

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Avaliação do comportamento de BTEX e seus metabólitos de biodegradação em solos: Estudos de remediação em microcosmos”

Leidy Rocío Niño Camacho*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini

* bolsista FAPESP Processo No. 2012/13925-0

São Carlos – SP

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

N716ac Niño Camacho, Leidy Rocío.
Avaliação do comportamento de BTEX e seus metabólitos de biodegradação em solos : Estudos de remediação em microcosmos / Leidy Rocío Niño Camacho. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
124 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Química analítica. 2. BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos totais). 3. Metabólitos. 4. Solo - contaminação. 5. Diesel. 6. Bactérias anaeróbias. I. Título.

CDD: 543 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Leidy Rocio Niño Camacho, realizada em 28/08/2015:

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini
UFSCar

Profa. Dra. Adriana Ururahy Soriano
Petrobras

Prof. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour
UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Aparecido Mozeto
UFSCar

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro
UFSCar

Dedicatória

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes” (Cora Carolina).

A mi hijo Gabriel e a mi esposo Diego, por iluminar mi camino. A mis padres Marina Camacho e Antonio Niño, a ellos todo lo que soy.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini pela orientação do meu doutorado, pela confiança depositada em mim para a realização dos trabalhos e também por sua valiosa amizade. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Antonio Mozeto por todos os aportes acadêmicos e materiais para o desenvolvimento do trabalho, também pela amizade desenvolvida durante os anos que permaneci no laboratório.

A Engenheira Adriana Soriano por supervisionar o estágio realizado no CENPES/PETROBRAS na Gerência de Biotecnologia para aprender as técnicas microbiológicas usadas na determinação das bactérias de interesse. Agradeço também pelas sugestões aportadas para a realização do trabalho.

A todos os integrantes do LBGqA: um agradecimento muito especial para o estudante de iniciação científica Murilo Paix, por todo o apoio prestado durante a parte experimental do trabalho, por sua boa vontade e pelo ótimo ambiente de trabalho. À Dra. Ana Paula Sueitt por toda a ajuda nas análises microbiológicas e por sua linda amizade. À Dra. Mariele Campanha pelos aportes no desenvolvimento do método de LC, pela amizade e bons momentos vividos. Ao técnico Guilherme Grosseli pela colaboração no desenvolvimento do método de GC, e em geral pela logística do laboratório. À Dra. Diana de Souza, à Glaucia Pantano, ao Pedro Jr., a Dra. Almas Awan e a todos os estudantes de IC pelas conversas acadêmicas e não tão acadêmicas e, em geral, a todas as pessoas que de uma ou outra forma colaboraram no trabalho e pelo agradável ambiente de trabalho.

Ao Diego Mauricio por todo seu apoio durante esta etapa de vida, por nosso filho Gabriel e por toda sua grande dedicação com nossa família. Obrigada Amor.

Ao Professor Harry H. Beller do laboratório Nacional de Lawrence Berkeley por ceder gentilmente os padrões dos metabólitos não disponíveis comercialmente, através da Bianca Ferreira.

A agência de fomento a pesquisa FAPESP pela bolsa concedida com número do projeto: 2012/13925-0. E por todo apoio financeiro durante a realização do trabalho e também ao(a) assessor(a) que anonimamente muito contribuiu.

A Petrobras-ANP pelo auxílio financeiro para o fornecimento do equipamento do LC-MS/MS.

Ao programa de pós-graduação em química da UFSCar, ao departamento de química da UFSCar e professores.

Ao povo brasileiro pelo acolhimento durante minha estadia no Brasil.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BTEX – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno.
- BSA – do inglês “benzilsuccinicacid”, ácido benzilsuccínico ou benzilsuccinato.
- 2-metilBSA e 3-metilBSA – “2 / 3methyl-benzilsuccinicacid”, ácido 2/3-metil benzilsuccinico.
- GC/FID – Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama.
- GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.
- NMP - Número mais provável.
- BRS – Bactérias redutoras de sulfato.
- BRN – Bactérias redutoras de nitrato.
- BRF – Bactérias redutoras de ferro (III).
- SPME-HS– do inglês “Solid phase microextraction- head space”. Microextração em fase sólida no modo headspace.
- SPE – do inglês “Solid phase extraction”. Extração em fase sólida.
- ANM – Atenuação natural monitorada.
- LOD - Limites de detecção
- LOQ - Limites de quantificação.
- Aa/Ac – Área na série ativa / Área na série controle estéril.
- Ca/Cc – Concentração da série ativa / Concentração na série controle estéril.

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1- Características físico-químicas dos BTEX.	7
TABELA 2.2 -Tipos de respiração.	17
TABELA 4.1- Variáveis e níveis do planejamento para o método de SPME. ...	22
TABELA 4.2 - Resultados do planejamento experimental Box-Behnken na extração de BTEX, avaliados em função das áreas dos picos obtidos.	24
TABELA 4.3 - Respostas (área do pico) do planejamento experimental Box-Behnken convertidas para desejabilidade e desejabilidade global.	25
TABELA 4.4 - Características do método de HS-SPME-GC-FID.	29
TABELA 4.5- Características físico-químicas dos metabólitos de BTEX estudados.	34
TABELA 4.6- Resumo dos cartuchos e metodologias utilizadas no desenvolvimento da metodologia por SPE.	37
TABELA 4.7 - Recuperação obtida para os compostos de interesse no procedimento de SPE empregando cartuchos Oasis HLB da Waters (EUA).	39
TABELA 4.8 - Recuperações da extração completa com o método de MeOH 20% a pH 2.	44
TABELA 4.9 - Condições cromatográficas e do detector usadas no método de determinação dos metabólitos de BTEX.	45
TABELA 4.10 - Grupos Microbianos, Meios de Cultura, Metodologia e Condições de Cultivo.	51
TABELA 4.11- Soluções estoque usadas no preparo da solução de diluição. ...	53
TABELA 4.12- Composição da água de diluição.	53
TABELA 5.1 - Caracterização do solo usado nos microcosmos.	63
TABELA 5.2- Equações estequiométricas da oxidação completa do benzeno com diferentes receptores de elétrons.	78
TABELA 5.3- Equações estequiométricas da oxidação completa do tolueno com diferentes receptores de elétrons.	80

TABELA 5.4- Equações estequiométricas da oxidação completa do etilbenzeno e xilenos com diferentes receptores de elétrons.	84
TABELA 5.5 - Fração remanescente de cada BTEX nos microcosmos enriquecidos com os diferentes receptores de elétrons.	87
TABELA 5.6– Parâmetros cinéticos para o tolueno.	88
TABELA 5.7–Concentrações máximas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos metabólitos de BTEX nos microcosmos enriquecidos com os diferentes receptores de elétrons, entre parêntesis o tempo de incubação em dias.	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1- Estruturas dos BTEX	6
FIGURA 2.2 - Metabólitos de BTEX gerados em condições anaeróbias selecionados para serem monitorados no presente estudo.	12
FIGURA 4.1- Montagem de sistema de extração dos BTEX por SPME. Fonte: fotografia feita pela autora no LBGqA/DQ/UFSCar.	20
FIGURA 4.2 - Efeito da força iônica na extração de BTEX por SPME.	23
FIGURA 4.3 - Diagrama de pareto mostrando os efeitos padronizados das variáveis estudadas para a deseabilidade global na extração de BTEX.	26
FIGURA 4.4- Superfície de resposta de D (deseabilidade) da área do pico.	27
FIGURA 4.5- Superfície de resposta do do desvio padrão (%RSD).	28
FIGURA 4.6- (a) Cromatograma de BTEX de solo fortificado com padrão (2 mg kg ⁻¹), (b) cromatograma de solo contaminado com óleo diesel dessulfurado S-10 (1% m/m), e (c) cromatograma de solo contaminado com óleo diesel S-1800 (1% m/m).	30
FIGURA 4.7- Cromatógrafo gasoso com detector FID e ECD da Shimadzu. Fonte: fotografia feita pela autora no LBGqA/DQ/UFSCar.	31
FIGURA 4.8- Etapa de dessorção dos compostos da fibra a 200°C.	32
FIGURA 4.9 - Esquema de extração dos metabólitos de BTEX a partir de solos.	33
FIGURA 4.10 - Sistema de extração por SPE, usado para limpeza do extrato e transferência de solvente.	36
FIGURA 4.11 - Escolha do cartucho para SPE como etapa de “ <i>clean up</i> ” e transferência de solvente na extração, barra de erro desvio padrão.	37
FIGURA 4.12- Ultrassom usado na metodologia de extração, amostras recém retiradas do ultrassom e posteriormente centrifugadas.	40
FIGURA 4.13 - Métodos testados na extração dos metabólitos.	41

FIGURA 4.14- Comparação dos métodos durante a extração dos metabólitos por ultrassom-SPE, em cada imagem, à esquerda está o tubo de extração depois da centrifugação e a direita o cartucho de SPE depois da limpeza do extrato.	42
FIGURA 4.15 - Recuperação dos analitos e padrões internos na extração dos metabólitos a partir do solo contaminado com diesel, e solo livre de diesel, por dois métodos diferentes (barra de erro desvio padrão).	43
FIGURA 4.16 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector triplo quadrupolo da Waters [®] . Fonte: Fotografia feita pela autora no LBGqA/DQ/UFSCar.	46
FIGURA 4.17 - Determinação da composição da fase móvel (A: água 0.1% ácido fórmico, B: Metanol), em função da separação dos isômeros 2 e 3 metilBSA e ácidos toluicos.	47
FIGURA 4.18- Cromatograma dos metabólitos e seus padrões internos, mostrando a transição de quantificação.	48
FIGURA 4.19- Esquema de diluições seriadas no método de NMP.	50
FIGURA 4.20 - Preparação do meio de cultivo para bactérias anaeróbias redutoras de ferro.	52
FIGURA 4.21 -Interpretação dos resultados para as bactérias redutoras de sulfato, 1) Positivo (preto), pela presença de precipitado preto devido a formação de FeS, 2) Negativo (Rosa).	54
FIGURA 4.22 - Esquema para interpretação das bactérias redutoras de nitrato.	55
FIGURA 4.23 - Resultados para bactérias redutoras de nitrato (BRN), 1) Positivo para BRN ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$), a coloração vermelha indica a presença de nitrito, formado a partir da redução do nitrato, 2) Positivo para BRN ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$), 3) Negativo para BRN.	56
FIGURA 4.24 -Interpretação para as BRF, a) 1) Resultado positivo pela formação de um complexo roxo ($\lambda=562$ nm) com o Fe^{2+} gerado pela redução de Fe^{3+} pela presença de BRF, 2) negativo. b) Complexo de ferrozina com Fe^{2+}	56

FIGURA 4.25 - Esquema da montagem dos microcosmos montados para estudo de biodegradação de BTEX.	57
FIGURA 4.26- Condicionamento da microbiota natural do solo ao diesel. a) solo in natura passado por peneira de 4 mm, b) distribuição inicial do solo no frasco, camada inferior do solo contaminado com diesel e saturada com água, coberta com uma camada de solo seco, c) troca de atmosfera realizada semanalmente com fluxo de N ₂	58
FIGURA 4.27- Séries dos microcosmos, envolvendo um total de 30 frascos para cada série. Para cada tempo monitorado foram sacrificados três de cada um, a) série de sulfato, série de nitrato e série de ferro (III), b) série de diesel e c) série do controle estéril no tempo 0.	59
FIGURA 4.28- Montagem dos microcosmos, a) pesagem de 70 gramas de solo seco b) após a adição do meio salino seguiu-se uma etapa de desaeração dos frascos com fluxo de N ₂ , c) adição de BTEX e homogeneização, d) frascos fechados e lacrados rapidamente.	60
FIGURA 4.29- a) Estufa usada para incubação dos microcosmos, b) vista interna da estufa com os grupos de microcosmos incubados a 30°C.	60
FIGURA 4.30- Representação esquemática do método de monitoramento.	62
FIGURA 5.1 - Bactérias redutoras de sulfato no início (a) e final do experimento (b) nos microcosmos com BTEX.	65
FIGURA 5.2 - Bactérias redutoras de sulfato no início (a) e final do experimento (b) nos microcosmos com diesel.	66
FIGURA 5.3 - Bactérias redutoras de nitrato no início (a) e final do experimento (b) nos microcosmos com BTEX.	67
FIGURA 5.4 - Bactérias redutoras de nitrato no início (a) e final do experimento (b) dos microcosmos com diesel.	68
FIGURA 5.5- Bactérias redutoras de ferro no início (a) e final do experimento (b) dos microcosmos com compostos BTEX.	69

FIGURA 5.6- Bactérias redutoras de ferro no início (a) e final do experimento (b) dos microcosmos com diesel.....	70
FIGURA 5.7- Quantificação de grupos bacterianos por NMP, a) Experimento com mistura de BTEX, b) Experimento com diesel convencional.	72
FIGURA 5.8- Mudanças temporais nas séries de microcosmos com BTEX a) série com SO_4^{2-} no tempo 8 dias, b) série com NO_3^- no tempo 25 dias, c) série com Fe^{+3} no tempo 8 dias, d) controle estéril.....	73
FIGURA 5.9- Cromatogramas dos compostos BTEX nos solos dos microcosmos no tempo 35 d, a) com NO_3^- no controle (—) e série ativa (—), b) com SO_4^{2-} no controle (—) e na série ativa (—).	74
FIGURA 5.10– Indicativo de ausência de crescimento para bactérias anaeróbias totais no controle abiótico no final no tempo 60 dias.....	74
FIGURA 5.11- Cromatogramas dos BTEX nos microcosmos com SO_4^{2-} , a) no tempo 0, no solo (—), e no <i>headspace</i> (—), b) no tempo 35 no solo (—), e no <i>headspace</i> (—).....	75
FIGURA 5.12 – Monitoramento de benzeno no <i>head space</i> nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	77
FIGURA 5.13 – Monitoramento de benzeno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	77
FIGURA 5.14 – Monitoramento de tolueno no <i>headspace</i> nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	79
FIGURA 5.15 – Monitoramento de tolueno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	79
FIGURA 5.16 – Monitoramento de etilbenzeno no <i>headspace</i> nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	81
FIGURA 5.17 –Monitoramento de etilbenzeno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	81
FIGURA 5.18 – Monitoramento de p-xileno no <i>headspace</i> nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	83

FIGURA 5.19 – Monitoramento de p-xileno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	83
FIGURA 5.20 – Monitoramento de o-xileno no <i>headspace</i> nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	85
FIGURA 5.21 – Monitoramento de o-xileno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	86
FIGURA 5.22 -Formação do ácido benzilsuccínico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.....	90
FIGURA 5.23 -Mecanismo de reação proposto para a enzima benzilsuccinato sintasa. O radical que contém a enzima produz um radical benzil no tolueno, onde é adicionado o fumarato para formar o benzilsuccinato. Figura tomada de HEIDER et al., 1999.	91
FIGURA 5.24 - Formação do ácido 2-metilbenzilsuccínico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	92
FIGURA 5.25 -. Formação do ácido 2-toluico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	93
FIGURA 5.26 - Formação do ácido 4-toluico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	94
FIGURA 5.27 - Formação do ácido benzóico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.	96
FIGURA 5.28- Mudanças de aspectos na série dos microcosmos com diesel S-1800.	97
FIGURA 5.29- Cromatogramas dos microcosmos com diesel no <i>head space</i> no tempo 0, (—) e no tempo 8 dias(—).	98
FIGURA 5.30- Produção de CO ₂ nos microcosmos com diesel.....	99
FIGURA 5.31- Cromatogramas dos microcosmos com diesel no solo no tempo 0, (—) e no tempo 30 dias(—).	99
FIGURA 5.32 - Monitoramento de BTEX no <i>head space</i> dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.	100

FIGURA 5.33 -Monitoramento de benzeno e tolueno no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.....	101
FIGURA 5.34 - Monitoramento de etilbenzeno e xilenos no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.	102
FIGURA 5.35 -Formação dos ácidos benzilsuccínico e 2-metilbenzilsuccínico no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.....	104
FIGURA 5.36 -Formação dos ácidos 2 e 3 toluico no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.....	105
FIGURA 5.37 -Formação do ácido benzóico no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.....	105

RESUMO

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BTEX E SEUS METABÓLITOS DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLOS: ESTUDOS DE REMEDIÇÃO EM MICROCOSMOS. Os hidrocarbonetos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, conhecidos como BTEX são comumente encontrados em locais próximos a refinarias de petróleo e derivados, postos de abastecimento, ou ao redor de oleodutos, quando oriundos de vazamentos e/ou derramamentos. Nestes locais, a atividade microbiana pode promover a transformação desses produtos em compostos como CO₂ ou metano, como também convertê-los em compostos altamente tóxicos e/ou cancerígenos. Alguns dos metabólitos resultantes do processo de biotransformação dos BTEX são benzilsuccinato, 2-metilbenzilsuccinato, isômeros do ácido toluico e o ácido benzóico. Nesse contexto, o objetivo deste estudo é ampliar o conhecimento acerca da biodegradação de hidrocarbonetos monoaromáticos em solos, mediante a investigação da remoção sob três diferentes condições (SO₄²⁻, NO₃⁻ e Fe(III)), e a avaliação da formação de produtos associados à biodegradação. Para observar o que acontece em um solo onde diferentes receptores de elétrons atuam como oxidantes, foram montadas séries de experimentos em microcosmos com sulfato, nitrato e ferro (III) atuando de forma individual em solo contaminado com BTEX. Visando simular um cenário mais realista de contaminação, foi montada também uma série de experimentos em microcosmos com solo artificialmente contaminado com óleo diesel convencional e uma mistura dos receptores de elétrons previamente mencionados. As concentrações de BTEX e dos metabólitos foram monitoradas durante 90 dias. Previamente ao monitoramento foi necessário o desenvolvimento dos métodos analíticos para este fim, empregando cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (GC/FID) para a determinação dos BTEX e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo

(LC-MS/MS), para a determinação dos metabólitos. Uma caracterização microbiológica preliminar dos grupos de bactérias investigadas foi realizada, mostrando uma predominância das bactérias redutoras de nitrato no solo utilizado. Foram encontradas evidências de que os compostos BTEX podem ser removidos sob condições anaeróbias em presença de nitrato e sulfato. O uso de ferro (III) não propiciou uma diminuição significativa na concentração dos contaminantes durante os três meses de incubação, exceto para tolueno. Os resultados também mostraram que o tolueno foi o composto mais facilmente degradado em meio anaeróbio, em solos enriquecidos com diferentes receptores de elétrons. Por outro lado o aparecimento de metabólitos foi mais rapidamente detectado na série empregando nitrato, devido ao maior conteúdo de bactérias redutoras de nitrato nativas no solo, associado ao fato de que o nitrato possui um maior poder oxidante dentre os receptores de elétrons estudados. No caso do ferro (III) o aparecimento dos metabólitos foi mais lento, sendo, no entanto, detectadas altas concentrações principalmente para o ácido benzilsuccínico proveniente da degradação de tolueno. Já no solo artificialmente contaminado com óleo diesel o grande número de compostos presentes neste combustível provocou um aumento na toxicidade do meio, inibindo a atividade biológica e afetando a eficiência de remoção dos BTEX.

Palavras-chave: BTEX, metabólitos BTEX, contaminação de solos por óleo diesel, bactérias anaeróbias, bactérias redutoras de nitrato.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF THE BEHAVIOR OF BTEX AND ITS BIODEGRADATION METABOLITES IN SOIL: REMEDIATION STUDIES IN MICROCOSMOS. The monoaromatic hydrocarbons composed by benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes isomers (BTEX), are commonly found near local oil refineries, filling stations, or around pipelines, as a result of leaks and/or spills. In such places, a microbial activity not only promotes the transformation of these compounds into products such as CO₂ or methane, but also convert them into highly toxic and/or carcinogenic compounds. Some of the metabolites resulting from biotransformation process are benzy succinic acid, 2-methylbenzy succinic acid, isomers of toluic acid and benzoic acid. The aim of this study is to increase knowledge about the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in soils, by investigating their removal under three different conditions, and to evaluate the formation products associated with their degradation. This work was carried out with series of anaerobic microcosms with three different electron acceptors acting as oxidants: sulfate, nitrate and iron (III). The individual effect of each in a soil contaminated with BTEX and another set containing a mixture of these electron acceptors with soil contaminated with conventional diesel were investigated. The concentrations of BTEX and metabolites were monitored for 90 days. Previously, it was necessary to develop suitable analytical methods for monitoring BTEX through gas chromatography coupled with flame ionization detection (GC/FID) while high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (LC-MS/MS) was used for determining the metabolites. A preliminary microbiological characterization of groups of bacteria was carried out, showing a prevalence of nitrate-reducing bacteria in the soil utilized. Evidence that the BTEX compounds may be removed in anaerobic conditions linked to nitrate and sulfate reduction were found. Using iron (III) like electron receptor was not observed a significant decrease in the concentration of contaminants during the

three months of incubation, except for toluene. Results also show that toluene was the compound quite easily degraded in anaerobic conditions in soil, enriched with different electron acceptors. On the other hand the appearance of metabolites was quickly detected in the series of experiments employing nitrate, due to the higher content of native nitrate reducing bacteria in the soil, associated with the fact that nitrate has a higher oxidizing power from the electron receptors studied. In case of iron (III), metabolites were slow to appear, however higher concentrations were detected mainly of benzylsuccinic acid from toluene degradation. To establish a scenario more realistic of contamination, a soil was artificially contaminated with diesel. However, due to the large number of compounds present in the fuel, the toxicity of the medium was increased, causing inhibition of the biological activity and thus affecting the efficiency of BTEX removal.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
SUMÁRIO	xx
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1- Considerações gerais.....	4
2.2- Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos (BTEX).....	5
2.3- Biorremediação de solos contaminados.....	7
2.4- Biodegradação anaeróbia de BTEX	9
2.5- Bactérias anaeróbias: bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias redutoras de nitrato (BRN) e bactérias redutoras de ferro (BRF)	13
3- OBJETIVOS	18
3.1- Objetivo geral.....	18
3.2- Objetivos específicos.....	18
4- MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS	19
4.1- Determinações de BTEX.....	19
4.1.1- Extração de BTEX do solo por SPME-HS	19
4.1.2- Otimização das variáveis de extração de BTEX - planejamento experimental Box-Behnken e análise multirresposta.....	21
4.1.3- Determinações de BTEX por GC/FID.....	31

4.2-	Determinação dos metabólitos	32
4.2.1-	“Clean up” dos extratos por SPE.....	35
4.2.2-	Extração dos metabólitos de BTEX do solo por ultrassom.....	39
4.2.3-	Determinação dos metabólitos por LC-MS/MS.....	44
4.3-	Caracterização e quantificação das bactérias anaeróbias envolvidas na degradação pelo método do número mais provável (NMP)	48
4.3.1-	Técnica do número mais provável (NMP)	49
4.3.2-	Descrição da preparação dos meios	50
4.3.3-	Preparação das amostras	52
4.3.4-	Interpretação dos resultados para cada grupo de bactérias	54
4.4-	Montagem experimental dos microcosmos	57
5-	RESULTADOS	63
5.1-	Caracterização do solo usado nos experimentos	63
5.2-	Caracterização microbiológica do solo.....	63
5.2.1-	Bactérias redutoras de sulfato (BRS)	64
5.2.2-	Bactérias redutoras de nitrato (BRN).....	66
5.2.3-	Bactérias redutoras de ferro (BRF)	69
5.3-	Degradação anaeróbia de BTEX sob diferentes condições de redução 72	
5.3.1-	Resultados preliminares nos microcosmos com BTEX.....	72
5.3.2-	Monitoramento da remoção de BTEX com três diferentes receptores de elétrons	75
5.3.3-	Monitoramento do aparecimento dos metabólitos.....	89
5.4 -	Degradação anaeróbia de BTEX em solo contaminado com óleo diesel e enriquecido com os três receptores de elétrons	96

5.4.1-	Resultados preliminares nos microcosmos com diesel	97
5.4.2-	Monitoramento da remoção de BTEX nos microcosmos contaminados com diesel.....	100
5.4.3-	Monitoramento do aparecimento dos metabólitos nos microcosmos contaminados com diesel.....	103
6-	CONCLUSÕES.....	106
7-	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
	ANEXOS	118
	APÊNDICE.....	124

1- INTRODUÇÃO

Quando ocorre um derramamento de derivados do petróleo em solos, uma das principais preocupações é a contaminação das águas subterrâneas e dos aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano. A água subterrânea e a umidade do solo representam em conjunto mais de 98% dos recursos mundiais de água doce, sendo a fonte de água potável para muitas pessoas, especialmente nas áreas rurais. Em todo planeta, cerca de dois bilhões de pessoas usam a água subterrânea para suprir suas necessidades de água potável (WORLD BANK, 2010).

No Brasil estima-se que entre 30 e 40% da água consumida é proveniente do subsolo. Em especial, as comunidades rurais nas regiões semiáridas do Nordeste Brasileiro são atendidas pelas águas subterrâneas. O incremento no uso desta água para abastecimento se deve principalmente à escassez hídrica existente em certas regiões do país, e também à melhor qualidade que apresenta em relação à água superficial, levando também a uma diminuição nos custos no tratamento. No estado de São Paulo, 71,6% dos municípios são abastecidos com águas subterrâneas, incluindo grandes cidades do interior de São Paulo, como Ribeirão Preto, Marília, São José dos Campos e São José do Rio Preto (HIRATA E CONICELLI, 2012) e também São Carlos, que capta tanto água superficial quanto também subterrânea.

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) representam um grupo de compostos orgânicos com maior preocupação ambiental, que aliam elevado grau de toxicidade e características cancerígenas, e que devido a sua relativa alta solubilidade em água ameaçam os escassos recursos de água potável (MAZZEO et. al, 2010). Tais compostos estão presentes nos derivados mais leves do petróleo, como a gasolina e o diesel, e podem chegar as águas subterrâneas por vazamentos de depósitos de resíduos químicos, aterros

municipais, tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis (WEELINK et. al, 2010), ou até por derramamentos provocados por ações de vandalismo, ou roubo a oleodutos, conforme é relatado com respeito a diferentes países produtores como Nigéria, Colômbia, México e Brasil entre outros (LAWAL e ESE, 2012; TORRES, 2013; PARFOMAK, 2013; EL TIEMPO, 2013 e 2015).

Os derramamentos de petróleo e seus derivados registrados em solos brasileiros vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas que visam, principalmente, a descontaminação dessas matrizes e a minimização da contaminação de aquíferos subterrâneos. Uma prática comum é combinar uma técnica de remediação ativa focada na eliminação da fonte de contaminação, a um monitoramento da contaminação residual, caracterizando um processo conhecido como “atenuação natural” o qual tem sido empregado para descrever a remediação passiva do solo, envolvendo diversos processos de origem natural, como a biodegradação, volatilização, dispersão, diluição e adsorção (ANDRADE et al., 2010).

A hipótese deste trabalho é estudar o potencial do solo para a biorremediação *in situ* de substâncias tóxicas lixiviadas do solo para as águas subterrâneas, como os BTEX. Neste trabalho a degradação de BTEX foi observada em um solo com três diferentes receptores de elétrons atuando como oxidantes individualmente, sendo eles sulfato, nitrato e ferro (III). Foram montadas séries de experimentos em microcosmos com cada um dos receptores atuando de forma individual em solo artificialmente contaminado com uma mistura de BTEX. Paralelamente a estes experimentos, foi montada outra série contendo uma mistura dos receptores de elétrons anteriormente citados em um solo contaminado com diesel convencional, a fim de simular um cenário mais realista.

INTRODUÇÃO

Uma etapa preliminar consistiu no estabelecimento dos métodos analíticos que são usados no monitoramento dos compostos envolvidos, empregando a cromatografia de gases acoplada ao detector de ionização em chama (GC/FID) para a determinação dos BTEX e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) para a quantificação dos metabólitos gerados pela degradação anaeróbia. Foram escolhidos sete metabólitos mais reportados na literatura como originados na degradação anaeróbia de BTEX, representados por ácido benzóico, ácido o-toluíco, ácidos m-/p-toluíco, ácido benzilsuccínico (BSA), ácido 2-metilbenzilsuccínico (2-metilBSA), ácido 3-metilbenzilsuccínico (3-metilBSA). Como parte dos procedimentos, foram otimizadas as técnicas de extração dos analitos em fase sólida (SPME) para os BTEX e por ultrassom-SPE (extração em fase sólida) para os metabólitos.

Nesta tese são mostrados o desenvolvimento e os resultados da validação dos métodos analíticos na seção referente à parte experimental. Na seção dos resultados são mostrados os dados e discussão concernentes à caracterização microbiológica dos solos, assim como a montagem dos microcosmos e o monitoramento dos compostos alvo e seus respectivos metabólitos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Considerações gerais

A água subterrânea tem um papel estratégico, evidenciado em tempos de escassez conforme o atualmente experimentado no sudeste do Brasil e com o agravamento de possíveis mudanças climáticas globais. Devido às suas características, os aquíferos podem fornecer água por longos períodos, mesmo durante estiagens prolongadas. Existe também um incremento no seu uso para abastecimento tanto em função de episódios de escassez de águas superficiais como também à melhor qualidade que apresentam, com relação às águas superficiais, o que implica também a uma diminuição nos custos com tratamento (HIRATA e CONICELLI, 2012; WORLD BANK, 2010). Frente a este cenário, é de suma importância manter e preservar a qualidade desses recursos para um futuro de incerteza climática, mediante o controle e a fiscalização da qualidade dos solos e da água subterrânea.

Por outro lado, a introdução de contaminantes no solo pode resultar na perda de algumas ou de várias de suas funções e provocar, ainda, a contaminação da água subterrânea, sendo que uma das principais preocupações ambientais são as ocorrências de vazamentos de derivados do petróleo em solos e a conseqüente contaminação dos aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano.

O crescente interesse pela água subterrânea tem intensificado o foco nos estudos sobre lixiviação, a qual constitui fonte de poluentes para aquíferos, estimulando também os estudos sobre o papel desempenhado pelos microrganismos na transformação de contaminantes no ambiente terrestre em subsuperfície profunda. Embora nessa camada de solo o número de microrganismos diminua significativamente comparado ao horizonte A (camada mais superficial do solo), devido ao menor conteúdo orgânico e ausência de

oxigênio, existem um conjunto de bactérias anaeróbias que são encontradas nessa subsuperfície, como as bactérias redutoras de sulfato, arqueas metanogênicas, ou facultativos como os redutores de nitrato.

Mediante o exposto é importante o estudo do potencial da biorremediação *in situ* de substâncias tóxicas lixiviadas do solo para as águas subterrâneas, como os BTEX. Estudos de biorremediação podem esclarecer se os processos de biodegradação poderiam ser otimizados por meio da adição de nutrientes inorgânicos que estimulem a atividade microbológica (MADIGAN et al., 2004).

2.2- Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos (BTEX)

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três isômeros de xileno mostrados na Figura 2.1 (comumente conhecidos como BTEX) são constituintes do petróleo e são considerados como os principais contaminantes das águas subterrâneas, tendo ocorrência a partir de acidentes por derramamento na superfície, usualmente provenientes de operações de refino, armazenamento, transporte e comercialização do petróleo e de seus derivados, especialmente com respeito à gasolina e ao óleo diesel. Além disso, atuam também como fontes de contaminação o uso de solventes, o escoamento de gasolina nas ruas e a combustão de madeira (WEELINK et. al, 2010). Consequentemente, o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, são frequentemente encontrados como contaminantes nestes locais.

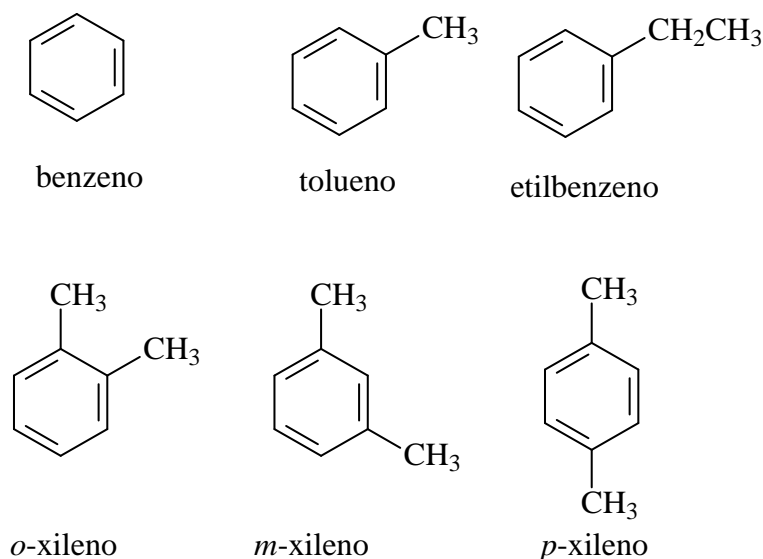


FIGURA 2.1- Estruturas dos BTEX

A toxicidade e o potencial impacto das diversas moléculas orgânicas variam consideravelmente de acordo com grupo ao qual pertencem. Para hidrocarbonetos de uma mesma classe, a toxicidade tende a aumentar com a diminuição da massa molar, sendo facilmente espalhados nos compartimentos da pedosfera, com dissipação dependente também do tipo de microrganismo exposto e da etapa do ciclo de metabolismo envolvida (NAVARRO, 2009). Para hidrocarbonetos com massa molar similar, a toxicidade tende a aumentar na seguinte ordem: alcanos, alcenos, ciclo parafinas, aromáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Os hidrocarbonetos mais tóxicos são os aromáticos com baixo ponto de ebulição, dentre eles se encontram os BTEX, que tendem a se solubilizar facilmente na água, apresentando baixos coeficientes de partição octanol-água e exibindo uma lenta absorção no solo. Algumas características físico-químicas destes compostos são mostradas na Tabela 2.1. Desse modo, esses compostos apresentam um transporte preferencial no meio aquoso, favorecendo a contaminação de reservatórios de água e interações com a cadeia trófica (MAZZEO et. al, 2010).

Uma vez ingeridos, os BTEX podem ser metabolizados e originar derivados carcinogênicos ou mutagênicos, mesmo quando o composto original é de relativa baixa toxicidade (NAVARRO, 2009). A exposição a cada um desses compostos, mesmo que individualmente, pode produzir danos neurológicos e afetar o sistema nervoso central. O benzeno, além de ser um agente carcinogênico, pode causar distúrbios hematológicos, que por sua vez podem ter como consequência, em casos extremos, a anemia aplástica e a leucemia mielóide aguda (ATSDR, 2004).

TABELA 2.1- Características físico-químicas dos BTEX.

Substância	Massa molar (g mol ⁻¹)	Pressão de vapor (mm Hg) 20°C	Solubilidade em água (µg L ⁻¹) a 25°C	P. ebulição (°C)	Log (Kow)
benzeno	78	95,2	1700	80,1	2,13
tolueno	92	28,4	515	110,6	2,69
etilbenzeno	106	9,5	152	136,0	3,15
o-xileno	106	6,6	175	144,4	2,77
m-xileno	106	8,0	158	139,0	3,20
p-xileno	106	7,0	198	138,4	3,15

Dados de <http://www.chemspider.com/>

2.3- Biorremediação de solos contaminados

As ocorrências de contaminações por derivados do petróleo vêm motivando a realização de pesquisas relacionadas à remediação e ao controle ambiental. A maior parte do petróleo é passível de biodegradação, no entanto trata-se de um processo lento e que pode demorar muitos anos. Mesmo frente à questão cinética, o processo de biodegradação é amplamente aceito hoje no contexto da atenuação natural como uma ferramenta adequada para lidar com a contaminação da superfície terrestre e controlar a propagação de plumas contaminantes com menor custo e menor dano ambiental (TONINI et. al, 2010).

Em países do hemisfério norte, como os Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa, a técnica bioquímica de remediação vem sendo

amplamente utilizada em trabalhos que se baseiam no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. No caso do Brasil a adição de microrganismos ainda é muito discutida e os projetos de biorremediação ainda estão no campo da teoria ou em escala piloto. Por enquanto, a melhor estratégia no país é aproveitar os microrganismos nativos no solo, e a adaptação desta microbiota *in-situ*.

