Flávia Talarico Saia

**Contribuição à exploração tecnológica dos estudos
microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP:
Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de
pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito
fixo (RAHLF)**

Tese apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Hidráulica e Saneamento

Orientadora. Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

São Carlos

2005

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

S132c

Saia, Flávia Talarico

Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP : avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) / Flávia Talarico Saia. -- São Carlos, 2005.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller.

1. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo.
2. Desalogenação redutiva do PCP. 3. Arquéias metanogênicas halofílicas. 4. Estuário de Santos-São Vicente. 5. DGGE, FISH. 6. Bioremediação anaeróbia.
- I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **FLÁVIA TALARICO SAIA**

Tese defendida e julgada em 01-07-2005 perante a Comissão Julgadora:

Profa. Dra. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Profa. Dra. **VIVIAN HELENA PELLIZARI**
(Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

Dra. **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIĆ**
(Pós-Doutoranda/FAPESP)

Dr. **GILSON PAULO MANFIO**
(Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda.)

Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

*Dedico este trabalho aos meus exemplos de vida
Que tanto me ensinaram e ensinam
O alicerce do meu desenvolvimento*

*Meus pais, Neise e Nicolau
Meu irmão, Fernando
Meus avós, Américo (in memoriam) e Alice Talarico, Geosolmino e
Lydia Saia (in memoriam)
Minha orientadora, Rosana*

Com carinho

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas
inexplicáveis e pessoas incomparáveis (Fernando Pessoa)*

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos meus anjos da guarda, por terem me dado força, saúde, proteção e perseverança para a realização deste trabalho.

À Rosana Filomena Vazoller, por TUDO..... pessoa melhor não teria. Mulher grandiosa, ser humano exemplar e admirável, que com amor, ética, dedicação, amizade, sabedoria, confiança e competência me orientou, me acolheu, me deu segurança, me permitiu voar.... ir além no conhecimento da importante função dos microrganismos anaeróbios do Estuário de Santos-Vicente e sua aplicação nos processos biológicos saneadores, bem como nas outras partes da vida. Muito contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada do fundo do meu coração Super!

Aos meus pais, pois não há pais melhores neste mundo! minha querida mãe Neise e o meu paizão Nicolau, pelo apoio e amor incondicional que dedicaram e dedicam-me durante toda a vida e por me darem coragem e segurança para eu poder caminhar....

Ao meu irmão Fernando, o melhor irmão que alguém podia ter!

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (proc. 00/08323-3) e por financiar várias pesquisas no estado de São Paulo.

A todos os pesquisadores do sub-projeto “Diversidade de Bactérias Associadas à Degradação de Compostos Recalcitrantes” do Projeto Temático BIOTA FAPESP – “Ecologia Molecular e Taxonomia Polifásica de Bactérias de Interesse Ambiental e Agri-Industrial”. No qual a presente tese está inserida, pelo prazeroso aprendizado e convivência, em especial à Cristina Rossi Nakayama, companheira de PCP, estando sempre presente, apesar da distância

À CETESB pela disponibilização do coletor “corer” e aos técnicos Carlos e Osvaldo pela imprescindível ajuda na coleta do sedimento do Estuário de Santos –São Vicente.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento Pavi, Sá, Flávia, André e Wagner pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A todos os professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento pelo valioso aprendizado do mundo do saneamento ambiental. Especialmente à Profa. Dra. Maria Bernadete

Varesche, quem me guiou à Rosana, pela amizade e por estar sempre pronta a ajudar em tudo o que precisei.

Ao Prof. Dr. Eugenio Foresti, pelo carinho e atenção dispensada. Sempre disposto a escutar e a propor soluções para o trabalho.

Ao Sr. Gallo, que com o seu super microscópio e com sua experiência me possibilitou compreender os microrganismos pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Paulo, Júlio e Cidinha do Laboratório de Saneamento por estarem sempre dispostos a ajudar e pela amizade desde os tempos do Mestrado.....

A Profa. Elizabeth de Matos Moraes e Maria Ângela Tallarico Adorno, pessoas adoráveis, pela paciência, carinho, amizade, compreensão, e pelo aprendizado indispensável nas técnicas cromatográficas de determinação de compostos clorofenólicos.

À Dra. Eloiza Pozzi, pelo auxílio na microscopia, sugestões, amizade e carinho dispensado.

À Dra. Márcia Damianovic, iniciadora da pesquisa de degradação anaeróbia de PCP no SHS, muito agradeço pelo apoio, carinho, incentivo, ensinamentos indispensáveis para a finalização deste trabalho e pela “torcida”, sempre!

Ao velho e bom amigo Dr. Eduardo Cattony, pela amizade, sugestões e realização das análises de DGGE. Ao novo e bom amigo Dr. Fábio Chinaglia, que com toda paciência e sabedoria muito me ensinou nos procedimentos de extração e amplificação do DNA, como também pelas conversas, sugestões e pelas revisões nos textos em inglês. À grande amiga Mércia Domingues (Mercinha) pela amizade sincera, conselhos e por me ensinar a técnica FISH.

À toda turma do SHS, especialmente ao pessoal do Laboratório de Processos Biológicos com quem eu convivi durante o trabalho experimental Sávia, Valquíria, Eduardo, Fábio, Tiago, Bruna, Tininha, Sidney, Betão, Arnaldo, Ari, Sandra, Karina, Monique, Estela, Tati Areta, Márcia, Cristina, Gica, Léo, Julia, Fernandão, Douglas, Cáscia, Katt, Luis Hamilton, Dirlane, Gunther, Rogers, Samantha, Nélia, Larissa, Ana Pula Micheleto, Dani, Madalena, Anderson, Alê, Bia, Roberta, Eugênio, Luis Sérgio, Leitão, Gabriel, Glauce, Aline, Pedro, Julia, Isabel e por quem mais eu não lembro, não por falta de importância, mas por falta de memória.....Estas pessoas sempre tiveram algo bom para falar.... a respeito da pesquisa, da vida e assim importantes amizades nasceram

Aos amigos de fé, muito queridos, irmãos e irmãs camaradas, pessoas maravilhosas que eu tive a sorte de encontrar, Lara Steil, Mercinha, Roseli, Maurinha, Fernanda, Rodrigo, Gunther, Paula, e em especial ao grande e querido amigo Renato Siman, pelo carinho, companhia, conselhos e amizade sincera e incondicional.

Aos queridos amigos Dani, Marcus, Rosângela, João Camaroto, Léo, Sidney, Telma, Flavinha, Dú, Katinha, Jacques, Milena, Mirella, Livia, Liza, Renata, Tereza, Jú, por fazerem parte da minha vida.

À minha grande e querida família, aos tios, tias, primos, primas, avós,..... sempre

A todos que passaram pela minha vida e que contribuíram de alguma forma para eu estar vivendo este lindo momento!

MUITO OBRIGADA

Flávia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1. Síntese, identificação e características físicas, químicas e organolépticas do pentaclorofenol – PCP	7
3.2. Degradação de compostos orgânicos halogenados	8
3.2.1. Biodegradação anaeróbia de compostos orgânicos halogenados – a desalogenação redutiva	9
3.2.2. Halorespiração – microrganismos envolvidos e aspectos metabólicos	12
3.3. Biodegradação anaeróbia do PCP	18
3.3.1. Biotransformação do PCP	18
3.3.2. Reatores utilizados na biodegradação anaeróbia do PCP	20
3.4. Determinação analítica de clorofenóis por cromatografia gasosa	25
3.5. Técnicas da biologia molecular utilizadas no estudo da diversidade de microrganismos	35
3.5.1. Considerações gerais	35
3.5.2. A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	36
3.5.3. Hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Procedimentos para preparação e armazenamento de amostras	48
4.2. Descrição dos pontos e coleta das amostras de sedimento do Estuário de Santos- São Vicente	53
4.3. Testes para estabelecimento do protocolo de determinação cromatográfica de clorofenóis no sedimento e na amostra líquida	58
4.3.1. Recuperação dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento compostas do Estuário de Santos-São Vicente – coleta 1	58
4.3.2. Recuperação dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento do Largo do Caneus e da Cosipa – coleta 2.	60
4.3.3. Recuperação dos clorofenóis extraídos de amostra líquida – meio de cultivo salino	61
4.4. Ensaio microbiológicos	62
4.5. Descrição dos reatores	63
4.5.1. Reatores semi-contínuos	63
4.5.2. Reator contínuo do tipo RAHLF	64
4.6. Meios de cultivo, procedimentos de inoculação e operação	65
4.6.1. Meios de cultivo e condições nutricionais	65
4.6.2. Procedimentos de inoculação	67
4.6.3. Operação dos frascos reatores	69
4.7. Parâmetros e métodos de análise	73
4.8. Análises Microbiológicas	76
4.8.1. Exames de microscopia óptica	76
4.8.2. Exames de microscopia eletrônica de varredura	76
4.8.3. Coloração de Gram	76
4.8.4. Hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	76
4.8.5. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	82

4.9. Ensaios de adsorção de PCP na espuma de poliuretana do RAHLF	87
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.1. ETAPA 1: Análises Cromatográficas – Protocolos Testados	89
5.1.1. Escolha do melhor veículo de dissolução de PCP e agente derivatizante	89
5.2. Determinação de PCP nas amostras de sedimento das coletas 1 e 2	91
5.2.1. Amostras compostas de sedimento da coleta 1	91
5.2.1.1 Ensaios para verificar a perda de PCP em amostras submetidas à secagem e à centrifugação, com e sem a adição de sulfato de sódio anidro	91
5.2.1.2. Análise das curvas de calibração e da recuperação dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento	92
5.2.2. Extração de PCP e congêneres em amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa	98
5.3. Implementação de metodologia analítica para a determinação de PCP e seus congêneres em matriz líquida	100
5.3.1. Análise de clorofenóis por cromatografia gasosa sem derivatização	100
5.3.2. Determinação de clorofenóis no meio de cultivo Zinder salino a 2%	100
5.3.2.1. Análise da recuperação dos clorofenóis extraídos do meio cultura	100
5.4. ETAPA 2. Isolamento e caracterização de culturas de bactérias e arqueias metanogênicas crescidas na presença e na ausência de PCP	106
5.4.1. Enriquecimento das amostras compostas de sedimento da região estuarina do Porto de Santos-São Vicente : Enriquecimento 1	106
5.4.2. Isolamento e caracterização de culturas	109
5.4.2.1. Resposta de culturas microbianas em meio de cultivo na presença e ausência de PCP	109
5.4.2.2 Ensaios fisiológicos e caracterização filogenética das culturas de arqueias metanogênicas e de bactérias cultivadas na ausência de PCP	111
5.5. ETAPA 3. Enriquecimento das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa – Enriquecimento 2	131
5.5.1. Coleta das amostras e resultados dos fatores abióticos no Largo do Canéus e na Cosipa	132
5.5.2. Enriquecimento 2 das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa	134
5.6. ETAPA 4. Biodegradação do PCP no reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)	149
5.6.1. Enriquecimento das amostras de sedimento da Cosipa com vistas à inoculação do RAHLF	150
5.6.2. Inoculação e operação do RAHLF	152
5.6.2.1. Inoculação do RAHLF	152
5.6.2. Avaliação do desempenho do RAHLF	156
5.6.3. Variação espacial dos valores de PCP, DQO e ácidos orgânicos ao longo do reator para cada concentração de PCP aplicada	162
5.6.4. Análise das características morfológicas dos microrganismos presentes no RAHLF	169
5.6.5. Análise da diversidade da comunidade microbiana durante a operação do RAHLF	175
5.6.6. Crescimento da biomassa e análise da adsorção do PCP na espuma de poliuretana no RAHLF	181
5.6.7. Considerações do Experimento com o RAHLF com e sem adição do PCP	182
6. CONCLUSÕES	186
8. RECOMENDAÇÕES	189
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191

