI, Valéria Souza.

Palestras

1^0 Ciclo de Palestra **2005** no CETEM/MCT. Apresentação do trabalho ---- Utilização de Surfactantes como Auxiliar a Técnica de Biorremediação de Solo Impactado com Óleo Cru 07/04/2005. CETEM/CPMA

Technal Advisor Team

Participação no grupo de revisores do XIII International Conference on heavy Metal in the Environment. 05 a 09 June de **2005**, Rio de Janeiro, Brazil