Segundo a Agência Ambiental Norte-Americana – USEPA – o termo “Atenuação Natural Monitorada” (ANM) refere-se ao uso dos processos de atenuação natural que ocorrem espontaneamente, dentro de um contexto de remediação monitorada e controlada de um sítio, em um período de tempo razoável, com o objetivo de reduzir a concentração e toxicidade de contaminantes até níveis adequados à proteção da saúde humana e ao meio ambiente (USEPA, 1999).

Na ANM, mesmo sem acréscimo de nutrientes ocorre uma degradação dos contaminantes, o que se constitui em uma das principais vantagens da atenuação natural em solo, uma vez que são aproveitados os minerais e nutrientes naturais do ambiente. A produtividade do solo depende grandemente da fração orgânica presente, embora, normalmente esta fração seja menor que 5%, ela serve como fonte de alimento para os microrganismos (MANAHAN, 2000).

Em geral, a ANM tem custo reduzido quando comparado a outros métodos de remediação. Além disso, é um método que pode ser usado antes ou após outras tecnologias de remediação, podendo ser aplicado mesmo quando o contaminante se encontra amplamente difundido no solo. No entanto a aplicabilidade da técnica depende da velocidade de migração dos contaminantes, sendo que estes podem migrar antes de serem degradados. Durante a atenuação natural, os microrganismos autóctones passam a utilizar em seus metabolismos os compostos orgânicos poluentes como fontes de carbono, provocando, então, a

redução das concentrações dessas substâncias ao longo do tempo (ROBB e MOYER, 2001).

Os solos brasileiros, em particular, possuem características físico-químicas que favorecem a degradação desses contaminantes, fatores ambientais como teores de umidade e oxigênio, bem como a disponibilidade de nutrientes nos solos e as condições climáticas do Brasil, são bastante adequadas para o emprego dessa técnica de biorremediação (ANDRADE et al., 2010). Por outro lado, são solos que se caracterizam por estar entre os mais ácidos no mundo, com faixas de pH aproximadas entre 5,0 e 6,0, (IAEA, 2000) o que exige uma especial atenção, sendo que a faixa ideal do pH para o crescimento das bactérias mesófilas está entre 6,5 e 8,5 (ANDRADE et al., 2010).

Diferentemente dos estudos de degradação em meios aquosos, os mecanismos de biodegradação em solos ganham complexidade devido ao grande número de variáveis envolvidas: a natureza heterogênea do solo, a disponibilidade de receptores de elétrons, a composição de sais, minerais, nutrientes, microbiota nativa, conteúdo de água e/ou carbono. Todas estas variáveis podem afetar e mudar a eficiência de biodegradação de compostos orgânicos em solos. Desse modo, justifica-se a importância do estudo do comportamento dos BTEX em solos tropicais. Os microcosmos montados neste trabalho foram com solo saturado, simulando o solo saturado de um aquífero.

2.4- Biodegradação anaeróbia de BTEX

A capacidade das bactérias de biodegradar anaerobiamente os BTEX tem sido claramente demonstrada por diferentes estudos prévios. Durante o processo de biodegradação anaeróbia os BTEX são usados como doadores de elétrons e como fonte de carbono. Contudo, essa biodegradação é limitada pela disponibilidade de receptores de elétrons como nitrato, sulfato, dióxido de carbono ou ferro (III) (LAWRENCE, 2006; MADIGAN e MARTINKO, 2006).

Estudos prévios têm caracterizado principalmente microrganismos desnitrificantes (DOU et al., 2008a) e bactérias redutoras de sulfato nas vias de degradação do tolueno e etilbenzeno, (SPORMANN e WIDDEL, 2000; FOGTH, 2008) e também para o *m*-xileno (MORASCH et. al, 2001). COZZARELLI et al. (2010), DOU et al. (2008b) e HU et al. (2007) relatam a biodegradação anaeróbia de BTEX ligada à redução de nitrato e sulfato, além de outros receptores de elétrons como Fe(III), Mn(IV), NO_3^- , SO_4^{2-} e dióxido de carbono (COZZARELLI e BAEHR, 2003; FOGHT, 2008). Em condições anaeróbias, as constantes de biodegradação variam consideravelmente entre um e outro BTEX, de forma geral o benzeno mostrou ser o mais recalcitrante com decaimentos de 0,03% por dia, enquanto que o tolueno mostrou ser o composto mais factível de ser biodegradado, com decaimentos de 3,3% por dia (SUAREZ e RIFAI, 1999).

Em 1928 foi observada pela primeira vez a degradação natural dos BTEX em solos, sendo esta degradação promovida por microrganismos. De fato têm sido encontradas mais de 245 espécies de bactérias presentes em amostras de solo contaminado, as quais são capazes de degradar hidrocarbonetos. Dentre as espécies mais citadas encontram-se as do gênero *Pseudomonas*, como as *Pseudomonas putida*, (OTENIO et, al., 2005; SHIM et al., 2005), *Pseudomonas fluorescens*, (SHIM et al., 2005), *Pseudomona saureofaciens*, e outras bactérias como as microbactérias do leite (DOU et al., 2008a), e fungos *Cladophialophora* sp (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002).

A princípio, um processo efetivo de biodegradação de um composto orgânico deve levar principalmente à produção de água, gás carbônico e biomassa. No entanto, a atividade microbiana pode transformar compostos pouco ou nada tóxicos em metabólitos altamente tóxicos, o que torna importante o monitoramento dos produtos gerados durante os processos de biodegradação.

Para avaliar a eficácia do processo de biorremediação natural em solos contaminados, é importante a utilização de técnicas químicas, biológicas e de bioensaios que forneçam dados confiáveis e consistentes sobre os riscos reais causados pela ação de metabólitos formados na biodegradação de compostos orgânicos. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar os mecanismos de degradação aeróbia e anaeróbia de BTEX no ambiente. Dentre as publicações focadas principalmente na degradação anaeróbia desses compostos podem ser destacados os trabalhos de FOGHT (2008); WADE (2009) e BELLER (1995 e 2000) os quais discutem as rotas e processos de biodegradação de BTEX, assim como sua importância na caracterização de fontes (denominado em inglês de ‘*chemical finger printing*’).

Existem três vias de biodegradação anaeróbia para o benzeno: (a) hidroxilação do anel benzênico, onde o primeiro produto formado é o fenol, seguido da formação da acetofenona, (b) metilação do benzeno formando o metilbenzeno (tolueno) e (c) a carboxilação do anel, formando o benzoato ou ácido benzóico. Contudo, as três vias chegam ao mesmo intermediário que é o benzoil-CoA, uma molécula que participa do ciclo metabólico do ácido cítrico (WEELINK et. al, 2010).

Durante a biodegradação do etilbenzeno também ocorre uma hidroxilação, porém, diferentemente do benzeno, a hidroxilação ocorre na cadeia alifática, formando o 1-feniletanol (WEELINK et. al, 2010). Por outra via é adicionada uma molécula de fumarato, originando o (1-fenil-etil) succinato (KNIEMEYER et. al, 2003). No caso do tolueno e dos isômeros xilenos, deve ser estudado o benzilsuccinato (ou ácido benzilsuccínico) e os seus homólogos metilbenzilsuccinatos para os xilenos (2,3 ou 4-metilbenzilsuccinato) formados pela reação com o fumarato sob condições anaeróbias (FOGHT, 2008; BELLER et. al, 1995). O ácido benzóico é gerado na fase final da biodegradação de todos esses compostos antes de formar gás carbônico (BELLER et al., 2000). Na

Figura 2.2 são mostradas as estruturas moleculares dos metabólitos que serão abordados no presente trabalho.

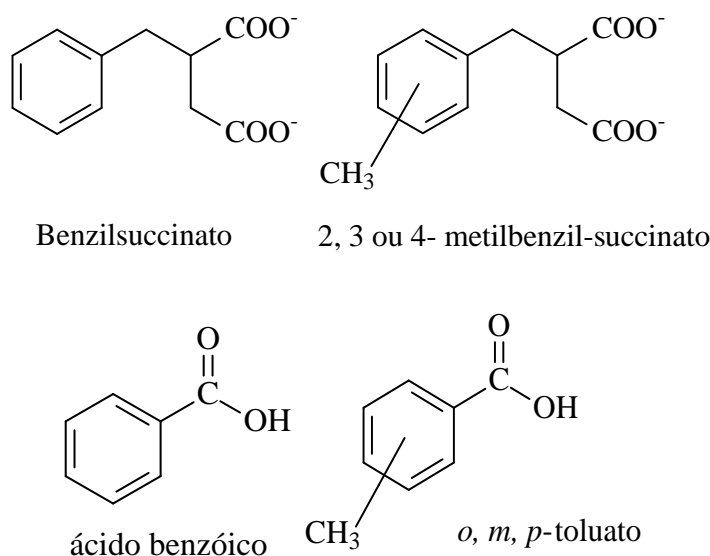


FIGURA 2.2 - Metabólitos de BTEX gerados em condições anaeróbias selecionados para serem monitorados no presente estudo.

BELLER et al. (1995) foram os pioneiros em determinar subprodutos do metabolismo de biodegradação de BTEX em águas subterrâneas. Esses autores propuseram que metabólitos como o ácido benzilsuccínico, o ácido benzilfumárico, e os ácidos o-, m-, e p-metilsuccínicos podem ser usados como indicadores biogeoquímicos do metabolismo anaeróbio *in situ* em aquíferos contaminados com gasolina. Na época, o instrumento analítico empregado foi o GC/MS, sendo necessária a derivatização como etapa adicional no preparo da amostra, devido à natureza polar dos compostos. Estudos mais recentes (BELLER, 2002; ALUMBAUGH et al., 2004) propuseram uma forma mais rápida e adequada para análise de águas subterrâneas mediante o uso de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), que evita a etapa de derivatização.

No presente estudo, a contribuição analítica foi baseada no desenvolvimento e otimização do método para análises dos BTEX em solos empregando a técnica de HS-SPME e cromatografia de gases acoplada ao detector de ionização em chama (GC/FID), assim como o desenvolvimento do método analítico para determinação dos metabólitos em solos mediante a técnica de extração ultrassônica-SPE junto à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Em amostras complexas, tais como solos, é realmente difícil alcançar reprodutibilidade na determinação, havendo a necessidade de trabalhos intensivos de otimização. A complexidade do solo enquanto matriz é incrementada quando este é contaminado com óleo diesel, tal qual ocorre em episódios de vazamentos. Frente a esta situação, no presente trabalho foram primeiramente otimizadas as técnicas analíticas usadas no monitoramento da biodegradação de BTEX em solos contaminados com diesel.

2.5- Bactérias anaeróbias: bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias redutoras de nitrato (BRN) e bactérias redutoras de ferro (BRF)

O conhecimento da diversidade microbiana no solo é de grande importância para determinar quais populações possivelmente estão envolvidas na biodegradação dos hidrocarbonetos. O solo é um ambiente originalmente rico em quantidade e diversidade de microrganismos, sendo que o crescimento microbiano mais intenso ocorre nas superfícies das partículas do solo, geralmente na rizosfera. As bactérias representam a maior parte da população microbiana do solo, sendo majoritariamente heterotróficas das quais os bacilos esporulados são muito comuns.

No solo ocorre a reciclagem de compostos químicos, sendo onde ocorrem as reações bioquímicas pelas quais os compostos orgânicos são

quebrados em compostos inorgânicos ou seus elementos constituintes, em um processo denominado de mineralização, no qual os microrganismos desempenham um papel essencial para as transformações químicas. Na superfície do solo se encontram principalmente as bactérias aeróbias, já nos horizontes mais profundos as bactérias anaeróbias ou facultativas são predominantes (STANIER ET al., 1996).

Dentro do ciclo biogeoquímico do nitrogênio, a conversão de amônio em nitrato (*nitrificação*) é realizada por bactérias quimioautotróficas aeróbias estritas, sendo o nitrato a principal forma de nitrogênio encontrado no solo. O processo de redução do nitrato a nitrito e deste a amônia, gás nitrogênio ou óxido nítrico é chamado de *desnitrificação* e ocorre em solos saturados com água, pela ação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, dentre outras (STANIER ET al., 1996).

Em condições de anaerobiose muitas bactérias aeróbias podem utilizar nitratos no lugar do oxigênio como receptor final de elétrons. Assim quando o material orgânico se decompõe no solo ou na água e o oxigênio se esgota como resultado da respiração aeróbia microbiana, algumas dessas bactérias aeróbias continuaram respirando caso haja nitrato presente e atuando como receptor de elétrons. Esse tipo de bactérias são as redutoras de nitrato (BRN), as quais reduzem o nitrato para nitrito (por exemplo, as *Escherichia coli*). Além disso, uma grande variedade de bactérias (*Rhodobacter*, *Thiobacillus*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre outras) são capazes de realizar uma cascata de respirações anaeróbias subsequentes usando o íon nitrito (NO_2^-) como receptor final de elétrons, o qual é reduzido a óxido nitroso (N_2O) e nitrogênio (N_2). Por meio deste processo o nitrogênio é eliminado do solo e da água para a atmosfera (STANIER ET al., 1996).

As bactérias redutoras de sulfato (BSR) são microrganismos anaeróbios estritos, metabolicamente versáteis provenientes de várias famílias e

diferentes gêneros. Utilizam o sulfato e outros compostos oxidados de enxofre como receptor final de elétrons (agente oxidante) para a produção de H₂S. Podem crescer de forma heterotrófica usando moléculas orgânicas de baixo peso molecular e de maneira autotrófica usando hidrogênio e dióxido de carbono (NAGPAL et al., 2000; HAO, 2003).

As BRS são subdivididas em dois grandes grupos dependendo da capacidade para degradar a matéria orgânica em forma parcial ou total, quer dizer, se oxidam ou não o acetato como fonte de carbono e energia. As oxidantes incompletas do substrato geram acetato como produto final, e utilizam lactato, piruvato, etanol e alguns ácidos graxos como fonte de carbono e energia para reduzir o sulfato a sulfeto. Sob condições ideais têm uma velocidade de crescimento muito mais rápida do que as oxidantes completas e podem exibir tempos de duplicação de 3 a 4 horas, se alimentadas com os substratos que as favorecem, como hidrogênio e lactato. O grupo está constituído por gêneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Thermodesulfobacterium* (BARTON e FAUQUE, 2009). As bactérias que promovem a oxidação completa do substrato a dióxido de carbono e sulfeto utilizam ácidos graxos, especialmente acetato. Mostram um crescimento lento, freqüentemente com tempos de duplicação superiores a 20 horas. Alguns exemplos de gêneros de bactérias capazes de oxidar completamente o substrato são *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* e *Desulfobacterium* (NAGPAL et al., 2000).

As BRS são comuns em ambientes anaeróbios onde auxiliam na degradação de matéria orgânica. Nesse tipo de ambiente, as bactérias fermentadoras extraem energia das grandes moléculas orgânicas e, como resultado são geradas moléculas pequenas como ácidos orgânicos e álcoois que são oxidados por bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas. A cor preta dos lodos gerados nestas condições é devida à ação das BRS. O forte cheiro de ovo podre é característico do sulfeto de hidrogênio e com freqüência um

marcador da presença de bactérias redutoras de sulfato na natureza. Durante a degradação anaeróbia da matéria orgânica, as BSR podem utilizar tanto o sulfato como receptor de elétrons como também compostos como o tiosulfato, o tetrionato e o enxofre elementar (HOU, 2003; POSTGATE et al., 1979). Algumas BRS também podem crescer na presença de nitrato, devido a seu metabolismo versátil que proporciona um maior saldo energético que com o sulfato.

Por outro lado, as bactérias redutoras de ferro são uma classe especial de microrganismos que utilizam óxidos e hidróxidos de Fe como receptores de elétrons. O Fe (III) é um receptor final de elétrons extensamente utilizado pelos organismos anaeróbios autotróficos e heterotróficos. O fluxo de elétrons nesses organismos é similar aos que usam como receptores finais o oxigênio ou nitrato, porém nos organismos redutores de ferro (III) a enzima final é a ferro-férrico redutase. Os organismos modelo incluem *Shewanella putrificiens* e *Geobacter metallireducens*. Estudos moleculares do DNA ribossomal (DNAr) 16S, em bactérias isoladas de sistemas líquidos, indicam que os membros da família *Geobacteraceae* são os microrganismos redutores de Fe(III) predominantes (LOVLEY et al., 1993). Algumas bactérias redutoras de ferro (III) como as *G.metallireducens* podem utilizar hidrocarbonetos tóxicos como o fenol ou tolueno como fonte de carbono. Por isso existe um grande interesse em usar esses microrganismos como agentes de biorremediação em aquíferos contaminados ricos em ferro (III) (LU et al., 2008), como é caso do Brasil.

Na Tabela 2.2 são mostrados os tipos de respiração e as respectivas equações estequiométricas generalizadas da oxidação completa da matéria orgânica, com os subprodutos formados em cada caso de mineralização. Em ambientes subterrâneos a seqüência de utilização dos receptores de elétrons, seguindo os valores da energia livre de Gibbs é: $O_2 > NO_3^- > Fe(III) > SO_4^{2-} > CO_2$. Primeiramente há uma alta demanda de oxigênio dissolvido que leva à

rápida depleção do oxigênio no ambiente e então os processos de biodegradação anaeróbios são prevaletentes.

Quando ocorre um vazamento de algum combustível derivado do petróleo, uma grande concentração de hidrocarbonetos se torna presente no solo, existindo um excesso de doadores de elétrons em comparação com as substâncias receptoras de elétrons. Nas plumas de contaminação ocorre conseqüentemente uma queda na concentração dos receptores de elétrons no centro da pluma, aumentando a limitação da biodegradação (MECKENSTOCK et al., 2015), havendo ainda um incremento na toxicidade causada pela alta concentração e variedade de hidrocarbonetos, o que diminui o potencial de degradação dos microrganismos nativos.

TABELA 2.2 -Tipos de respiração.

Tipo de respiração	Equação estequiométrica generalizada
(1) Aeróbia	$12\text{-CH-} + 15\text{O}_2 \rightarrow 12\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$
(2) Desnitificação	$\text{-CH-} + \text{NO}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \frac{1}{2}\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$
(3) Redução de manganês	$\text{-CH-} + \frac{1}{2}\text{Mn (IV)} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mn(II)} + \text{HCO}_3^-$
(4) Redução de ferro	$\text{-CH-} + \text{Fe(III)} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{HCO}_3^- + 6\text{H}^+$
(5) Redução de sulfato	$\text{-CH-} + \text{SO}_4^{-2} + 5\text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$

Fonte: GeovationConsultants, Inc., Florida, NY (US), 2002.

A presença de receptores de elétrons dissolvidos é diminuída na zona da fonte e não pode ser facilmente reabastecida na pluma devido ao fluxo laminar e a dispersão transversal limitada no meio poroso. Por conseguinte, a degradação metanogênica ou redução do ferro insolúvel (III) e manganês (IV) seriam os únicos processos possíveis que acontecem no núcleo da pluma, segundo estudos recentes que apóiam este novo conceito e que contradiz o conceito clássico de zoneamento redox reversível (ANNESER et al., 2010).

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

- ✓ Avaliar a biodegradação anaeróbia de BTEX em solos tropicais mediante o acompanhamento da formação dos subprodutos metabólicos, ácido benzilsuccínico, e seus homólogos metilbenzilsuccinatos, bem como a determinação dos grupos de bactérias associados, propiciando ferramentas para o entendimento da atenuação natural destes compostos em solos contaminados com óleo diesel.

3.2- Objetivos específicos

- ✓ Avaliar cinéticas de biodegradação visando um melhor entendimento deste tipo de remediação sob condições anaeróbias.
- ✓ Estudar o comportamento dos compostos BTEX sob três diferentes condições de redução (SO_4^{2-} , NO_3^- e Fe(III)).
- ✓ Desenvolver e validar métodos analíticos para a correta quantificação dos compostos BTEX e de seus metabólitos por GC/FID e LC/MS em solos contaminados com óleo diesel.
- ✓ Determinar os grupos de bactérias anaeróbias envolvidas no processo de degradação dos compostos BTEX.

4- MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

4.1- Determinações de BTEX

4.1.1- Extração de BTEX do solo por SPME-HS

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica que não utiliza solvente, é rápida, versátil e pode ser usada para extração de compostos orgânicos voláteis. Consiste em uma fibra de sílica fundida, coberta por uma fase estacionária polimérica que pode ser usada tanto em amostras líquidas como sólidas. Essa técnica envolve dois processos: adsorção dos analitos provenientes da amostra na fibra, que é a fase estacionária e, dessorção térmica dos analitos previamente adsorvidos pela fibra, por meio da exposição ao ambiente de alta temperatura no injetor do cromatógrafo gasoso. A técnica foi usada no modo “Head-Space (HS)”, devido à alta volatilidade dos compostos de interesse, evitando também ocasionar problemas de interação entre solvente e amostra (MENÉNDEZ et. al, 2000). Na Figura 4.1 é mostrada a montagem de SPME usada neste trabalho. A temperatura foi controlada com um termômetro imerso em banho maria. O frasco usado para SPME foi de 40 mL, o qual foi colocado a aproximadamente meio centímetro da base do recipiente externo. O dispositivo de SPME e as fibras foram obtidos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). A fibra de microextração foi de 10 mm de comprimento, 100 µm de diâmetro, e revestida com uma camada de 100 µm de espessura de poli(dimetilsiloxano). Antes da extração foi colocada uma barra magnética para agitação constante a 20 rpm.

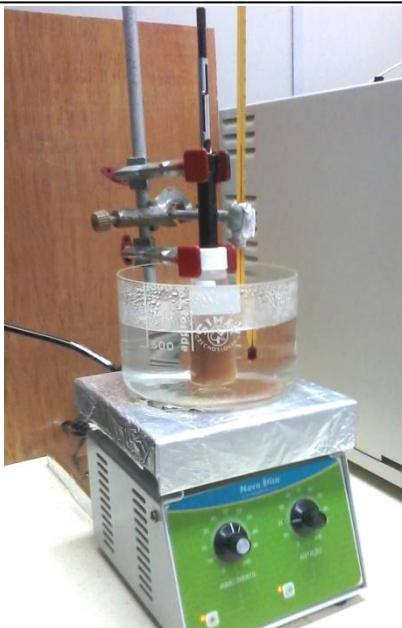


FIGURA 4.1- Montagem de sistema de extração dos BTEX por SPME. Fonte: fotografia feita pela autora no LBGqA/DQ/UFSCar.

Foi necessário um prévio acondicionamento da fibra no início de cada teste (antes da extração), para evitar interferências de compostos voláteis do ambiente, e também entre corridas. O condicionamento da fibra foi realizado no injetor do GC a 250 °C por 20 minutos.

Os testes de extração de BTEX foram realizados com 1 g de solo previamente seco a temperatura ambiente, o qual foi pesado diretamente no frasco (vial) de SPME de 40 mL. O solo foi fortificado com 100 μL de uma solução padrão de BTEX de 10 mg L^{-1} (resultando em uma concentração final de 1 $\mu\text{g g}^{-1}$) e depois mantido a -20°C no freezer por um dia, para promover a interação solo-analitos. A seguir 20 mL de água Milli-Q[®] foram adicionados ao solo no frasco. O vial foi fechado com um septo e colocado em uma placa de aquecimento, provida de agitação. O septo foi então furado com a agulha do sistema de SPME expondo a fibra, que foi assim mantida pelo tempo necessário em cada teste. Uma vez completado o tempo de exposição, a fibra foi retirada e levada diretamente para o injetor do GC.

4.1.2- Otimização das variáveis de extração de BTEX - planejamento experimental Box-Behnken e análise multirresposta

Para avaliar quais variáveis são mais significativas e estabelecer as melhores condições no processo de extração foi escolhido um planejamento experimental chamado Box-Behnken. Os experimentos de Box-Behnken possuem três níveis dos fatores e suportam modelos de segunda ordem. Nesse planejamento, fixa-se uma das variáveis em zero, enquanto um fatorial 2^2 é executado com as outras duas variáveis, o que faz desse planejamento ideal para ser utilizado em situações em que não é possível utilizar condições experimentais extremas (BOX e BEHNKEN, 1960; NIST/SEMATECH, 2012a). A relação entre as variáveis se expressa matematicamente na forma de um modelo de polinômio quadrático onde a resposta está em função das variáveis mais relevantes. Os valores otimizados das variáveis foram obtidos com ajuda de análises de gráficos de superfície de resposta (BOX e NORMAN, 1987), considerando a área do pico e a variância de cada experimento.

Três níveis experimentais de três variáveis foram utilizados para investigar os parâmetros de processo (NIST/SEMATECH, 2012a). As variáveis avaliadas foram o tempo de agitação (t) (4-12 min), a temperatura de extração (T) (25-60 ° C) e a força iônica (S) (0-36% m/v). Os níveis de fator foram codificados como -1 (ponto baixo), 0 (ponto central) e 1 (ponto alto). A Tabela 4.1 mostra as variáveis codificadas.

TABELA 4.1- Variáveis e níveis do planejamento para o método de SPME.

Variáveis	Baixo (- 1)	Ponto central (0)	Alto (+1)
T= Temperatura (°C)	25	45	65
t= Tempo (min)	4	8	12
S= Força iônica (g NaCl 100 mL ⁻¹)	0	18	36

As melhores condições de extração para todos os BTEX foram escolhidas com ajuda de uma análise multi-resposta, seguindo a metodologia proposta por DERRINGER e SUICH (1980). Segundo esses autores, cada função de resposta, Y_i , deve ser transformada em uma função de "desejabilidade", d_i , com valores na faixa de 0 a 1, onde $d_i = 0$ (resposta indesejável) $d_i = 1$ (resposta desejada). Este é um método tradicional, que atribui uma "pontuação" para um conjunto de respostas e escolhe as configurações de fator que maximizam a pontuação (NIST/SEMATECH, 2012b), as equações seguidas (equação 1) foram utilizados para essa transformação:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left[\frac{y - L}{T - L} \right]^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases} \quad (1)$$

onde y é a resposta, L é o valor mínimo aceitável, T o valor objetivo (definido pelo autor), e s é o peso (geralmente= 1).

A partir dos resultados da otimização do método de extração foi produzido um manuscrito no *Journal Analytical Methods* (NIÑO et al., 2014). No Anexo 1 é mostrada a página inicial do artigo e a seguir será mostrado um resumo dessa otimização.

4.1.2.1- Testes preliminares

Testes preliminares apontaram que a adição de sal aumenta a eficiência da extração de BTEX, tendo sido avaliados dois tipos de sais inorgânicos, o NaCl e o Na₂CO₃. O NaCl mostrou resultados melhores ao aumentar a resposta em torno de duas vezes, quando comparada a resposta sem adição de sal, como é mostrado na Figura 4.2. Em função de tal observação, os ensaios descritos a seguir foram realizados com NaCl. A força iônica foi um parâmetro que mostrou influenciar bastante no processo de HS-SPME aumentando a sensibilidade do método. Este efeito é conhecido como “*salting out effect*” (MENÉNDEZ et al. 2000, PAWLISZYN, 1997), sendo que a influência de tal efeito é mostrada nos resultados do planejamento experimental.

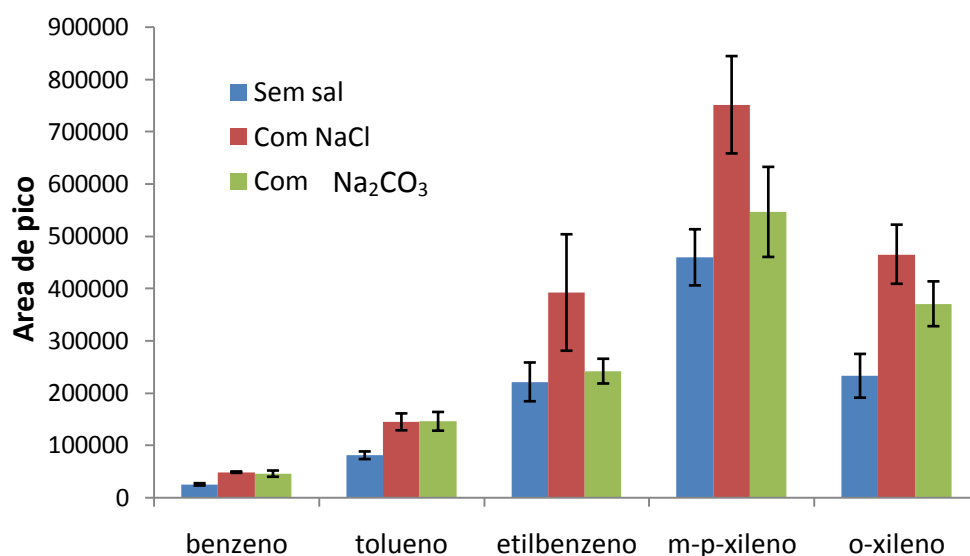


FIGURA 4.2 - Efeito da força iônica na extração de BTEX por SPME.

4.1.2.2- Resultados do desenvolvimento

A Tabela 4.2 mostra os resultados do planejamento experimental de Box-Behnken. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados são expressos como a área média de cada pico.

TABELA 4.2 - Resultados do planejamento experimental Box-Behnken na extração de BTEX, avaliados em função das áreas dos picos obtidos.

Variáveis				Resultados (área média do pico)				
Exp . #	Temp. (C°)	Tempo (min)	Força iônica (g 100 mL ⁻¹)	benzeno	tolueno	Etilbenzeno	m-/p-xileno	o-xileno
1	-1	-1	0	45384	145668	318421	725271	383206
2	1	-1	0	34760	104427	214903	497239	380931
3	-1	1	0	56294	193225	449780	1009331	506860
4	1	1	0	31051	118462	200851	485402	354004
5	-1	0	-1	23564	73646	197904	450295	197187
6	1	0	-1	20294	64454	125221	285873	307358
7	-1	0	1	81143	279673	601067	1351210	902275
8	1	0	1	51349	131479	217688	518100	508903
9	0	-1	-1	24851	80034	207958	466063	256107
10	0	1	-1	20351	64532	161633	410792	166399
11	0	-1	1	61058	172357	319999	707969	439778
12	0	1	1	60312	207122	421929	948564	589259
13	0	0	0	54323	168197	383862	879309	489585
14	0	0	0	46260	145616	324797	740026	437994
15	0	0	0	50664	163209	382145	904065	421188
16	0	0	0	47217	150554	351438	803824	484333
17	0	0	0	49614	172338	382194	905695	503699

Com o objetivo de avaliar as melhores condições para todos os BTEX simultaneamente, os resultados foram convertidos para uma resposta única de desejabilidade global (D), obtidas a partir das respostas combinadas

(Tabela 4.3), geradas pela média geométrica de cada função individual “ d_i ”, mediante a equação 2, onde m é o número total de respostas (SOUZA et al., 2007, DERRINGER e SUICH, 1980):

$$D_i = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_m)^{1/m} \quad (2)$$

Este desenho permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem, que pode ser usado para descrever ou otimizar o processo de extração (BAKKU et al., 2012, BABU et al., 2007). A equação polinomial tem a seguinte forma (equação 3):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i \chi_i + \sum \beta_{ii} \chi_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (3)$$

TABELA 4.3 - Respostas (área do pico) do planejamento experimental Box-Behnken convertidas para desejabilidade e desejabilidade global.

Exp. #	T	t	S	di benzeno	di tolueno	di etilbenzeno	di m-p-xileno	di o-xileno	D global
1	-1	-1	0	0,41	0,38	0,41	0,41	0,29	0,38
2	1	-1	0	0,24	0,19	0,19	0,20	0,29	0,22
3	-1	1	0	0,59	0,60	0,68	0,68	0,46	0,60
4	1	1	0	0,18	0,25	0,16	0,19	0,25	0,20
5	-1	0	-1	0,05	0,04	0,15	0,15	0,04	0,07
6	1	0	-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00
7	-1	0	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1	0	1	0,51	0,31	0,19	0,22	0,47	0,32
9	0	-1	-1	0,07	0,07	0,17	0,17	0,12	0,11
10	0	1	-1	0,00	0,00	0,08	0,12	0,00	0,00
11	0	-1	1	0,67	0,50	0,41	0,40	0,37	0,46
12	0	1	1	0,66	0,66	0,62	0,62	0,57	0,63
13	0	0	0	0,24	0,22	0,27	0,28	0,16	0,23
14	0	0	0	0,56	0,48	0,54	0,56	0,44	0,51
15	0	0	0	0,43	0,38	0,42	0,43	0,37	0,40
16	0	0	0	0,50	0,46	0,54	0,58	0,35	0,48

MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

17	0	0	0	0,44	0,40	0,48	0,49	0,43	0,45
----	---	---	---	------	------	------	------	------	------

O diagrama de Pareto (Figura 4.3) mostra os efeitos de cada variável e suas interações. Nesse caso, três efeitos têm valores de p inferiores a 0,05, sendo eles a força iônica (S), a temperatura (T) e a interação da força iônica com a temperatura (TS) o que indica que esses valores são significativamente diferentes de zero com 95,0% de confiança, tendo influência significativa no processo de extração.

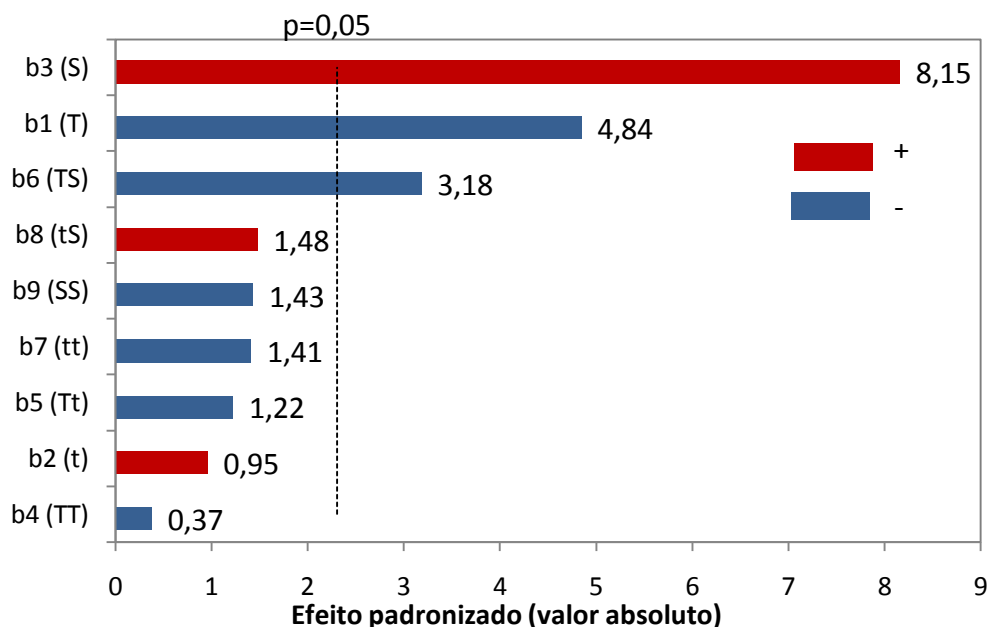


FIGURA 4.3 - Diagrama de Pareto mostrando os efeitos padronizados das variáveis estudadas para a desejabilidade global na extração de BTEX.

Para encontrar as condições mais adequadas para a extração de BTEX, foram avaliados em conjunto a eficiência de extração e o erro de cada experimento (ou seja, o %RSD), a fim de garantir a reprodutibilidade em cada análise. Na Figura 4.4 é mostrada a superfície de resposta em função da desejabilidade global (D), para as áreas de pico, onde é possível observar que as melhores condições foram a 25°C (nível -1) e 36 g 100 mL⁻¹ de NaCl, (nível +1). Enquanto que na Figura 4.5, que mostra a superfície de resposta para o

MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

desvio padrão (RSD%), se observa que a 45°C (nível 0) a desejabilidade global (D) se aproxima de 0. Por tanto, comparando as duas superfícies pode-se concluir que as melhores condições de extração de BTEX são a 45°C (nível 0) e 36 g 100 mL⁻¹ de NaCl (nível +1). Nesta condição, a conveniência global, com respeito às áreas dos picos é mais próxima de 0,8 (Figura 4.4).