FIGURAS

Figura 1. Modelo de sistema respiratório da <i>Dehalobacter restrictus</i> , Hy= hidrogenase, ETS = sistema de transferência de elétrons, PCER = redutase tetracloroetileno, PCE = tetracloroetileno, cis-1,2 DCE = cis-1,2 dicloroetileno.	13
Figura 2. Modelo da desalogenação redutiva anaeróbia do PCP (Madsen & Aamand, 1990) e degradação do fenol pela rota do ácido benzóico ou p-carboxilação do fenol (Londry & Fedorak, 1992)	19
Figura 3. Esquema simplificado da conversão do benzoato a metano em ambientes anaeróbios (Fang et al., 1997)	20
Figura 4. Representação esquemática do DGGE. Os ácidos nucleicos são extraídos da amostra e os genes para DNAr 16S são amplificados por PCR	37
Figura 5. Processo de hibridização in situ: fixação, hibridização, lavagem e detecção (Abe, 1998 apud Dominges, 2001)	41
Figura 6. Esquema geral da proposta de trabalho.	47
Figura 6.1. Localização dos pontos de amostragem no estuário de Santos – São Vicente (SP)	53
Figura 6.2. As fotos mostram: a) amostrador tipo “corer” utilizado para a coleta das amostras de sedimento	57
Figura 6.3. Fluxograma geral da metodologia aplicada ao sedimento acidificado, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica	59
Figura 6.4. Fluxograma geral da metodologia aplicada aos sedimentos, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica	61
Figura 6.5. Fotos dos reatores utilizados nos enriquecimentos.	63
Figura 6.5.1. Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)	64
Figura 6.6. Ilustração do frasco utilizado na inoculação e alimentação do RAHLF	65
Figura 6.7. Esquema da técnica de diluição decimal seriada.	68
Figura 6.8. Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridização in situ.	80
Figura 7. Representação esquemática das curvas de calibração de cada clorofenol.	93
Figura 7.1. Representação esquemática dos valores de recuperação da extração de clorofenóis das amostras de sedimento da região estuarina da Baixada Santista, dopadas com 10, 50 e 200 µg clorofenóis/ Kg de sedimento	96
Figura 7.2. Eficiências de extração de PCP e intermediários clorados das amostras de sedimento do Largo do Canéus)a) e da Cosipa (b), para cada tempo de extração	98
Figura 7.3. Representação esquemática dos valores de recuperação dos clorofenóis na matriz líquida pelos testes de extração estudados	102
Figura 8. Produção do gás metano (%) em cada frasco reator em função do período de incubação	107
Figura 8.1. Morfologias predominantes nos frascos reinoculados contendo meio de cultivo para arqueias e bactéria na presença de PCP, após 145 dias de incubação.	109
Figura 8.2. Morfologias predominantes nos frascos Repique 2 contendo meio de cultivo para arqueias e bactéria na presença de PCP, após 145 dias de incubação.	110
Figura 8.3. Fotos dos géis de agarose 1% ilustrando a extração de DNA (a) e os produtos de PCR (b-d) das culturas de arqueias metanogênicas e bactérias do sedimento do estuário de Santos-São Vicente.	112
Figura 8.4. Fotos dos géis de DGGE das culturas de arqueias metanogênicas e bactérias do sedimento do estuário de Santos-São Vicente.	113

Figura 8.5. Morfologias observadas na cultura de arqueia metanogênica cultivada em meio com acetato de sódio.	117
Figura 8.6. Hibridização com a sonda ARC915 da cultura cultivada em acetato de sódio.	118
Figura 8.7. Hibridização com a sonda MS821 da cultura de arqueia metanogênica cultivada em acetato de sódio	119
Figura 8.8. Morfologias observadas na cultura de arqueia metanogênica cultivada em meio com metanol	123
Figura 8.9. Hibridização com a sonda MS821 da cultura de arquea metanogênica cultivada em metanol	124
Figura 8.10. Morfologias observadas na cultura de arqueia metanogênica cultivada em meio com formiato de sódio com vancomicina	126
Figura 8.11. Hibridização dupla com as sondas MB1174+MB310 da cultura cultivada em formiato de sódio	127
Figura 8.12. Morfologias observadas no meio de cultivo com lactato de sódio	129
Figura 8.13. Hibridização com as sondas MS821 e ARC915 da cultura cultivada em lactato de sódio	130
Figura 9.1. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás e na concentração de PCP nas réplicas dos reatores Canéus com PCP	135
Figura 9.2. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás e na concentração de PCP nas réplicas dos reatores Cosipa com PCP	136
Figura 9.3. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás e na concentração de PCP nas réplicas 2 dos reatores controle Canéus (a) e Cosipa (b).	137
Figura 9.4. Variação na concentração de PCP nos frascos reatores Canéus e Cosipa (a) controles negativos e (b) controles abióticos	140
Figura 9.5. Variação temporal na concentração de glicose nas réplicas dos reatores Canéus e Cosipa PCP e réplicas 2 dos reatores controles após a adição de PCP.	140
Figura 9.6. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás das réplicas 1 dos reatores controles Canéus e Cosipa. Canéus C1 (a) e Cosipa C1 (b).	141
Figura 9.7. Morfologias predominantes nas réplicas nos reatores Canéus com PCP observadas em microscopia de contraste de fase	145
Figura 9.8. Morfologias predominantes nos reatores Cosipa com PCP, observadas em microscopia de contraste de fase	146
Figura 10. Produção do gás metano (%) no biogás em cada frasco reator em função do tempo de incubação.	150
Figura 10.1. Morfologias predominantes na réplica 1 do reator Cosipa observadas em microscopia de contraste de fase	152
Figura 10.2. Aspecto do RAHLF após a inoculação demonstrando maior colonização no início do reator	153
Figura 10.3. microscopia de contraste de fase do biofilme do RAHLF imediatamente após a inoculação	154
Figura 10.4. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF imediatamente após a inoculação	155
Figura 10.5. Concentrações iniciais de DQO e glicose no frasco de alimentação (a) e variação temporal da concentração de DQO afluente e efluente (b).	157
Figura 10.6. Variação temporal da concentração de PCP e DQO efluente (a) e da eficiência de remoção de PCP e DQO (b).	158
Figura 10.7. Variação temporal da concentração de alcalinidade e ácidos voláteis do efluente	161
Figura 10.8. Variação temporal na porcentagem (a) e concentração (b) de metano no biogás do reator	161
Figura 10.9. Representação esquemática da variação espacial na massa de PCP adsorvida na biopartícula em cada seção do reator para cada concentração de PCP aplicada	163

Figura 10.10. Representação esquemática da variação espacial no fator de resposta de clorofenóis adsorvidos na biopartícula em cada seção do reator para as concentrações aplicadas de PCP iguais a 5mg/L (a) e 13 mg/L (b)	164
Figura 10.11. Representação esquemática da variação espacial no fator de resposta de clorofenóis adsorvidos na biopartícula em cada seção do reator para as concentrações aplicadas de PCP iguais a 15mg/L (a) e 21 mg/L (b)	165
Figura 10.12. Representação esquemática da variação espacial na concentração de PCP para cada concentração de PCP afluyente aplicada	166
Figura 10.13. Representação gráfica da variação espacial na concentração da DQO para cada concentração de PCP afluyente aplicada	167
Figura 10.14. Representação gráfica da variação espacial na concentração de ácidos voláteis para cada concentração de PCP afluyente aplicada	169
Figura 11. Microscopia de contraste de fase do biofilme do RAHLF na ausência (a-b) e presença (c-j). Aumento de 1500x.	173
Figura 11.1. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF durante a adição de PCP. Aumento de 5000x.	175
Figura 11.2. Fotografias de eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de DNA das amostras do RAHLF em cada seção do reator (L/D) para todas as concentrações de PCP.	175
Figura 11.3. Fotografias do gel de agarose a 1% com amostras do RAHLF e do enriquecimento (Enr) dos produtos de PCR com primers dos Domínios Bacteria e Archaea	176
Figura 11.4. Fotografias dos resultados das análises de DGGE dos fragmentos do produto de PCR amplificados com primers dos Domínios Archaea (a;b) e Bacteria (c;d).	177

ANEXOS

Figura 1A. Fluxograma geral da metodologia aplicada ao sedimento alcalinizado, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica.	
Figura 2A. Fluxograma geral da metodologia aplicada ao sedimento alcalinizado/acidificado, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica.	
Figura D2. Cromatograma obtido durante a avaliação da coluna cromatográfica HP1.	
Figura D3. Cromatograma obtido durante a avaliação da coluna cromatográfica HP17	
Figura D4. Cromatograma obtido durante a avaliação da coluna cromatográfica HP608.	
Figura E.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis – baixas concentrações	xxvi
Figura E.2. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis – altas concentrações	xxvii
Figura E.3. Cromatograma obtido da solução padrão de clorofenóis acetilados	
Figura F.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis	xlii
Figura G.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis	lv
Figura H.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis	lxx

TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas do PCP	8
Tabela 2. Mecanismos envolvidos nas reações de desalogenação redutiva em ambientes anaeróbios	10
Tabela 3. Microrganismos envolvidos nas rotas de desalogenação redutiva	12
Tabela 4. Culturas puras capazes de realizar a halorespiração de vários compostos organoclorados	15
Tabela 5. Energia da degradação anaeróbia de alguns compostos organoclorados	19
Tabela 6. Reatores anaeróbios de fluxo contínuo utilizados na biodegradação do PCP	23
Tabela 7. Composição dos meios de cultivo Zinder modificado para salino e Biota	49
Tabela 7.1. Composição da solução de vitaminas	50
Tabela 7.2. Composição da solução traço de metais 1	50
Tabela 7.3. Composição da solução traço de metais Biota	51
Tabela 7.4. Descrição das soluções estoques das fontes orgânicas	52
Tabela 7.5. Descrição dos pontos de amostragem no Estuário de Santos-São Vicente	54
Tabela 7.6. Descrição dos testes de recuperação dos clorofenóis extraídos do meio de cultivo	62
Tabela 7.7. Composição final dos meios de cultivo utilizados nos enriquecimentos e no RAHLF	66
Tabela 7.8. Carga Orgânica Volumétrica (COV) de DQO e PCP aplicada no reator durante a operação do sistema	72
Tabela 7.9. Parâmetros monitorados em cada ensaio experimental	73
Tabela 7.10. Sondas utilizadas para as análises de FISH	77
Tabela 7.11. Características relevantes das sondas	77
Tabela 7.12. Corante e concentração final de cada sonda	78
Tabela 7.13. Protocolos de hibridização e lavagem das amostras	81
Tabela 7.14. <i>Primers</i> dos Domínios Archaea e Bacteria utilizados nas reações de PCR das amostras das culturas e do RAHLF	83
Tabela 7.15. Diluições de DNA utilizadas na mistura de reação: volumes para as reações de PCR das amostras do RAHLF para os <i>primers</i> dos Domínios Archaea e Bacteria	84
Tabela 7.16. Programas de amplificação por PCR para os <i>primers</i> dos Domínios Bacteria e Archaea	85
Tabela 8. Valores médios, de desvio padrão e de coeficiente de variação das áreas das soluções de PCP em K ₂ CO ₃ 3% e em Na ₂ CO ₃ 3%, empregando-se 100 e 200 µL de anidrido acético	89
Tabela 8.1. Valores médios, de desvio padrão e de coeficiente de variação dos fatores de resposta obtidos dos cromatogramas das soluções de PCP em K ₂ CO ₃ 3% acetiladas com 200 µL de anidrido acético e metiladas com 1mL de diazometano	90
Tabela 8.2. Valores médios, de desvio padrão e de coeficiente de variação dos fatores de resposta obtidos dos cromatogramas das soluções de PCP em NaOH 0,2M, e K ₂ CO ₃ 3% metiladas	90
Tabela 8.3. Valores dos fatores de resposta dos sedimentos dopados e sem adição de sulfato de sódio	91
Tabela 8.4. Valores dos fatores de resposta dos sedimentos dopados e com adição de sulfato de sódio	91
Tabela 8.5. Valores das concentrações teóricas e absolutas dos clorofenóis na solução padrão, calculadas a partir das equações da curva de calibração	94

Tabela 8.6. Valores das médias, dos desvios-padrão (DP) e dos coeficientes de variação (CV) dos fatores de respostas (FR) das réplicas das amostras de sedimento	95
Tabela 8.7. Comparação entre as concentrações absolutas dos clorofenóis na matriz dopada, calculadas a partir das equações da curva de calibração (Figura 7) e as concentrações teóricas	95
Tabela 8.8. Resultados da recuperação (%) do método de extração dos clorofenóis das amostras de sedimento dacoleta 1, dopadas com 10, 50 e 200 µg/L de clorofenóis	96
Tabela 8.9. Resultados da recuperação (%) da extração do padrão interno das amostras de sedimento coleta 1	97
Tabela 8.10. Recuperação (%) para cada tempo de extração dos analitos extraídos das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa dopadas com 5mg clorofenóis/Kg sedimento	99
Tabela 8.11. Valores das recuperações (%) dos clorofenóis extraídos das amostras do meio de cultura pelos testes 1 a 4	101
Tabela 8.12. Valores de recuperação (%) do padrão interno, obtidos nos métodos de extração das amostras do meio de cultura dopadas com clorofenóis.	103
Tabela 8.13. Valores dos fatores de resposta obtidos com solução de clorofenóis de 25 µg/L, com o processo de acetilação e extração realizadas juntas por tempos de reação de 1, 2 e 3 minutos.	104
Tabela 8.14. Comparação dos protocolos de extração e derivatização do PCP de matriz líquida	105
Tabela 9. Procedimentos de operação dos frascos reatores apresentados na Figura 8	107
Tabela 9.1. Valores das concentrações de ácidos orgânicos voláteis em cada frasco reator ao longo do tempo de incubação	108
Tabela 9.2. Resumo dos resultados da técnica FISH, a partir das culturas da região do estuário de Santos-São Vicente	115
Tabela 10. Valores dos parâmetros abióticos determinados no ponto de coleta da Cosipa	132
Tabela 10.1. Valores dos parâmetros abióticos determinados no ponto de coleta do Largo dos Canéus	133
Tabela 10.2. Valores de remoção (%) de PCP por período de cada realimentação	138
Tabela 10.3. Valores da velocidade de consumo de PCP por período de cada realimentação para os reatores	138
Tabela 10.4. Concentrações mínimas e máximas dos ácidos nos frascos reatores Canéus e Cosipa durante os períodos de realimentação	139
Tabela 10.5. Valores de metano no biogás em porcentagem e concentrações mínimas e máximas de PCP nos frascos reatores Canéus e Cosipa durante os períodos de realimentação	139
Tabela 10.6. Valores das concentrações máximas e mínimas dos ácidos orgânicos, determinados entre as realimentações das réplicas 1 dos reatores controle positivo Canéus e Cosipa.	141
Tabela 11. Valores do conteúdo do SSV no frasco de inoculação no início e final da inoculação do RAHLF	153
Tabela 11.1 Valores das concentrações médias de PCP afluente, DQO afluente e efluente, com desvio padrão e número de amostras, durante o período de operação	156
Tabela 11.2. Valores médios de DQO afluente e efluente; valores mínimos e máximos de eficiência das reduções da DQO e do PCP; concentrações de alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis, como ácido acético, durante cada período de adição do PCP	159
Tabela 11.3. Valores mínimos e máximos do metano no biogás, em cada ponto de	159

amostragem durante cada período de adição de PCP	
Tabela 11.4. Valores da variação espacial na concentração de PCP para cada concentração de PCP afluyente aplicada	166
Tabela 11.5. Variação espacial na concentração da DQO para cada concentração de PCP afluyente aplicada	167
Tabela 12. Freqüência das morfologias celulares observadas sob contraste de fase e fluorescência durante o período operacional do RAHLF	171
Tabela 12.1. Valores para avaliação da massa de lodo imobilizado presente no RAHLF e da massa total de PCP adsorvida no final de operação	181
Tabela 12.2. Valores da massa de lodo biológico imobilizado no RAHLF no final de operação	181

ANEXOS

ANEXO A

Tabela A1. Réplicas das áreas das soluções de PCP em Na ₂ CO ₃ 3%. Derivatização com 100 µL de anidrido acético.	i
Tabela A2. Réplicas das áreas das soluções de PCP em K ₂ CO ₃ 3%. Derivatização com 100 µL de anidrido acético.	i
Tabela A3. Réplicas das áreas das soluções de PCP em K ₂ CO ₃ 3%. Derivatização com 200 µL de anidrido acético	i
Tabela A4. Réplicas das áreas das soluções de PCP em Na ₂ CO ₃ 3%. Derivatização com 200 µL de anidrido acético	i
Tabela A5. Tempos de retenção e áreas do PCP e do 2,4DBP em solução aquosa de K ₂ CO ₃ 3%, utilizados nos cálculo dos fatores de resposta do PCP. Derivatização com 200 µL de anidrido acético	ii
Tabela A6. Tempos de retenção e áreas do PCP e do 2,4DBP em solução aquosa de K ₂ CO ₃ 3%, utilizados nos cálculo dos fatores de resposta do PCP das amostras metiladas	ii
Tabela A7. Áreas do PCP e do 2,4DBP em solução aquosa de NaOH 0,2M, utilizadas nos cálculo dos fatores de resposta do PCP das amostras metiladas	iii

ANEXO B

Tabela B1. Cálculos dos fatores de resposta para as amostras de sedimento acidificado seco na estufa e centrifugado, com e sem sulfato de sódio anidro.	iv
Tabela B2. Cálculos dos fatores de resposta para as amostras de sedimento alcalinizado seco na estufa e centrifugado e sem sulfato de sódio anidro.	v
Tabela B3. Cálculos dos fatores de resposta para as amostras de sedimento alcalinizado/acidificado seco na estufa e centrifugado, com e sem sulfato de sódio anidro.	v

ANEXO C

Tabela C1. Valores de Q, das médias, dos desvios-padrão (DP) e dos coeficientes de variação (CV) dos fatores de respostas (FR) das réplicas das soluções padrão.	vi
Tabelas C1.1. a C1.6. Cálculo da média, desvio padrão, coeficiente de variação e Q dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários derivatizadas com diazometano e utilizadas para a elaboração da curva de calibração. Os valores em negrito foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q	vii
Tabelas C2.1. à C2.6. Cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta dos extratos derivatizados do sedimento dopado com clorofenóis nas concentrações de 10, 50 e 200 µg/L.	xii

Tabela C3.1. Eficiência de extração de PCP e congêneres nas amostras de sedimento do Largo do Caneus para os tempos de extração de 3,5, 10 e 20 minutos.	xv
Tabela C.3.2. Quantidade (mg/l) de clorofenóis remanescentes na água das amostras dopadas de sedimento do Largo do Caneus, após 12 horas de adsorção.	xvi
Tabela C.3.3. Eficiência de extração de PCP e congêneres nas amostras de sedimento da Cosipa para os tempos de extração de 3, 5, 10 e 20 minutos.	xvi
Tabela C.34. Quantidade (mg/l) de clorofenóis remanescentes na água das amostras dopadas de sedimento do Largo do Caneus, após 12 horas de adsorção.	xvii

ANEXO D

Tabela D1. Condições cromatográficas utilizadas para cada coluna testada.

ANEXO E

Tabelas E.1. a E.9. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.	xviii
Tabela E.10. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das Figuras E.1 e E.2	xxviii
Tabela E.11 a E.13. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada.	xix
Tabela E.14. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta das Figuras B.1 e B.2.	xxxix
Tabela E.15. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela e.10.) e da matriz dopada (Tabela E.14)	xxxix

ANEXO F

Tabelas F.1. a F.9. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.	xxxix
Tabela F.10. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das retas da Figura F.1.	xl
Tabela F.11 a F.13. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada	xli
Tabela F.14. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta da Figura F.1.	xlii
Tabela F.15. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela F.10.) e da matriz dopada (Tabela F.14)	xliii

ANEXO G

Tabelas G.1. a G.7. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração	xliii
Tabela G.8. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das retas da Figura G.1.	lvi
Tabela G.9. a G.11. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada	lvii
Tabela G.12. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta da Figura G.1.	lix
Tabela G.13. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela G.8.) e da matriz dopada (Tabela G.12.)	lx

ANEXO H

Tabelas H.1. a H.8. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.	lxi
Tabela H.9. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das retas da Figura H.1.	lxxi

Tabelas H.10. a H.12. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada	lxxii
Tabela H.13. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta da Figura H.1.	lxxiv
Tabela H.14. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela H.9.) e da matriz dopada (Tabela H.13.)	lxxv

ANEXO I

Tabela I1. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus PCP 1. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxvi
Tabela I2. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus PCP2. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxvii
Tabela I3. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus C 2. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxix
Tabela I4. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus C1. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxx
Tabela I5. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa PCP 1. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxxii
Tabela I6. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa PCP 2. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxxiii
Tabela I7. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa C2. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxxiv
Tabela I8. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa C1. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxxvi
Tabela I9. Variação temporal nas concentrações de pentaclorofenol (mg/L) nos reatores Caneus. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxxxvii
Tabela I10. Variação temporal nas concentrações de pentaclorofenol (mg/L) nos reatores Cosipa. As colunas em amarelo referem-se à realimentações	lxviii

ANEXO J

Tabela J1. Quantificação da massa de PCP adsorvida na biopartícula (mgPCP/gbiopartícula) do reator para cada concentração de PCP aplicada.	xc
Tabela J2. Massa de Sólidos Totais (ST) e Sólidos Totais Voláteis (STV) retidos na espuma no final de operação do reator	xc

RESUMO

SAIA, F.T. (2005). Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Tese (Doutorado) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

O estudo que ora se apresenta integrou o conjunto de pesquisas do sub-projeto “Diversidade de Bactérias Associadas à Degradação de Compostos Recalcitrantes”, do Projeto Temático BIOTA FAPESP – “Ecologia Molecular e Taxonomia Polifásica de Bactérias de Interesse Ambiental e Agro-Industrial”. Apresenta caráter inovador, na medida em que procurou avaliar o potencial de aplicação biotecnológica de microrganismos anaeróbios de uma área severamente contaminada no Brasil, o Estuário de Santos-São Vicente, em degradar o Pentaclorofenol (PCP). A pergunta fundamental a ser respondida pelos resultados experimentais realizados foi: *são os microrganismos autóctones do estuário capazes de servirem de inóculo para degradar o pentaclorofenol em biorreatores sob condições metanogênicas?* Dois grupos de amostras foram avaliados, o primeiro, uma parcela composta por vários sedimentos coletados no estuário e, o segundo, sedimentos coletados na região do Largo de Canéus e na frente da Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA).