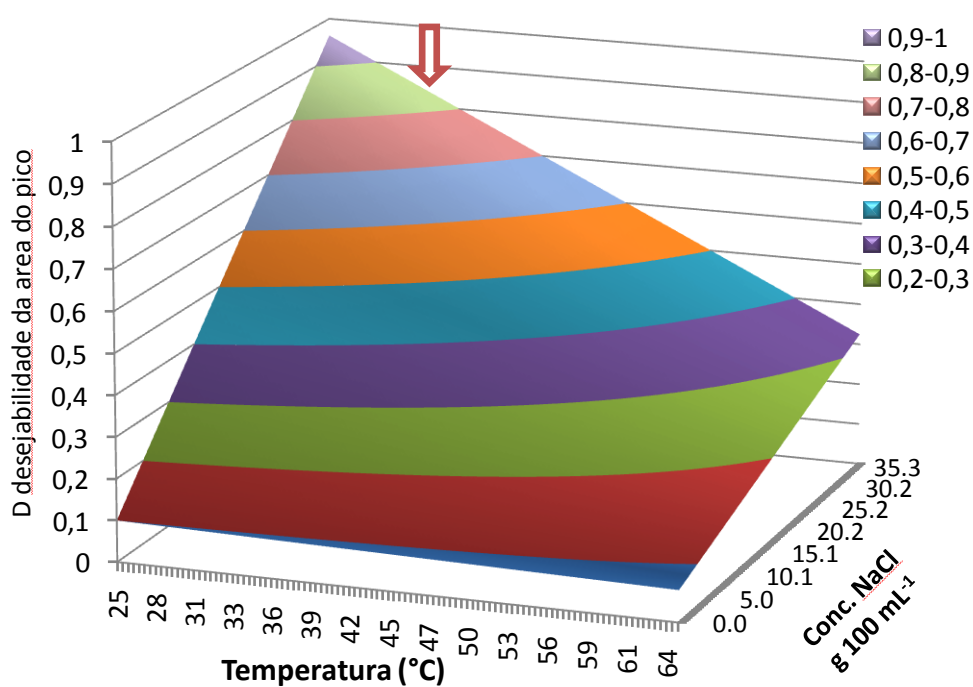


FIGURA 4.4- Superfície de resposta de D (desejabilidade) da área do pico.

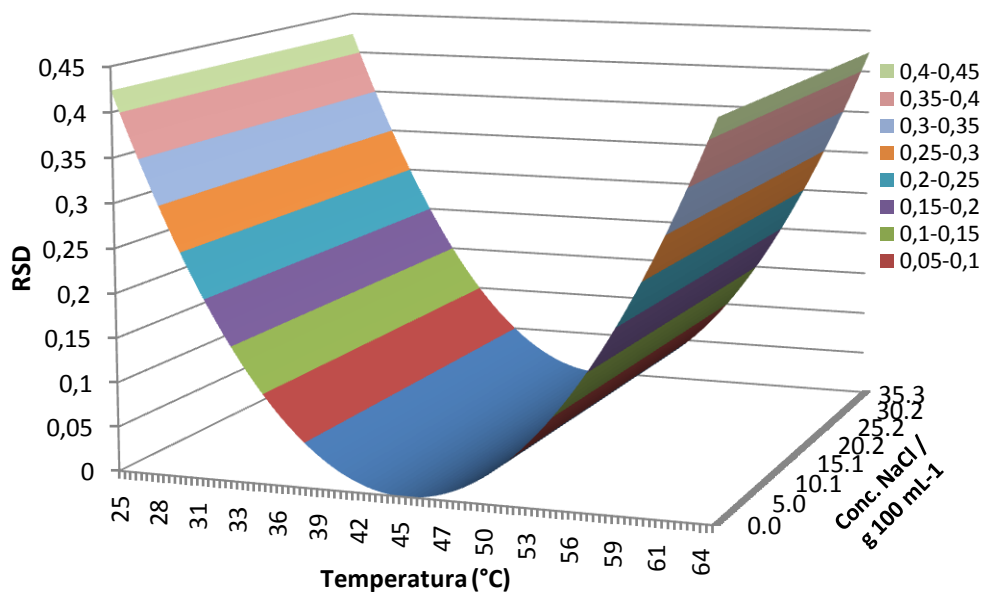


FIGURA 4.5- Superfície de resposta do desvio padrão (%RSD).

Em resumo, o incremento da temperatura diminui a extração dos analitos, sendo que os melhores resultados foram a 25°C; no entanto, a 45°C foram obtidos os menores desvios padrões (%RSD) e os experimentos com maior reprodutibilidade entre replicadas, então a temperatura escolhida para trabalho foi de 45°C. O tempo de extração geralmente é um parâmetro que deve ser considerado neste tipo de análise, devido que HS-SPME é uma técnica baseada no equilíbrio de partição de uma substância entre a matriz da amostra, o espaço de cabeça (do inglês *head space*) e a fibra de (SARAFRAZ-YAZDI et al., 2011), no entanto nesta análise, o tempo não foi significativo (Figura 4.3), e o equilíbrio foi atingido cerca dos 4 minutos para todos os compostos, bastante baixo ao se comparar com um trabalho onde foram necessários 30 minutos para atingir a maior eficiência (EZQUERRO et al., 2004).

Os intervalos de concentração (0,02-8 mg kg⁻¹) das curvas de calibração apresentaram boa linearidade com coeficientes de correlação $R^2 > 0,9933$. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), assim como os

coeficientes de variação (%RSD) podem ser encontrados na Tabela 4.4. Tendo em conta a complexidade da matriz da amostra, podem ser aceites percentagens de erro de até 20% (RIBANI et Al., 2004; HARTMANN et al., 1998).

TABELA 4.4 - Características do método de HS-SPME-GC-FID.

Compostos	Coefficiente Angular $\pm s_m$	Coefficiente Linear $\pm s_b$	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	R ²	DPR ^a (%) (mg kg ⁻¹)
Benzeno	57065 \pm 4593	-6535 \pm 2945	0,016	0,040	0,9969	7,34
Tolueno	157390 \pm 10631	-10040 \pm 9978	0,010	0,020	0,9951	9,28
Etilbenzeno	288796 \pm 8582	-44218 \pm 6455	0,010	0,020	0,9933	9,46
m-/p-xileno	630102 \pm 29049	-67325 \pm 18246	0,002	0,016	0,9973	8,94
o-xileno	360781 \pm 14097	-33011 \pm 22841	0,002	0,016	0,9980	13,42

s_m : Desvio padrão do coeficiente angular, s_b : Desvio padrão do coeficiente linear. ^aCalculado a partir de três replicatas de uma concentração de 0,02 mg kg⁻¹ de BTEX em solo.

O método apresenta boa reprodutibilidade mesmo em concentrações próximas ao limite de detecção. BUDDHADASA et al. (2002) descrevem outros métodos para esta mesma análise, como P&T/GC MS e DCM/GC FID, para os quais encontraram boas recuperações, mas não conseguiram detectar baixas concentrações. A menor concentração detectável de BTEX total alcançada no trabalho de BUDDHADASA et al. (2002) foi de 0,5 mg kg⁻¹, com o agravante de desvantagens com respeito ao fato de serem metodologias lentas e com grande demanda de solventes.

A metodologia proposta foi aplicada em amostras de solos contaminados com dois tipos de óleo diesel. A Figura 4.6 mostra os cromatogramas dos solos contaminados com óleo diesel brasileiro S-1800 (c), e com óleo diesel dessulfurado (S-10) (b), que foram comparados com um solo natural enriquecido com uma solução padrão de compostos BTEX, dando uma concentração final de 2 mg kg⁻¹ (a). Cada análise foi realizada em triplicata, mostrando boa reprodutibilidade entre elas tanto no tempo de retenção como na área dos picos.

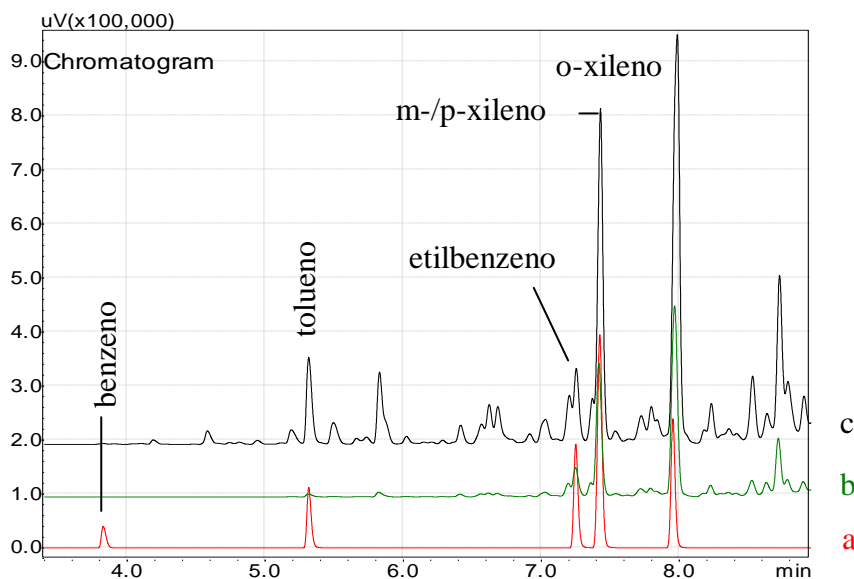


FIGURA 4.6- (a) Cromatograma de BTEX de solo fortificado com padrão (2 mg kg^{-1}), (b) cromatograma de solo contaminado com óleo diesel dessulfurado S-10 ($1\% \text{ m/m}$), e (c) cromatograma de solo contaminado com óleo diesel S-1800 ($1\% \text{ m/m}$).

Os cromatogramas mostraram diferenças significativas entre os dois tipos de óleo diesel. O óleo diesel S-1800 mostrou uma maior frequência de picos detectados (teor de enxofre de 1.800 mg kg^{-1}), em comparação com o diesel S-10. O óleo Diesel S-10 é um combustível com um teor máximo de enxofre de 10 mg kg^{-1} e recentemente entrou no mercado brasileiro para atender à necessidade dos novos veículos fabricados a partir de 2012. A meta é reduzir em até 80% o material particulado (MP nas emissões) e em até 98% as emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x) (PETROBRAS, 2013).

Uma das principais vantagens da aplicação do método de HS-SPME na análise de amostras contaminadas com diesel é que se limita a perda de analitos durante o preparo de amostra, já que no processo estão incluídas a extração, a concentração e a injeção numa única etapa. O modo HS protege as fibras de efeitos colaterais que podem ser causados por substâncias não-voláteis, representadas por substâncias de alta massa molecular presentes nas amostras,

permitindo a determinação de compostos voláteis derivados do petróleo com uma maior confiabilidade (TANKIEWICZ et al., 2013).

4.1.3- Determinações de BTEX por GC/FID

As determinações de BTEX foram realizadas em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu GC -2010 (Japão), (equipado com um injetor de *split/splitless* e detector de ionização de chama (FID) (Figura 4.7). A dessorção dos analitos foi realizada na porta de injeção do GC durante 4 minutos, no modo *splitless* a 200°C (Figura 4.8), empregando um “*liner*” específico para SPME. A separação foi realizada em uma coluna RTX-5, 30m x 0,25mm id com 0,25µm de espessura da fase estacionária de 5 % difenil - 95 % dimetilpolisiloxano (Restek, EUA).



FIGURA 4.7- Cromatógrafo gasoso com detector FID e ECD da Shimadzu.

Fonte: fotografia feita pela autora no LBGqA/DQ/UFSCar.



FIGURA 4.8- Etapa de dessorção dos compostos da fibra a 200°C.

A gradiente de temperatura no método GC começou a 40°C, seguido por uma rampa de temperatura de 6°C min⁻¹ até 80 °C, seguido de 10 °C min⁻¹ até 100 °C, sendo a temperatura final foi mantida durante 2 minutos. O tempo total de corrida foi de 10,67 min. A temperatura do detector foi de 280 °C. O gás de transporte utilizado foi o N₂ com um fluxo de composição de 30 ml min⁻¹, um fluxo de H₂ de 40 ml min⁻¹, e um fluxo de ar de 400 ml min⁻¹. As concentrações das curvas de calibração foram de 0,02; 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg kg⁻¹, onde a quantidade de metanol (100 µL) para cada ponto foi mantida constante.

4.2- Determinação dos metabólitos

Os compostos utilizados para monitorar a biorremediação dos BTEX são mostrados na Tabela 4.5. Como padrões internos foram utilizados: ácido benzil succínico-d5 (BSA-d5), ácido benzoico-d5, 2- ácido toluíco-d6 e ácido 4-clorobenzóico, todos os compostos foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) com pureza acima de 99%. Os compostos: ácido benzilsuccínico-d5, ácido 2-metilbenzilsuccínico e 3-metilbenzilsuccínico não são disponíveis

comercialmente, porém foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Harry Beller, Berkeley, Califórnia, EUA.

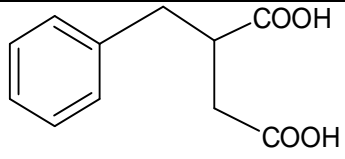
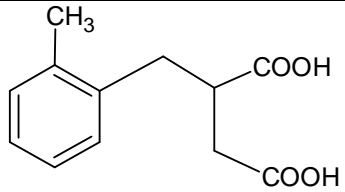
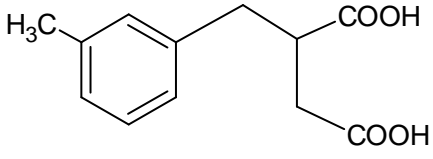
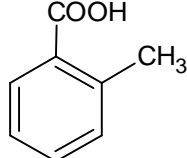
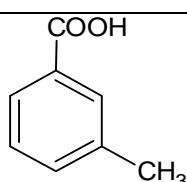
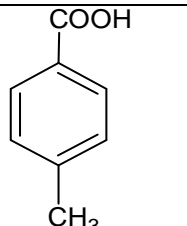
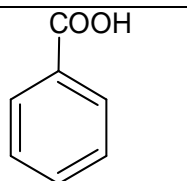
Soluções padrão de 100 mg L^{-1} foram preparadas em metanol e armazenadas no congelador a -18°C . A partir destas soluções se prepararam soluções estoque dos padrões individuais de 1 mg L^{-1} para a calibração dos compostos no espectrômetro de massas. As soluções de trabalho foram preparadas como mistura de todos compostos envolvidos a partir da diluição das soluções estoque individuais, sendo uma mistura para os compostos não deuterados e, separadamente, uma mistura dos compostos deuterados.

De forma geral a metodologia para extração dos metabólitos dos BTEX do solo foi estabelecida como é mostrado na Figura 4.9, mas antes de definir as condições de extração no ultrassom foi necessário estabelecer as melhores condições para a etapa de limpeza do extrato e transferência de solvente pelo método de extração em fase sólida (SPE).



FIGURA 4.9 - Esquema de extração dos metabólitos de BTEX a partir de solos.

TABELA 4.5- Características físico-químicas dos metabólitos de BTEX estudados.

Composto	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa (25°C) ^a	Solubilidade e em água (mg L ⁻¹) (25°C) ^c
Ácido benzilsuccínico (BSA) CAS no. 884-33-3		208,21	4.25 ^b	6649
Ácido 2-metilbezilsuccínico (2-metilBSA) CAS no. 19263-11-7		222,24	--	1912
Ácido 3-metilbenzilsuccínico (3-metilBSA) CAS no. 628-49-9		222,24	--	1912
2-ácido toluico CAS no. 118-90-1		136,15	3.95	1180
3-ácido toluico CAS no. 99-04-7		136,15	4.27	980
4-ácido toluico CAS no. 99-94-5		136,15	4.37	340
Ácido benzóico		122,12	4,20	3400

^a<http://www.zirchrom.com/organic.htm>,^b<http://www.drugbank.ca/drugs/DB07506>,^c<http://www.chemspider.com/>, -- dados não reportados na literatura até dia 13/06/2014.

4.2.1- “Clean up” dos extratos por SPE

Atualmente a técnica de extração em fase sólida (SPE) é uma das mais utilizadas no preparo de amostras, devido a sua praticidade, pouco uso de solvente, poder de pré-concentração dos analitos, e eliminação de interferentes. É freqüentemente empregada em amostras líquidas, e para extratos semivoláteis e não voláteis (WATERS, 2014a; SIGMA-ALDRICH, 2014). Pode também ser usada em amostras sólidas com uma prévia extração com solventes. Neste presente caso, visando desenvolvimento analítico para solos, a técnica de SPE é usada com o objetivo de promover a limpeza do extrato e também como etapa fundamental para a transferência para o solvente adequado para a técnica instrumental empregada.

A SPE oferece uma grande variedade de fases absorventes, para compostos polares, hidrofóbicos e iônicos, sendo a escolha do tipo de cartucho a primeira etapa quando se desenvolve uma metodologia por SPE. A técnica consiste basicamente de três etapas principais: o condicionamento da fase estacionária, a aplicação da amostra e por fim a eluição dos analitos de interesse. Em alguns casos é realizada uma lavagem antes da eluição visando arrastar interferentes que possam prejudicar a coluna cromatográfica e o sistema de detecção. Cada uma destas etapas tem que ser otimizada e avaliada para evitar possíveis perdas dos compostos de interesse (MUTAVDZIC-PAVLOVIC et al., 2010).

O sistema de SPE foi composto por um manifold equipado com 12 canais (Agilent Technologies, EUA) no qual foram acoplados os cartuchos extratores. Em cada cartucho foram conectados tubos de capilares *peek*, uma extremidade foi imersa na solução da amostra no interior de frascos âmbar e a outra acoplada às tampas dos cartuchos. Uma bomba de vácuo conectada ao manifold foi responsável pela passagem da amostra pelo tubo de *peek* até chegar ao cartucho. A Figura 4.10 ilustra o sistema utilizado.



FIGURA 4.10 - Sistema de extração por SPE, usado para limpeza do extrato e transferência de solvente.

Foram realizados testes de recuperação do procedimento de SPE, usando 100 mL de água ultrapura (Mili-Q[®]) colocada em frascos de plásticos (PET) âmbar de 500 mL. Cada 100 mL foram fortificados com os metabólitos dos compostos BTEX e os padrões internos para uma concentração final de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. O extrato foi coletado em tubos de vidro, e depois da eluição o extrato foi concentrado diretamente nos tubos com N_2 até secagem total. O extrato foi então transferido para um vial de 2 mL com cerca de 1,5 mL de metanol e agitação vigorosa em um vortex, assegurando uma correta lavagem do tubo na transferência. Depois da transferência o extrato no vial, o solvente foi novamente evaporado com N_2 , até secagem total. O extrato final foi reconstituído em 1 mL de água: metanol (65:35), resultando em uma concentração final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para avaliar o método de extração em fase sólida, vários tipos de cartuchos de diferentes marcas e classes de absorventes foram testados. As respectivas metodologias empregadas em cada caso estão reunidas na Tabela 4.6 e as recuperações com cada método são mostradas na Figura 4.11.

MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

TABELA 4.6- Resumo dos cartuchos e metodologias utilizadas no desenvolvimento da metodologia por SPE.

Cartuchos	Ativação	Condicionamento	Extração	Eluição	Reconstituição	Método utilizado
C18-Cromabond (6cc, 500 mg)	6 mL MeOH	2x4 mL H ₂ O pH 2,0 (ácido fórmico)	100 mL água pH 2,0	2x4 mL MeOH	1 mL MeOH:H ₂ O (35:65)	X
C18-Strata (3cc, 500 mg)	6 mL MeOH	2x4 mL H ₂ O pH 2,0 (ácido fórmico)	100 mL água pH 10,0 NH ₄ OH (10 mmol L ⁻¹)	2x4 mL MeOH	1 mL MeOH:H ₂ O (35:65)	X
SAX-Strata (3cc, 500 mg)	6 mL MeOH	2x4 mL H ₂ O pH 10,0 – NH ₄ OH	100 mL água pH 10,0 NH ₄ OH (10 mmol L ⁻¹)	2x4 mL MeOH pH 2,0 ácido fórmico	1 mL MeOH:H ₂ O (35:65)	X
C18-AccuBond (6cc, 500 mg)	6 mL MeOH	2x4 mL H ₂ O pH 2,0 (ácido fórmico)	100 mL água pH 2,0	2x4 mL MeOH	1 mL MeOH:H ₂ O (35:65)	X
Oasis-HLB (6cc, 200 mg)	6 mL MeOH	2x4 mL H ₂ O pH 2,0 (ácido fórmico)	100 mL água pH 2,0	2x4 mL MeOH	1 mL MeOH:H ₂ O (35:65)	✓

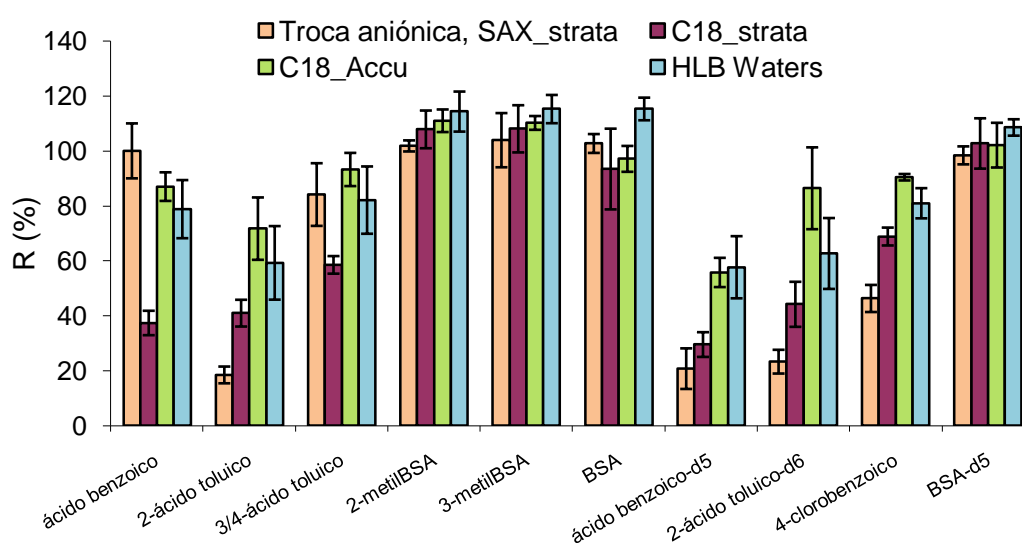


FIGURA 4.11 - Escolha do cartucho para SPE como etapa de “clean up” e transferência de solvente na extração, barra de erro desvio padrão.

Foi avaliada a capacidade de retenção com testes de recuperação para os metabólitos e padrões internos usados. A partir da comparação dos 4 tipos de cartuchos testados se pode observar que a maior média de recuperação foi alcançada com os cartuchos C18-AccuBond, da Agilent (EUA), e a segunda melhor foi com os cartuchos Oasis HLB da Waters (EUA), sendo que estes últimos possuem uma fase estacionária que consiste de um copolímero de fase reversa que apresenta um equilíbrio hidrofóbico-lipofílico, que permite uma forte retenção de compostos neutros, ácidos e básicos e uma alta estabilidade em solventes orgânicos (WATERS, 2014b). Com o cartucho de C18-Strata, da Phenomenex (EUA), não foram observadas boas recuperações para o ácido benzóico, ácidos toluicos, e seus padrões internos.

Menores recuperações ainda foram observadas para estes mesmos compostos, com os cartuchos de troca iônica XT-Strata, exceto para o ácido benzóico. Nos cartuchos de troca iônica, um grupo de amina quaternária permanece carregado positivamente em todas as condições, propiciando um forte mecanismo de troca aniônica de retenção (PHENOMENEX, 2014). Os compostos BSA, 2-metilBSA e 3-metilBSA, BSA-d5, não mostraram grandes diferenças de comportamento entre os cartuchos testados.

Devido ao fato de que a linha de cartuchos da Agilent (EUA) C18-AccuBond foi descontinuada, outros cartuchos com absorvente C18 de outros fabricantes foram testados, mas para a linha C18-Strata da Phenomenex (EUA) e a linha C18-Cromabond, da Macherey-Nagel (Alemanha) (dados não mostrados) não foram obtidas boas recuperações para o ácido benzóico e ácidos toluicos, evidenciando diferentes comportamentos entre cartuchos com a mesma fase, porém provenientes de diferentes fabricantes. Para a etapa de *clean up* dos extratos de solo foram escolhidos os cartuchos Oasis HLB da Waters, tendo em vista seus bons valores recuperações conforme mostrado na Tabela 4.7 e a não disponibilidade comercial do C18 AccuBond.

TABELA 4.7 - Recuperação obtida para os compostos de interesse no procedimento de SPE empregando cartuchos Oasis HLB da Waters (EUA).

Metabólitos	Rec absoluta (%) SPE
Ácido benzóico	79
Ácido 2-toluico	59
Ácidos 3-/4-toluicos	82
2-metilBSA	114
3-metilBSA	115
BSA	115

4.2.2- Extração dos metabólitos de BTEX do solo por ultrassom

Os metabólitos foram extraídos do solo no banho de ultrassom, seguido da centrifugação e diluição da extração sobrenadante em frascos âmbar de 500 mL, em 100 mL de água ultrapura. Primeiro foi adicionado o solvente extrator (5 mL) a 1 grama de amostra de solo seco. Com a amostra homogeneizada (com ajuda de um agitador vortex) foi aplicada uma potência de 40 kHz no banho de ultrassom por 10 minutos (2 ciclos de 10 min) (Figura 4.12). Depois de cada ciclo o tubo foi colocado em uma centrifuga marca Excelsa, a 4000 rpm por 5 minutos. A solução sobrenadante foi diluída em um frasco âmbar (PET) de 500 mL, com 100 mL de água e a seguir a solução foi acidificada até pH 2 com ácido fórmico (100µL). Depois disto foi realizada a extração em fase sólida (SPE) nos cartuchos e condições descritas previamente.

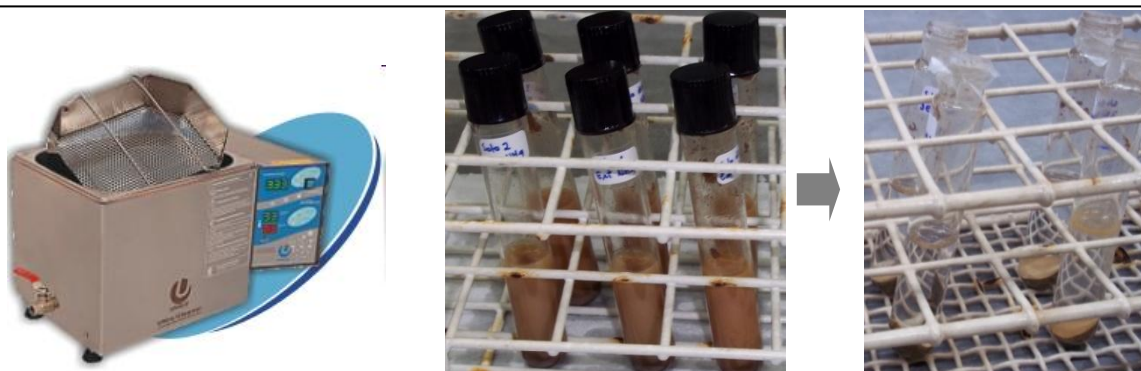


FIGURA 4.12- Ultrassom usado na metodologia de extração, amostras recém retiradas do ultrassom e posteriormente centrifugadas.

Os testes de recuperação da extração dos metabólitos dos solos foram iniciados 24 horas após a adição dos padrões na amostra de solo. Nesse período a mistura foi armazenada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este procedimento foi adotado para que houvesse uma melhor adesão dos compostos à fase sólida. A concentração final no solo foi de $100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram comparadas as áreas obtidas para cada analito a partir dos cromatogramas das amostras fortificadas antes e depois da extração, e a recuperação do método de extração foi calculada como $\text{Rec}=(A1/A2)*100$, onde: A1 é a área do analito na amostra fortificada antes da extração e A2 é a área do analito na amostra fortificada após a extração.

Cada teste de extração no solo foi aplicado em dois tipos de amostras, um solo livre de diesel e outro contaminado com diesel 5% m/m. Um teste inicial da extração foi realizado da seguinte forma: um ciclo no ultrassom com MeOH:H₂O (50:50) a pH 2, e um segundo ciclo com MeOH. Este primeiro teste serviu para estabelecer vários parâmetros metodológicos como o tempo no ultrassom e na centrifuga. Foi observado um bom desempenho para o solo livre de diesel, mas não para as amostras contaminadas com óleo diesel, devido à formação de uma emulsão na reconstituição do extrato final empregando MeOH: H₂O, o que impediu a injeção no LC.

Com o intuito de evitar a formação de emulsão no extrato final pelo arraste de óleo com o metanol puro, foram testados dois métodos mostrados na Figura

4.13. Neles se fez uso da influência do pH na solubilidade dos ácidos carboxílicos em água (CHOWHAN, 1987). Considerado que a maioria de ácidos carboxílicos não são solúveis em água neutra e nem em valores de pH baixos, o pH foi diminuído para 2, possibilitando que os ácidos na forma não ionizada fossem extraídos na fase orgânica de metanol diluído a 20% em água. No segundo método se faz o contrário, propiciando-se a ionização das moléculas mediante o aumento de pH para 10, formando o correspondente íon carboxilato, solúvel em água.

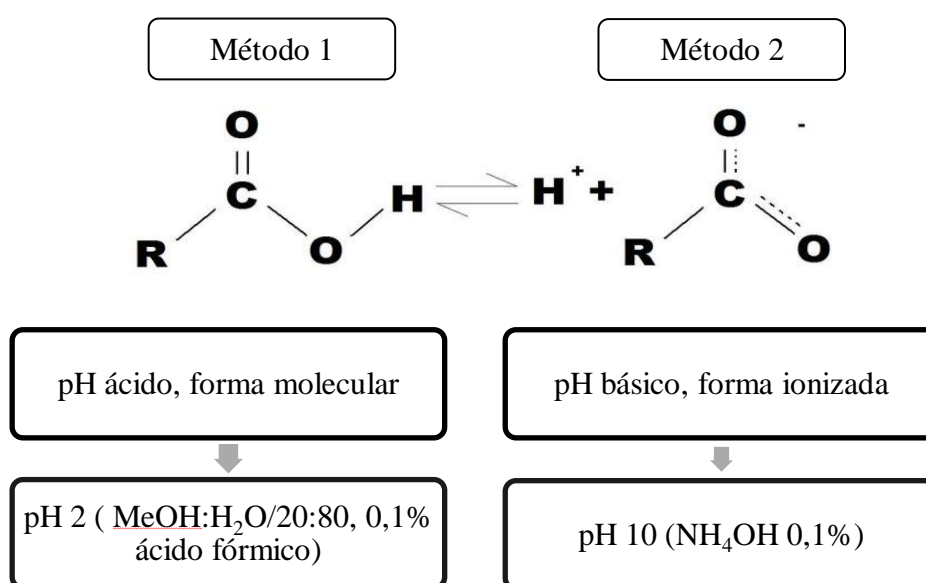


FIGURA 4.13 - Métodos testados na extração dos metabólitos.

Os extratos do método 2, especificamente após a centrifugação apresentaram grandes diferenças visuais na solução sobrenadante (solução alaranjada), com respeito aos extratos do método 1 transparentes (Figura 4.14). Tais diferenças podem ser resultantes da formação de hidróxidos de ferro solúveis a valores elevados de pH. Os sobrenadantes são diluídos em 100 mL de água antes da etapa de *clean up* (SPE), sendo esta solução acidificada até pH 2, o que é necessário antes da etapa SPE. Com esta diminuição de pH, os hidróxidos e complexos orgânicos solúveis a altos pH se tornam insolúveis a

MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

baixos pHs, formando precipitados e material particulado que acabam passando pelo cartucho de SPE, como é mostrado na Figura 4.14.

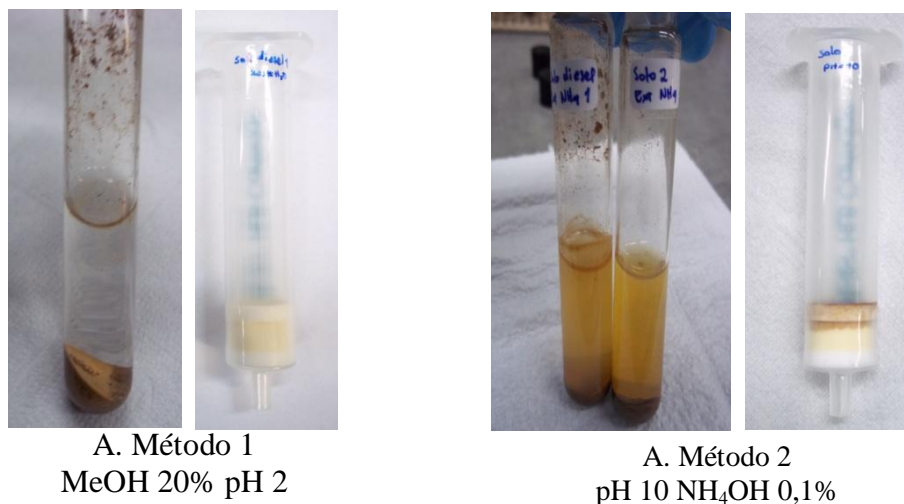


FIGURA 4.14- Comparação dos métodos durante a extração dos metabólitos por ultrassom-SPE, em cada imagem, à esquerda está o tubo de extração depois da centrifugação e a direita o cartucho de SPE depois da limpeza do extrato.

Na Figura 4.15 são mostradas as porcentagens de recuperação dos métodos testados, para os compostos 2-metilBSA, 3-metilBSA e BSA. Foram observadas valores de recuperação maiores que 100% no método de extração a pH 10, o qual está relacionado a um aumento da eficiência de formação de espécies iônicas dos analitos, fenômeno conhecido como efeito matriz, o qual prejudica a quantificação. Por outro lado, o método de extração com MeOH 20% e pH 2, apresentou extratos mais limpos e valores de recuperação mais consistentes entre 71-111% (para solo com diesel), exceto para o ácido benzóico que foi o único composto já presente na amostra antes da fortificação prejudicando a avaliação da % R e ocasionando coeficientes de variação elevados. Por tanto, o primeiro método de extração com MeOH:H₂O (20:80) a pH 2 mostrou uma maior eficiência na extração simultânea dos metabólitos em solo livre de diesel e em solo contaminado.

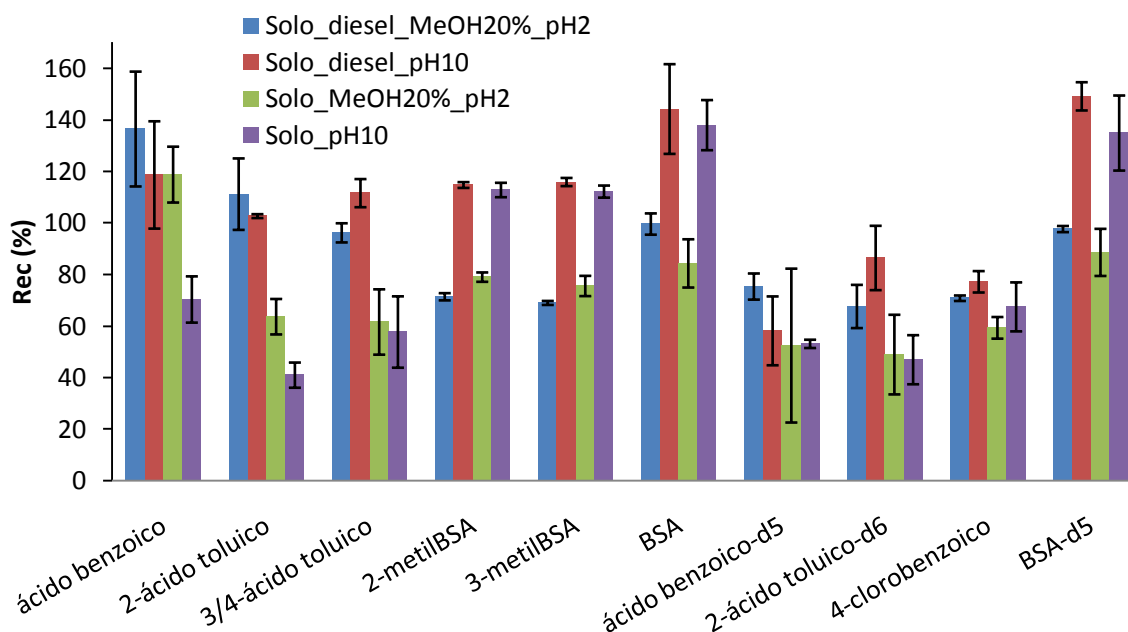


FIGURA 4.15 - Recuperação dos analitos e padrões internos na extração dos metabólitos a partir do solo contaminado com diesel, e solo livre de diesel, por dois métodos diferentes (barra de erro desvio padrão).