O estabelecimento da determinação cromatográfica do PCP e congêneres menos clorados para o monitoramento experimental mostrou que na análise da presença dos clorofenóis nos sedimentos, o método de extração por ultrassom com posterior metilação dos analitos foi adequado para concentração mínima de 200 µg clorofenóis/Kg sedimento para 2,3; 2,6 diclorofenóis; 2,4,6 e 2,3,6 triclorofenóis. Contudo, não foi adequado para a determinação do PCP e 2,3,4 triclorofenol. Para o meio de cultivo, o método de extração do PCP por agitação em vórtex e acetilação dos analitos mostrou-se adequado para todos os clorofenóis e com limite de quantificação de 0,1mg/L.

A avaliação do potencial metanogênico foi realizada com as amostras compostas do estuário enriquecidas sob condições halofílicas. O valor estável de metano no biogás de 50% foi obtido nos primeiros 20 dias de incubação. O sedimento nessas condições foi utilizado como inóculo para fins de isolamento de culturas metanogênicas, redutoras do íon sulfato e degradadoras de PCP. Não foram obtidas culturas desalogenadoras; porém foram isoladas arqueias metanogênicas, cultivadas em metanol, acetato e formiato de sódio, bem como bactérias cultivadas em lactato de sódio na presença e ausência de sulfato de sódio. Ensaio fisiológicos aliados aos métodos moleculares FISH e DGGE permitiram identificar arqueias metanogênicas do gênero *Methanosarcina* sp. e microrganismos do Domínio *Bacteria*.

Os sedimentos individualmente estudados foram coletados com maior controle da anaerobiose empregando-se amostrador do tipo corer. O enriquecimento destes sedimentos, inicialmente sob concentração de 2,5mgPCP/gSTV e com adições periódicas de 50% da concentração inicial do clorofenol e 1,25 a 2,5g/L de glicose por 13 meses a 30°C, resultou na obtenção de culturas degradadoras do PCP sob anaerobiose estrita. Nos reatores controles sem PCP, já primeiros 20 dias de incubação 70% de metano foi determinado no biogás. Nos reatores com PCP, a produção do metano (20%) iniciou após 100 dias. A adsorção foi o principal mecanismo de remoção de 50% do PCP nas primeiras 12 horas de incubação dos enriquecimentos. Posteriormente, a redução do PCP no meio de 77% para a amostra de Canéus e 70% para a da COSIPA foi relacionada a mecanismos de biodegradação anaeróbia, como a desalogenação redutiva. Exames microscópicos mostraram a seleção de microrganismos na presença de PCP, com predomínio de bacilos formadores de esporos semelhantes ao gênero *Clostridium* sp., filamentos diversos e filamentos semelhantes as arqueias metanogênicas acetoclásticas relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp. O enriquecimento foi realizado sob condições halofílicas, segundo a salinidade de cada amostra estudada do estuário. Não houve perda do clorofenol por volatilização.

Os resultados obtidos no enriquecimento anterior viabilizaram o estudo seguro do potencial anaeróbio dos microrganismos oriundos do sedimento da COSIPA em metabolizar o PCP em reator contínuo do tipo RAHLF. Assim, sedimento enriquecido sob condições metanogênicas e halofílicas foi inoculado no RAHLF, controlando-se rigorosamente a anaerobiose. O reator preenchido com cubos de espuma de poliuretano foi operado por 126 dias e tempo de detenção hidráulica de 18 horas, com meio de cultura salino contendo glicose (1g/L) como principal fonte de carbono e PCP-Na nas concentrações de 5, 13, 15 e 21 mg/L. O desempenho do RAHLF foi estável com boa eficiência durante toda a operação. A redução dos níveis de matéria orgânica medida em DQO variou de 70 a 100% e a de PCP foi de 99%, com detecção de intermediários menos clorados e sob teores de metano no biogás de 20%. Da massa de

1111,73 mg de PCP aplicada no reator, 286,9mg ficou retida no sistema pelo processo de adsorção nas biopartículas e 824,83 mg foi biodegradada. As análises morfológicas dos tipos celulares, em conjunto com as técnicas moleculares DGGE e FISH, revelaram a presença de grupos microbianos do Domínio *Archaea* pertencente à família *Methanosarcinacea* e grupos do Domínio *Bacteria*. A participação de grupos do Domínio *Bacteria*, cuja estrutura dos tipos microbianos na comunidade variou ao longo do RAHLF e das concentrações de PCP, e dos organismos metanogênicos da Família *Methanosarcinaceae*, possibilitou responder a questão inicialmente formulada, uma vez que se pode afirmar que os microrganismos autóctones foram capazes de degradar o PCP sob condições metanogênicas e halofílicas, com eficiência adequada. A prática para a seleção dos microrganismos retirados do ambiente estuarino, de interesse para biotecnologia anaeróbia aplicada ao saneamento ambiental, que empregou o reator do tipo RAHLF, parece promissora para avanços da engenharia na remediação biológica de uma área cuja relevância é indiscutível para o Estado de São Paulo.

Palavras-chave: reator RAHLF, desalogenação redutiva do PCP, condições metanogênicas e halofílicas, Estuário de Santos-São Vicente, bioremediação

ABSTRACT

SAIA, F.T. (2005). Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Tese (Doutorado) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

This study has an innovative character, once aimed to evaluate the biotechnological application of anaerobic microorganisms degrading pentachlorophenol (PCP) at a severely polluted area in Brazil, Estuary of Santos-São Vicente-São Paulo State. This study integrated a group of researches of the sub-project "Diversity of Bacteria Associated to the Degradation of Recalcitrant Compounds", supported by major Project BIOTA FAPESP which theme is "Molecular Ecology and Polyphasic Taxonomy of Bacteria of Environmental and Agriculture-Industrial Interest. The fundamental question to be answered by the accomplished experimental results was: "Are the autochthonous microorganisms of the estuary capable of serving as inoculum to degrade the PCP in bioreactors under methanogenic conditions? In order to evaluate this hypothesis, two groups of samples were collected: sediments taken from several sites of the Estuary and sediments taken from two sites, one severely contaminated with organochlorine compounds, in front of the São Paulo Metallurgical Company (Cosipa) and other, less contaminated, in the area of Canéus.

The establishment of protocol for the PCP and less chlorinated compounds chromatographic determination showed that the extraction method by ultrasonication followed by metilation of the chlorinated compounds was appropriated to evaluate concentrations of 200 ug chlorophenols/Kg of sediment, 2,3; 2,6 dichlorophenols; 2,4,6 and 2,3,6 trichlorophenols. However, it was not appropriated for evaluation of PCP and 2,3,4 trichlorophenol. For the culture medium, the extraction method by vortex agitation followed by acetilation was appropriated for all of the chlorophenols compounds. The quantification limit was 0,1mg/L

The evaluation of the methanogenic potential and PCP biodegradation was accomplished with the samples of the estuary enriched under halophylic conditions. In the experiments without PCP was possible to obtain cultures of *Methanosarcina* sp, identified by FISH technique and cells of Domain *Bacteria*, identified by DGGE. In the experiment with PCP dehalogenated cultures were not obtained.

To evaluate PCP anaerobic biodegradation by sediments of Cosipa and Caneus sites, sediments collected under anaerobic conditions by a corer device were enriched in a halophylic brine medium with glucose and PCP at concentration of 2.5mgPCP/gVTS. Periodic additions of 50% of the initial concentration of PCP and 1.25 to 2.5g/L of glucose were done. With this strategy was possible to obtain PCP dehalogenated cultures. The adsorption was the main mechanism of 50% of PCP removal in the first 12 hours of incubation. The PCP reduction of 77% for Caneus reactor and 70% for Cosipa reactor was related to anaerobic biodegradation. Microscopic exams showed selection of microorganisms, with predominance of cells related to *Clostridium* sp., and filaments related to methanogenic acetoclastic archaea *Methanosaeta* sp. Chlorophenols volatilization was not observed.

The biotechnological application of HAIB reactor in PCP biodegradation was evaluated using sediment of Cosipa site previously enriched with glucose. The reactor was operated by 126 days and hydraulic detention time of 18 hours, with saline brine medium containing glucose (1g/L) and NaPCP in concentrations of 5, 13 ,15 and 21 mg/L. PCP amendments did not affect the overall performance and functional stability of the process. COD and PCP reduction was close to 80% and 100%, respectively with detection of trichlorophenols and dichlorophenols. Percentage of methane in the biogas closed to 30%. Adsorption analyses demonstrated that 287mg of PCP was removed by adsorption in the biofilm and 825 mg was removed by biodegradation. Biofilm DGGE-profiling showed the presence of specific bands of *Bacteria* and *Archaea* Domains when PCP was amended. The appearance of new bands of *Bacteria* showed that this organisms had a direct influence at PCP dehalogenation. *Archaea* organisms of *Methanosarcinaceae* family had an indirect influence in this metabolism.

This thesis demonstrated that HAIB reactors, using autochthonous microorganisms under halophylic and methanogenic conditions, are a potential alternative for organochlorines bioremediation.

Keywords. HAIB reactor, PCP reductive dehalogenation, halophylic and methanogenic conditions, Santos-São Vicente Estuary, DGGE, FISH, biorremediation

*Se Sonhar um pouco é perigoso,
a Solução não é Sonhar menos, é sonhar mais
(Marcel Proust)*

1. INTRODUÇÃO

Os compostos halogenados orgânicos, tais como os organoclorados, são utilizados na indústria para a fabricação de inseticidas, herbicidas, fungicidas, plásticos, solventes, desengraxantes e preservantes de madeira. Além disso, podem ser formados como subprodutos nos processos de desinfecção de água que utilizam cloro ou hipoclorito de sódio, bem como durante o branqueamento da polpa de celulose na fabricação do papel, sendo então liberados nas águas residuárias destas indústrias (Flora *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1993; Basu *et al.*, 1996).

Os organoclorados de estrutura química complexa, por exemplo, o pentaclorofenol (PCP) e os bifenilos policlorados (PCBs), apresentam grande resistência à decomposição biótica e abiótica. São compostos de longa persistência no ambiente, elevada toxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e tendência ao acúmulo nas cadeias alimentares (McAllister *et al.*, 1996). O PCP, introduzido no Brasil na década de 30 para a preservação de madeira é um composto tóxico a muitas formas de vida. Nos seres humanos, a exposição aguda pode causar anestesia, hipertemia, sudorese, dispnéia e coma. Os efeitos crônicos são manifestados por irritações na pele, erupções cutâneas, sinusites e doenças oculares. Além disso, o PCP é considerado mutagênico, embriotóxico e fetotóxico (Crosby, 1981; Wild *et al.*, 1992).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), o PCP e 16 outros compostos aromáticos clorados fazem parte da lista dos poluentes quantitativamente mais significativos e potencialmente perigosos.

Embora o uso do PCP sofra restrições em vários países desde a década de 70 (SATO, 1997), a produção mundial do pesticida em 1985 foi estimada em 100.000 toneladas e, em 1996, apenas nos Estados Unidos, a indústria produziu 1,25 milhões de toneladas (McAllister *et al.*, 1996). No Brasil, a utilização deste composto em defensivos agrícolas (agrotóxicos) foi proibida pela Portaria nº 329 do Ministério da Agricultura de 02/09/1985, e seu transporte, estocagem e uso são atividades tidas como potencialmente poluidoras de acordo com a Resolução nº 5 do CONAMA de 20/11/1985 (Damianovic, 1997).

A história da produção do PCP no Brasil revela que em 1962 a indústria Clorogil S.A, localizada na área estuarina do Porto de Santos (Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo), região de Cubatão, passou a produzir esse composto na forma de pentaclorofenato de sódio. A produção da fábrica também incluía outros organoclorados, como o solvente

tetracloreto de carbono, um desengraxante utilizado na indústria metalúrgica para remover graxas e óleos de placas e componentes metálicos. Posteriormente, em 1976, a Clorogil foi incorporada pela Rhodia S.A, e no ano de 1988, por exigência da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB e da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, a empresa instalou um incinerador de alta temperatura (900-1200⁰C) para o tratamento dos resíduos gerados nas unidades de produção. Apesar desse empenho, a unidade fabril da Rhodia S.A. foi interditada em 1994, bem como o incinerador em operação, pois à época constatou-se a contaminação de operários da fábrica por organoclorados, cuja origem incidia nos subprodutos da queima dos resíduos com provável formação de dioxinas (Bonini, 1997 *apud* Nakayama, 1999).

É possível afirmar que a área Estuarina do Porto de Santos, localizada entre o Oceano Atlântico e a Serra do Mar no estado de São Paulo é uma das áreas mais severamente contaminadas no Brasil. A Baixada Santista, na década de 50, passou a integrar o circuito da industrialização pesada, com a implantação da refinaria Presidente Bernardes da Petrobrás, da Companhia Siderúrgica de São Paulo (COSIPA) em 1965 e do complexo de fertilizantes entre 1970 e 1976, em Cubatão. Em 1985, 23 indústrias de grande e médio porte, abrigando 111 fábricas distintas, foram instaladas na região (Cetesb, 1990). A disposição e lançamento pretéritos de resíduos das numerosas indústrias localizadas na região, o recebimento dos cursos d'água que drenam as áreas industriais de Cubatão, as atividades portuárias, do Entrepasto de Pesca, do cais da COSIPA e o da ULTRAFÉRTIL e o lançamento de águas residuárias de origem doméstica carreadas pelos sistemas hídricos continentais da região favoreceram um conjunto de condições deletérias e impactantes ao ambiente estuarino (Cetesb, 2001). No período entre 1966 a 1988, 12 mil toneladas de produtos tóxicos impregnados de compostos organoclorados, sendo o principal deles o PCP, seguido por hexaclorobenzeno, pentaclorobenzeno, hexaclorobutadieno, tetraclorobenzeno e hexacloroetano, foram dispostos pela Rhodia S.A. entre outras indústrias, na área estuarina do Porto de Santos e em localidades próximas da Baixada Santista, sem os cuidados essenciais ao meio ambiente. Em consequência, a avaliação ambiental da região no final da década de 80 identificou quinze áreas contaminadas, sendo seis no município de Cubatão, quatro em Itanhaém e cinco em São Vicente (SÃO PAULO 1985a e 1992a *apud* Matheus, 1997). A Figura 7 (ver Capítulo Material e Métodos) apresenta uma visão geral do estuário de Santos (SP) e os 9 pontos de amostragem utilizados pela Companhia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) no monitoramento da qualidade de vida e dos sistemas hídricos durante os anos 90. A Tabela 7 (ver Capítulo Material e Métodos) apresenta a descrição completa destes pontos de amostragem bem como sua localização georeferenciada.

Apesar do esforço do “Programa de recuperação da qualidade ambiental de Cubatão”, instituído pela Companhia Tecnológica de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

(Cetesb) em meados dos anos 80, compostos tóxicos e recalcitrantes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), metais pesados e outros compostos fenólicos, ainda são encontrados em níveis acima dos limites de toxicidade em amostras de sedimento, coluna d'água e organismos aquáticos, nas várias áreas do estuário (Cetesb, 2001). Apesar do PCP não ter sido detectado em amostras de sedimento nas análises reportadas no relatório da Cetesb (2001), foi em 1990 que concentrações próximas a 35,0µg/kg alertaram problemas de contaminação dos sedimentos da bacia do rio Cubatão por clorofenóis (Cetesb, 1990).

Neste contexto é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas que visem o estudo de tecnologias efetivas para a recuperação das áreas degradadas apontadas, através do biotratamento de efluentes e/ou práticas que envolvam a biorremediação de áreas específicas. Segundo Damianovic, (1997) e Field *et al.* (1995), a degradação natural lenta dos compostos organoclorados xenobióticos sob determinadas condições ambientais, bem como os elevados custos e resultados discutíveis das técnicas de tratamento físico-químicas, têm estimulado o interesse pela pesquisa científica e tecnológica dos processos biológicos mais eficientes na estabilização dos tóxicos clorados. O metabolismo microbiano aeróbio e/ou anaeróbio pode converter os clorados orgânicos em produtos mineralizados a um custo reduzido se comparado com processos abióticos físico-químicos, como “*stripping*” ou dispersão pelo ar, adsorção do composto em carvão, aterro químico, isolamento hidrodinâmico ou imobilização com agentes químicos.

De acordo com Mohn & Tiedje (1992), alguns compostos altamente clorados parecem resistir a biodegradação em ambientes aeróbios, enquanto em ambientes anaeróbios naturais pode ocorrer com maior facilidade (Madsen & Aamand, 1990). A resposta positiva dos microrganismos anaeróbios na degradação de compostos organoclorados vem estimulando o desenvolvimento de pesquisas tecnológicas sobre os melhores sistemas anaeróbios para o tratamento de tais compostos. As vantagens da biotecnologia anaeróbia aplicada a descontaminação ambiental, quando comparadas às dos processos aeróbios, são o custo inferior e a geração de menor quantidade de resíduos e/ou de subprodutos menos tóxicos.

A compreensão sobre a diversidade microbiana e seu papel funcional frente à ecologia dos habitats naturais contaminados pode constituir objeto de grande valor para os processos tecnológicos de tratamento de resíduos, nos quais busca-se selecionar o inóculo do próprio sistema danificado. Há inúmeros exemplos de ambientes anaeróbios poluídos com compostos organoclorados, tais como solos saturados ou subsuperficiais, lençóis freáticos, sedimentos marinhos e de d'água doce e, portanto, a estratégia tecnológica para a recuperação desses locais deve procurar estimular a ação microbiana autóctone capaz de degradar os poluentes.

A investigação da diversidade microbiana nos ambientes contaminados, em especial a dos procariontes, deve optar por técnicas experimentais que facilitem a caracterização da estrutura

da comunidade dos organismos e sua identificação. Até recentemente, a obtenção dessas informações limitava-se apenas às espécies cultivadas em laboratório e através de técnicas microbiológicas clássicas. O desenvolvimento de técnicas da biologia molecular, tais como o “FISH - *fluorescent in situ hybridization*” – ou hibridização *in situ* com sondas fluorescentes e o “DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”- ou eletroforese em gel com gradiente desnaturante, permitiu um grande avanço na análise direta da diversidade microbiana em amostras ambientais e/ou enriquecidas e, como consequência, o conhecimento taxonômico de diferentes comunidades e sua distribuição geográfica (Canhos *et al.*, 1999). Soma-se a isso, o valor do estudo da diversidade funcional, o qual possibilita ampliar horizontes para o entendimento das relações e funções exercidas pelas diferentes comunidades microbianas em seus ecossistemas de origem (Kawanabe, 1996).

Por sua vez, o tratamento dos resíduos tóxicos pode ser feito através da atividade dos microrganismos anaeróbios autóctones em biorreatores compatíveis com o tipo de resíduo a ser estabilizado e/ou sua adequação para tal. Dentre as configurações de biorreatores anaeróbios existentes, os de biomassa imobilizada têm sido amplamente pesquisados para o tratamento de águas residuárias contendo compostos tóxicos, principalmente pelo fato de favorecerem a retenção e o crescimento das células microbianas, minimizando ou eliminando possíveis inibições do processo (Dwyer *et al.*, 1986 *apud* Bolaños, 2001; Hanaki *et al.*, 1994). Foresti *et al.* (1995) desenvolveu o Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), que contém espumas de poliuretano como suporte para a imobilização da biomassa. Trata-se de um reator tubular, cuja configuração proporciona o aumento do volume útil reacional do reator, em consequência da redução do volume destinado à separação do gás. Este reator vem sendo utilizado por pesquisadores do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB/SHS/EESC/USP), em pesquisas pioneiras no estudo da degradação anaeróbia do PCP e outros compostos tóxicos. Dentre os trabalhos podem ser citados os de Damianovic (1997) e Baraldi (2001), que empregaram o reator do tipo RAHLF e o de Montenegro (2001, 2002a), que usou um reator anaeróbio híbrido. Os resultados dos trabalhos relacionados foram bastante positivos na verificação da degradação anaeróbia do PCP sob condições metanogênicas. Trabalhos posteriores, que também empregaram o RAHLF, mostraram excelente desempenho microbiana na degradação anaeróbia de fenol e BTEX, como os de Bolaños (2001), Nardi *et al.*, (2005), Ribeiro (2005) e Cattony (2005) tanto sob condições metanogênicas como sulfidogênicas.

Assim, a pesquisa que ora se apresenta avaliou a atividade microbiana anaeróbia capaz de degradar o PCP sob condições metanogênicas, a partir de amostras de sedimento coletadas na região do Estuário de Santos- São Vicente. Para tanto, foram empregadas técnicas da biologia molecular em conjunto com as microbiológicas clássicas para o enriquecimento, isolamento e

identificação de microrganismos anaeróbios. Além disso, procurou avaliar a resposta dos sedimentos enriquecidos na degradação do PCP em um reator operado sob condições contínuas do tipo RAHLF, com vistas à exploração tecnológica da microbiota autóctone, procurando fornecer dados sobre os possíveis mecanismos de degradação de clorados orgânicos no ambiente de estudo sob metanogênese.

*Nunca fazemos bem alguma coisa enquanto
não paramos pra pensar na maneira de fazê-la.*
(William Hazlitt, escritor inglês- 1778-1830)

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar a atividade microbiana anaeróbia capaz de degradar o PCP sob condições metanogênicas, a partir de amostras de sedimento coletadas na região do Estuário de Santos-São Vicente.

Objetivos Específicos:

- Implementar a determinação cromatográfica de clorofenóis, particularmente do PCP, em matrizes sólida e líquida
- Enriquecer e isolar, na presença e ausência de PCP, culturas de microrganismos metanogênicos e redutores de sulfato, oriundas dos sedimentos estuarinos contaminados com compostos tóxicos;
- Identificar as culturas isoladas através das técnicas moleculares FISH (“*fluorescent in situ hybridization*”) e DGGE (“*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”), exames microscópicos e ensaios fisiológicos;
- Estudar o potencial metanogênico e de degradação anaeróbia do PCP em reatores semi-contínuos inoculados com amostras de sedimentos estuarinos oriundos de dois diferentes pontos, um contaminado (Cosipa) e outro com menor contaminação (Largo do Caneus);

-
- Avaliar o potencial de degradação anaeróbia do PCP e matéria orgânica em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) inoculado com lodo previamente enriquecido a partir do sedimento estuarino oriundo de uma região altamente contaminada (Cosipa);
 - Acompanhar por meio da técnica molecular DGGE (*“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”*) a diversidade dos microrganismos durante a operação do reator RAHLF;
 - Identificar através da técnica molecular FISH (*“fluorescent in situ hybridization”*) e exames microscópicos as culturas predominantes no final da operação do RAHLF.