Para o solo contaminado com diesel mesmo com a diluição do metanol na extração, o solvente continua arrastando óleo diesel, o que ocasionou a necessidade de acrescentar uma etapa final de filtração da amostra com filtros de seringa de 0,2 μm . Esta etapa não alterou os valores de recuperação. As recuperações absolutas do primeiro método são encontradas na Tabela 4.8.

O processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. Isso nem sempre é possível, visto que a solução de fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente não presentes na matriz. Por essa razão, tenta-se usar um volume reduzido de solução de fortificação e condições que levem a mínima alteração possível da amostra.

TABELA 4.8 - Recuperações da extração completa com o método de MeOH
20% a pH 2.

Metabólitos	Rec absoluta (%) Ultrassom-SPE solo sem diesel	CV (%)	Rec absoluta (%) Ultrassom-SPE solo com diesel 5% p/p	CV (%)
Ácido benzóico	119	11	136	22
Ácido 2-toluico	64	7	111	14
Ácidos 3-/4- toluicos	61	13	96	4
2-metilBSA	79	2	71	1
3-metilBSA	76	4	69	1
BSA	84	9	99	4

CV: Coeficiente de variação.

4.2.3- Determinação dos metabólitos por LC-MS/MS

As primeiras determinações para os metabólitos aqui estudados foram realizadas por BELLER et al. em 1995. Esses autores propuseram o acompanhamento destes compostos em águas subterrâneas contaminadas com gasolina. Além disso, no trabalho de BELLER et al. (1995) os compostos foram quantificados com GC/MS, onde uma etapa de derivatização prévia foi necessária para aumentar o grau de volatilidade dos compostos de natureza ácida e polar. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, a cromatografia líquida foi proposta para a determinação destes mesmos compostos, diminuindo os tempos de análises, mediante a eliminação da etapa de derivatização. Os trabalhos prévios foram focados em análises de águas subterrâneas (ALUMBAUGH et al., 2004). Alguns parâmetros reportados nesses trabalhos foram adotados inicialmente para estabelecer os parâmetros do detector no desenvolvimento do método no presente trabalho, fazendo-se as modificações conforme necessário (Tabela 4.9), uma vez que a matriz deste trabalho (solo) é mais complexa do que a água, tornando necessário um desenvolvimento analítico, principalmente no preparo de amostra.

TABELA 4.9 - Condições cromatográficas e do detector usadas no método de determinação dos metabólitos de BTEX.

Condições	MS/MS	UPLC
Voltagem do capilar	2,7 kV	
Fluxo gás nebulizador	20 L/h	
Fluxo gás desolvatação	750 L/h	
Temp gas nebulizador	500°C	
Temp bloco da fonte	120°C	
Coluna		Acquity BEH C18
Fase móvel		Isocrático MeOH:H ₂ O (35: 65 0,1% ácido Fórmico)
Fluxo		0,3 mL/min
Vol injeção		10 µL

As determinações dos compostos foram feitas em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas, com analisador triploquadrupolo (UPLC-MS/MS, Waters (EUA), modelo TQD) (Figura 4.16). O cromatógrafo é equipado com uma bomba binária, uma válvula seletora de solvente, desgaseificador de membrana, auto-injetor e eletrospray como interface LC-MS (fonte de íons).

Para o desenvolvimento do método analítico de todos os compostos em uma mesma corrida cromatográfica, foi necessário estabelecer as condições de sintonização no espectrômetro de massas, envolvendo a otimização de voltagens e energias de colisão para cada composto individualmente. Depois disso foi realizada uma otimização na separação cromatográfica dos compostos, principalmente para os isômeros.



FIGURA 4.16 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector triplo quadrupolo da Waters[®]. Fonte: Fotografia feita pela autora no LBGqA/DQ/UFSCar.

Para a otimização das voltagens no tune do espectrômetro de massas e determinação das transições apropriadas para a quantificação, se trabalhou com o detector mediante infusão direta a uma razão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. Para isso, usou-se uma solução de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto em metanol:água (50:50). Estas primeiras condições foram usadas para determinar a melhor proporção da fase móvel e otimizar a separação cromatográfica dos compostos. Uma vez estabelecidas as condições no LC, as transições e voltagens foram corrigidas de acordo com as características da fase móvel determinada. A primeira transição SRM1 mais estável foi usada para quantificação, a segunda só foi usada como confirmação, quando necessário. No anexo 1 são mostradas as transições e voltagens usadas para identificação e quantificação dos metabólitos e seus respectivos deuterados usados como padrões internos.

Na Figura 4.17 são mostrados somente os cromatogramas dos metabólitos isômeros, que devido ao fato de produzir os mesmos fragmentos no espectrômetro de massas, demandam a otimização da separação cromatográfica de modo a terem uma correta detecção. Na Figura 4.17 são mostradas as corridas com diferentes composições de fase móvel, sendo o solvente “A” a

MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico, e “B” metanol, de modo a resultar nas combinações 50A:50B, 60A:40B, 70A:30B, e 65A:35B. A corrida foi otimizada a 65A:35B no modo isocrático que é mais estável e favorece a separação de isômeros. Não foi possível a separação dos isômeros dos ácidos 3 e 4 toluico, pois qualquer pequena mudança na composição da fase móvel na tentativa de melhorar a separação desses isômeros afetou a separação dos 2-metilBSA e 3-metilBSA. Os compostos que coeluem são quantificados em conjunto.

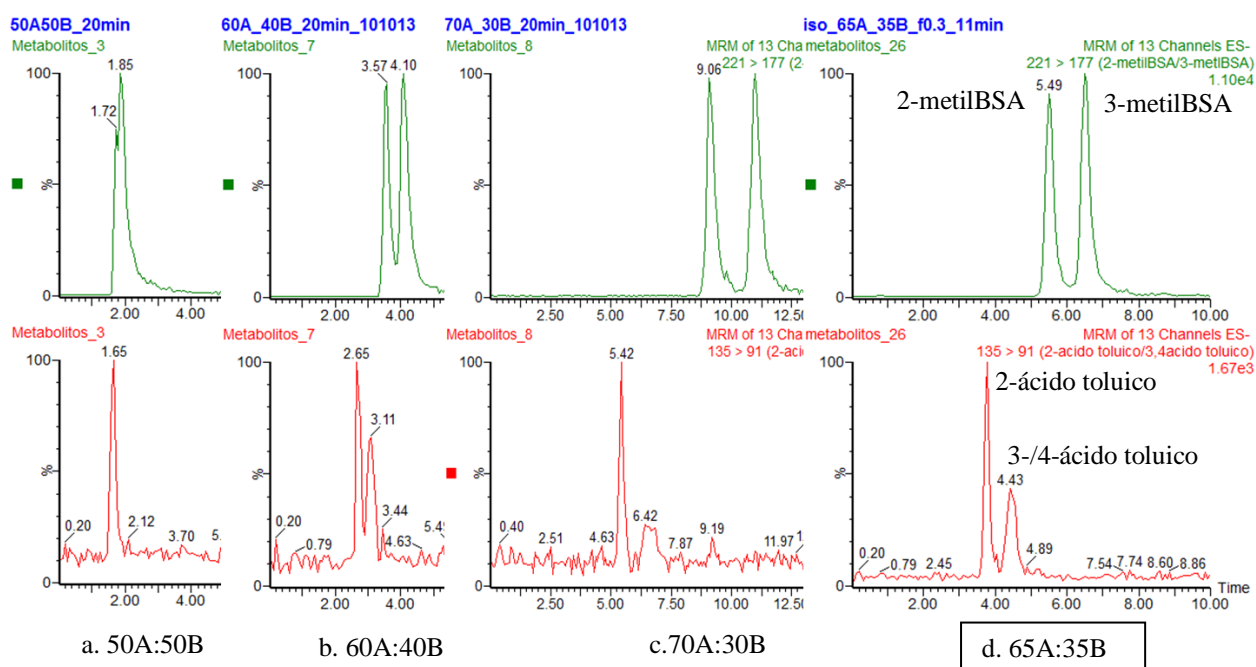


FIGURA 4.17 - Determinação da composição da fase móvel (A: água 0.1% ácido fórmico, B: Metanol), em função da separação dos isômeros 2 e 3 metilBSA e ácidos toluicos.

Uma vez otimizada a composição da fase móvel, as voltagens e energias de colisão foram corrigidas com soluções padrão preparadas em solvente na proporção de 65:35 v/v (H₂O:MeOH), as voltagens e energias definidas são mostradas no Anexo 2. Na figura 4.18 são mostrados os

cromatogramas de todos os metabólitos (à esquerda) e padrões internos (à direita).

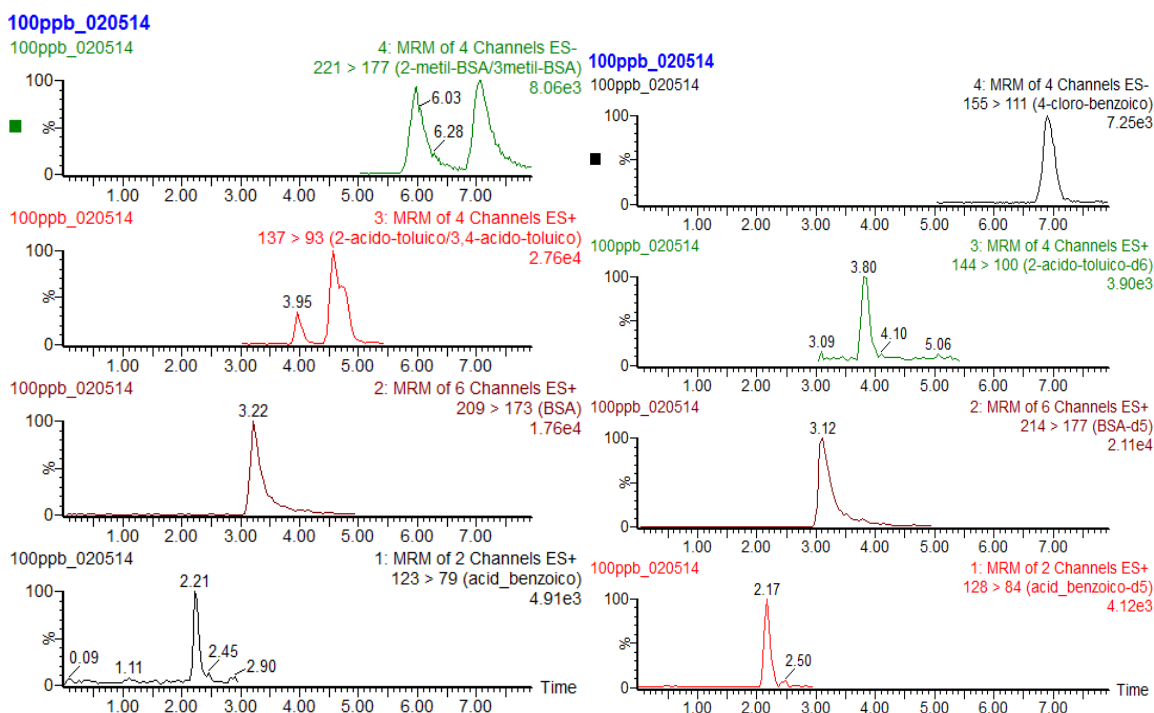


FIGURA 4.18- Cromatograma dos metabólitos e seus padrões internos, mostrando a transição de quantificação.

4.3- Caracterização e quantificação das bactérias anaeróbias envolvidas na degradação pelo método do número mais provável (NMP)

Com o objetivo de esclarecer alguns aspectos biológicos envolvidos nos processos de biorremediação e/ou de atenuação natural, foi realizada uma caracterização dos grupos de bactérias que formam parte ativa deste processo dependendo de qual receptor de elétrons esteja majoritariamente atuando.

4.3.1- Técnica do número mais provável (NMP)

A determinação dos grupos de bactérias foi realizada pela técnica do método do número mais provável (NMP), originalmente descrita por McCRADY em 1915, esta técnica de microbiologia clássica consiste em estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise. Útil para contar microrganismos difíceis de cultivar em meio sólido como as bactérias anaeróbias, permitindo manter um ambiente anaeróbio dentro dos tubos, sem necessitar de sistemas mais complexos como câmaras anaeróbias. O líquido de cultura deve ser específico para o crescimento do tipo de microrganismo de interesse. O método requer a realização de uma série de diluições em série da amostra (SUTTON, 2010).

Após o tempo de incubação, cada tubo foi caracterizado como positivo ou negativo de acordo a presença ou ausência de crescimento nas diluições consecutivas realizadas por triplicata. A combinação de resultados em três diluições sucessivas que possam abranger uma faixa de resultados positivos e negativos é localizada em uma tabela estatística de distribuição de probabilidade que gera o número de células presentes, este resultado é uma aproximação da quantidade de microrganismos presentes na amostra em concentração de NMP mL⁻¹ ou NMP g⁻¹ (BLODGETT, 2010). A tabela de probabilidade para determinação do NMP para três tubos, se encontra no Apêndice 1.

A forma de preparação das diluições seriadas e inoculação são mostradas na Figura 4.19. Em geral, para cada medição são realizadas oito diluições por triplicata que dão um conjunto de 24 frascos de penicilina de 10 mL, mais 3 de 10 mL como controles. Em cada frasco de 10 mL que previamente contém 9 mL de meio de cultura, é adicionado 1 mL da amostra, originando assim a diluição da respectiva amostra.

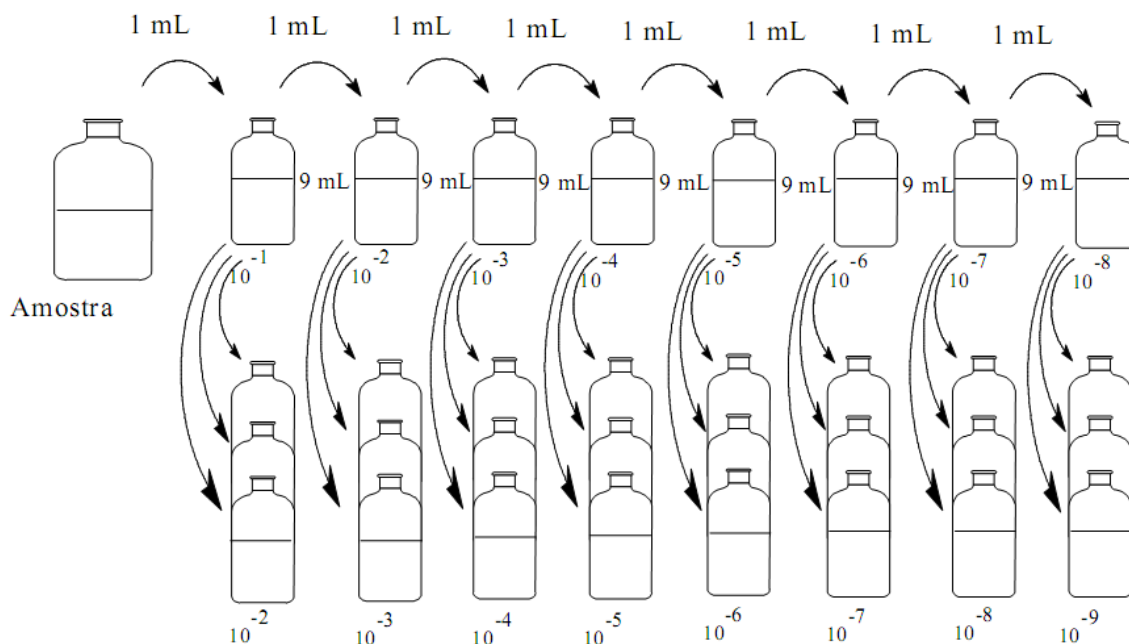


FIGURA 4.19- Esquema de diluições seriadas no método de NMP.

4.3.2- Descrição da preparação dos meios

Na Tabela 4.10 são mostrados os grupos de bactérias avaliados e a técnica usada para sua determinação. Para aprender estas técnicas microbiológicas, a doutoranda realizou um estágio no CENPES/PETROBRAS na Gerência de Biotecnologia a cargo da Engenheira Dra. Adriana Ururay Soriano durante uma semana (8-12 de julho de 2013). Os detalhamentos da composição dos meios de cultura encontram-se no Anexo 3.

TABELA 4.10 - Grupos Microbianos, Meios de Cultura, Metodologia e Condições de Cultivo.

Grupo microbiano	Meio de cultura	Metodologia condição de cultivo
Bactérias redutoras de sulfato (BRS)	Postgate E	NMP/ Incubação a 30°C x 28 dias
Bactérias redutoras de ferro (BRF)	Meio basal presença de peptona	NMP/ Incubação a 30°C x 28 dias
Bactérias redutoras de nitrato (BRN), desnitrificantes (NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻)	Caldo nitrato	NMP/ Incubação a 30°C x 48 horas
Bactérias redutoras de nitrato (BRN), denitrificantes (NO ₃ ⁻ /N ₂)	Caldo nitrato	NMP/ Incubação a 30°C x 48 horas

Para as bactérias BRS primeiro se prepara o meio redutor com sulfato sob fluxo de nitrogênio, com aquecimento brando, por último é adicionada a resazurina como indicador do estado de oxidação ou aerobiose; o pH é especificamente ajustado para cada meio, entre 7,0-7,8. Uma vez preparado, são colocados 9 mL do meio em frascos de penicilina (10 mL), fechados e lacrados rapidamente. O conjunto de frascos com o meio é levado para autoclave por 15 min a 121°C (1,1 kg cm⁻²).

Para as bactérias redutoras de ferro (BRF) o procedimento é similar as BRS, para a quantificação das BRF foi utilizado sal sódico de EDTA férrico segundo GOULD, 2003. A Figura 4.20 ilustra a preparação do meio de cultura para a quantificação das BRF. O tempo de incubação para as BRS e BRF é de 28 dias, a 30°C.



FIGURA 4.20 - Preparação do meio de cultivo para bactérias anaeróbias redutoras de ferro.

Para detecção de bactérias redutoras de nitrato é seguido um procedimento diferente, as análises são realizadas em tubos de ensaio com tampa de rosca, o meio não precisa ser preparado sob purga de nitrogênio, uma vez que as BRS são facultativas. Uma vez tendo sido o meio preparado, são colocados 9 mL de tal meio nos tubos. Estes são levados para autoclave por 15 min, 121°C (1,1 kg cm⁻²). Depois de esfriar é feita a inoculação em capela de fluxo laminar nas diluições sucessivas e incubados a 30°C por 48 horas.

4.3.3- Preparação das amostras

Uma solução salina foi previamente preparada para diluir as amostras de solo e também para realizar as diluições seriadas. A solução salina de diluição foi preparada a partir de duas soluções de estoque, descritas na tabela 4.11. As soluções estoque uma vez preparadas foram esterilizadas em autoclave (1 atm, 121 °C, 20 minutos) e armazenadas na geladeira.

TABELA 4.11- Soluções estoque usadas no preparo da solução de diluição.

Solução	Quantidades x 100 mL de água ultrapurificada
Estoque 1 - K_2HPO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$)	3,48 g
Estoque 2 - KH_2PO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$)	2,72 g

A água de diluição ou solução salina foi preparada em água previamente fervida para diminuir o conteúdo de oxigênio dissolvido. A água de diluição foi esfriada até temperatura ambiente, sob fluxo de N_2 por 20 minutos aproximadamente e foi preparada conforme descrito na tabela 4.12.

TABELA 4.12- Composição da água de diluição.

Solução	Quantidades em 250 mL de água ultrapurificada
Estoque 1 - K_2HPO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$)	1 mL
Estoque 2 - KH_2PO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$)	0,25 mL

Seguidamente foram distribuídos 9 mL da água diluição nos frascos de penicilina de 10 mL, estes frascos foram fechados e lacrados e depois esterilizados em autoclave a 1 atm, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos. Após resfriamento, foram guardados até inoculação.

A preparação da amostra foi realizada conforme a seguir descrito: 10 gramas de cada amostra de solo foram pesadas em frascos de penicilina de 100 mL, sendo a cada um adicionados 30 mL de solução salina. Esta mistura foi mantida sob agitação constante por 30 minutos antes da inoculação nos respectivos meios. Esta amostra foi usada para todos os grupos bacterianos.

4.3.4- Interpretação dos resultados para cada grupo de bactérias

Na Figura 4.21 é mostrado um resultado típico do crescimento de BRS, denotado pelo aparecimento de coloração preta no meio de cultura, que está associada à redução do sulfato a sulfeto e a sua precipitação sob forma de sulfeto ferroso ($\text{FeS}_{(s)}$). Esta conversão de sulfato a sulfeto no meio de cultura comprova a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) na amostra analisada.

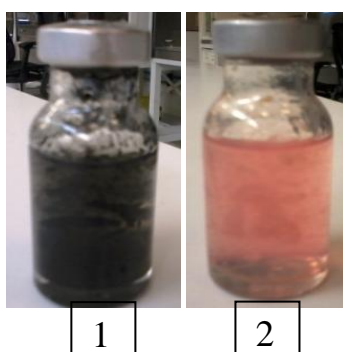


FIGURA 4.21 -Interpretação dos resultados para as bactérias redutoras de sulfato, 1) Positivo (preto), pela presença de precipitado preto devido a formação de FeS , 2) Negativo (Rosa).

As bactérias redutoras de nitrato têm a capacidade de reduzir o nitrato para formar nitrito ou promover a completa redução do nitrato até N_2 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$). A Figura 4.22 mostra como devem ser interpretados os dados na quantificação de BRN.

Se uma coloração vermelha é observada logo após a adição dos reagentes A (α -naftilamina em ácido acético 30%) e B (ácido sulfanílico em ácido acético 30%), tem-se um indicativo da existência de muito nitrito (NO_2^-) no meio, onde inicialmente só havia nitrato, permitindo inferir a presença de BRN. Por outro lado, se a solução fica sem coloração depois a adição dos reagentes A e B, são cabíveis dois motivos: 1) o nitrato não foi reduzido, ou 2) o nitrito foi reduzido a N_2 . Visando prosseguir com a investigação é adicionado pó

de Zinco ao tubo. Como o Zn reduz o nitrato para nitrito, o aparecimento de coloração vermelha somente após a adição de Zn, indicaria a presença de nitrato no meio, consolidando assim o veredicto negativo quanto à presença de BRN.

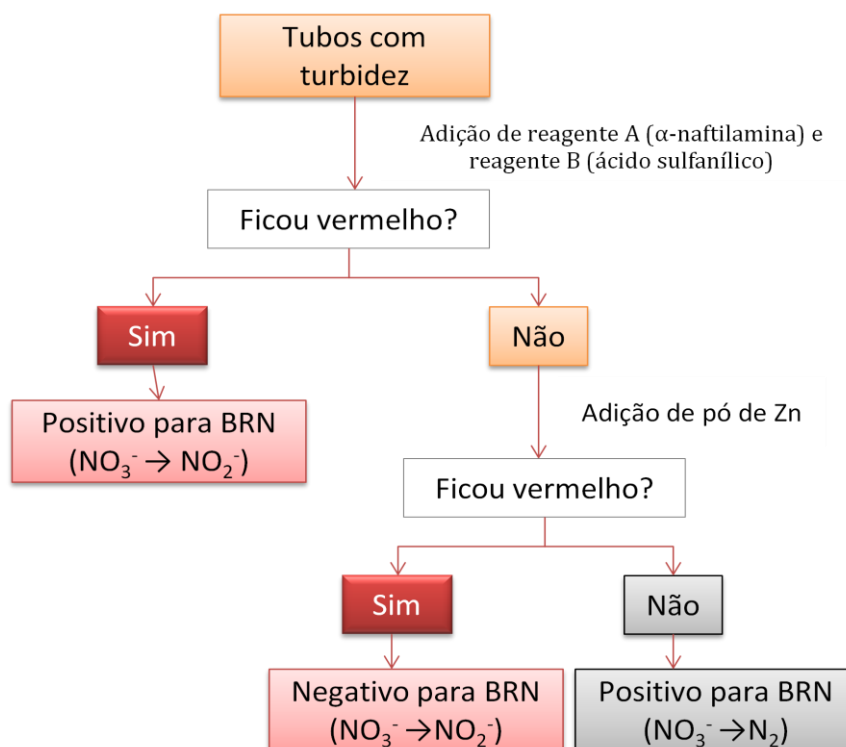


FIGURA 4.22 - Esquema para interpretação das bactérias redutoras de nitrato.

A imagem apresentada na Figura 4.23 ilustra as observações possíveis. Na figura 4.23(1) mostra que o teste é positivo para BRN, pela presença de nitrito denotada pela coloração vermelha. Na Figura 4.23(2) o teste é positivo para BRN, uma vez que depois da adição de Zn que reduziria o nitrato para nitrito, não foi observada cor na solução, indicando que o nitrato inicial foi convertido completamente para N_2 pelas BRN. A figura 4.23(3) mostra que o teste é negativo para BRN, pois logo após adição de Zn a solução assume uma coloração vermelha indicando que o nitrato inicial estava ainda presente.



FIGURA 4.23 - Resultados para bactérias redutoras de nitrato (BRN), 1) Positivo para BRN ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$), a coloração vermelha indica a presença de nitrito, formado a partir da redução do nitrato, 2) Positivo para BRN ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$), 3) Negativo para BRN.

Após o tempo de incubação nos meios das BRF foi adicionada a ferrozina como indicador da presença de Fe (II). Foram adicionados 0,2 mL de ferrozina a todos os frascos com ajuda de uma seringa estéril através do septo (GOULD, 2003). Padronizando o tempo de agitação no vortex para todos, e esperando aproximadamente um minuto de reação. A ferrozina forma um complexo de coloração roxa ($\lambda=562$ nm), como mostrado na Figura 4.24(b), dando resultado positivo para esta mudança de cor, e crescimento negativo no caso de permanecer amarelo como a cor original do meio (Figura 4.24(a)).

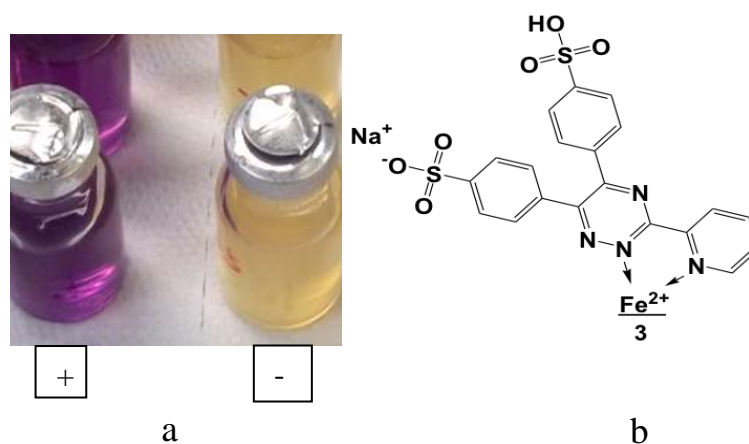


FIGURA 4.24 -Interpretação para as BRF, a) 1) Resultado positivo pela formação de um complexo roxo ($\lambda=562$ nm) com o Fe^{2+} gerado pela redução de Fe^{3+} pela presença de BRF, 2) negativo. b) Complexo de ferrozina com Fe^{2+} .

4.4- Montagem experimental dos microcosmos

Para os experimentos foram usados dois tipos de solo, um solo *in natura* e um solo previamente condicionado com diesel durante sete meses. Na figura 4.25 é mostrado o esquema da montagem dos microcosmos: o solo nativo foi contaminado com BTEX na hora da montagem, sendo este solo dividido em três séries às quais foram adicionados três diferentes receptores de elétrons (sulfato, nitrato e ferro (III)) individualmente. O solo previamente condicionado com óleo diesel foi fortificado com mais diesel e BTEX na hora da montagem, sendo disponível neste último uma mistura dos três receptores de elétrons.

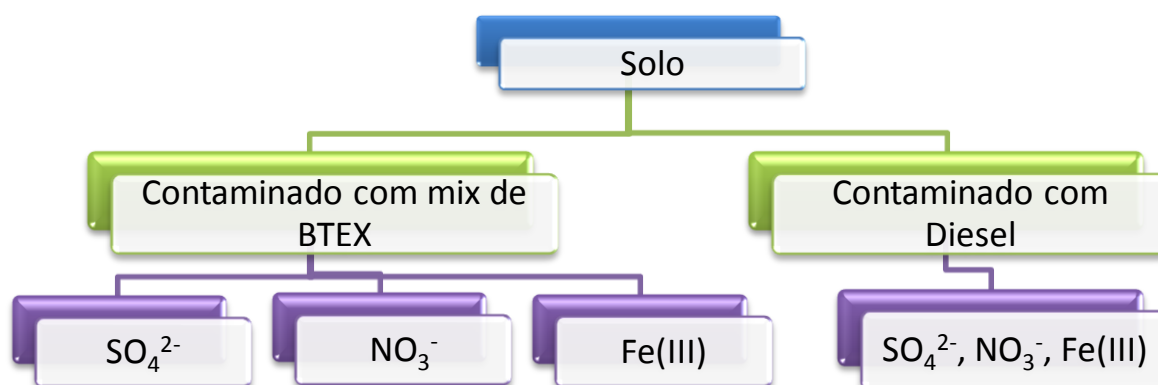


FIGURA 4.25 - Esquema da montagem dos microcosmos montados para estudo de biodegradação de BTEX.

Para condicionar a microbiota natural do solo à contaminação com diesel, foram pesados 400 g de solo do bosque de pinos da UFSCar, São Carlos-SP, que foi previamente peneirado a 4 mm, a este solo foram adicionados 40 g de diesel (10%) e 100 mL de água desaerada. Tal solo foi coberto com solo limpo para auxiliar na manutenção das condições anaeróbias (Figura 4.26, a e b). Depois de um mês foi observada uma pequena separação da camada de solo superior. Indicando a formação de gases no meio e atividade biológica no sistema. Observado isto, foi misturado o conteúdo do frasco e adicionado mais

diesel e água desaerada. O frasco foi lacrado com parafilme, e então foi realizada a troca de atmosfera com fluxo de nitrogênio. Finalmente o frasco perfeitamente vedado e mantido em estufa a 30°C. A troca de atmosfera envolvendo a injeção de N₂ foi realizada semanalmente para garantir as condições anaeróbias (Figura 4.26, b).

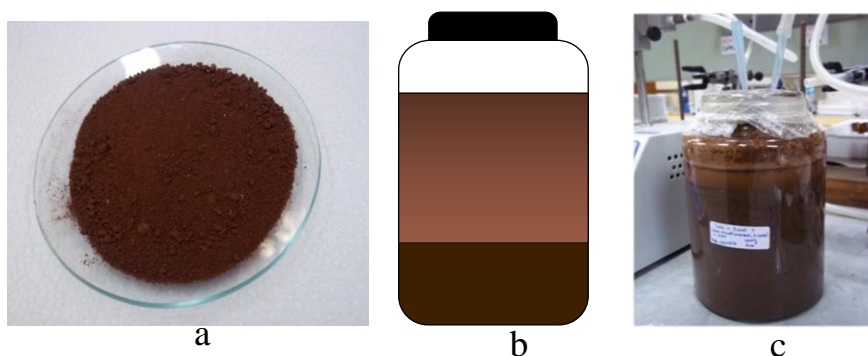


FIGURA 4.26- Condicionamento da microbiota natural do solo ao diesel. a) solo in natura passado por peneira de 4 mm, b) distribuição inicial do solo no frasco, camada inferior do solo contaminado com diesel e saturada com água, coberta com uma camada de solo seco, c) troca de atmosfera realizada semanalmente com fluxo de N₂.

O estudo da biodegradação de BTEX relacionada a cada um dos receptores de elétrons testados foi realizada em triplicata (Figura 4.27). Além dos quatro grupos antes mencionados, um quinto grupo foi montado como controle estéril ou abiótico, nesta série o solo e o meio salino foram previamente esterilizados por três dias consecutivos por ciclos de 30 minutos a 121°C e 1 kgf cm⁻² (1 atm) segundo PHELPS e YOUNG (1999). A montagem foi realizada em atmosfera inerte, sendo que as mesmas análises conduzidas nas séries ativas foram também realizadas com as amostras estéreis. Neste grupo foi adicionada a mesma quantidade de BTEX que nos outros três primeiros grupos. O controle foi montado em duplicata.

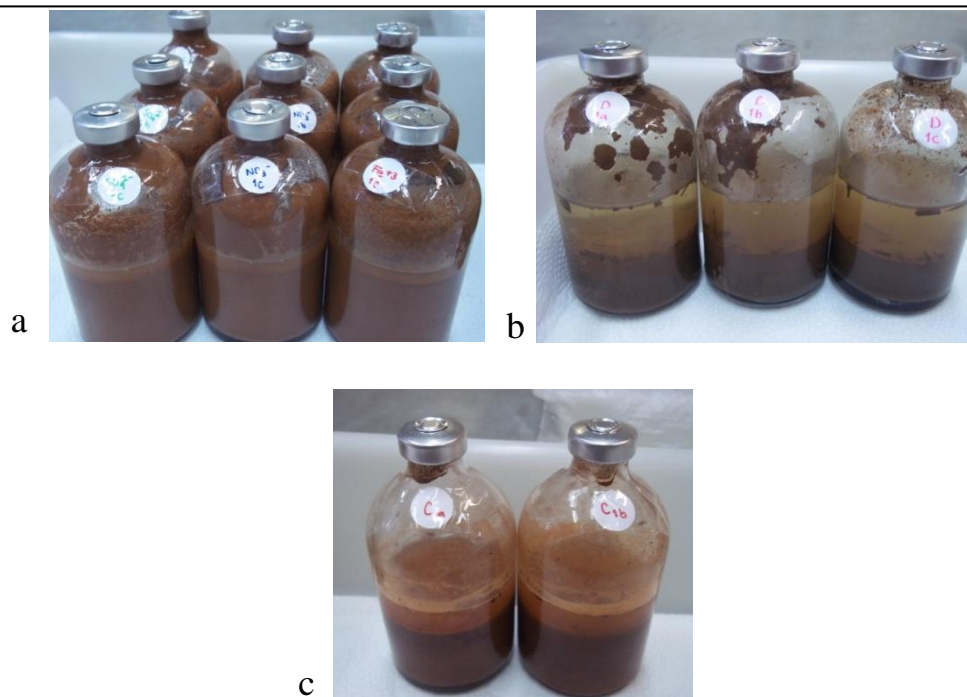


FIGURA 4.27- Séries dos microcosmos, envolvendo um total de 30 frascos para cada série. Para cada tempo monitorado foram sacrificados três de cada um, a) série de sulfato, série de nitrato e série de ferro (III), b) série de diesel e c) série do controle estéril no tempo 0.

Na Figura 4.28 é mostrado o esquema de montagem. Em cada frasco de vidro com volume útil de 100 mL foram adicionados 70 g de solo, que foram saturados com 30 mL de cada um dos meios contendo os receptores de elétrons, o solo foi saturado simulando o cenário do solo de um aquífero. Foi mantida uma parte vazia no frasco para a liberação de gases e para o monitoramento dos compostos BTEX no “*head space*” do mesmo. O solo e meio foram homogeneizados com bastão de vidro e os frascos foram desareados sob fluxo de N_2 por 5 min, em um bloco de secagem, marca Selab (Itália). Rapidamente foram adicionados 24 μ L de uma mistura pura dos BTEX, que foram misturados rapidamente com bastão de vidro. Imediatamente os frascos foram fechados com rolhas de borracha e lacrados com selos de alumínio. Os microcosmos foram incubados a 30°C, em uma estufa incubadora marca Quimis (Brasil) (Figura 4.29) por até 90 dias.

MATERIAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

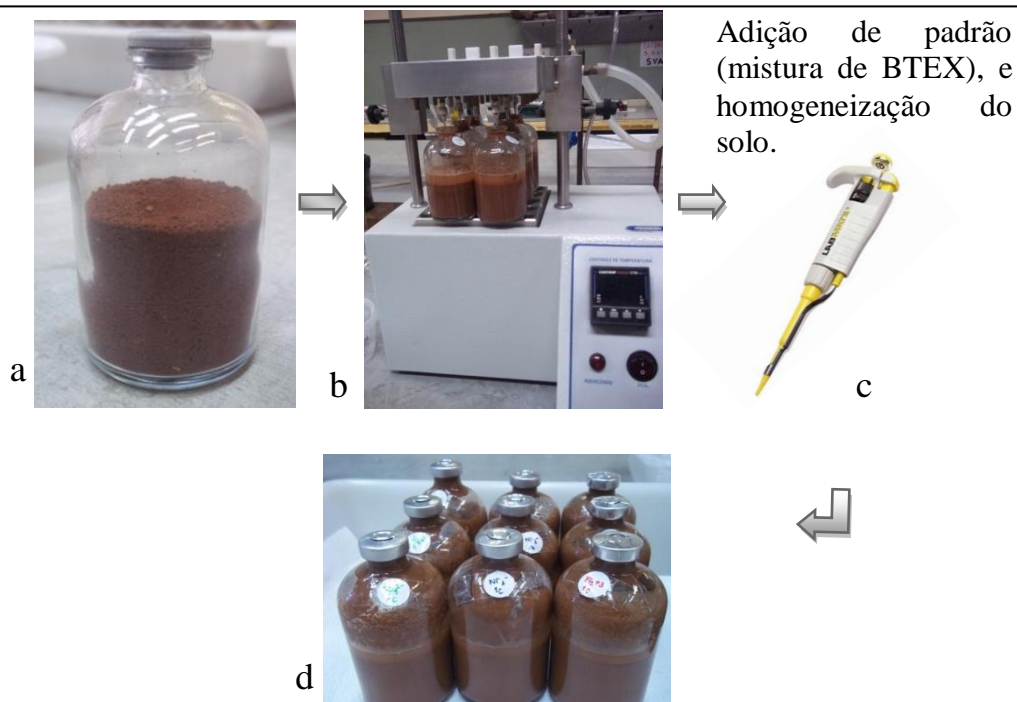


FIGURA 4.28- Montagem dos microcosmos, a) pesagem de 70 gramas de solo seco b) após a adição do meio salino seguiu-se uma etapa de desaeração dos frascos com fluxo de N_2 , c) adição de BTEX e homogeneização, d) frascos fechados e lacrados rapidamente.

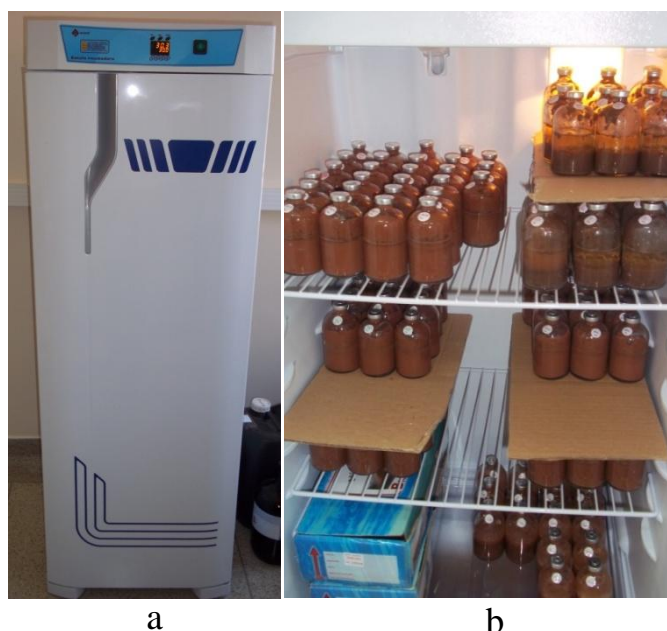


FIGURA 4.29- a) Estufa usada para incubação dos microcosmos, b) vista interna da estufa com os grupos de microcosmos incubados a $30^{\circ}C$.

A composição do meio basal, tanto de sulfato quanto de nitrato foram preparadas segundo DOU et al., 2008b. A composição do meio mineral basal continha os seguintes constituintes: NH_4Cl (1 g L^{-1}), KH_2PO_4 (1 g L^{-1}), MgCl_2 ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ g L}^{-1}$), e 1% (v/v) de suplemento de metais traço. Esta solução de metais teve a seguinte composição (g L^{-1}): H_3BO_3 0,062, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,098, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,119, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,237, CuCl_2 0,134 e ZnCl_2 0,068, como PHELPS e YOUNG (1999). O meio da série de sulfato teve adição de Na_2SO_4 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) e de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1%. O meio da série com nitrato teve adição de KNO_3 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), e o meio de ferro continha uma suspensão amorfa de FeOOH (Goetita) sendo que esta classe de óxidos hidróxidos de ferro é uma das formas mais comuns nos solos, que foi formada mediante a reação de FeCl_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução de NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$). O preparo da suspensão amorfa de $\text{FeOOH}_{(s)}$ foi seguida como BOTTON e PARSONS (2006). No final o pH de cada meio foi estabelecido para 7. Os meios minerais foram desareados por 30 minutos com fluxo de nitrogênio e ajuda de uma pedra porosa dispersadora antes da distribuição em cada frasco.

A Figura 4.30 mostra o esquema geral das determinações nos microcosmos durante o tempo. Os compostos BTEX tiveram a sua presença monitorada tanto nos solos quanto no “*head space*” (parte vazia do frasco) antes da abertura dos frascos. Esta medida foi usada como uma avaliação qualitativa do que estava acontecendo dentro do frasco antes destes serem abertos. Esta análise foi realizada com uma seringa especial para gases (do inglês *gas tight*), tendo sido injetado o volume máximo da seringa de $10 \mu\text{L}$ no mesmo método cromatográfico usado para as análises dos solos. O monitoramento dos ensaios foi realizado entre 8 e 15 dias, os intervalos do experimento foram definidos de acordo com o comportamento apresentado para os compostos alvo e metabólitos.

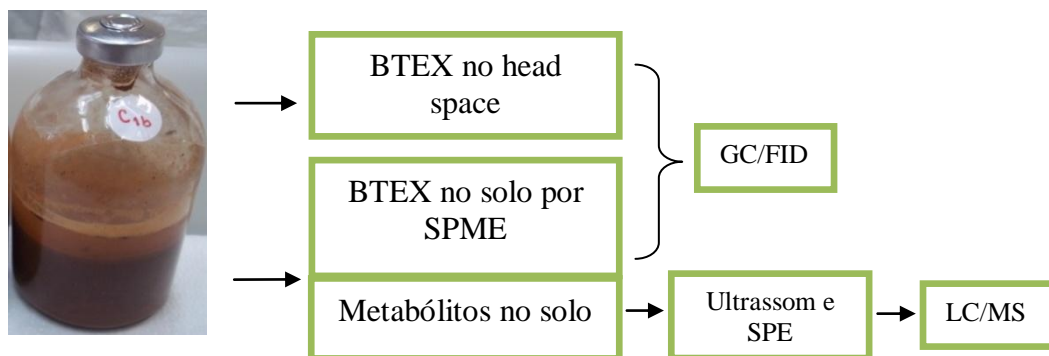


FIGURA 4.30- Representação esquemática do método de monitoramento.

5- RESULTADOS

5.1- Caracterização do solo usado nos experimentos

As amostras de solo foram coletadas no bosque de pinos da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. O solo foi peneirado em malha de 4 mm, para remover pedras grandes, raízes e outros detritos. Segundo avaliações granulométricas o solo mostrou ter natureza arenosa (59%). As determinações de BTEX mostraram valores abaixo do limite de detecção. Dentre os metabólitos, o ácido benzóico foi identificado no solo original a uma concentração relativamente alta de $182 \mu\text{g kg}^{-1}$, o ácido 4-toluico também foi identificado, mas a uma concentração menor de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, os outros metabólitos não foram detectados. Algumas características do solo foram analisadas e são apresentadas na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 - Caracterização do solo usado nos microcosmos.

Parâmetros	Valor
Areia (%)	59,0
Silte (%)	4,7
Argila (%)	36,3
Carbono orgânico total (%)	8,0
Umidade (%)	11,5
pH em água	5,2-6,5
BTEX (mg kg^{-1})	<LD
Ácido benzóico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	182 ± 2
Ácido 4-toluico	$1,0 \pm 0,7$

5.2- Caracterização microbiológica do solo

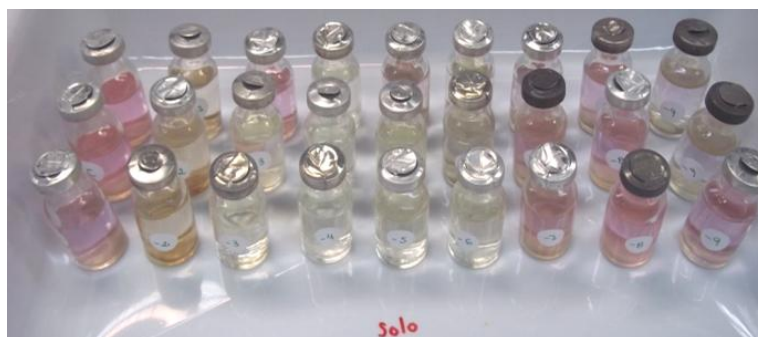
Foi realizada uma caracterização microbiológica das classes de bactérias de interesse neste trabalho, representadas pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias redutoras de nitrato (BRN) e redutoras de ferro (BRF),

ao início do experimento e no final do mesmo. Os resultados são mostrados a seguir.

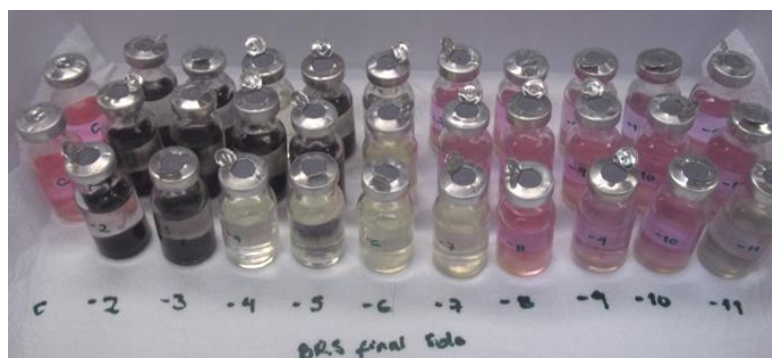
5.2.1- Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

Como as bactérias redutoras de sulfato são estritamente anaeróbias, a quantidade deste tipo de bactérias no solo original foi não significativa ($<3,0$ NMP g^{-1}) (Figura 5.1a), este solo foi coletado superficialmente. No entanto, no final do experimento (incubação por 90 dias) foi observada a formação de precipitado preto até a diluição 10^{-5} (Figura 5.1b).

Foram escolhidas as diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} com resultados de (1,2,0) respectivamente, gerando um resultado de $1,1 \times 10^5$ NMP g^{-1} . Tal valor indica que no solo nativo provavelmente havia alguma quantidade de esporos das BRS que estavam inativos em função do contato com O_2 . Já no final do experimento as condições anaeróbias favoreceram o crescimento deste grupo de bactérias no solo (Figura 5.1b).



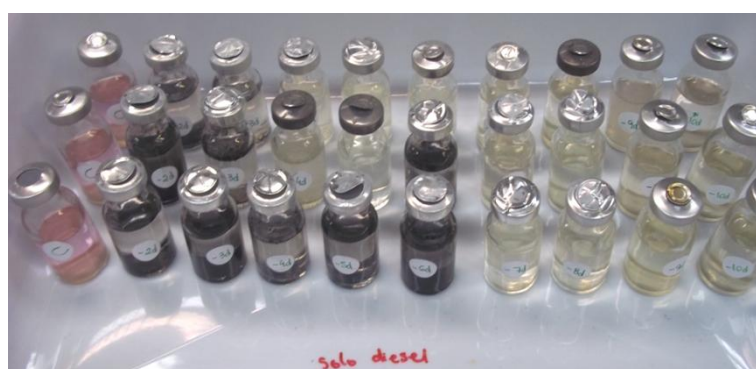
a) BRS no solo UFSCar início: $< 3,0$ NMP g^{-1}



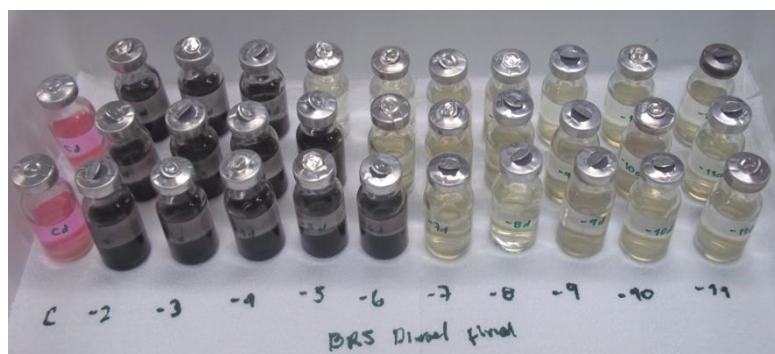
b) BRS solo UFSCar final: $1,1 \times 10^5$ NMP g^{-1}

FIGURA 5.1 - Bactérias redutoras de sulfato no início (a) e final do experimento (b) nos microcosmos com **BTEX**.

Na Figura 5.2 são mostrados os resultados da quantificação das BRS no experimento dos microcosmos contaminados com óleo diesel e BTEX. Este experimento foi realizado com o solo acondicionado por sete meses, por isso foi observada a formação do $FeS_{(s)}$ até diluições altas (10^{-6}) no tempo zero da incubação, resultando em uma concentração inicial de $1,1 \times 10^6$ NMP g^{-1} de BRS. Ao final da incubação foi também observada a formação do precipitado preto até a diluição de 10^{-6} , mas com uma combinação diferente, gerando um resultado de $1,5 \times 10^6$ NMP g^{-1} .



a) BRS no solo com diesel início: $1,1 \times 10^6$ NMP g^{-1} .



b) BRS solo com diesel final $1,5 \times 10^6$ NMP g^{-1} .

FIGURA 5.2 - Bactérias redutoras de sulfato no início (a) e final do experimento (b) nos microcosmos com diesel.

A mínima diferença entre a concentração inicial e final de BRS indica uma baixa atividade biológica por parte desta classe de bactérias neste experimento, afetadas possivelmente pela grande variedade de hidrocarbonetos tóxicos presentes no diesel, ou como resultado de que neste experimento foram adicionados os outros receptores de elétrons (nitrato e ferro (III)), termodinamicamente mais favoráveis na respiração anaeróbia. Consequentemente, até o consumo destes outros receptores de elétrons as BRS ficaram em repouso.

5.2.2- Bactérias redutoras de nitrato (BRN)

No Figura 5.3 são mostradas as fotografias que registram a quantificação das BRN ao início e final de operação dos microcosmos contaminados com BTEX. Na quantificação deste grupo de bactérias no solo nativo (início da incubação) foi observado o aparecimento da coloração vermelho-alaranjado até a diluição 10^{-7} , indicando a presença do íon nitrito o qual forma o complexo avermelhado com os reagentes indicadores (Figura 5.3a). Até a diluição 10^{-4} o nitrato foi convertido para N_2 . No solo nativo foi obtida uma alta concentração de BRN de $4,3 \times 10^8$ NMP g^{-1} .

Ao finalizar o experimento foi observado o crescimento de bactérias, denotada pelo surgimento de turbidez e coloração vermelha até a diluição 10^{-8} , sendo que quantidade de BRN foi de $1,5 \times 10^7$ NMP g^{-1} . A fotografia foi realizada antes a adição de Zn, e como se pode observar na Figura 5.3b, até a diluição 10^{-6} as bactérias converteram todo o nitrato a N_2 , levando a uma ausência de coloração avermelhada nessas diluições. Isso significa que aos 90 dias as bactérias desnitrificantes tiveram maior tempo para converter todo o nitrato para N_2 (NO_3^-/N_2).



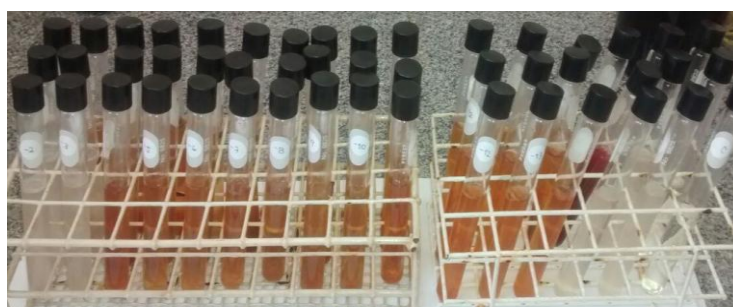
a) BRN no solo UFSCar início: $4,3 \times 10^8$ NMP g^{-1} .



b) BRN solo UFSCar final: $1,5 \times 10^7$ NMP g^{-1} .

FIGURA 5.3 - Bactérias redutoras de nitrato no início (a) e final do experimento (b) nos microcosmos com BTEX.

No experimento com solo acondicionado e contaminado com diesel, foi necessária a preparação de maiores diluições (10^{-16}) para conseguir contar as BRN neste solo ao início do experimento. Como se observa na Figura 5.4a, a na maioria dos tubos ocorreu a formação do complexo avermelhado até a diluição 10^{-14} , denotando que no solo havia uma maior concentração de bactérias desnitrificantes ($9,3 \times 10^{16}$ NMP g^{-1}). Aos 90 dias de incubação anaeróbica, foram realizadas mais diluições (10^{-18}), em função da expectativa de haver uma maior concentração das BRN no final do experimento. Conforme esperado o crescimento foi elevado, tanto que foi observado em todas as diluições, indicando uma concentração aproximada de $2,9 \times 10^{18}$ NMP g^{-1} de BRN (Figura 5.4b).



a) BRN no solo com diesel início: $9,3 \times 10^{16}$ NMP g^{-1} .



b) BRN solo com diesel final: $2,9 \times 10^{18}$ NMP g^{-1} .

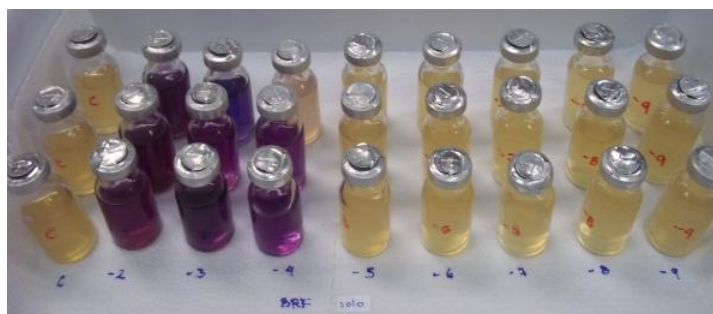
FIGURA 5.4 - Bactérias redutoras de nitrato no início (a) e final do experimento (b) dos microcosmos com diesel.

O maior crescimento de BRN nos microcosmos com diesel indica que a microbiota foi previamente aclimatada, e favorecida respeito às outras

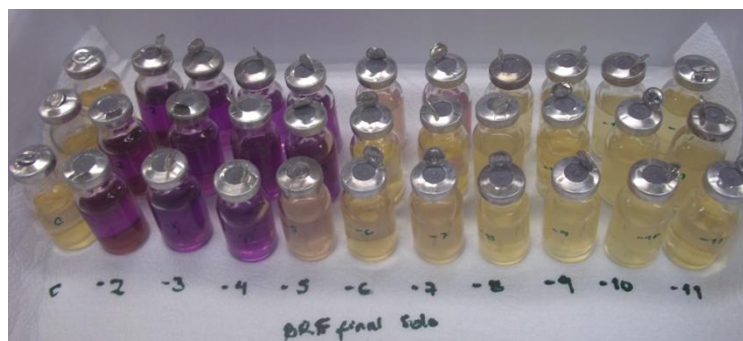
classes de bactérias e conseguiram alimentar-se com a matéria orgânica do diesel, sendo que o saldo energético das bactérias mediante a redução de nitrato é maior.

5.2.3- Bactérias redutoras de ferro (BRF)

A Figura 5.5 mostra o resultado para as bactérias redutoras de ferro (III) para os microcosmos com solo nativo e contaminados com BTEX, no início foi obtida uma concentração de $9,3 \times 10^4$ NMP g^{-1} . Depois da incubação foi observado um pequeno aumento nos resultados positivos até a diluição 10^{-7} . Dando uma concentração de $1,4 \times 10^6$ NMP g^{-1} de BRF, duas ordens de magnitude a mais do que no início do experimento, indicando que as concentrações de BTEX no meio não foram tóxicas para este grupo de bactérias e pelo contrário, podem consumir os compostos BTEX como substrato.



a) BRF no solo UFSCar início: $9,3 \times 10^4$ NMP g^{-1} .



b) BRF solo UFSCar final $1,4 \times 10^6$ NMP g^{-1} .

FIGURA 5.5- Bactérias redutoras de ferro no início (a) e final do experimento (b) dos microcosmos com compostos BTEX.

RESULTADOS

Nos microcosmos com solo condicionado com diesel, foi inicialmente obtida uma resposta parecida com a obtida para a concentração inicial nos microcosmos com o solo nativo de $1,5 \times 10^5$ NMP g^{-1} . No final da incubação a densidade populacional foi elevada para $4,6 \times 10^{10}$ NMP g^{-1} . Isto indica que as BRF podem crescer em presença de um combustível como o óleo diesel e ainda degradar alguns de seus componentes. Possivelmente haja maior disponibilidade de ferro endógeno que favoreça o crescimento desta classe de bactérias.



a) BRF no solo com diesel início: $1,5 \times 10^5$ NMP g^{-1} .



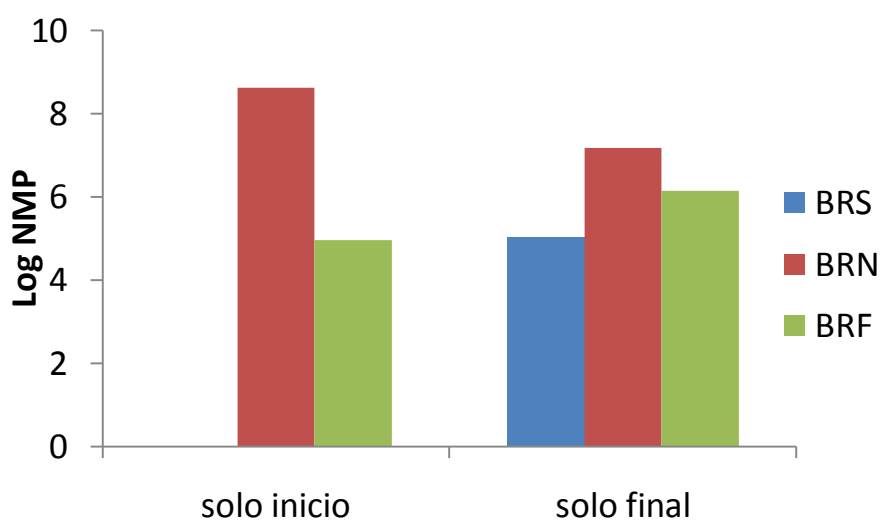
b) BRF solo com diesel final: $4,6 \times 10^{10}$ NMP g^{-1} .

FIGURA 5.6- Bactérias redutoras de ferro no início (a) e final do experimento (b) dos microcosmos com diesel.

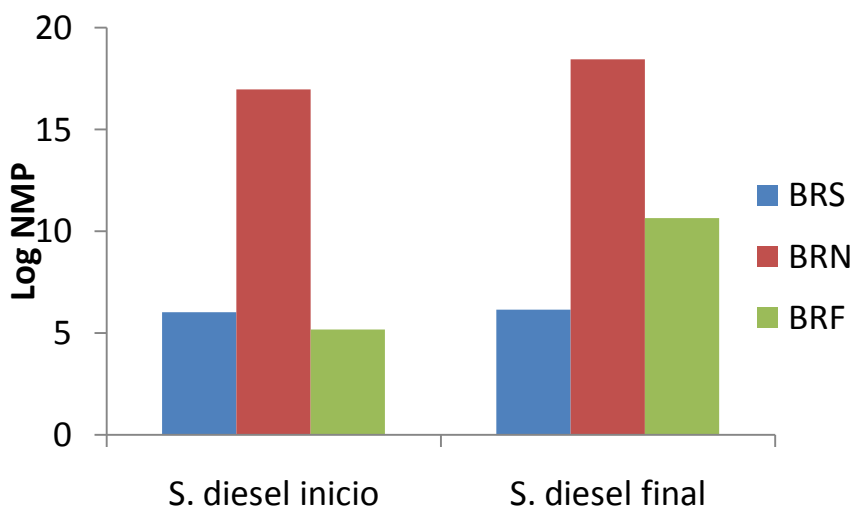
Como modo de comparação e resumo dos resultados dos grupos de bactérias caracterizados no trabalho foi realizado um gráfico em função logarítmica das concentrações de bactérias encontradas para cada experimento. Na figura 5.7a se encontram os resultados para os experimentos com solo nativo e contaminado com uma mistura de compostos BTEX. De modo geral as BRN

foram predominantes no solo escolhido para o trabalho. Por serem facultativas não são afetadas pela presença de oxigênio. E são mais facilmente adaptáveis a diferentes mudanças ambientais. Não foi observada a presença de BRS no solo nativo, por ser estritamente anaeróbias e conseqüentemente afetadas pelo oxigênio. As BRF foram detectadas no solo original e também mostraram algum aumento ao final da incubação, tal qual as BRN.

No caso do experimento com solo previamente condicionado com diesel e contaminado adicionalmente com mais diesel e compostos BTEX (Figura 5.7b), foi observado um grande aumento na população nas BRN e nas BRF. Depois do condicionamento e início da incubação foi observada a presença de BRS, pois provavelmente no solo original havia alguma presença não detectável deste grupo de bactérias que foi desenvolvido com o condicionamento em condições anaeróbias. Não ocorreram alterações significativas ao longo do experimento.



a) Experimento com uma mistura de BTEX.



b) Experimento com diesel convencional e BTEX

FIGURA 5.7- Quantificação de grupos bacterianos por NMP, a) Experimento com mistura de BTEX, b) Experimento com diesel convencional.

5.3- Degradação anaeróbica de BTEX sob diferentes condições de redução

5.3.1- Resultados preliminares nos microcosmos com BTEX

Para compreender o comportamento dos contaminantes com os diferentes receptores de elétrons foram analisados os perfis de concentração dos BTEX com o tempo, no *head space* do frasco e no solo. Inicialmente foram observadas algumas diferenças visuais nos frascos de cada série sendo que na Figura 5.8 são mostradas algumas fotos dos frascos no transcurso do experimento. Dentre as séries contaminadas com a mistura de BTEX, a série com nitrato foi a que apresentou maior presença de bolhas de gás na superfície, fornecendo um indicativo inicial de que alguma atividade biológica estava

ocorrendo dentro do frasco e como provável resultado da formação de espécies gasosas e reduzidas de nitrogênio.

As séries com sulfato e ferro também mostraram alguma aparição de bolhas de gás, sendo que na de sulfato a intensidade foi um pouco maior do que na de ferro. O gás produzido pelas BRN é principalmente composto por CO_2 e N_2 , no caso das BRS CO_2 e H_2S , em quanto que as BRF inicialmente produzem bicarbonato que só depois de muito tempo vai se converter em CO_2 , explicando a menor quantidade de gás nos microcosmos com Ferro (III). Na série de controle abiótico não foi observada a aparição de nenhuma bolha, sendo que o aspecto permaneceu inalterado durante todo o tempo monitorado.

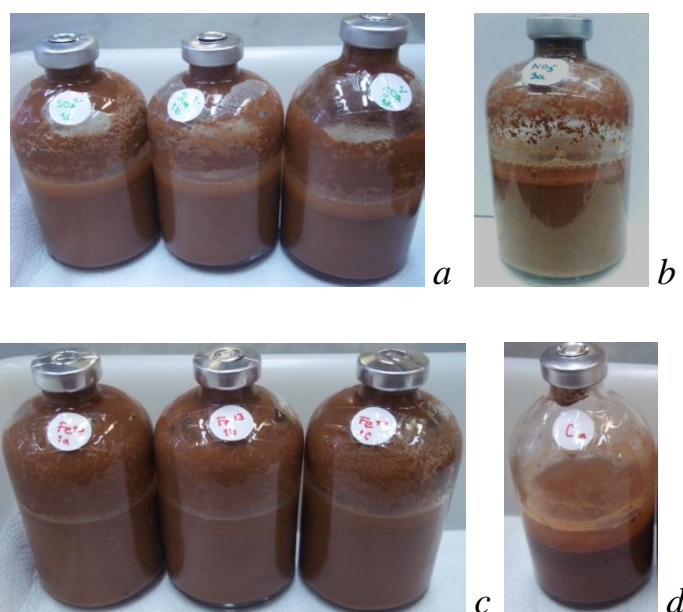


FIGURA 5.8- Mudanças temporais nas séries de microcosmos com BTEX a) série com SO_4^{2-} no tempo 8 dias, b) série com NO_3^- no tempo 25 dias, c) série com Fe^{+3} no tempo 8 dias, d) controle estéril.

Na Figura 5.9 são mostrados o perfis dos cromatogramas de BTEX na série de nitrato (5.9a) e na série de sulfato (5.9b) no tempo 35 dias, usando o controle como referência. De forma geral no controle foi observada uma diminuição dos BTEX, um comportamento não esperado nesta serie abiótica.

Devido à perda de BTEX no controle os resultados foram expressos como Ca/Cc (Concentração BTEX na série ativa/Concentração na serie controle), já que mesmo com perda na série ativa foram observadas maiores diminuições em alguns BTEX como é possível observar para o tolueno. Admitindo-se a possibilidade de ter ocorrido uma evaporação dos compostos, foi tomada uma amostra composta dos frascos em atmosfera inerte para análise das bactérias anaeróbias totais, visando descartar uma possível contaminação ou ineficiência do processo de esterilização deste solo por autoclave. Na Figura 5.10 é mostrada a ausência de crescimento na série de controle nas diluições para bactérias anaeróbias totais, reforçando a hipótese de evaporação dos compostos.

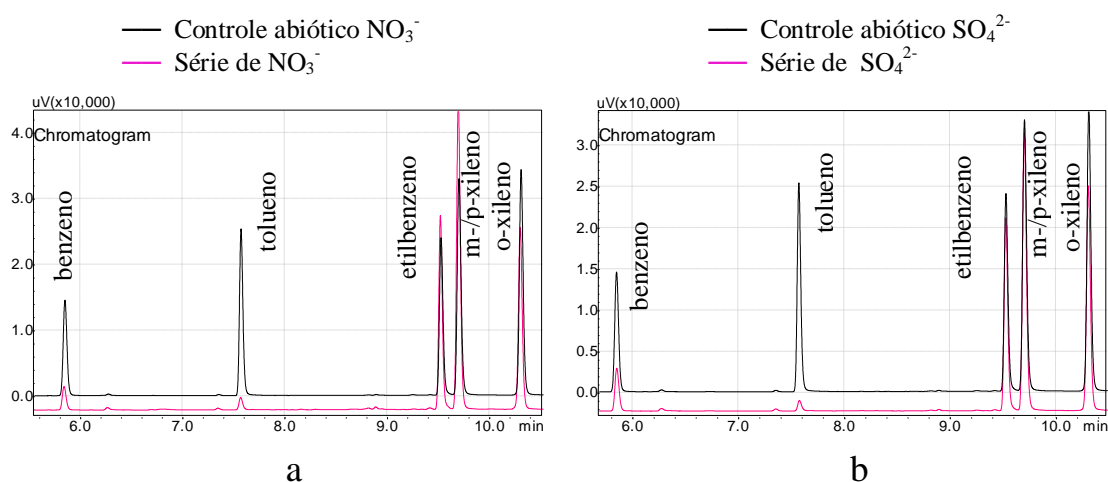


FIGURA 5.9- Cromatogramas dos compostos BTEX nos solos dos microcosmos no tempo 35 d, a) com NO_3^- no controle (—) e série ativa (—), b) com SO_4^{2-} no controle (—) e na série ativa (—).

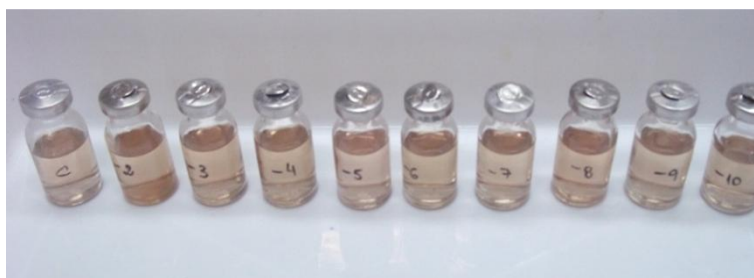


FIGURA 5.10– Indicativo de ausência de crescimento para bactérias anaeróbias totais no controle abiótico no final no tempo 60 dias.

Na Figura 5.11 são mostrados os perfis dos cromatogramas dos BTEX na série com sulfato, no *head space* e no solo para dois tempos do experimento: 0 e 35 dias. Neles é possível observar que no início ($t=0$, Figura 5.11a) os compostos BTEX mais voláteis como o benzeno e tolueno estão em maior proporção no *headspace*, enquanto que no solo é normal encontrar em maior proporção os hidrocarbonetos menos voláteis como etilbenzeno e os xilenos. No tempo 35 dias (Figura 5.11b) os BTEX remanescentes estão majoritariamente no solo, principalmente os menos voláteis.

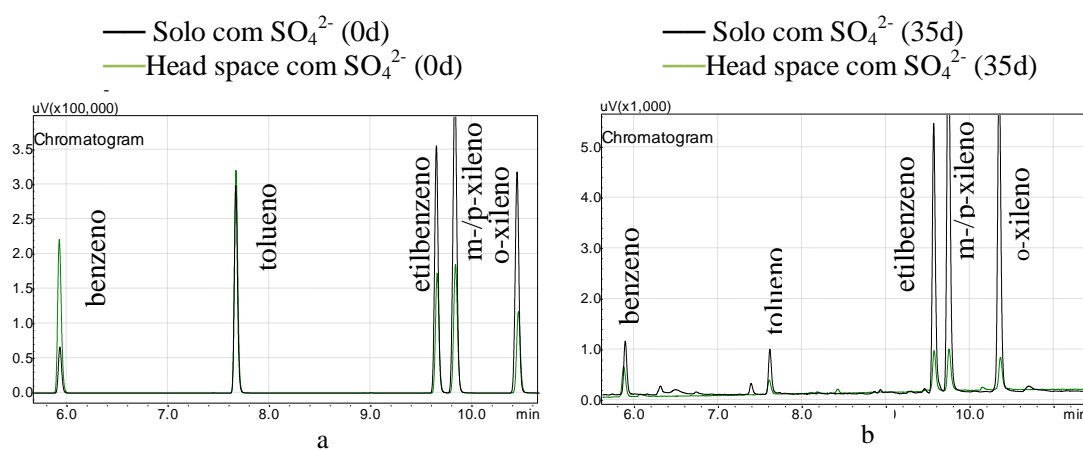


FIGURA 5.11- Cromatogramas dos BTEX nos microcosmos com SO_4^{2-} , a) no tempo 0, no solo (—), e no *headspace* (—), b) no tempo 35 no solo (—), e no *headspace* (—).

5.3.2- Monitoramento da remoção de BTEX com três diferentes receptores de elétrons

Os resultados de cada ponto correspondem ao valor médio dos três frascos monitorados com coeficientes de variação menores do que 20%, valores aceitos considerando a complexidade da amostra do solo e a alta volatilidade dos

BTEX (RIBANI, 2004). Os resultados foram expressos como Ca/Cc (Concentração BTEX na série ativa/ Concentração na série controle estéril).

As Figuras 5.12 e 5.13 mostram os resultados do monitoramento da remoção de benzeno nos microcosmos sob três diferentes condições distintas de redução, ou seja, com sulfato, nitrato ou ferro (III), no “*head space*” e no solo respectivamente. No *head space* o benzeno teve um aumento na série com nitrato aos 25 dias, mas depois mostrou uma rápida queda em comparação com os outros receptores de elétrons. Aos 60 dias, na série com ferro (III) também se observou um aumento no *head space* no tempo de 35 dias, contudo este composto foi eliminado aos 75 dias de incubação. Neste mesmo tempo o benzeno desapareceu na série em que o sulfato foi empregado como receptor de elétrons.