*Tem gente que sonha com realizações importantes,
e há quem vai lá e realiza.
(George Bernard Shaw)*

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Síntese, identificação e características físicas, químicas e organolépticas do pentaclorofenol - PCP

O pentaclorofenol (PCP) foi primeiramente sintetizado em 1872 por MER & WEITH. Este composto pode ser produzido a partir da cloração do fenol ou pela hidrólise do hexaclorobenzeno. No primeiro caso, o fenol, clorofenol e policlorofenol são clorados na presença de catalisadores como amoníaco, antimônio e seus cloretos em elevadas temperaturas. A cloração se processa em dois passos sendo que o fenol é inicialmente clorado para 2,4,6, triclорofenol a temperaturas entre 30 e 40⁰C. A seguir, um catalisador é introduzido auxiliando a complementar a cloração realizada em elevadas temperaturas (5 a 10⁰C acima do ponto de fusão). No segundo caso, a síntese é realizada pela hidrólise alcalina de hexaclorobenzeno em metanol e outros álcoois hidratados e misturados em vários solventes, havendo a substituição de um íon cloreto por um íon hidróxido. Em ambos os casos, o rendimento da produção é de 95-97% (Crosby, 1981).

O PCP é um composto orgânico aromático halogenado que possui cinco átomos de cloro ligados a um anel benzênico conforme ilustrado na Tabela 1. Está na classe dos halogênios, que são fortemente eletronegativos e existem freqüentemente como ânions em soluções aquosas. Os halogênios formam ligações estáveis com átomos de carbono, assim o PCP é bastante estável no ambiente e muito reativo nos sistemas biológicos (Wackett, 1995 *apud* Montenegro, 2001). O PCP puro apresenta-se como cristais brancos ou levemente marrons e com odor pungente quando aquecido. É um composto relativamente volátil mesmo à temperatura ambiente, praticamente insolúvel em água em pH levemente ácido e altamente solúvel em solventes orgânicos. Sais solúveis do composto, como o pentaclorofenato de sódio (PCP-Na), podem ser utilizados em vários processos industriais. O PCP encontra-se sob duas formas de acordo com o pH do meio, como fenolato aniônico em pH neutro a alcalino e como fenol não dissociado em pH ácido; tem-se, contudo, que 1% do composto é ionizado no pH 2,7 e 99% de ionização ocorre no pH 6,7 (Who, 1987). A Tabela 1 da World Health Organization (Who, 1987) apresenta algumas características físico-químicas do PCP.

Tabela 1. Características físico-químicas do PCP.

Características	Valores
<p>Pentachlorophenol</p>	
Estrutura da molécula	
Peso molecular (g/mol)	266,34
Ponto de fusão (°C)	190-191
Ponto de ebulição (°C)	309-310
Temperatura de decomposição (°C)	310
Solubilidade (mg/L, 20°C)	
em água	< 1
em etanol (95%)	~100
em acetona	~100
Solubilidade em benzeno (mg/L, 25°C)	15

Fonte: World Health Organization (1987)

3.2. Degradação de compostos orgânicos halogenados

Em geral, a degradação de compostos orgânicos na natureza ocorre fundamentalmente pela ação dos microrganismos. Assim, qualquer composto sofrerá biodegradação somente se houver uma enzima ou um sistema enzimático capaz de catalisá-lo. As características físicas e estruturais da molécula, bem como as características físicas e químicas do meio, tais como pH, temperatura, disponibilidade de água, luz e oxigênio, apresentam significativa influência na transformação e/ou quebra de um determinado composto. Uma molécula pode ser considerada persistente se não for decomposta em determinados ambientes e recalcitrante se resistir à biodegradação em vários e diferentes ambientes (Matheus, 1997).

O termo biodegradação pode ser definido como um processo metabólico que envolve a quebra completa de um composto orgânico em seus componentes inorgânicos, referido comumente como mineralização. A biotransformação, por sua vez, consiste na alteração química da estrutura molecular do composto orgânico ou inorgânico, resultando em uma molécula com características diferentes da original, em geral pela perda de uma propriedade específica, porém com a complexidade inicial (Walter & Crawford, 1997 *apud* Montenegro, 2001).

Outros fatores importantes que influenciam a biodegradação de um determinado composto, de acordo com Field *et al.* (1995) e Field (2002) são:

- Biodisponibilidade: definida como a forma com que os compostos químicos estão disponíveis para o organismo. Há duas formas nas quais eles não estão disponíveis. A primeira refere-se ao caráter não hidrolisável de polímeros como plásticos e lignina, o que dificulta a ação microbiana. A segunda diz respeito à baixa solubilidade dos compostos altamente apolares em água, somada a uma forte tendência de manterem-se adsorvidos em outras moléculas, como é o caso dos compostos aromáticos policlorados e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Tais compostos ocorrem predominantemente na fase sólida e adsorvidos ao solo, sedimento ou partículas de lodo. Em tais casos, as limitações cinéticas de dissolução e ou dessorção apresentam importante função na velocidade de biodegradação.

- Limitações intrínsecas: este termo refere-se às limitações da capacidade degradativa dos microrganismos envolvidos nas reações. Portanto, são de origem biológica e variam conforme a comunidade microbiana;

- Ligações irreversíveis dos poluentes ao húmus: representa a tendência de certos compostos, suscetíveis a reações com radicais livres, em submeter-se a um acoplamento oxidativo. Este acoplamento pode resultar na formação de húmus recalcitrante e inacessível aos microrganismos.

3.2.1. Biodegradação anaeróbia de compostos orgânicos halogenados – a desalogenação redutiva

Para que um composto orgânico halogenado entre no metabolismo intermediário, os halogênios devem ser primeiramente removidos de modo que o esqueleto de carbono seja transformado em um intermediário comum. Isto pode ser feito por reações de oxidação, redução, substituição ou eliminação do halogênio (Wackett, 1995 *apud* Montenegro, 2001).

A característica eletronegativa dos grupos substituintes faz com que os compostos halogenados sejam mais oxidados que seus correspondentes não halogenados, tornando-os, portanto, mais suscetíveis às reações de redução que às de oxidação. Assim, quanto maior o número de halogênios, a redução torna-se mais propícia que a oxidação (Field *et al.*, 1995). O composto organoclorado tetraclorometano, por exemplo, é o clorometano com o maior número de substituições, possui o potencial de óxido-redução mais alto e é o mais favorável aceptor de elétrons. Como consequência, é o composto cuja reação de descloração é mais exergônica, como pode ser constatado pelos valores negativos de energia livre de Gibbs (ΔG^0) (Montgomery *et al.*, 1994).

De acordo com Wildeman & Verstraete (2003), dependendo dos elétrons envolvidos nas reações de desalogenação, diferentes mecanismos podem ocorrer nos ambientes anaeróbios (Tabela 2). Quando não há transferência de elétrons, as reações possíveis são as de substituição

e dehidroalogenação. Por sua vez, as reações de oxi-redução requerem a presença de doadores de elétrons e são assim definidas:

- hidrogenólise: é uma reação de redução na qual a ligação carbono-halogênio é quebrada e um átomo de halogênio é substituído por um de hidrogênio, com a inserção de um próton e dois elétrons;

- dialoelimação: é uma reação de redução na qual dois halogênios são removidos de átomos de carbono adjacentes e, ao mesmo tempo, forma-se uma ligação dupla entre os átomos de carbono pela inserção de dois elétrons;

- reação de acoplamento: é uma ligação entre dois radicais livres, eliminando-se um halogênio e inserindo-se dois elétrons.

Todos estes mecanismos de redução podem estar envolvidos no processo de desalogenação redutiva de uma molécula halogenada, sendo este o termo genérico para designar a reação em que os compostos halogenados sofrem a perda do halogênio e são reduzidos pelo hidrogênio.

Tabela 2. Mecanismos envolvidos nas reações de desalogenação redutiva em ambientes anaeróbios.

Tipo de reação	Exemplos de reações com ácido cloroacético (reações de substituição) e com 1,2-dicloroeteno (demais reações)
Sem doador de elétrons	
1. Substituição <u>a-substituição nucleofílica</u> $R-X + Nu^- \rightarrow R-Nu + X^-$ <u>b- hidrólise ($Nu^- = OH^-$)</u> $R-X + OH^- \rightarrow R-OH + X^-$ 2. Dehidroalogenação	$HOOC-CH_2Cl + Nu^- \rightarrow HOOC-CH_2Nu + Cl^-$ $HOOC-CH_2Cl + OH^- \rightarrow HOOC-CH_2OH + Cl^-$ (ácido glicólico) ^a $ClH_2C-CH_2Cl \rightarrow H_2C=CHCl$ (cloreto de vinila) ^b
Com doador de elétrons	
3. Redução <u>a-hidrogenólise</u> $R-X + H^+ + 2e^- \rightarrow R-H + X^-$ <u>b-dialoelimação</u>	$ClH_2C-CH_2Cl + H^+ + 2e^- \rightarrow ClH_2C-CH_3 + Cl^-$ (cloroeteno) ^c $ClH_2C-CH_2Cl \rightarrow H_2C=CH_2 + 2Cl^-$ (eteno) ^d

c-acoplamento	
$2R-X + 2e^- \rightarrow R-R + 2X^-$	$2ClH_2C-CH_2Cl + 2e^- \rightarrow ClH_2C-CH_2-CH_2-CH_2Cl + 2Cl^-$ (1,4 - dicloroeteno)

Legenda: ^areação catalisada pelas espécies *Desulfobacterium* sp e *Methanobacterium* sp (Egli *et al.*, 1987)ⁿ; ^breação catalisada pela *Dehalococcoides ethenogenes* linhagem 195 (Maymó-Gatell *et al.*, 1999)ⁿ; ^creação catalisada pela *Methanosarcina barkeri* e seus extratos celulares (conversão cometabólica) (Holliger *et al.*, 1990)ⁿ; ^dreação catalisada pela *Dehalococcoides ethenogenes* linhagem 195 (Maymó-Gatell *et al.*, 1999)ⁿ.

Fonte: ⁿ *apud* Wildeman & Verstraete (2003).

São três as principais rotas para a desalogenação redutiva microbiana (Holliger *et al.*, 1990; El Fantroussi *et al.*, 1998; Wildeman & Verstraete, 2003):

- Via metabolismo principal, em que o composto é a única fonte de carbono e energia. Neste metabolismo, a desalogenação é feita por um processo fermentativo, como ocorre em linhagens que utilizam hidrocarbonetos clorados C1 e C2 como substrato. Este metabolismo é encontrado também na degradação anaeróbia do cloreto de metila por uma bactéria homoacetogênica que fermenta este composto juntamente com o dióxido de carbono à acetato e cloro;

- Via co-metabolismo, também chamado de reação “gratuita”, na qual enzimas ou cofatores de uma reação que ocorre naturalmente no organismo provocam uma modificação fortuita do composto halogenado. Os microrganismos são capazes de catalisar reações de redução sem um ganho aparente de energia. Portanto, neste metabolismo, um composto é transformado por um microrganismo, ainda que o organismo seja incapaz de crescer na sua presença. Estas reações ocorrem em microrganismos que expressam ampla especificidade de enzimas catabólicas, podendo transformar compostos orgânicos halogenados sem uma ligação direta com o seu metabolismo energético ou biossintético. As reações do co-metabolismo são lentas e incompletas;

- halorespiração, processo pelo qual compostos halogenados são utilizados como aceptores de elétrons e a energia para o crescimento celular é gerada a partir de reações exergônicas de desalogenação. Quando por exemplo o hidrogênio ou formiato são usados como doadores de elétrons, não ocorre nenhuma reação indireta de fosforilação no nível do substrato. Portanto, a presença do composto halogenado é essencial para o crescimento dos microrganismos halorespiradores. Ao contrário do que acontece no co-metabolismo, a desalogenação nesses organismos é catalisada por enzimas específicas com grande afinidade pelo substrato e alta atividade específica. A velocidade de descloração dos halorespiradores é de 2-5 vezes maior que a observada nas reações co-metabólicas. Em geral, são liberados 100nmol Cl⁻min⁻¹mg⁻¹ de proteína, correspondendo a 100 mgClh⁻¹g⁻¹ de peso seco de célula. A Tabela 3 relaciona espécies de microrganismos que realizam a desalogenação redutiva.