Na fase solo, se observa que o benzeno foi totalmente removido dos microcosmos com nitrato aos 90 dias, enquanto que em condições com sulfato e ferro (III) a remoção não mostrou um padrão uniforme de queda e aumento, sendo que tal comportamento pode ser atribuído à liberação e sorção do benzeno no solo. No caso com sulfato ainda foi observada uma pequena queda com o tempo, mas com ferro não ocorreram alterações significativas durante os três meses de incubação.

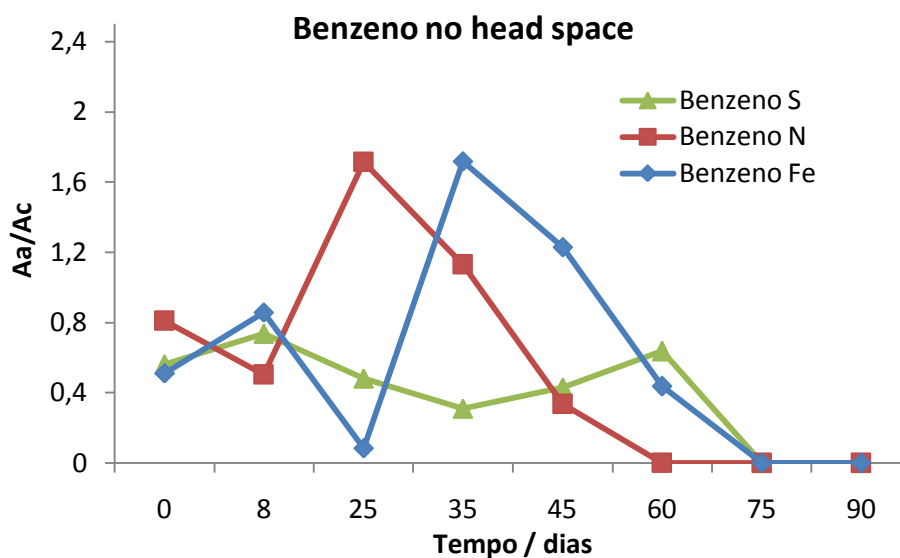


FIGURA 5.12 – Monitoramento de benzeno no *head space* nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

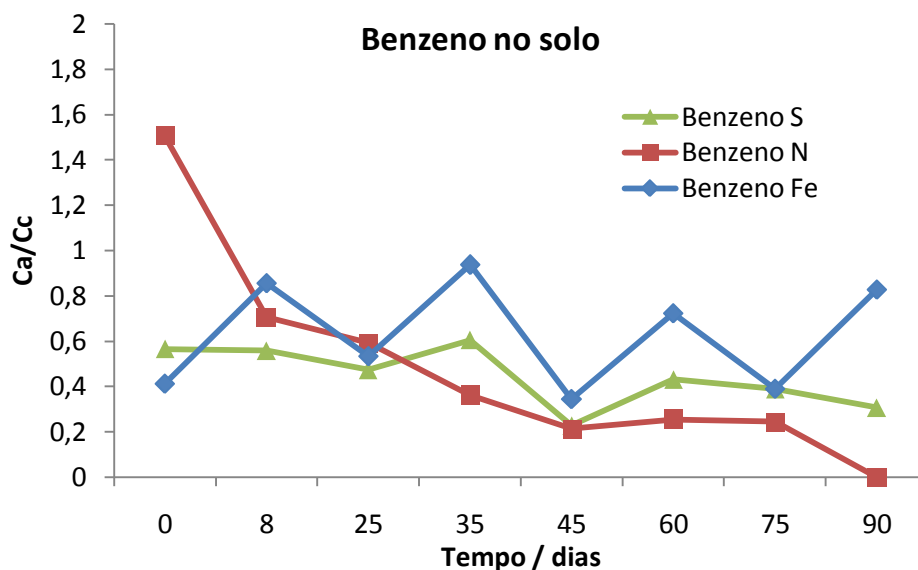


FIGURA 5.13 – Monitoramento de benzeno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Trabalhos prévios mostraram a resistência do benzeno à biodegradação, e também diminuição nas taxas de degradação a partir de altas concentrações iniciais do benzeno ($>100 \text{ mg kg}^{-1}$), mostrando toxicidade para a microbiota e inibindo a capacidade de biodegradação (DOU et al., 2008c;

PHELPS e YOUNG, 1999). No presente trabalho as concentrações iniciais do benzeno foram baixas para evitar este efeito de toxicidade as quais foram entre 1,3 e 5 mg kg⁻¹. Na Tabela 5.2, são mostradas as reações estequiométricas da oxidação completa do benzeno frente aos três receptores de elétrons (HU et al., 2007).

TABELA 5.2- Equações estequiométricas da oxidação completa do benzeno com diferentes receptores de elétrons.

Tipo de biodegradação	Equação estequiométrica
Redução de sulfato	$C_6H_6 + 3,75SO_4^{2-} \rightarrow 6CO_2 + 3,75S^{2-} + 3H_2O$
Redução de nitrato (NO ₃ ⁻ / N ₂)	$C_6H_6 + 6NO_3^- + 6H^+ \rightarrow 6CO_2 + 3N_2 + 6H_2O$
(NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻)	$C_6H_6 + 15NO_3^- \rightarrow 6CO_2 + 15NO_2^- + 3H_2O$
Redução de ferro (III)	$C_6H_6 + 18H_2O + 30Fe(III) \rightarrow 6HCO_3^- + 30Fe(II) + 36H^+$

Os dados das Figuras 5.14 e 5.15 mostram que o tolueno pode servir como fonte de carbono para cultivos enriquecidos com sulfato e principalmente nitrato, devido à rápida diminuição deste composto tanto no *head space* como no solo durante o tempo monitorado. No caso do ferro (III) o tolueno também foi consumido (<LD), mas em um período maior, se comparado com os outros receptores de elétrons estudados. As concentrações iniciais do tolueno foram de 3,9 mg kg⁻¹ na série com sulfato, de 12,6 mg kg⁻¹ na série com nitrato e de 3,6 mg kg⁻¹ na série com ferro (III).

O maior tempo necessário para a degradação do tolueno no meio com ferro (III) pode ser explicado por que apenas uma espécie de bactéria redutora de ferro tem sido reportada como responsável pela degradação do tolueno, sendo ela a *Geobacter metallireducens*. Por outro lado, o crescimento destas bactérias é provavelmente limitado pela disponibilidade de FeOOH_(s) (HEIDER et al., 1999).

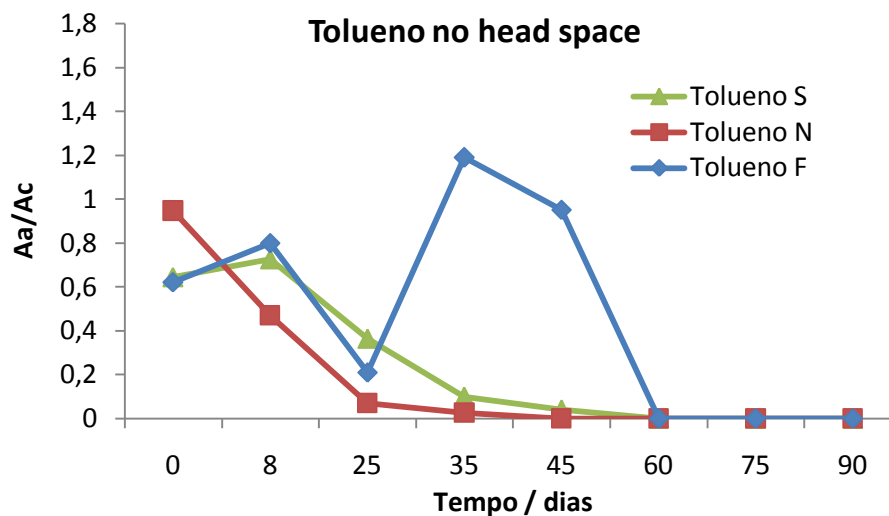


FIGURA 5.14 – Monitoramento de tolueno no *headspace* nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

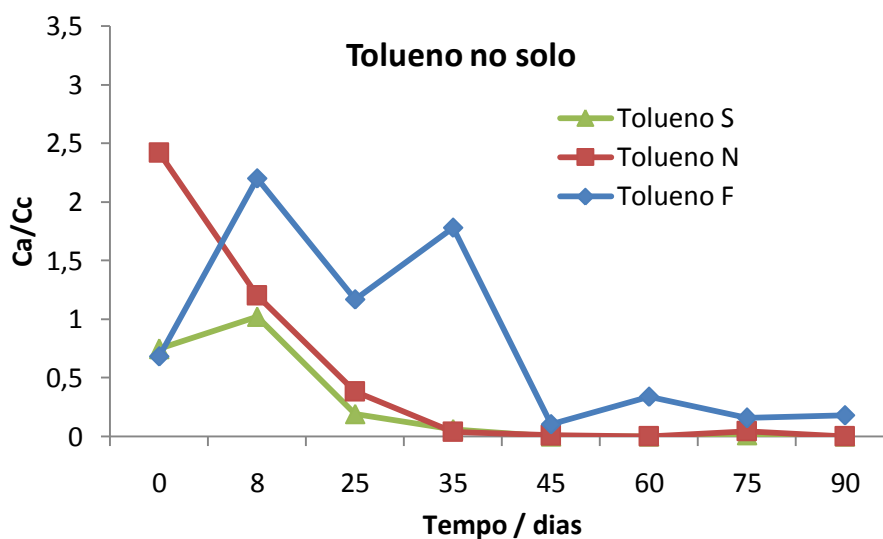


FIGURA 5.15 – Monitoramento de tolueno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Dentre os BTEX, o tolueno tem sido o mais amplamente estudado com respeito a sua degradação anaeróbica. Ele mostrou ser o composto mais favorável para ser degradado anaerobiamente em solos enriquecidos com diferentes receptores de elétrons, o que é consistente com trabalhos prévios que comparam as taxas de biodegradação destes compostos (HU al., 2007; DOU et

al., 2008a, COZZARELLI et al., 2010). As reações de oxidação completa do tolueno são mostradas na Tabela 5.3 (HU et al., 2007).

TABELA 5.3- Equações estequiométricas da oxidação completa do tolueno com diferentes receptores de elétrons.

Tipo de biodegradação	Equação estequiométrica
Redução de sulfato	$C_7H_8 + 4,5SO_4^{2-} \rightarrow 7CO_2 + 4,5S^{2-} + 4H_2O$
Redução de nitrato (NO_3^- / N_2)	$C_7H_8 + 7,2NO_3^- + 7,2H^+ \rightarrow 7CO_2 + 3,6N_2 + 7,6H_2O$
(NO_3^- / NO_2^-)	$C_7H_8 + 18NO_3^- \rightarrow 7CO_2 + 18NO_2^- + 4H_2O$
Redução de ferro (III)	$C_7H_8 + 21H_2O + 36Fe(III) \rightarrow 7HCO_3^- + 36Fe(II) + 43H^+$

Para o etilbenzeno a remoção foi a menos eficiente, com respeito aos três receptores de elétrons, observando-se até um aumento no *head space* e no solo com o tempo no grupo com ferro (III) (Figura 5.16 e 5.17). Como os resultados são dados em função relativa da concentração de etilbenzeno na série ativa normalizada pela concentração na série de controle abiótico, o aumento indica que ocorreu uma maior perda do etilbenzeno na série controle que na série com ferro (III). As concentrações iniciais do etilbenzeno foram de 4,0 mg kg⁻¹ (sulfato), 13,2 mg kg⁻¹ (nitrato) e 3,8 mg kg⁻¹ (ferro(III)).

No trabalho de BOTTON e PARSONS (2006) o etilbenzeno não foi degradado em um período superior a dois anos em condições redutoras de ferro (III). Tal fato é consistente com o observado neste trabalho. Mesmo que o etilbenzeno seja quimicamente parecido com o tolueno, não foi observado um comportamento parecido em nenhuma das séries. No estudo de HEIDER et al., 1999, o autor também relata a ausência de alguma indução cruzada das enzimas catabólicas em células da cepa EbN1 por parte do tolueno (HEIDER et al., 1999).

RESULTADOS

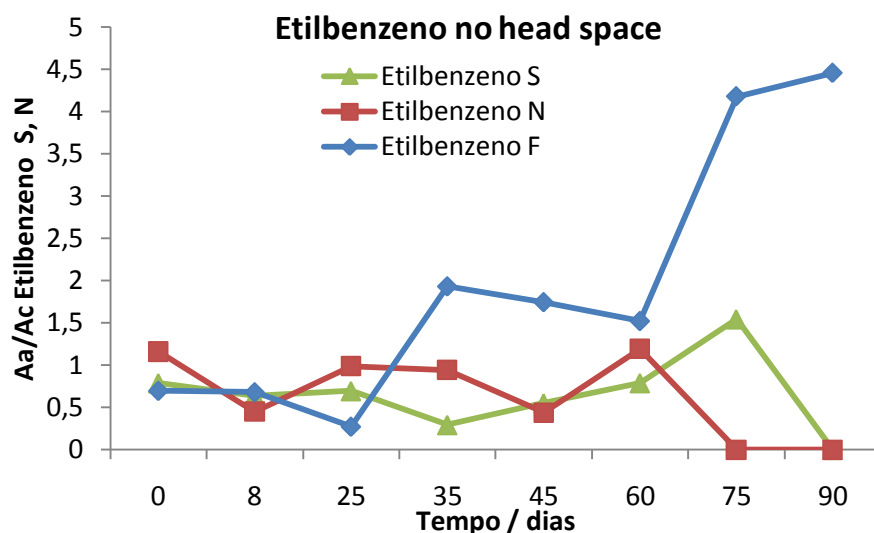


FIGURA 5.16 – Monitoramento de etilbenzeno no *headspace* nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

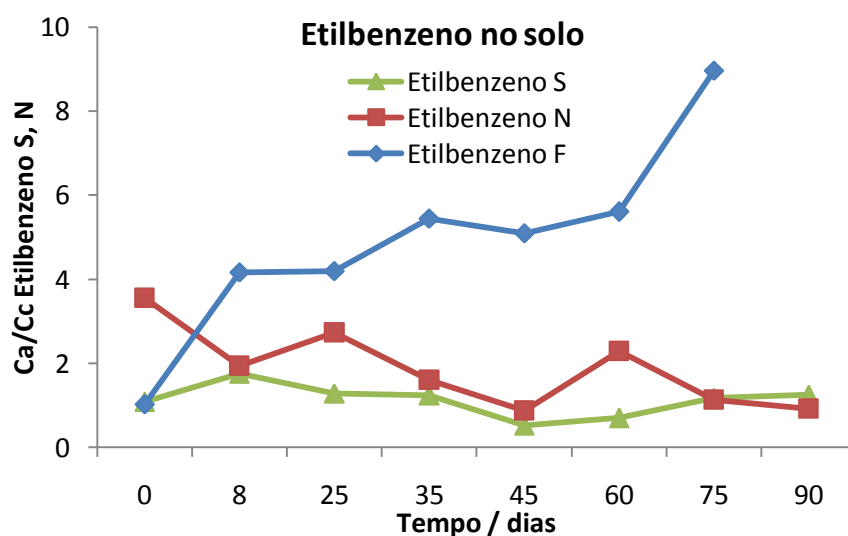


FIGURA 5.17 – Monitoramento de etilbenzeno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

A grande diferença no comportamento de biodegradação do etilbenzeno com relação ao tolueno é que embora as reações de adição de fumarato sejam comumente encontradas como passo inicial na ativação do hidrocarboneto, uma via diferente ocorre para o etilbenzeno. Mediante a hidroxilação da cadeia alifática, formando o 1-feniletanol, o álcool é

adicionalmente oxidado para a acetofenona, e especula-se que depois a acetofenona, é carboxilada formando o benzoilacetato e depois ativada até benzoil acetil-CoA que então sofre uma clivagem formando o acetil-CoA. (WEELINK et. al, 2010; BOLL et al., 2002). Quanto a via por hidroxilação, se acredita que seja mais factível, em função da estrutura do etilbenzeno impedir estéricamente a reação com o fumarato (DOU et al., 2008c). Neste trabalho não foi monitorado nenhum metabólito direto para o etilbenzeno e por tanto não podemos concluir que via é mais favorecida, mesmo com a baixa biodegradabilidade observada para este composto.

Foi observada a ausência de remoção do p-xileno durante o tempo de monitoramento nos solos com os três receptores de elétrons estudados (Figura 5.19), e no *head space* uma queda só no final do experimento nos meios redutores de nitrato e sulfato (Figura 5.18). As concentrações iniciais para cada experimento foram 2,7, 8,5 e 2,5 mg kg⁻¹ nas séries com sulfeto, nitrato e ferro(III) respectivamente. O p-xileno e o etilbenzeno parecem ser os BTEX mais recalcitrantes, justificando o menor número de trabalhos de degradação existentes para estes BTEX. De fato são escassos os estudos encontrados com culturas puras anóxicas crescendo em p-xileno isoladamente (HEIDER ET al., 1999, BELLER e SPORMANN, 1997). No entanto, um estudo registrou a degradação de p-xileno por um enriquecimento bacteriano quando foi fornecido o nitrato como o receptor de elétrons (HANER et al., 1995).

Similarmente ao comportamento observado para o etilbenzeno, também na série com ferro (III) foi registrada uma maior perda na série controle que na série ativa. A menor perda de etilbenzeno e xilenos nos microcosmos com Fe (III) pode ser explicada pela capacidade de sorção dos óxidos e hidróxidos de ferro com a matéria orgânica dissolvida. KAISER e

GUGGENBERGER (2007) mostraram evidências sobre a sorção de matéria orgânica sobre a superfície na goetita ($\text{FeOOH}_{(s)}$).

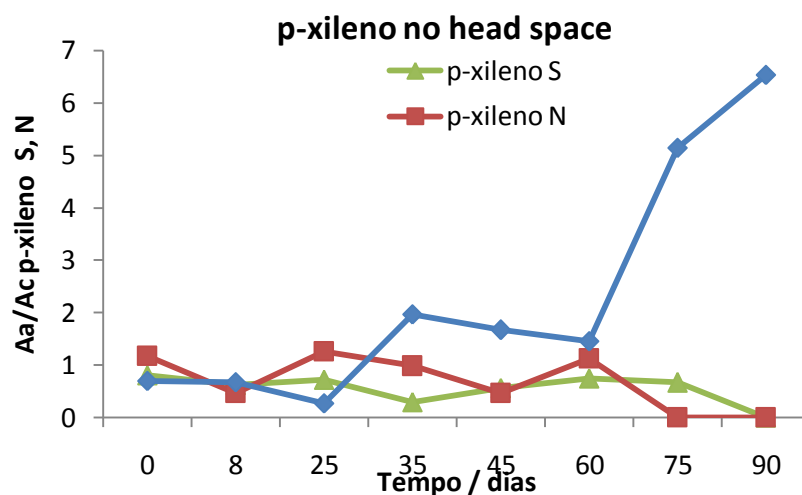


FIGURA 5.18 – Monitoramento de p-xileno no *headspace* nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

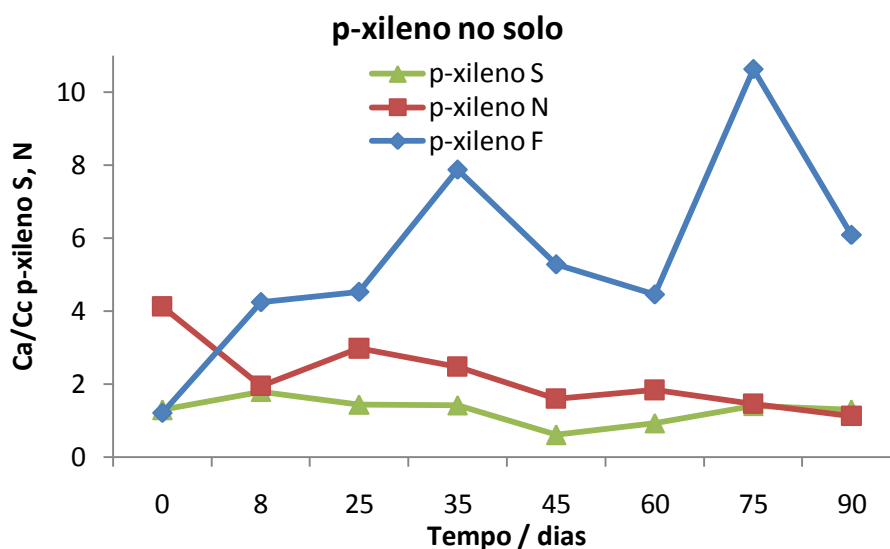


FIGURA 5.19 – Monitoramento de p-xileno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Quanto à degradação do o-xileno no solo, foi observada uma maior remoção, se em comparação à remoção observada para o p-xileno nos solos com nitrato e sulfato (Figura 5.21). No entanto, segundo estudos prévios, esta

remoção é principalmente devida a um co-metabolismo das bactérias em presença de outros substratos como o tolueno. Sendo que o-xileno não pode servir como única fonte de energia (HEIDER ET al., 1999, BELLER E SPORMANN, 1997). Até o momento poucas culturas puras têm sido reportadas como degradadoras de o-xileno, a cepa oXyS1 (HARMS et al. 1999 e a cepa OX39 do gênero *Desulfotomaculum* (MORASCH e SCHINK, 2004), ambas sob condições de redução de sulfato.

As concentrações iniciais para cada experimento foram 3,0; 10,7 e 3,5 mg kg⁻¹ na série com sulfeto, nitrato e ferro(III) respectivamente. A tabela 5.4 mostra as equações estequiométricas da oxidação completa para o etilbenzeno e isômeros do xileno (HU et al., 2007).

TABELA 5.4- Equações estequiométricas da oxidação completa do etilbenzeno e xilenos com diferentes receptores de elétrons.

Tipo de biodegradação	Equação estequiométrica
Redução de sulfato	$C_8H_{10} + 5,25SO_4^{2-} \rightarrow 8CO_2 + 5,25S^{2-} + 5H_2O$
Redução de nitrato (NO ₃ ⁻ / N ₂)	$C_8H_{10} + 8,4NO_3^- + 8,4H^+ \rightarrow 8CO_2 + 4,2N_2 + 9,2H_2O$
(NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻)	$C_8H_{10} + 21NO_3^- \rightarrow 8CO_2 + 21NO_2^- + 5H_2O$
Redução de ferro (III)	$C_8H_{10} + 24H_2O + 42Fe(III) \rightarrow 8HCO_3^- + 42Fe(II) + 50H^+$

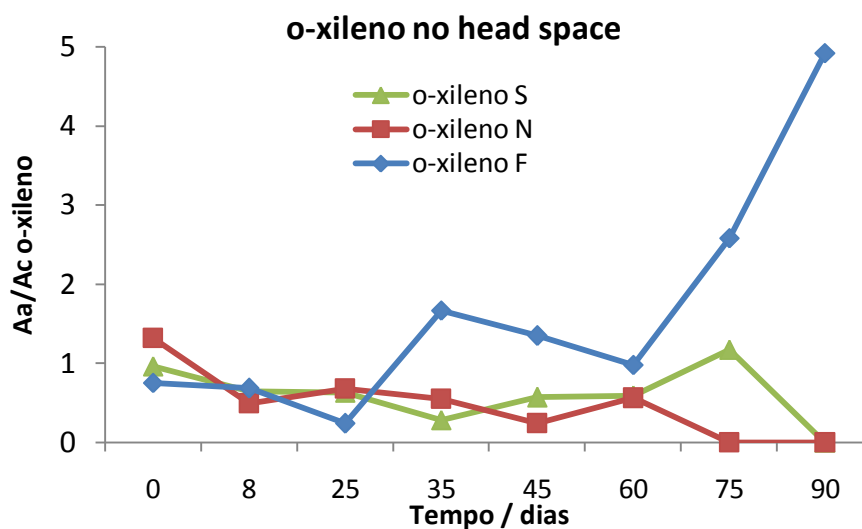


FIGURA 5.20 – Monitoramento de o-xileno no *headspace* nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Sob condições redutoras com sulfato e nitrato, os BTEX mostraram uma aparente persistência na seguinte ordem: etilbenzeno \approx p-xileno > benzeno > o-xileno > tolueno. Uma tendência parecida com a observada por COZZARELLI et al. (2010) (etilbenzeno > benzeno > m,p-xilenos > o-xileno > tolueno) em seu trabalho acerca de taxas de biodegradação de BTEX em águas subterrâneas, realizado em microcosmos *in situ* em um aquífero contaminado com petróleo cru em Minnesota (EUA).

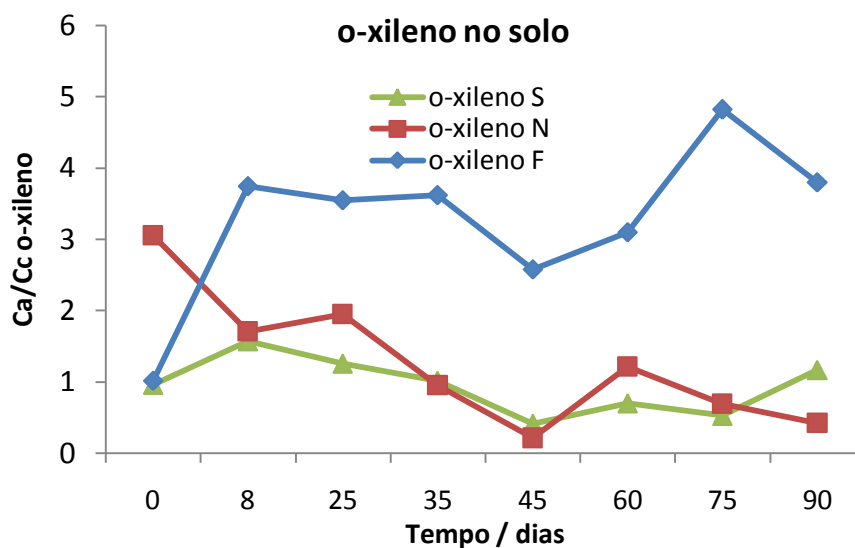


FIGURA 5.21 – Monitoramento de o-xileno no solo nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Na Tabela 5.5 são apresentadas as porcentagens remanescentes de BTEX nos microcosmos. O benzeno foi biodegradado completamente no cultivo com nitrato, já o tolueno foi removido completamente dos microcosmos com sulfato e nitrato. As altas porcentagens no grupo de Fe(III) se devem ao anteriormente explicado como uma menor perda dos compostos nesses microcosmos que no controle estéril. Exceto para o tolueno com 26% remanescente no final do experimento de Fe(III), indicando que mesmo com a existência de uma perda física, o tolueno foi biodegradado enquanto que os demais BTEX foram bastante recalcitrantes nesse meio redutor.

Os resultados em geral mostraram que a presença de nitrato favorece a degradação dos BTEX. Tal fato pode ser atribuído ao favorecimento termodinâmico do nitrato com um maior poder oxidante de $+0,96 \text{ E}^\circ, \text{ V}$ entre o Fe(III) ($+0,77 \text{ E}^\circ, \text{ V}$) e o SO_4^{2-} ($+0,17 \text{ E}^\circ, \text{ V}$). MOUSSAVI e GHORBANIAN (2015) confirmaram que na ausência de nitrato como receptor de elétrons externo se favorece o metabolismo fermentativo, enquanto que na presença de

nitrito ocorre um metabolismo respiratório, com taxas de remoção bem maiores na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo.

TABELA 5.5 - Fração remanescente de cada BTEX nos microcosmos enriquecidos com os diferentes receptores de elétrons.

BTEX (% remanescente)	Sulfato	Nitrato	Fe(III)
benzeno	54	0	201
tolueno	0	0	27
etilbenzeno	11	26	568
p-xileno	100	27	504
o-xileno	121	13	373

Outros autores também demonstraram uma maior eficiência da degradação de compostos orgânicos na presença do íon nitrato, tanto em águas como em solos (DOU et al., 2008b, HU et al., 2007; PHELPS e YOUNG, 1999). Neste estudo, o nitrato também mostrou ser mais eficiente na remoção dos BTEX, pelo qual poderia se pensar como a melhor opção para estimular a biodegradação destes contaminantes nos solos. Porém, um ponto importante na questão do nitrato é a capacidade poluidora deste íon na natureza (RESENDE, 2002). O nitrato é a principal forma de nitrogênio associada à contaminação da água. Esse íon possui uma solubilidade elevada sendo facilmente arrastado pelas águas das chuvas em função do fenômeno de lixiviação indo, juntamente com parte do solo para os corpos hídricos, com o agravante de que é fracamente ligado à matéria orgânica do solo (MANAHAN, 2000).

Como o tolueno foi o único BTEX que foi degradado pelos três receptores de elétrons aqui estudados, foi calculada a constante da taxa de degradação (k) e o tempo de meia vida com os três receptores de elétrons apenas para o tolueno, sendo que os valores são mostrados na Tabela 5.6.

A remoção de tolueno com os três receptores de elétrons foi descrita como uma cinética de primeira ordem:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Onde C_0 ($\mu\text{g g}^{-1}$) é a concentração no tempo zero, C ($\mu\text{g g}^{-1}$) é a concentração de tolueno depois de subtrair a perda abiótica no tempo t (dias) e k é a constante de taxa de degradação neste estudo. A curva de degradação foi linearizada como:

$$\ln C = -kt + \ln C_0$$

As curvas de linearização são mostradas no Anexo 3, e o seu r^2 é reportado na Tabela 5.6, junto com a taxa de degradação para cada receptor de elétrons e o tempo de meia vida. O tempo de meia vida $t_{1/2}$ foi calculado como:

$$t_{1/2} = \frac{(\ln 2)}{k}$$

TABELA 5.6– Parâmetros cinéticos para o tolueno.

Receptor de elétrons	r^2	k (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)
Sulfato	0,946	0,057	12
Nitrato	0,942	0,065	10
Ferro (III)	0,956	0,058	12

Os valores cinéticos aqui determinados foram similares a alguns reportados na literatura, como por exemplo BOTTON e PARSONS (2006) que observaram taxas de biodegradação para o tolueno entre 0,03 e 0,155 por dia sob condições redutoras de ferro(III). Já o LAWRENCE em seu relatório para a USGS (*U.S. Geological Survey*), 2006, cita tempos de meia vida para a biodegradação anaeróbia do tolueno de 12 dias em estudos de campo e de 13 dias em condições redutoras de nitrato. SUAREZ e RIFAI (1999) analisaram

estatisticamente intervalos de taxas de biodegradação para vários contaminantes sob diferentes condições redox para aproximadamente 280 estudos. Nesse sumário, a média das taxas de degradação de primeira ordem para o decaimento de tolueno foram de 0,062; 0,459 e 0,012 dia⁻¹ em condições redutoras de sulfato, de nitrato e de ferro(III), respectivamente. Os tempos de meia vida (média dos valores) foram de 20, 8 e 70 dias na ordem apresentada anteriormente para cada tipo de meio redutor.

5.3.3- Monitoramento do aparecimento dos metabólitos

O ácido benzilsuccínico foi identificado nos três grupos de microcosmos (Figura 5.22), sendo o metabólito direto do tolueno. Esta identificação concorda com a degradação observada do tolueno com os três receptores de elétrons. O monitoramento dos metabólitos durante 90 dias de incubação mostrou um pico de concentração (14 µg kg⁻¹) na série com nitrato aos 25 dias e depois uma diminuição até valores não detectáveis. Na série com sulfato o metabólito começou a surgir aos 8 dias e continuou aumentando até o final do monitoramento. Na série com ferro (III), o BSA começou a aparecer aos 25 dias e continuou aumentando até os 75 dias, com uma concentração de 64 µg kg⁻¹.

A acumulação do ácido benzilsuccínico foi observada em estudos prévios de mineralização de tolueno e foi interpretada como a formação de um produto sem destino (BELLER et al. 1992; EVANS et al., 1992). As possíveis explicações poderiam ser a falta de um sistema de transporte para o benzilsuccinato (se acredita que este metabólito seja incapaz de entrar na célula), falta de indução de genes catabólicos para o tolueno com o benzilsuccinato (BIEGERT, 1996) ou uma possível toxicidade do benzilsuccinato

(COSCHIGANO e BISHOP, 2004). O fato é que culturas não conseguem crescer quando o BSA é usado como fonte de carbono.

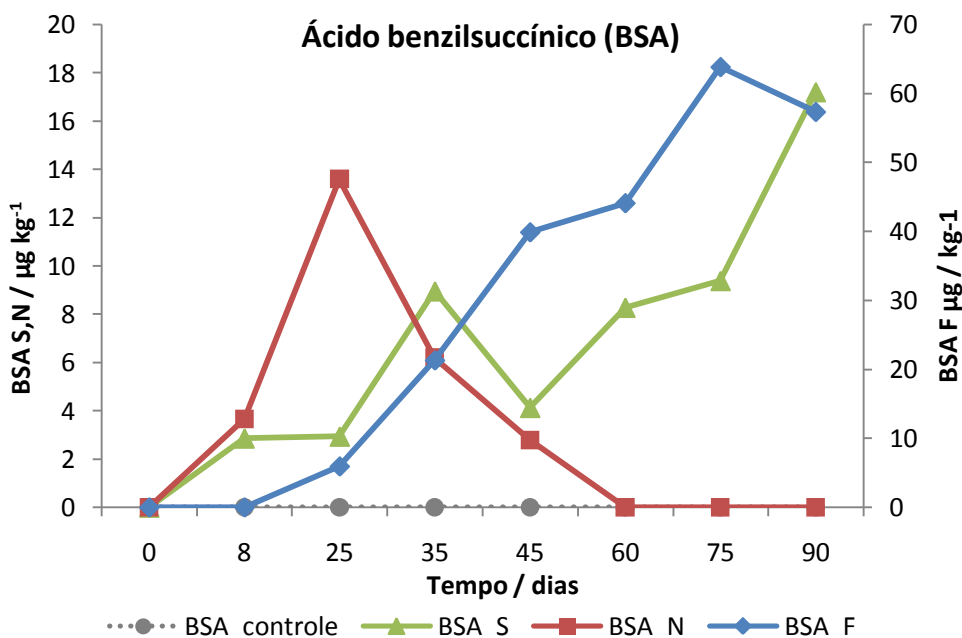


FIGURA 5.22 -Formação do ácido benzilsuccínico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Na série com nitrato como receptor de elétrons, o metabólito desapareceu depois dos 25 dias, mostrando uma degradação completa do tolueno. Estudos prévios foram realizados em águas subterrâneas ou com culturas puras no laboratório, sendo este estudo pioneiro no acompanhamento da produção de metabólitos de BTEX na matriz solo. Pode ser que devido à grande variedade de microrganismos, minerais e nutrientes presentes no solo, mecanismos podem ter interferido e/ou induzido na continuidade do caminho de degradação do BSA na série com nitrato. Revisões sobre a degradação de compostos aromáticos por via anaeróbia mostram as possíveis vias de transformação do tolueno, onde depois da formação do BSA este é convertido para o benzilsuccinil-CoA. Este intermediário é depois adicionalmente oxidado para se obter E-fenil-itaconil-CoA (FOGHT, 2008; WEELINK et al., 2010) e

eventualmente a benzoil-CoA, um metabólito aromático central que subseqüentemente é submetido a redução do anel, a clivagem e a oxidação para CO₂ (BIEGERT et al., 1996; HEIDER et al., 1999).

A formação do BSA a partir do tolueno e fumarato representa a primeira reação na oxidação do tolueno em meio anaeróbico, sendo mediada pela enzima benzilsuccinato sintase. A atividade da enzima é extremamente sensível ao ar, exibindo um tempo de vida meia de apenas 20-30s (HEIDER et al., 1999).

O mecanismo da reação proposta para a benzilsuccinato sintase começa com a formação de um radical, ativado pela enzima. O radical que contém a enzima produz um radical benzilo a partir do tolueno, onde se adiciona o fumarato para formar um radical benzilsuccínico. A enzima converte o produto radical do benzilsuccinato e a forma radical da enzima é regenerada (HEIDER et al., 1999; BELLER E SPORMANN, 1997) (Figura 5.23).