Tabela 3. Microrganismos envolvidos nas rotas de desalogenação redutiva.

Rotas de desalogenação	Microrganismo	Metabolismo	Fontes
Metabolismo principal	<i>Dehalobacterium formicoaceticum</i>	Conversão do diclorometano a formiato e acetato, razão molar de 2:1.	1
Halorespiração	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	Procarionte redutor de sulfato que acopla a desalogenação redutiva do 3-CB à piruvato à oxidação do hidrogênio e /ou formiato, conservando a energia quimiosmoticamente.	2
	<i>Desulfitobacterium</i>	Acopla a desalogenação redutiva à oxidação de hidrogênio e/ou formiato, conservando a energia através de fosforilação ligada a uma cadeia transportadora de elétrons.	3
	* <i>Desulfovibrio</i> TBP-1	Acopla a redução de orto- e para-bromofenóis à oxidação de lactato.	4
Co-metabolismo	<i>Methanosarcina</i> sp. DCM	Acopla a desalogenação do percloroetileno (PCE) à metanogênese, utilizando um agente de transferência de elétrons ainda desconhecido para transportar elétrons da metanogênese para o PCE. Aparentemente, a linhagem não é capaz de desalogenar o PCE se não houver adição de metanol.	5

1 e 5. El Fantroussi *et al.* (1998); 2. Mohn & Tiedje (1991); 3. Smidt (1999); 4. (Boyle *et al.*, 1999);

* bactéria isolada de ambiente estuarino.

3.2.2. Halorespiração –microrganismos envolvidos e aspectos metabólicos

Alguns autores como Suflita & Townsed (1995) e Hendriksen *et al.* (1992) creditaram o envolvimento da desalogenação redutiva a processos respiratórios, conforme apresentado na Figura 1. Como o metabolismo respiratório resulta na geração de energia celular, alguns aspectos sobre o mesmo não foram aprofundados no decorrer do presente texto.

Nas duas últimas décadas Smidt *et al.* (2000), Holliger *et al.* (1999), El Fantroussi *et al.* (1998), Madsen & Aamand (1992) e Mohn & Tiedje (1991), trabalhando com culturas puras confirmaram que a desalogenação redutiva está realmente associada a processos respiratórios - halorespiração, ou seja, os microrganismos são capazes de acoplar a desalogenação redutiva de compostos alifáticos e aromáticos à conservação de energia e, portanto, ao crescimento celular. Isto explica o benefício fisiológico aos microrganismos que catalisam esta reação, uma vez que este metabolismo para alguns compostos aromáticos halogenados levam a congêneres menos halogenados, porém com o anel aromático intacto. Os metabólitos desalogenados são freqüentemente acumulados em proporções estequiométricas.

Figura 1. Modelo de sistema respiratório da *Dehalobacter restrictus*, Hy= hidrogenase, ETS = sistema de transferência de elétrons, PCER = redutase tetracloretileno, PCE = tetracloretileno, cis-1,2 DCE = cis-1,2 dicloroetileno.
Fonte: Holliger & Schumacher (1994).

Os estudos com culturas puras isoladas procuram determinar quais os microrganismos responsáveis pela atividade desalogenante, suas enzimas e cofatores, bem como as influências dos fatores abióticos na resposta celular. O conhecimento dos grupos específicos de microrganismos é fundamental para a aplicação segura de sistemas para a biorremediação e/ou biotratamento de organohalogenados (Mohn & Tiedje, 1992). Até o momento a maioria dos microrganismos que realizam a halorespiração pertence ao Domínio *Bacteria*, sendo os grupos mais comuns os redutores de sulfato ou enxofre do subgrupo δ e ϵ *Proteobacteria* (Holliger *et al.*, 1999). Uma caracterização detalhada de linhagens capazes de realizar a halorespiração foi apresentada nas revisões publicadas por El Fantroussi *et al.* (1998) e Holliger *et al.* (1999).

A presente pesquisa enfoca a degradação do composto organoclorado (PCP), assim o mote da revisão da literatura visou o conhecimento das culturas puras e consórcios microbianos capazes de realizar a halorespiração de compostos clorados. A Tabela 4 apresenta algumas características das culturas já identificadas.

Visto que a desalogenação redutiva pode ser uma nova forma de respiração anaeróbia, deve-se avaliar a sua ocorrência em relação aos possíveis doadores, aceptores e transportadores de elétrons celulares. A concentração e o mecanismo pelos quais os doadores atuam não está ainda totalmente esclarecido uma vez que, são várias as espécies microbianas capazes de desalogenar anaerobiamente moléculas e tão pouco se pode afirmar que são poucos ou distintos os doadores de elétrons que garantem a atividade desalogenante. Ainda mais ao se observar que esses doadores podem servir como fonte de carbono para os microrganismos desalogenadores realizarem biossíntese, ou até mesmo, em consórcio, ser empregado para produção de energia e novas células por microrganismos associados de forma sinérgica, mutualística e comensal com os desalogenadores (Suflita & Townsend, 1995). Na revisão feita por Pak (1994), constatou-se que os substratos orgânicos doadores de elétrons são essenciais para que a desalogenação de fenóis altamente clorados ocorra, além de sustentar o crescimento celular dos agentes desalogenadores. Assim, a falta de doadores de elétrons exatos resulta na limitação da biotransformação anaeróbia de contaminantes tóxicos.

Outros trabalhos descritos, notadamente na década de 90 e início dos anos 2000, corroboraram com as afirmações de Pak (1994), podendo-se citar os de Montenegro (2002), Zou *et al.* (2000); Jin & Bhattacharya (1997); Stuart & Woods (1998); Kennes *et al.* (1996); Wu *et al.* (1993); Madsen & Aamand (1991; 1992); Nicholson *et al.* (1992); Hendricksen *et al.* (1992); Mohn & Kennedy (1992). Neles esclarece-se a evidente necessidade da adição de doadores de elétrons ao estímulo à desalogenação redutiva de compostos clorofenólicos. Em 1999, Smidt (1999) comentou que as bactérias halo-respiradoras competem entre si e concorrem pelo hidrogênio com os procariontes comuns aos ambientes anaeróbios, tais como os procariontes redutores de sulfato e os metanogênicos. Muito embora algumas espécies desses dois últimos grupos possam também se envolver com a desalogenação de moléculas por outros mecanismos, a atividade das halo-respiradoras é preponderante ao metabolismo energético celular e assim, há obrigatoriedade na busca do doador de elétrons. Um exemplo se encontra nos estudos com culturas enriquecidas, de acordo com o mesmo autor, no qual verificou que a descloração foi estimulada às custas da inibição da metanogênese na presença de substratos lentamente fermentáveis, como o propionato, ou sob baixas concentrações de compostos rapidamente fermentáveis como o lactato.

Tabela 4. Culturas puras capazes de realizar a halorespiração de vários compostos organoclorados.

Cultura	Origem	Características	Doadores de elétrons e *indutores da desalogenação	Aceptores de elétrons	Produto	Especificidade da desalogenação	Afiliação filogenética	Referência
<i>Bacterium</i> 2CP-1	Sedimento enriquecido com 2CP, formiato, acetato e BESA	bacilos finos longos (0,5-3um de comprimento); anaeróbios facultativos e gram negativos	-acetato ou formiato ou Besa	2-CP	fenol	orto	Anaeróbio facultativo, delta-proteobacteria relacionada à mixobactéria	1
			-acetato+formiato+Besa	2CP	fenol	orto		
			-não descrito	2,5-DCP	2-CP	orto		
			-não descrito	2,6-DCP	2-CP e fenol	orto		
<i>Desulfotobacterium chlororespirans</i> , Linhagem Co23	solo enriquecido que mineralizou 2,3DCP	bacilos curvos (3-5um comprimento e 0,5-0,7 um de diâmetro) anaeróbios estritos, gram positivos e formadores de esporos	- formiato + butirato	2,3-DCP	-	orto	Relacionada a <i>Desulfotomaculum</i>	2
			- H ₂ + acetato	2,3-DCP	-	orto		
			- butirato	2,3-DCP	acetato	orto		
			-crotonato	2,3-DCP	acetato	orto		
			-lactato ou butirato	2,3-DCP; 2,6-DCP; 2,4,6-TCP	3-CP; 2-CP; 4-CP	orto orto orto		
				3Cl-4-HBA	4-HBA	orto		
<i>Desulfomonilie tiedje</i> Linhagem DCB-1	Lodo de esgoto enriquecido com 3CB	bactéria redutora de sulfato (BRS), estritamente anaeróbia, gram negativa	-formiato + *3CB	PCP	3CP	meta		3
				2,3,4,6-TeCP;	2,4,6-TCP	meta		
				2,3,5,6-TeCP;	2,3,6-TCP;	meta		
					2,6-DCP	meta		
				2,3,4-TCP	2,4-DCP	meta		
				2,3,5-TCP	2,3-DCP;	meta		
					2-CP	meta		
				2,3,6-TCP	2,6-DCP	meta		
				2,4,5-TCP	2,4-DCP	meta		
<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i>	Enriquecimento de sedimento de lago	de bacilos curvos (2,5-4 um de comprimento e 0,5-0,7 um de	Piruvato+*3-Cl-4-OHPA + 0,1% extrato de carne	PCP; TeCPs	2-CP;2-CP	meta; meta	orto; orto	4 e
				3,4-DCP;3,5DCP	4-CP;3-CP	meta; meta		
				2,3,4-TCP		orto		

	suplementado com piruvato + formiato + 3-Cl-4-OHPA	diâmetro); anaeróbios, móveis, gram positivos e não formadores de esporos, cresce em meio contendo até 0,5M NaCl.		2,3,6-TCP 2,4,6-TCP 2,6-DCP;2,4-DCP; 2,3-DCP	orto orto orto; orto orto			
<i>Desulfovibrio dechloracetivornas</i> Linhagem SF3	Sedimento marinho enriquecido com 2CP e acetato.	vírios (1-4 um comprimento e 0,4-0,6um de diâmetro) anaeróbios, gram negativo e móveis Este microrganismo apresenta crescimento em meio de cultivo contendo de 1,6-2,5% de NaCl.	acetato ou lactato ou propionato ou piruvato ou alanina ou etanol	2-CP; 2,6-DCP 2,4,6-TCP;	orto	Grupo Desulfovibrio relacionado à BRS	6	
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Linhagem DCB-2	Consórcio de um lodo municipal tratando TCP	bacilos levemente curvos; anaeróbios, formadores de esporos; gram positivo, móvel;	Piruvato e extrato de carne	PCP 2,3,4,5TeCP 3,4,5-TCP 2,4DCP	orto orto meta	Relacionada ao gênero <i>Clostridium</i>	7	
				2,4,5-TCP 2,4,6-TCP 2,4-DCP 3,5-DCP	2,4DCP 4CP 4-CP 3-CP	orto; orto orto meta		
<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	Consórcio metanogênico oriundo de lodo de esgoto e de solo que tinha sido contaminado com PCP. Este consórcio degradou completamente o PCP em um meio suplementado com glicose e formiato	bacilos formadores de esporos, não móveis, cora para gram negativo, mas em observação por microscopia eletrônica são gram positivos	Piruvato e extrato de carne	Sulfito + PCP Tiosulfato + PCP Nitrato + PCP	2,3,4,5-TeCP 3,4,5-TCP 3,5-DCP 3-CP	orto orto	pertence ao gênero <i>Desulfitobacterium</i> com 95% de homologia com <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> JW/IU-DC1	8
<i>Desulfitobacterium</i> Linhagem PCE -1			Formiato; piruvato	PCE; 2-CP; 2,4,6-TCP; 2-Cl-4-OH-fenilacetato	orto		9	
<i>Desulfitobacterium</i> Linhagem PCE -S			piruvato	PCE; TCE; 2,4,5-TCP; PCP	orto e meta		10	
<i>Dehalobacter restrictus</i>			H ₂	PCE; TCE			11	
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>			H ₂	PCE; TCE; DCE; cloroeteno			12	
<i>Enterobacter</i> linhagem MS-1			Formiato; acetato	piruvato; PCE;TCE		Anaeróbio facultativo	13	