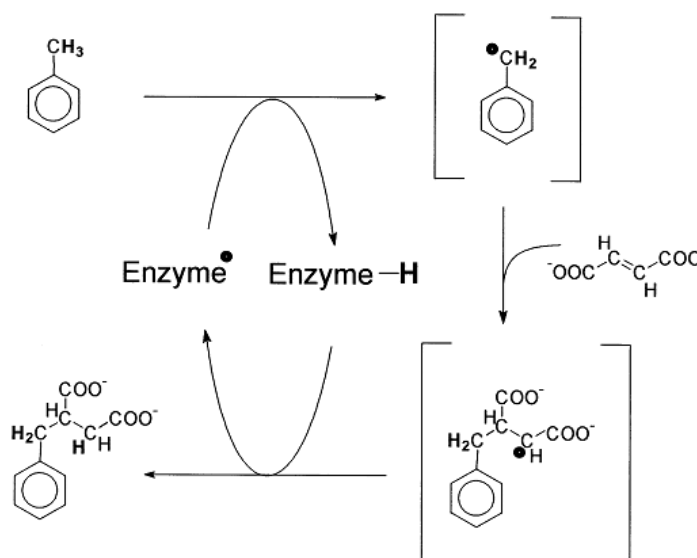


FIGURA 5.23 -Mecanismo de reação proposto para a enzima benzilsuccinato sintasa. O radical que contém a enzima produz um radical benzil no tolueno, onde é adicionado o fumarato para formar o benzilsuccinato. Figura tomada de HEIDER et al., 1999.

Na Figura 5.24 é mostrado o monitoramento do ácido 2-metil benzilsuccínico. Nos três grupos de experimentos, com diferentes receptores de elétrons foi observado o aparecimento deste metabólito, no entanto foi observada uma maior concentração na série com nitrato atingindo um valor máximo de $798 \mu\text{g kg}^{-1}$ aos 75 dias de incubação. Na série com sulfato foi observada a formação com um pico aos 45 dias, depois a concentração diminuiu e ficou mais ou menos constante ao redor de $39 \mu\text{g kg}^{-1}$. Na série com ferro só depois de 30 dias de incubação foi observado o surgimento do 2-metilBSA que continuou aumentando até o final do experimento.

Estudos prévios têm demonstrado que o-xileno não serve como substrato para o crescimento das bactérias, e sua transformação para 2-metilbenzilsuccinato pode ser devido a um co-metabolismo por parte de outros substratos como o tolueno (BELLER AND SPORMANN, 1997).

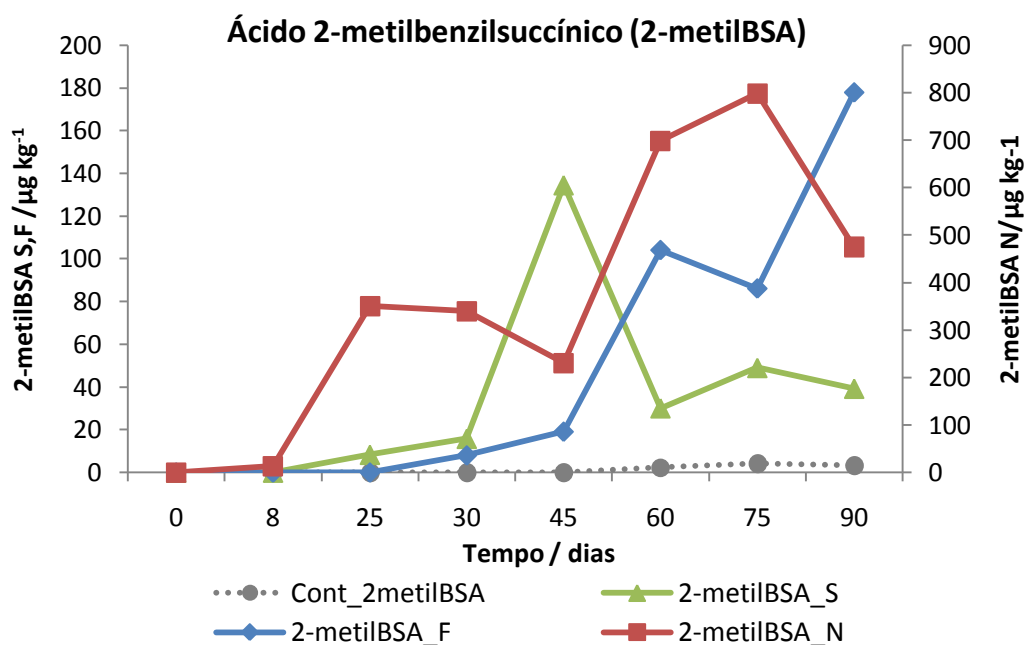


FIGURA 5.24 - Formação do ácido 2-metilbenzilsuccínico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Na Figura 5.25 é mostrado o monitoramento do ácido 2-toluico. Este metabólito mostrou um comportamento similar na série de nitrato e de ferro (III), com dois picos de concentração para cada caso, de 268 e 261 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. A diferenciação se deve a que o máximo na série de nitrato foi no tempo de 35 dias enquanto que na série de ferro foi aos 45 dias de incubação. Na série com sulfato também foi observado algum aumento na concentração depois de 8 dias, mas a concentração só atingiu o valor de 57 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A ocorrência de ácidos toluicos foi proposta como indicativo da degradação de xilenos sob condições anaeróbias (BELLER, 1995). O ácido 2-toluico é intermediário da degradação do 2-xileno, e o aparecimento dele com os três receptores de elétrons estudados, indica que os três grupos de bactérias conseguiram degradar o hidrocarboneto, sendo que a menor produção do metabólito na série com sulfato coincide com os resultados da caracterização bacteriana na ausência de BRS no solo original.

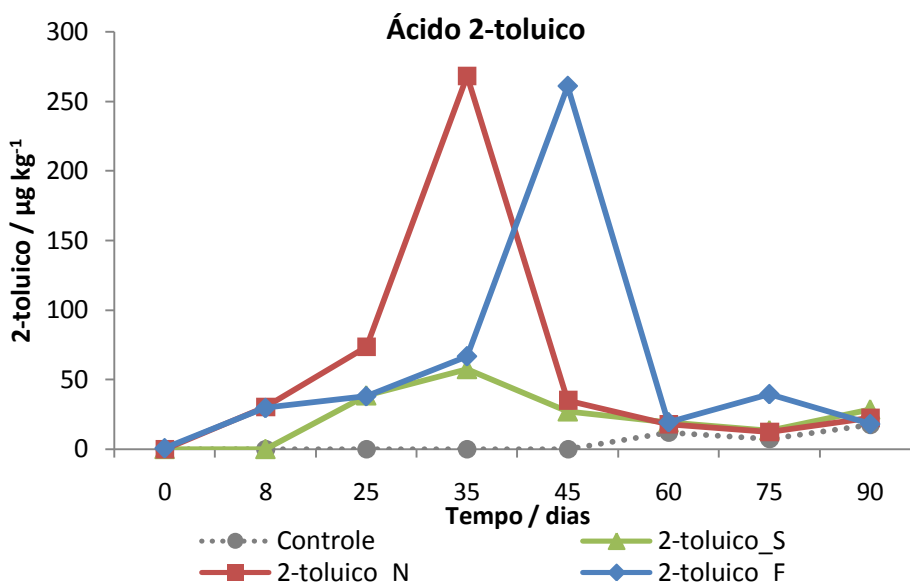


FIGURA 5.25 -. Formação do ácido 2-toluico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

No caso do ácido 4-toluico, originado pela biotransformação do p-xileno. Foi observado o leve aumento na concentração deste metabólito nos três grupos de microcosmos com diferentes receptores de elétrons (Figura 5.26). A série com nitrato teve um máximo de $70 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo o aparecimento do ácido 4-toluico foi mais rápido que nos outros receptores de elétrons. Desta forma, mesmo que de forma incipiente, uma parte do p-xileno foi consumida pelas bactérias associadas à atuação do nitrato como receptor de elétrons. Na caracterização inicial do solo foi detectada uma concentração de $1,0 \pm 0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ do ácido 4-toluico. No solo estéril foi detectado um pequeno aumento até aproximadamente $15 \mu\text{g kg}^{-1}$.

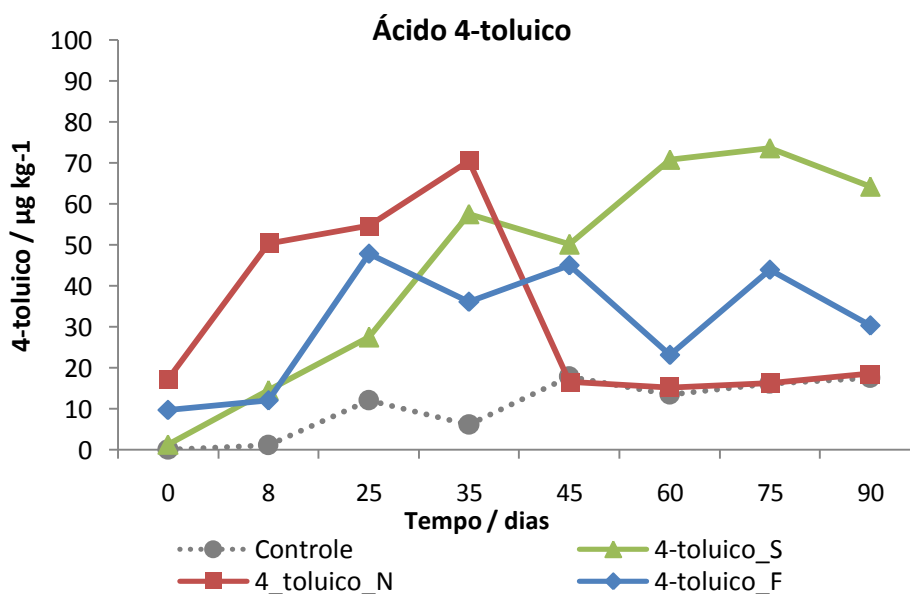


FIGURA 5.26 - Formação do ácido 4-toluico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

Na Tabela 5.7 é mostrado um resumo das concentrações máximas dos metabólitos em cada tipo de cultivo redutor, onde se pode observar de forma geral uma maior concentração nas séries de nitrato e ferro (III). No caso do Fe (III) essas maiores concentrações foram observadas nos tempos finais do

experimento, enquanto que com o nitrato, tal comportamento foi observado em torno dos 25 dias.

TABELA 5.7–Concentrações máximas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos metabólitos de BTEX nos microcosmos enriquecidos com os diferentes receptores de elétrons, entre parêntesis o tempo de incubação em dias.

Metabólitos	Sulfato	Nitrato	Fe(III)
BSA	17±4 (90)	14±3 (25)	64±6 (75)
2-metilBSA	134±10 (45)	798±28 (75)	178±26 (90)
Ácido 2-toluico	66±9 (35)	268±39 (35)	261±35 (45)
Ácido 4-toluico	74±12 (75)	71±13 (35)	48±5 (25)

O monitoramento do ácido benzóico com os três receptores de elétrons, não exibiu um acúmulo significativo do composto ao longo do tempo (Figura 5.27). Além disso, foi encontrada uma concentração basal no solo nativo de $182\pm 2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em trabalhos iniciais o ácido benzóico foi reportado como intermediário da degradação anaeróbia de mono-aromáticos (tolueno) (BELLER, 1995). Em cultivos com etilbenzeno, o benzoato foi detectado como um intermediário transitório (HEIDER et al, 1999). No entanto, segundo os resultados encontrados deste trabalho o ácido benzóico não mostrou ser um bom indicador geoquímico da degradação dos compostos BTEX. A concentração basal no solo é um indicativo de ser um intermediário da degradação de uma ampla gama de compostos aromáticos e por outro lado, ser biologicamente instável ou inconstante.

BIEGERT et al., 1999 reportaram que a oxidação do BSA para o ácido benzóico foi dependente da presença de coenzima A e de nitrato e foi observada somente em extratos concentrados (BIEGERT et al., 1996), podendo

explicar a ausência de formação deste metabólito em nossos experimentos não concentrados.

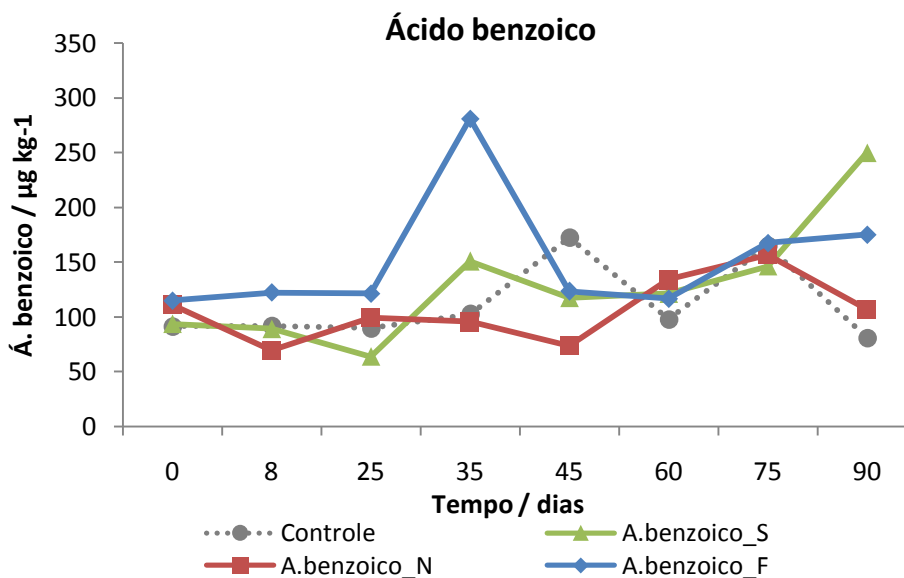


FIGURA 5.27 - Formação do ácido benzóico nos microcosmos com diferentes receptores de elétrons.

5.4 - Degradação anaeróbia de BTEX em solo contaminado com óleo diesel e enriquecido com os três receptores de elétrons

Com o intuito de criar uma situação mais próxima daquela observada por ocasião de um vazamento de petróleo ou de algum combustível derivado, foi montada uma série de microcosmos de solo contaminado com diesel e BTEX, ao qual foram adicionados os três receptores de elétrons juntos. Os resultados do monitoramento da incubação por 90 dias são mostrados a seguir.

5.4.1- Resultados preliminares nos microcosmos com diesel

Na figura 5.28 se mostra a mudança visual nos microcosmos contaminados com diesel entre o início do experimento e aos 20 dias de incubação, onde foi observado o aparecimento de um precipitado preto. Este precipitado é devido ao fato de que nestes microcosmos foram adicionados os três receptores de elétrons juntos, havendo a redução de sulfato para sulfeto, bem como a redução de Fe (III) para Fe (II), dando lugar à precipitação de sulfeto de ferro (FeS) de coloração preta e indicando que dentro dos microcosmos estava ocorrendo alguma atividade biológica e de natureza anaeróbia.

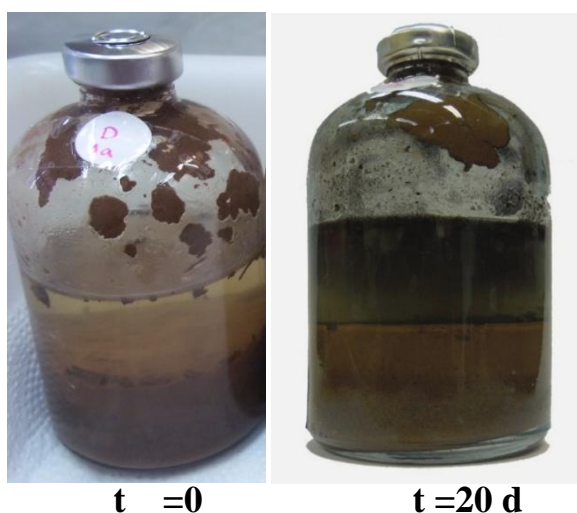


FIGURA 5.28- Mudanças de aspectos na série dos microcosmos com diesel S-1800.

Durante o monitoramento no *head space*, aos oito dias de incubação começou a aparecer um grande pico com tempo de retenção menor do que o do benzeno (tempo de retenção de 4 minutos) (Figura 5.29 linha verde). Este pico foi investigado no CG/MS, resultando em 99% de similaridade com o espectro de massas do CO₂. Nos microcosmos anteriores ativos, foi também observado, mas com pouca intensidade. Nestes microcosmos com diesel se produziu

bastante CO_2 devido à maior quantidade de matéria orgânica oriunda da adição do próprio combustível.

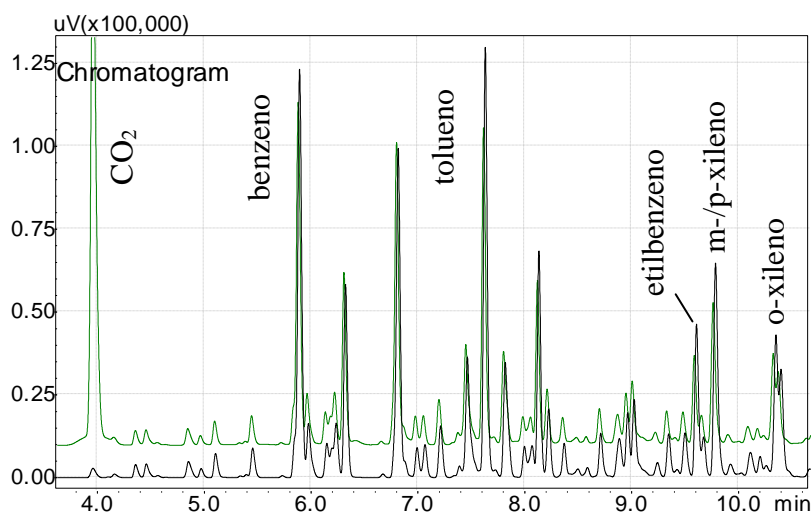
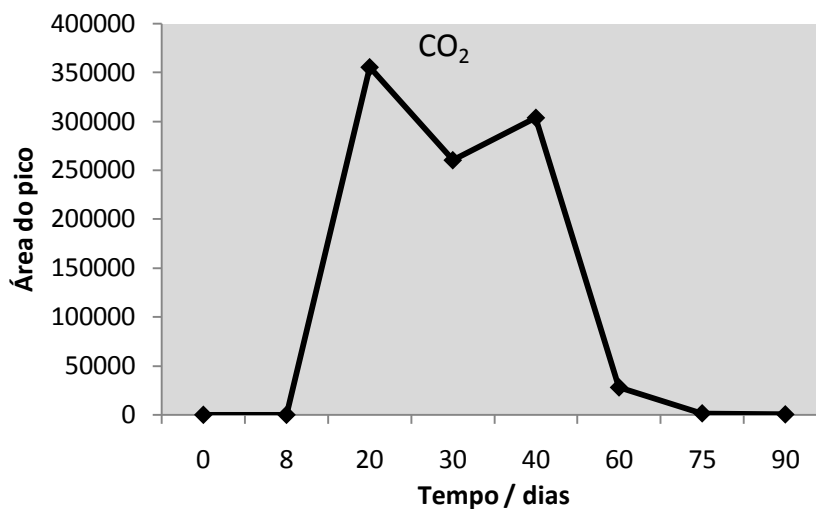


FIGURA 5.29- Cromatogramas dos microcosmos com diesel no *head space* no tempo 0, (—) e no tempo 8 dias(—).

O surgimento de CO_2 foi monitorado em termos de área do pico e é mostrado na Figura 5.30. A produção de CO_2 é uma forma clássica de acompanhar a mineralização de compostos orgânicos e atualmente continua sendo bastante utilizada em diversos estudos (JURGENS ET al., 2014; LI et al., 2015). Considerando a produção de CO_2 , a maior atividade biológica foi observada entre 8 e 60 dias de incubação.

RESULTADOS

FIGURA 5.30- Produção de CO₂ nos microcosmos com diesel.

Na figura 5.31 são comparados dois cromatogramas entre o primeiro e o trigésimo dia de incubação. Há uma diminuição significativa na intensidade dos picos, indicando que de alguma forma foram removidos os compostos voláteis presentes no diesel.

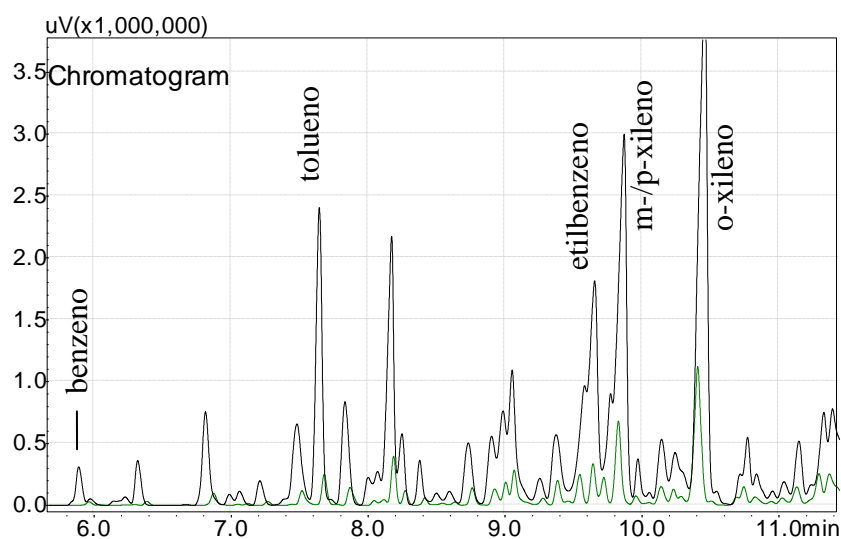


FIGURA 5.31- Cromatogramas dos microcosmos com diesel no solo no tempo 0, (—) e no tempo 30 dias(—).

5.4.2- Monitoramento da remoção de BTEX nos microcosmos contaminados com diesel

Nos microcosmos com diesel, o comportamento dos BTEX foi diferenciado com relação ao comportamento em um solo natural sem prévia contaminação de diesel. No *head space* (Figura 5.32) foi observado um aumento nas áreas dos compostos BTEX mais voláteis, do benzeno e tolueno a partir dos 20 dias, que depois decaiu com o tempo. Com o etilbenzeno e xilenos o comportamento foi diferente, havendo um aumento gradual durante o tempo. Neste caso os compostos mais voláteis foram concentrados na parte aérea do frasco, enquanto que os menos voláteis ficaram mais retidos no solo. Aqui também a presença de $\text{FeOOH}_{(s)}$ pode ter influenciado na retenção de espécies orgânicas, com relação ao controle.

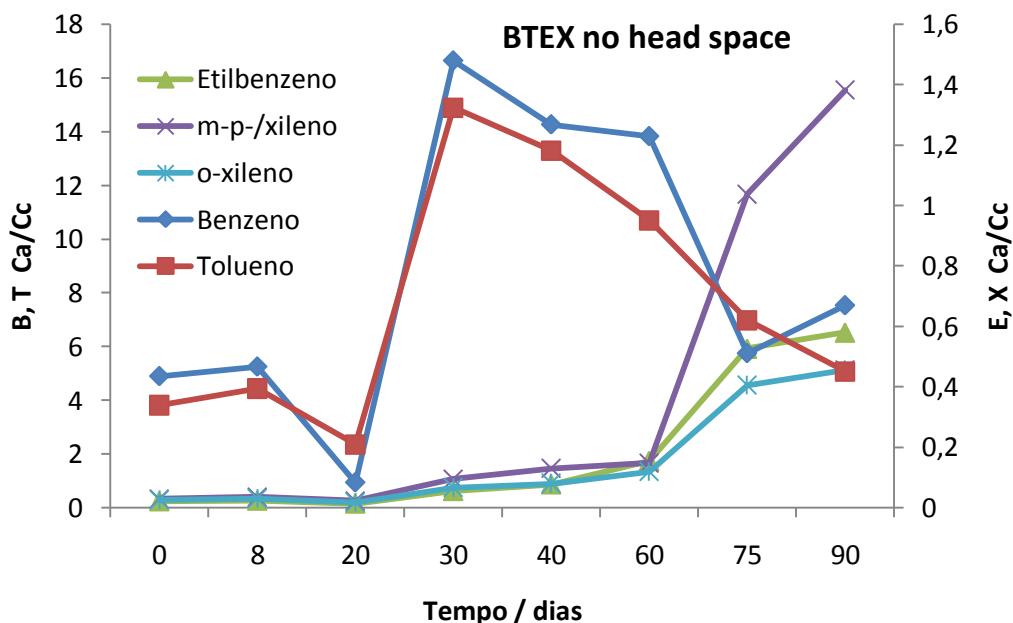


FIGURA 5.32 - Monitoramento de BTEX no *head space* dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.

No solo, de maneira geral, foi observada uma queda nos valores de concentração de todos os compostos BTEX ao longo do tempo, mas quando se reportaram os dados em relação ao controle estéril, o tolueno mostrou haver um aumento, que na realidade significa uma perda menor que na série de controle. A concentração de benzeno variou durante o tempo (Figura 5.33). Uma menor degradação do tolueno foi observada nestes microcosmos devido à grande variedade de outros hidrocarbonetos presentes no diesel que podem servir como fonte de carbono para as bactérias.

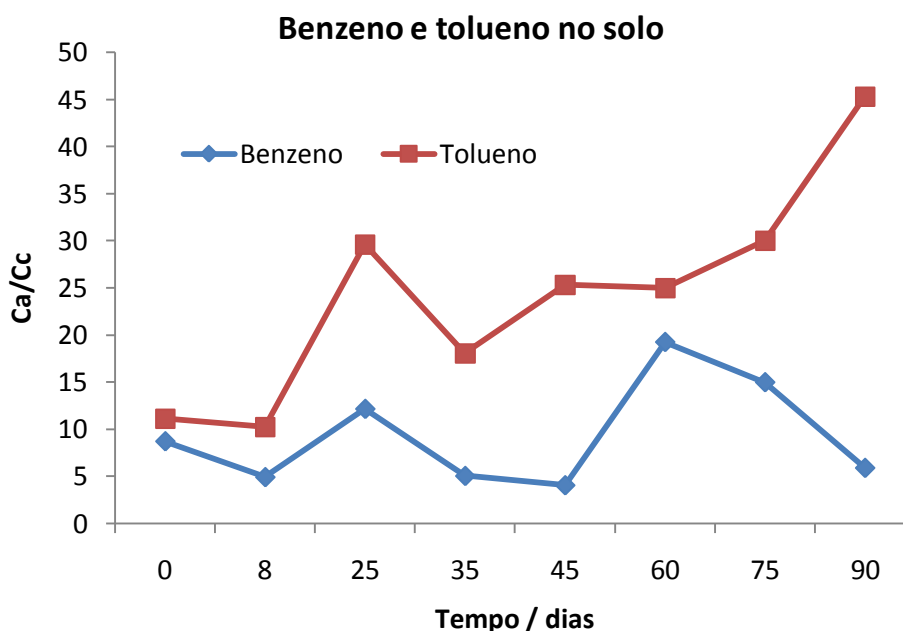


FIGURA 5.33 -Monitoramento de benzeno e tolueno no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.

O o-xileno mostrou um incremento relativamente similar ao observado para o tolueno, ou seja, uma perda menor que no controle (Figura 5.34). No caso de etilbenzeno e p-xileno a concentração relativa foi constante durante o tempo. Como foi discutido anteriormente o p-xileno e etilbenzeno foram os BTEX que apresentaram maior resistência a degradação, sendo que

nestes microcosmos com uma ampla variedade de outros hidrocarbonetos esta persistência é incrementada.

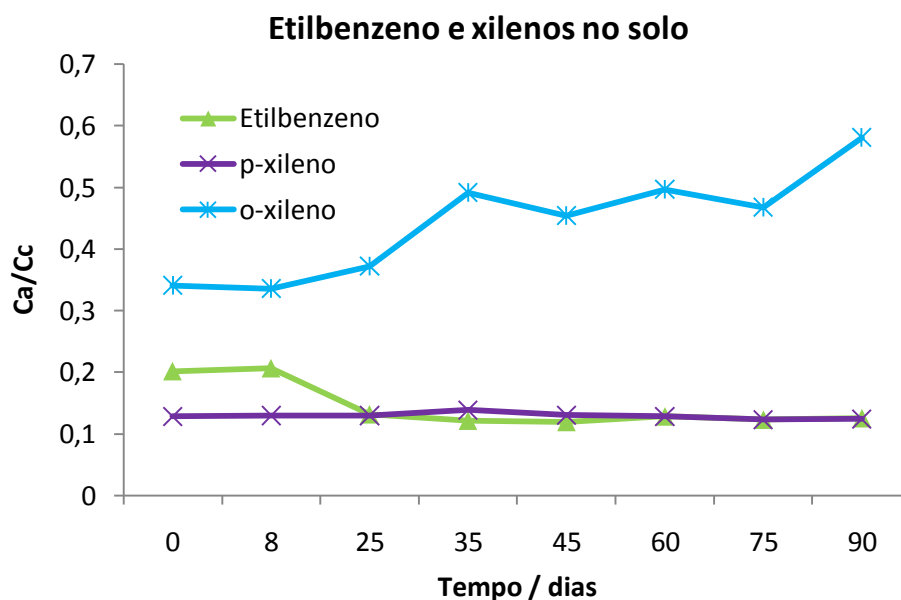


FIGURA 5.34 - Monitoramento de etilbenzeno e xilenos no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.

De forma geral nos microcosmos com diesel e solo previamente condicionados foi observada uma queda na degradação dos compostos BTEX, provavelmente ocasionada pela toxicidade do óleo diesel, competição de outros hidrocarbonetos usados como fonte de carbono e toxicidade de subprodutos formados durante o processo, similarmente ao observado por MORASCH e SCHINK (2004), onde a cepa OX39 estudada por tais autores mostrou ser sensível ao sulfeto gerado sob condições redutoras de sulfato havendo uma dependência da presença de Fe(II) para capturar o sulfeto produzido.

5.4.3- Monitoramento do aparecimento dos metabólitos nos microcosmos contaminados com diesel

Nas Figuras 5.35 e 5.36 é mostrado o monitoramento dos metabólitos aqui estudados. O BSA foi detectado entre o tempo 8 e 60 dias, o mesmo intervalo de tempo mostrado pelo surgimento do CO₂. Por ser metabólito direto do tolueno, o seu aparecimento indica que o tolueno foi degradado pelas bactérias presentes nos microcosmos. Com uma concentração máxima de 71 µg kg⁻¹ aos 45 dias, desapareceu e voltou a aparecer no final do experimento, sugerindo por analogia com os microcosmos com nitrato, que no início este aparecimento pode se dever a ação das BRN, e uma vez o nitrato acaba os outros receptores de elétrons começaram agir, e acumular o metabolito novamente.

O 2-metilBSA foi também detectado, mostrando uma tendência de aumento gradual e atingindo aos 90 dias uma concentração de 142 µg kg⁻¹. Contudo, na série com nitrato o 2-metilBSA atingiu uma concentração de 798 µg kg⁻¹, podendo esta diferença de concentração ser explicada por uma maior afinidade por parte de outros hidrocarbonetos presentes no diesel que servem como substratos para as BRN, que parecem não ser afetadas pelo óleo diesel, o que levou a um grande aumento na densidade populacional deste grupo de bactérias.

Devido ao condicionamento preliminar deste solo com diesel, no tempo zero já foi observada a presença dos ácidos toluicos (Figura 5.36) com uma concentração média de 20 µg kg⁻¹. Entre 35 e 45 dias foram observados picos de concentração de 78 µg kg⁻¹ para ácido 2-toluico e de 67 µg kg⁻¹ para o ácido 4-toluico. Contudo, o aumento não foi muito significativo, indicando uma baixa transformação do 2 e 4 xileno, respectivamente.

Mesmo para os metabólitos que apresentaram concentrações relativamente baixas nos microcosmos com diesel, o monitoramento dos subprodutos além dos compostos alvo permite avaliar um ambiente contaminado e indicar se existe um potencial de recuperação do solo, o qual é ainda mais importante quando os compostos principais são de natureza volátil e sua exclusiva determinação pode resultar em diagnósticos errôneos.

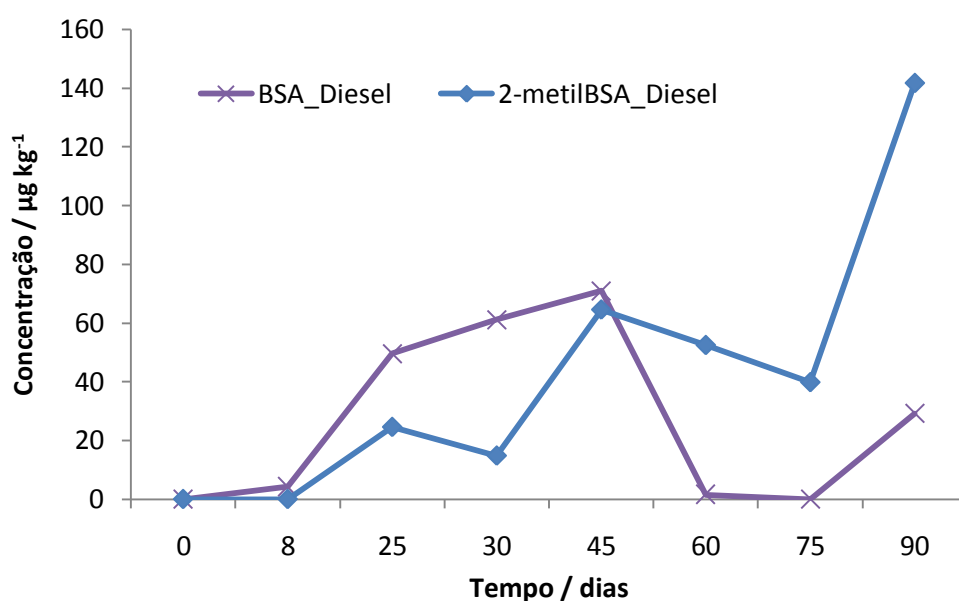


FIGURA 5.35 -Formação dos ácidos benzilsuccínico e 2-metilbenzilsuccínico no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.

RESULTADOS

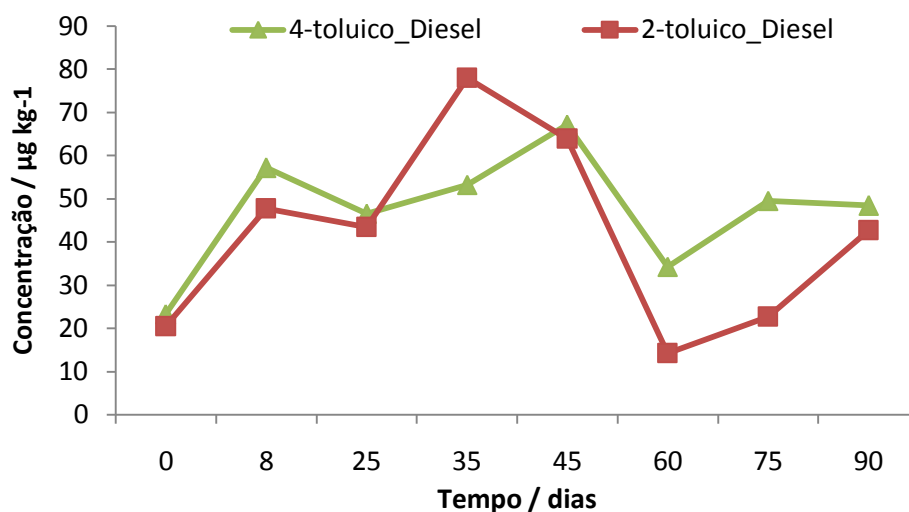


FIGURA 5.36 -Formação dos ácidos 2 e 3 toluico no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.

O ácido benzóico mostrou o mesmo comportamento observado nas séries com solo sem diesel (Figura 5.37), reforçando ainda mais a hipótese de que este composto não é um bom indicador de biodegradação anaeróbia de BTEX.

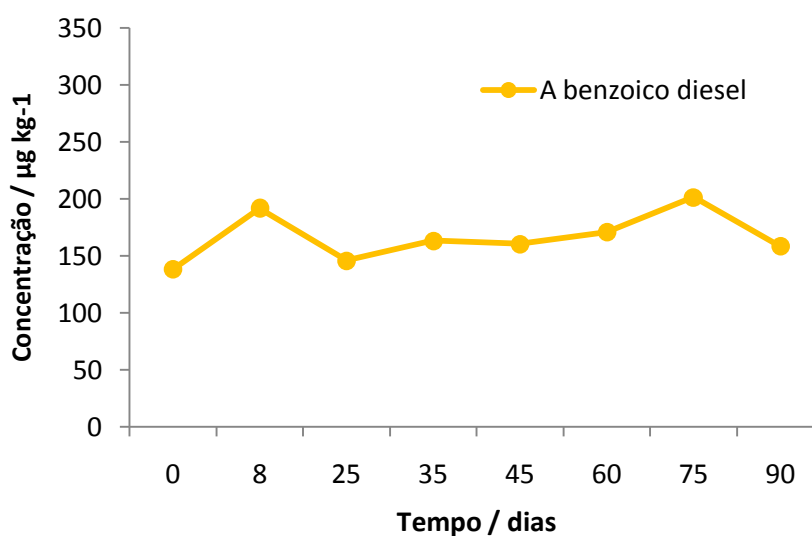


FIGURA 5.37 -Formação do ácido benzóico no solo dos microcosmos contaminados com diesel e com três receptores de elétrons.

6- CONCLUSÕES

Foi estabelecida a metodologia analítica para o monitoramento de compostos BTEX e seus metabólitos de degradação anaeróbia em amostras de solo contaminadas com diesel, propiciando ferramentas analíticas adequadas para o acompanhamento do comportamento destes compostos em diagnósticos ambientais, ou como meio de avaliação da ocorrência de atenuação natural após episódios de vazamentos.

Baseado na caracterização microbiológica nos cultivos de meios específicos pode-se concluir que o solo usado no experimento apresenta diversidade de grupos bacterianos, com uma predominância das bactérias redutoras de nitrato. Os altos valores das contagens também indicam que a comunidade microbiana está ativa, o que fornece bons indícios para a potencialidade de aplicação de um processo de biorremediação e/ou atenuação natural dos contaminantes presentes neste ambiente.

Foram encontradas evidências que os compostos BTEX podem ser removidos do solo estudado sob condições anaeróbias em presença de nitrato e sulfato, enquanto que o uso de ferro (III) não propiciou uma diminuição significativa na concentração dos contaminantes durante os três meses de incubação, exceto para tolueno.

O aparecimento de metabólitos foi mais rapidamente detectado na série empregando nitrato, devido ao maior conteúdo de bactérias redutoras de nitrato nativas no solo, associado ao fato de que o nitrato possui um maior poder oxidante dentre os receptores de elétrons estudados. No caso do ferro (III) os metabólitos demoraram a aparecer, sendo, no entanto, detectadas altas concentrações principalmente para o ácido benzilsuccínico proveniente da degradação de tolueno.

Os metabólitos selecionados principalmente o BSA e o 2-metilBSA se mostraram adequados como indicadores na ocorrência de processos de biodegradação de BTEX, sob as diferentes condições testadas, a exceção do ácido benzóico.

Na simulação de um cenário mais realista de contaminação, empregando óleo diesel e um conseqüente grande número de compostos presentes neste combustível, ocorreu uma diminuição da eficiência de remoção dos compostos BTEX, provavelmente em função do excesso de substrato.

Os resultados dos experimentos com óleo diesel mostraram a importância de se conhecer as características do sítio contaminado antes de iniciar algum tipo de remediação, uma vez que informações básicas tais como a concentração residual do contaminante, a diversidade e população de bactérias, e a presença de metabólitos podem ser determinantes no que se refere ao estímulo à degradação de contaminantes.

7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo ecotoxicológico dos metabólitos, visando determinar o potencial de toxicidade e degradação desses compostos com diferentes classes de microrganismos presentes no solo.

Busca por outros metabólitos que possam estar associados à degradação de compostos BTEX em solos tropicais.

Condução de trabalhos em áreas realmente contaminadas.

Monitoramento da concentração dos receptores de elétrons ligados a degradação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALUMBAUGH, R.E.; GIEG, L.M.; Field, J.A. “Determination of alkylbenzene metabolites in groundwater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry” *Journal of Chromatography A*, **1042**: 89–97, 2004.
- ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C. “Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados” *Eclét. Quím.*, São Paulo, 35 - 3: 17 - 43, 2010.
- ANNESER, B.; PILLONI, G.; BAYER, A.; LUEDERS, T.; GRIEBLER, C.; EINSIEDL, F.; RICHTERS, L. “High resolution analysis of contaminated aquifer sediments and groundwater ▪ What can be learned in terms of natural attenuation?” *Geomicrobiol. J.* **27**, 130–142, 2010.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction profile for: benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX). Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2004.
- BABU, G.S.; KIRAN, R.R.S.; LOKESWARI, N.; RAJU, K.J. “Optimization of Protease Production from *Aspergillus Oryzae* Sp. Using Box-Behnken Experimental Design” *E-Journal of Chemistry*, Vol. 4, No. 2, p 145-153, 2007.
- BAKKU, R.K.; TERLI, R.; SOMALANKA, S.R.; PALUKURTY, M.A. “Optimization of *Borassus flabellifer* Amylase Extraction Procedure Using Box-Behnken Design and Development of Simple Affinity Chromatographic Technique for Purification of Amylases” *British Biotechnology Journal* 2(3): 146-156, 2012.
- BARTON, L. L., FAUQUE, G. D. Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria, Ch 2 in *Advances in Applied Microbiology*, Vol 68, 2009, Elsevier Inc. ISSN 0065-2164.
- BELLER, H.R.; DING, W-H.; REINHARD, M. “Byproducts of Anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of in situ bioremediation” *Environmental Science & Techonology*, vol.29, No. 11, 2864-2870, 1995.
- BELLER, H.R., SPORMANN, A.M. “Anaerobic Activation of Toluene and o-Xylene by addition to fumarate in Denitrifying Strain T” *Journal of Bacteriology*, p. 670–676, 1997.
- BELLER, H.R. “Metabolic indicators for detecting in situ anaerobic alkylbenzene degradation” *Biodegradation* **11**: 125–139, 2000.

- BELLER, H.R. "Analysis of benzylsuccinates in groundwater by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and its use for monitoring in situ BTEX biodegradation" *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2724-2728. 2002.
- BIEGERT, T., FUCHS, G. AND HEIDER, J. "Evidence that oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate" *Eur. J. Biochem.* **238**: 661-668, 1996.
- BLODGETT, R. Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions, Bacteriological Analytical Manual, U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2010. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>. Acessado em 27/06/2015.
- BOLL, M., FUCHS, G., HEIDER, J. "Anaerobic oxidation of aromatic compound and hydrocarbons" *Current opinion in chemical biology*, **6**: 604-611, 2002.
- BOTTON, S., PARSONS, J.R. "Degradation of BTEX compounds under iron-reducing conditions in contaminated aquifer microcosms" *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 25, No. 10, 2630-2638, 2006.
- BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. *Technometrics*, **2**, 455-475, 1960.
- BOX, G.E.P.; NORMAN, D.R. *Empirical model-building and response surfaces*. New York: John Wiley, 1987.
- BUDDHADASA, S.C.; BARONE, S.; GIBSON, E.; BIGGER, S.W.; ORBELL, J. D. "Method Dependency in the Measurement of BTEX Levels in Contaminated soils" *JSS -J soils & Sediments* 2 (3) 137-142, 2002.
- CHOWHAN, Z.T. "pH-solubility profiles of organic carboxylic acids and their salts" *Journal of pharmaceutical sciences* **67**: 1257-1260, 1978.
- COSCHIGANO P.W., BISHOP B.J. "Role of benzylsuccinate in the induction of the *tutE* *tutFDGH* gene complex of *T. aromatica* strain T1" *FEMS Microbiology Letters* **231**: 261-266, 2004.
- COZZARELLI, I.M.; BAEHR, A.L. "Volatile Fuel Hydrocarbons and MTBE in the Environment". In H.D. Holland & K.K. Turekian. *Treatise on Geochemistry*. Vol. 9. Ch. 12. p. 433-474. 2003.

- COZZARELLI, I.M.; BEKINS, B.A.; EGANHOUSE, R.P.; WARREN, E.; ESSAID, H.I. “*In situ* measurements of volatile aromatic hydrocarbon biodegradation rates in groundwater” *J Contam Hydrol* **111**: 48–64, 2010.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. “Simultaneous Optimization of Several Response Variables” *Journal of Quality Technology*, 12 (4) 214-219, 1980.
- DOU, J.; LIU, X.; HU, Z. “Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions” *J. Haz. Materials* **158**: 264–272, 2008a.
- DOU, J.; LIU, X.; HU, Z.; DENG, D. “Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction” *J. Haz. Materials* **151**:720-729. 2008b.
- DOU, J.; LIU, X.; HU, Z. “Anaerobic BTEX degradado in soil bioaugmented with mixed consortio under nitrate reduction” *Journal of environmental sciences*, **20**: 585-512, 2008c.
- EL TIEMPO, Ataques a oleoductos en Colombia igualan desastre del Golfo de México, Abril de 2013, Disponible em: http://www.eltiempo.com/economia/ARTICULO-WEB-NEW_NOTA_INTERIOR-13804266.html. Acceso: 21/06/2014.
- EL TIEMPO, Atentados terroristas contra infraestructura petrolera provocan catástrofe ambiental, <http://www.elespectador.com/noticias/economia/atentados-terroristas-contra-infraestructura-petrolera-articulo-565585>, Acceso: 27/06/2015.
- EVANS, P.L., LING, W., GOLDSCHMIDT, B., RITTER, E.R., YOUNG, Y. “Metabolites Formed during Anaerobic Transformation of Toluene and o-Xylene and Their Proposed Relationship to the Initial Steps of Toluene Mineralization” *Applied and Environmental Microbiology*, p. 496-501, 1992.
- EZQUERRO, Ó.; ORTIZ, G., PONS, B.; TENA, M.T. “Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction” *J. Chromatogr. A* 1035: 17–22, 2004.
- FOGHT, J. “Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects” *J Mol Microbiol Biotechnol*, **15**: 93–120, 2008.
- GEOVATION CONSULTANTS, Inc., Florida, NY (US) , Hince E. C.; Zimmer; R. L., Anderson T. H., all of Harriman, NY (US) , Anaerobic bioremediation system , US 6,344,355 B1, 2002.

- GOULD, W.D., M. STICHBURY, M. FRANCIS, L. LORTIE, AND D.W. BLOWES. An MPN method for the enumeration of iron-reducing bacteria. In: Spiers, G., P. Beckett, and H. Conroy, editors, Proceedings of Mining and the Environment III. Laurentian University, Sudbury, ON, Canada. 25–28, May. p. 153–157, 2003.
- HÄNER A, HÖHENER P, ZEYER J “Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture” *Appl Environ Microbiol* **61**: 3185–3188, 1995.
- HAO, O. J. Sulphate-reducing bacteria, The Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Elsevier, 2003. ISBN 0-12-470100-0.
- HARMS, G., ZENGLER, K., RABUS, R., AECKERSBERG, F., MINZ, D., ROSSELLO-MORA, R., WIDDEL, F. “Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria” *Appl Environ Microbiol* **65**, 999-1004, 1999.
- HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; McDOWALL, R.D. “Validation of bioanalytical chromatographic methods” *J. Pharmaceut. Biomed.* **17**:193-218, 1998.
- HEIDER J., SPORMANN A., BELLER H., WIDDEL F. “Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons” *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 459-473, 1999.
- HIRATA, R.; CONICELLI, B. P. “Groundwater resources in Brazil: a review of possible impacts caused by climate change” *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol.84, n.2, pp. 297-312, 2012.
- HU, Z.; DOU, J.; LIU, X.; ZHENG, X.; DENG, D. Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based on optional electronic acceptors. *J. Env. Sciences* 19:1049-1054. 2007.
- IAEA, International atomic energy agency, Management and conservation of tropical acid soils for sustainable crop production, IAEA-TECDOC-1159. Vienna, 2000. Disponível em: http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1159_prn.pdf
- JURGENS, S.S.; HELMUS, R.; WAAIJERS, S.L.; UITTENBOGAARD, D.; DUNNEBIER, D.; VLEUGEL, M.; KRAAK, M.H.S.; VOOGT, P.; PARSONS, J.R. “Mineralisation and primary biodegradation of aromatic organo phosphorus flame retardants in activated sludge” *Chemosphere*, **111**: 238–242, 2014.

- KAISER, K.; GUGGENBERGER, G. "Sorptive stabilization of organic matter by microporous goethite: sorption into small pores vs. surface complexation" *European Journal of Soil Science*, **58**: 45–59, 2007.
- KNIEMEYER, O.; FISCHER, T.; WILKES, H.; GLOCKNER, F. O.; WIDDEL, F. "Anaerobic Degradation of Ethylbenzene by a New Type of Marine Sulfate-Reducing Bacterium" *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 2, 760–768, 2003.
- LAWAL, M.O.; ESE, T.C. "Environmental Impact of Pipeline Vandalization on the Nigerian Landscape: The Case of the Niger Delta Region" *J Hum Ecol*, 39(1): 73-84, 2012.
- LAWRENCE, S. J. Description, Properties, and Degradation of Selected Volatile Organic Compounds Detected in Ground Water— A Review of Selected Literature, Open-File Report 2006-1338, U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey.
- LI, C.H.; WONG, Y. S.; HONG-YUAN, WANG, H. Y.; TAM, N. F. Y. Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO₃, *Journal of Environmental Sciences* XX, XXX – XXX. 2015.
- LOVLEY, D.R. "Dissimilatory metal reduction" *Annu Ver Microbiol*, **47**: 263–290, 1993.
- LU, W.; WANG, H.; HUANG, C.; REICHARDT, W. "Aromatic compound degradation by iron reducing bacteria isolated from irrigated tropical paddy soils" *Journal of Environmental Sciences* **20**: 1487–1493, 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO J. M. Brock biology of microorganisms, 11th ed. Pearson Education, Inc, p 557-559, 2006.
- MADIGAN M. T., MARTINKO J. M e PARKER J., Microbiologia de Brock, 10 edition, LIVRO ELETRÔNICO, Pearson Education Companion, 2004.
- MANAHAN, STANLEY E. "SOIL ENVIRONMENTAL CHEMISTRY" Environmental Chemistry, Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- MAZZEO, D.E.C.; LEVY C. E.; de ANGELIS D.F.; MARIN-MORALES M.A.; BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery, *Science of the Total Environment* **408**: 4334–4340, 2010.
- McCRADY, M. H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. Infect. Dis.* **17**: 183-212, 1915.

- MECKENSTOCK, R. U.; MARTIN, E.; GRIEBLER, C. “Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers” *Environ. Sci. Technol.* **49**: 7073–7081, 2015.
- MENÉNDEZ, J.C.F.; FERNÁNDEZ M.L., SÁNCHEZ J. E.U., FERNÁNDEZ E. M., SANZ-MEDEL A. “Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography” *Analytica Chimica Acta* **415**: 9–20, 2000.
- MORASCH, B.; ANNWEILER, E.; WARTHMAN, R.J.; MECKENSTOCK, R.U. “The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: degradation of naphthalene, *o*-, and *m*-xylene by sulfate-reducing bacteria” *Journal of Microbiological Methods* **44**:183–191, 2001.
- MOUSSAVI, G.; GHORBANIAN, M. “The biodegradation of petroleum hydrocarbons in an upflow sludge-blanket/fixed-film hybrid bioreactor nitrate-reducing conditions: Performance evaluation and microbial identification” *Chemical Engineering Journal* **28**: 121-131, 2015.
- MUTAVDZIC-PAVLOVIC, D.; BABIC, S.; DOLAR, D.; ASPERGER, D.; KOSUTIC, K.; HORVAT, A.; KASTELAN-MACAN, M. “Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC-diode array detection” *J. Sep. Sci.* **33**: 258–267, 2010.
- NAGPAL, S.; CHUICHULCHERM, S.; PEEVA, L.; LIVINGSTON, A. “Microbial sulfate reduction in a liquid–solid fluidized bed reactor” *Biotechnology and Bioengineering*, **70**: 370, 2000.
- NAVARRO, M. N. Remediación de suelos afectados por hidrocarbonatos, cap 1 p.1-5, 2009. Disponible em: <http://www.scribd.com/doc/20300026/Remediacion-de-Suelos-Afectados-por-Hidrocarburos> Acceso: 10/10/2013.
- NIÑO L. R.; GROSSELI G. M.; MOZETO A. A.; FADINI P. S. “Optimization study of BTEX extraction from soils spiked with two kinds of Brazilian diesel by HS-SPME using Box–Behnken experimental design and multi-response analysis” *Analytical Methods*, **6**: 3247–3253, 2014.
- NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, 2012a, Disponible em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, Acceso: 18/09/2013.

- NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, 2012b, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri5322.htm>, accessed date: 18/09/2013.
- OTENIO, M.H.; SILVA, M.T.L.; MARQUES, M.L.O.; ROSEIRO, J.C.; BIDOIA, E.D. “Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852” *Braz J Microbiol* **36**: 258–61, 2005.
- PARFOMAK, P. W. Keeping America’s Pipelines Safe and Secure: Key Issues for Congress, Congressional Research Service, 2013. Disponível em: <http://www.fas.org/sgp/crs/homsec/R41536.pdf>
- PAWLISZYN, J.; Solid Phase Microextraction - Theory and Practice, Wiley-VCH: USA, 1997.
- PETROBRAS, technical manual, Diesel S-10, available in (Acesso: 9/26/2013): <http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/bbf8ea004de4797c8e8adf73cb9b3dc7/manual-tecnico-diesel-s-10.pdf?MOD=AJPERES>.
- PHENOMENEX, 2014 SAX, Phase Detail, <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata/SAX?returnURL=/Products/Search/SPE> Acesso: 21/06/2014
- PHELPS C.D.; YOUNG L.Y. “Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments” *Biodegradation* **10**: 15-25, 1999.
- POSTGATE, J. R. “The Sulphate-Reducing Bacteria.” Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1979.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J.T.C.; VAN GROENESTIJN, J.W. “Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1” *Appl Environ Microbiol*, **68**: 2660–5, 2002.
- RESENDE A.V. Agricultura e qualidade da água: contaminação da água por nitrato. Editora EMBRAPA, Planaltina, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F. “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos” *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.
- ROBB, J.; MOYER, E. “Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets” *Contam. Soil Sed. Water*, Spring: 67-71, 2001.

- SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A.; ROUNAGHI, G.; HOSSEINI, H.E. “A novel solid phase microextraction using cadted fiber based sol gel techinque using poly (ethylene glycol) grafted multi-walled carboon nanotubes for determination of BTEX in water sample with gas chromatography falm ionization detector” *J. Chromatogr. A.* **1218**: 5757-5764, 2011.
- SIGMA-ALDRICH, Guide to Solid Phase Extraction, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>. Acesso: 20/06/2014.
- SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S.S., KONG, S.H. “Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions” *Biodegradation* **16**: 319–27, 2005.
- SOUZA, C.R.F.; BOTT, R.F.; OLIVEIRA, W.P. “Optimization of the Extraction of Flavonoids Compounds from Herbal Material using Experimental Design and Multi-response Analysis” *Lat. Ame. J. Pharm.* **26** (5): 682-90, 2007.
- SPORMANN A.M.; WIDDEL F. “Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria” *Biodegradation* **11**: 85–105, 2000.
- STANIER, R.Y., INGRAHAN, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. *Microbiología*, Editorial Reverté S.A. 2 Edit. 1996, pg 592-594.
- SUAREZ M. P., RIFAI H. S. *Biodegradation Rates for Fuel Hydrocarbons and Chlorinated Solvents in Groundwater*, CRC Press LLC. P 337-362, 1999.
- SUTTON S. “The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation, Microbiology Topics” *Journal of Validation Technology* [Summer 2010], p35-38, 2010.
- TANKIEWICZ, M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M. “Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-flame-ionization detector (GC-FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples” *Microchem. J.* **108**: 117-123, 2013.
- TONINI R.M.C.W.; de REZENDE C.E.; GRATIVOL A. D. “Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão” *Oecologia Australis* **14**(4): 1025-1035, 2010.

- TORRES, S. Estadão. Roubo em dutos rega riscos e causa prejuízos, Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,roubo-em-dutos-gera-riscos-e-causa-prejuizos,989329,0.htm>, Janeiro 2013, Acesso: 18/06/2014.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA) (1999). Directive 9200.4-17P: Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oust/directiv/d9200417.pdf>>. Acesso em novembro de 2014.
- WADE, M.J. “Thoughts on Manufacturing Changes in the US Petroleum Industry: Implications for Age-dating, Calculating Weathering Indices and Hydrocarbon Fingerprinting” *International Journal of Soil, Sediment and Water*, vol 2, no 1, 2009.
- WATERS, 2014a, Beginner's Guide to SPE (Solid-Phase Extraction), Disponível em: [http://www.waters.com/waters/en_US/Beginner's-Guide-to-SPE-\[Solid-Phase-Extraction\]/nav.htm?cid=134721476](http://www.waters.com/waters/en_US/Beginner's-Guide-to-SPE-[Solid-Phase-Extraction]/nav.htm?cid=134721476), Acesso: 20/06/2014.
- WATERS, 2014b, Use manual, HLB cartridges and 96-well plates, Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>
- WEELINK, A. B.; VAN EEKERT, M.H.A.; STAMS, A.J.M. “Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application” *Rev Environ Sci Biotechnol* **9**: 359-385, 2010.
- WORLD BANK, CLIFTON, C.; EVANS, R.; HAYES, S.; HIRJI, R.; PUZ, G.; PIZARRO, C. Water and Climate Change: Impacts on ground water resources and adaptation options, World Bank, 2010, disponível em: <http://documents.worldbank.org/curated/en/2010/06/12418872/water-climate-change-impacts-groundwater-resources-adaptation-options>.

ANEXOS

ANEXO 1- Artigo Niño et al., 2014, Disponível em:
<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/AY/C3AY42253D#!divAbstract>

Analytical
Methods



PAPER

Optimization study of BTEX extraction from soils spiked with two kinds of Brazilian diesel by HS SPME using Box–Behnken experimental design and multi-response analysis

Cite this: *Anal. Methods*, 2014, 6, 3247

Leidy R. Niño, Guilherme M. Grosseli, Antonio A. Mozeto and Pedro S. Fadini*

In this work the main sorption conditions were optimized in the solid-phase microextraction (SPME) mode head-space (HS) for extraction of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers) from soils spiked with Brazilian conventional diesel and desulphurized diesel. Using a 100 μm poly(dimethylsiloxane) coating, the optimal exposure time was 4 min at 45 °C in saturated solution of NaCl (36 g per 100 mL). The resulting limits of detection (LODs) were between 0.002 and 0.02 mg kg^{-1} . Statistics tools were used to assist in the selection of extraction variables in function to the best response (peak area) and the reproducibility (RSD%). Using Box–Behnken experimental design and desirability functions, an empirical model was developed through a response surface methodology to describe the effect of tested variables (temperature, time and ionic strength). Each experiment was carried out in triplicate. The most important result of this work is a fast and easy method (including solvent-free) that was optimized to determine BTEX in soils by the HS-SPME procedure combined with analysis of GC-FID that showed applicability in real samples (spiked soils with conventional Brazilian diesel and desulphurized diesel). It is postulated that this methodology that was intentionally developed to assess the natural biodegradation of BTEX in soils may also be used for environmental diagnostics in general.

Received 16th December 2013
Accepted 24th February 2014

DOI: 10.1039/c3ay42253d

www.rsc.org/methods

1. Introduction

Soil contaminations by aromatic hydrocarbons such as benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers, known as BTEX, are commonly observed in areas near oil refineries and gas stations as well as in industrial wastes or are due to the intensive use of pesticides and herbicides.^{1–3} These volatile compounds have a low partition coefficient, K_{ow} (octanol–water), which implies that they are easily transported by surface and subsurface runoff, reaching surface water and groundwater reservoirs.^{4,5} In spite of the lower toxicity of these low-boiling point hydrocarbons when compared to higher-molecular weight aromatic compounds, they are considered to be the main source of acute toxicity of crude and refined oils due to the relatively high concentrations at which they are found in natural waters.⁶ Studies have demonstrated that exposure to each one of these individual compounds can produce neurological damage and affect the central nervous system. Benzene, besides being a carcinogenic compound, can cause hematologic disorders.^{6,7}

There are several studies in the literature dealing with the analysis of BTEX in water, especially groundwater; however, for

soils this number is considerably smaller. The most cited extraction techniques for analysis of BTEX in soil are the standard USEPA method 5030/5035 (purge-and-trap method)^{8,9} and the direct injection USEPA method 3585 for oily matrices.¹⁰ In addition to these, there are methods using headspace techniques (HS)^{11–13} and Soxhlet extraction.¹⁴ On the other hand, conventional sample preparation techniques, such as solvent extraction and solid phase extraction (SPE) methods, have well documented disadvantages, such as high solvent consumption, demand of a large amount of sample, time-consuming characteristics, and difficulties in the method automation.³

The SPME must also be cited due to its characteristics of simplicity and short analysis times that prevent the tedious sample preparation.¹⁵ When combined with the head space technique the SPME method can eliminate the influence of the sample matrix on the quantitative analysis of solid samples.¹⁶ Esquerro *et al.*, 2004 (ref. 17) reported BTEX extraction by multiple HS-SPME-GC-FID with low limits of detection in soils (LOD between 0.2 and 1.0 ng), but with longer extraction times of up to 30 min. By HS-GC/MS Shin (2012) determined trace levels of BTEX in soil samples with LOD that ranged from 0.08 to 0.09 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with 40 min of heating time.¹⁸

In complex samples such as soils it is really difficult to achieve reproducibility when determining volatile compounds like BTEX which demands intensive optimization studies.¹⁹ In

Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Núcleo de Estudos, Diagnósticos e Intervenções Ambientais, UFSCar, Rod. Washington Luiz km 235, CP 676, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil. E-mail: psfadini@ufscar.br; Fax: +55 16 3351-8065

ANEXO 2 - Transições, voltagens e energias de colisão usadas para a determinação dos metabólitos no espectrômetro de massas.

Compostos	Massa molecular (g/mol)	Modo de ionização	SRM 1	Cone (V)	Energia de Colisão (eV)	SRM 2	Cone (V)	Energia de Colisão (eV)
BSA	208	ES+	209>173	12	12	209>145	12	12
2-metilBSA 3-metilBSA	222	ES-	221>177	34	14	221>105	33	22
2-acidotoluíco 3- acidotoluíco 4-acidotoluíco	136	ES+	137>93	20	12	137>77	20	22
Ácido benzóico	122	ES+	123>79	18	12	-	-	-
BSA-d5	213	ES+	214>177	12	8	214>150	12	16
2-acido toluíco-d6	143	ES+	144>100	14	14	144>80	14	22
Ácido benzóico-d5	127	ES+	128>84	14	10	-	-	-
4-clorobenzoato	156	ES-	155>111	28	12	157>113	28	18

ANEXO 3 – Composição dos meios de cultura dos grupos de bactérias avaliadas.

TABELA A. Composição do meio de cultura Postgate E, para a determinação de BRS.

Reagente	Quantidade	Marca
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Mallinckrodt
NH ₄ Cl	1,0 g	Mallinckrodt
Na ₂ SO ₄	1,0 g	Vetec
CaCl ₂ .6H ₂ O	1,83 g	Vetec
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	Synth
Ácido ascórbico	0,1 g	Sigma-Aldrich
Extrato de levedura	1,0 g	Acumedia
Lactato de sódio (50 % p/v)	7,0 mL	Synth
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	Synth
Resazurina (0,025 % p/v)	4,0 mL	Vetec
Tioglicolato de sódio	0,124 g (*)	Sigma-Aldrich
Água destilada	1000 mL	
pH (após autoclavacão)	7,6	

TABELA B. Composição do meio de cultura caldo de nitrato para a determinação de BRN.

Reagente	Quantidade	Marca
Extrato de carne	3 g	Acumedia
Peptona	5 g	Acumedia
KNO ₃	1 g	Vetec
Água destilada	1000 mL	
Reativo A	5 g	Merck
α-naftilamina em ácido acético 30%		
Reativo B	8g	Sigma-Aldrich
Ácido sulfanílico em ácido acético 30%		

TABELA C. Composição do meio basal em presença de peptona, para a determinação de BRF.

Reagente	Quantidade	Marca
NaHCO ₃	2,5 g	Merck
NH ₄ Cl	1,5 g	Mallinckrodt
NaH ₂ PO ₄	0,6 g	Synth
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,15 g	Vetec
KCl	0,1 g	Synth
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,12 g	Synth
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,005 g	Synth
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001 g	Merck
EDTA férrico, sal sódio/hidrato(C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈)	1,84 g	Vetec
Peptona	1,5 g	Synth
Água destilada	1000 mL	

ANEXO 4 – Cinética de primeira ordem para o tolueno.

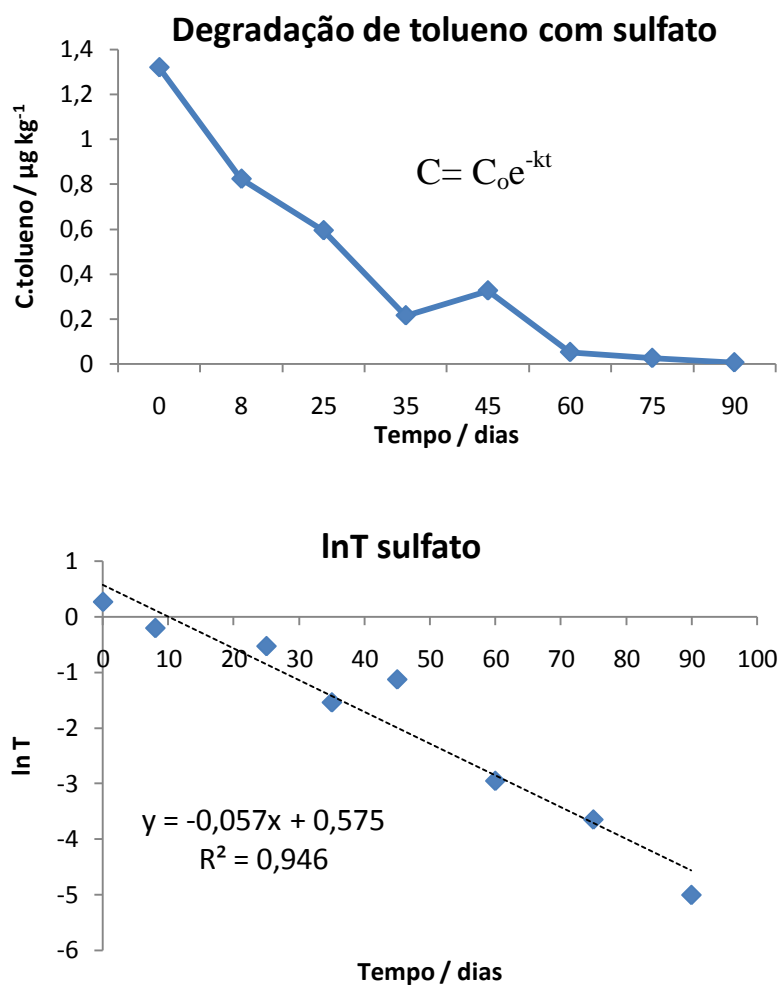
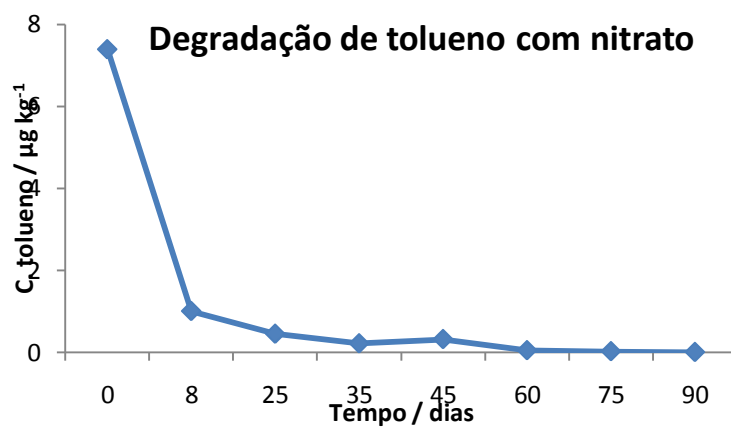


Figura A4.1- Cinética de primeiro ordem do tolueno com o sulfato.



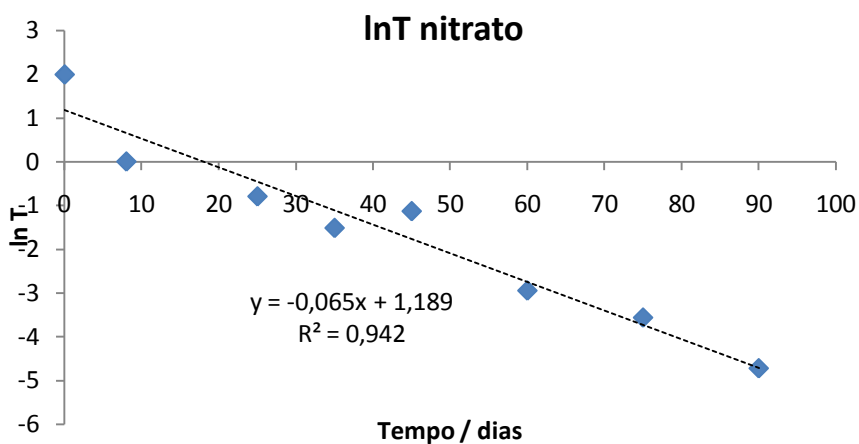


Figura A4.2- Cinética de primeiro ordem do tolueno com o nitrato.

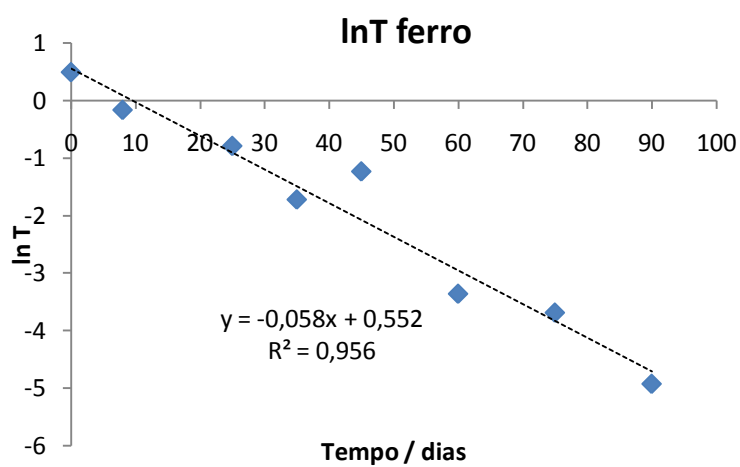
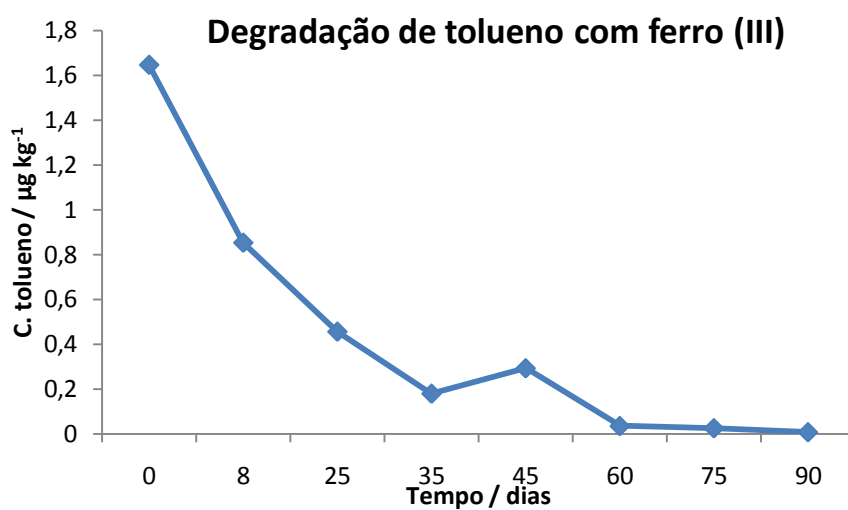


Figura A4.2- Cinética de primeiro ordem do tolueno com o ferro (III).

APÊNDICE

Tabela estatística de probabilidade do número mais provável para três tubos
(BLODGETT, 2010).

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–