Legenda: 3CB: 3-clorobenzoato; 3-Cl-OHPA: 3-cloro-4-hidroxifenilacetato; TCP: triclorofenol; * 3CB e *3-Cl-4-OHPA foram indutores da desalogenação reductiva dos compostos clorofenólicos; 1.Cole *et al.* (1994); 2.Sanford *et al.* (1996); 3.Mohn & Kennedy (1992); 4.Utkin *et al.* (1994); 5.Utkin *et al.* (1995); 6.Sun *et al.* (2000); 7.MADSEN & LICHT (1992); 8.Bouchard *et al.* (1996); 9. Gerritse *et al.* (1996) *apud* Holliger *et al.* (1999); 10. Granzow, S. (1998) *apud* Holliger *et al.* (1999); 11. HOLLIGER *et al.* (1998) *apud* Holliger *et al.* (1999); 12. Maymó-Gatell *et al.* (1997) *apud* Holliger *et al.* (1999); 13. SHARMA & Mccarty (1996) *apud* Holliger *et al.* (1999)

Nos ambientes anaeróbios é certo que as interações sintróficas de bactérias halo-respiradoras hidrogenotróficas e microrganismos produtores de H_2 são altamente favoráveis, pois o primeiro grupo mantém baixos os valores de pressão parcial de H_2 necessários para que o outro continue a atividade de produção do gás.

De acordo com Holliger & Schumacher (1994), as bactérias halo-respiradoras parecem apresentar baixas velocidades de crescimento e elevada afinidade pelos doadores de elétrons. Assim, em sistemas com baixas concentrações de substrato, estes microrganismos podem competir com os que apresentam altas velocidades de crescimento. Neste contexto, observa-se a halo-respiração em sistemas contínuos com baixa concentração de doadores de elétrons ou através do enriquecimento onde bactérias com elevada afinidade pelo substrato tenham uma vantagem competitiva. Um bom sistema para o enriquecimento de bactérias halo-respiradoras foi obtido com o cultivo de bactérias sintróficas produtoras de hidrogênio oxidando o benzoato. A espécie *Desulfomonilie tiedjei*, isolada de uma cultura degradadora de 3-clorobenzoato, obteve equivalentes redutores a partir da atividade de uma linhagem que produzia hidrogênio pela oxidação do benzoato (Dolfing & Tiedje, 1986 *apud* Holliger & Schumacher, 1994)

Em relação aos aceptores de elétrons verificaram-se algumas discordâncias entre os pesquisadores em relação à descrição dos mecanismos envolvidos na reação de desalogenação, tal como observado em Kennes *et al.* (1996) e Madsen & Aamand (1992). No entanto, é comum afirmar que a presença de certos aceptores de elétrons pode tanto estimular quanto inibir o processo. A habilidade do microrganismo desalogenador no uso de certos compostos relaciona-se à disponibilidade de aceptores de elétrons nos ambientes anaeróbios. Assim sendo, a regulação da desalogenação redutiva nesses ambientes depende do tipo deceptor de elétrons livre aos microrganismos e da habilidade das células desalogenadoras em competir por doadores de elétrons com os demais grupos microbianos. Trabalhos citados por Smidt (1999) indicaram que os oxianions de enxofre em particular são inibidores em potencial da halo-respiração, uma vez que provocam o desvio dos elétrons da redução do halogênio para a redução de um sulfato, por exemplo. Gerritse *et al.* (1999) *apud* Smidt (1999) mostraram que a espécie *Desulfitobacterium frappieri* TCE-1, degradadora de PCE (percloroetileno) através de desalogenação redutiva, foi sensível à presença de diferentes aceptores de elétrons sob concentrações limitantes de doadores de elétrons. A presença de sulfito, por exemplo, inibiu significativamente a redução do PCE. Porém, deve-se ter em conta que a presença equimolar de sulfito pode não inibir a descloração, tal como observado em culturas de *Desulfitobacterium dehalogenans* crescidas em Cl-OHPA.

As enzimas envolvidas na halo-respiração são as desalogenases redutivas. A 3-CB desalogenase redutiva foi a primeira enzima purificada e caracterizada, obtida a partir da cultura pura de *Desulfomonilie tiedjei*. São várias as desalogenases parcialmente ou totalmente purificadas e caracterizadas, bem como algumas já foram codificadas. As enzimas estudadas até

o momento estão associadas à membrana celular, como em geral verificam-se nos processos respiratórios. A exceção, no entanto, é a desalogenase redutiva do PCE de *Dehalospirillum multivorans* que foi isolada no citoplasma, muito embora evidências mostrem que a subunidade catalítica desta enzima encontra-se ancorada à membrana citoplasmática, em uma proteína (Neumann *et al.*, 1998 *apud* Smidt, 1999).

A regulação da atividade desalogenadora ocorre pela presença de um composto halogenado. Ainda que uma afirmação óbvia, esta é válida, pois a indução da atividade enzimática desalogenadora pode ocorrer também por moléculas não halogenadas. Esse mecanismo foi observado na espécie *Desulfomonilie tiedjei*, na qual a atividade da enzima desalogenase redutiva foi induzida tanto pela presença do substrato halogenado, como por uma ampla variedade de compostos não halogenados. A existência de atividade desalogenadora constitutiva foi detectada apenas em algumas linhagens, sendo a espécie *Dehalospirillum multivorans* um dos exemplos (Neumann *et al.*, 1994 *apud* Smidt, 1999).

A conservação de energia na halorespiração é mais estudada na presença do hidrogênio e/ou do formiato como doadores elétrons. A energia é conservada através de fosforilação ligada à cadeia transportadora de elétrons, como pode ser observado no metabolismo de *Desulfitobacterium*, além da ocorrência do acoplamento quimiosmótico por espécies como a *Desulfomonilie tiedjei* (Tabela 3) (Smidt, 1999).

3.3. Biodegradação anaeróbia do PCP

3.3.1. Transformação do PCP

O PCP está entre os compostos alicíclicos (aromáticos) que sofrem desalogenação do radical arila pelo processo da hidrogenólise, reação descrita somente nos anos 80 (MOHN & TIEDJE, 1992). Neste mecanismo, o halogênio é removido e substituído por um átomo de hidrogênio até que o esqueleto de carbono seja transformado em fenol, um intermediário comum do metabolismo microbiano. Estas reações são exergônicas conforme os valores apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Energia da degradação anaeróbia de alguns compostos organoclorados

Substrato	Produto	DG° (Kj)
PCP	2,3,4,5-TeCP	-156
2,3,4,5-TeCP	3,4,5-TCP	-141
3,4,5-TCP	3,5-DCP	-156
3,5-DCP	2-CP	-135

Fonte: Dolfig & Harrison (1992).

De acordo com revisão realizada por BOLAÑOS (2001), o fenol pode ser degradado sob condições anaeróbias por duas rotas distintas, uma rota redutiva produzindo o metabólito ciclohexona e outra, a rota do ácido benzóico, que produz o benzoato. Em estudos sobre a degradação do fenol, a maioria das publicações descreve o benzoato como metabólito principal e observa-se a presença abundante de bactérias que degradam este composto. A Figura 2 adaptada de Madsen & Aamand (1991) e Londry & Fedorak (1992) ilustra a biodegradação do PCP até benzoato.

Figura 2. Modelo da desalogenação redutiva anaeróbia do PCP (Madsen & Aamand, 1990) e degradação do fenol pela rota do ácido benzóico ou *p*-carboxilação do fenol (Londry & Fedorak, 1992).

De acordo com Fang *et al.* (1997), a posterior conversão do benzoato a metano em ambientes anaeróbios contendo sulfato envolve várias etapas subseqüentes mediadas por grande

diversidade de bactérias e arqueas metanogênicas, como esquematizado simplificada na Figura 3.

Figura 3. Esquema simplificado da conversão do benzoato a metano em ambientes anaeróbios (Fang *et al.*, 1997).

O esquema da Figura 3 mostra que o benzoato é primeiramente convertido a acetato pelas bactérias acetogênicas sintróficas (BAS) e pelos procariontes redutores de sulfato que realizam a degradação incompleta do substrato (BRS-I ou PRS-I). O hidrogênio produzido é resultante da atividade das BAS e o bicarbonato e o sulfeto de hidrogênio da ação dos procariontes redutores de sulfato que oxidam completamente o substrato (BRS-C). Nas etapas subsequentes, arqueas produtoras de metano acetoclásticas e hidrogenotróficas (APM) e BRS-C utilizam o acetato e o hidrogênio para a produção do metano (APM) e de sulfetos (BRS-C).

3.3.2. Reatores utilizados na biodegradação anaeróbia do PCP

Kato *et al.* (1999) afirmaram que a eficiência de um reator biológico aeróbio ou anaeróbio está relacionada com a cinética das reações bioquímicas, que apresenta dois aspectos chaves, as características hidráulicas, que deve promover a mistura adequada do meio líquido com a biomassa no sistema de reação, e a retenção da biomassa no reator. Assim, no que diz respeito aos reatores anaeróbios, as configurações eficientes, denominadas por “sistemas de alta taxa”, foram desenvolvidas para reter elevadas quantidades de biomassa ativa (o que significa elevado tempo de retenção celular), sob baixos tempos de detenção hidráulica. Resumidamente, os biorreatores são classificados quanto às suas características hidráulicas de mistura e fluxo. Quanto à mistura tem-se: - mistura completa, no qual as partículas líquidas presentes no afluente são totalmente misturadas de modo que as concentrações são praticamente iguais em todo o

reator; - mistura tubular, no qual o afluente entra e passa por meio de um tanque longo e estreito, com as partículas líquidas saindo na mesma seqüência da entrada, não ocorrendo mistura no sentido longitudinal e com pouca ou nenhuma dispersão transversal; nesse caso, as concentrações dos constituintes diminuem da entrada para a saída do tanque, resultando no fluxo pistonado. Quanto ao fluxo tem-se: - fluxo contínuo, no qual o reator recebe continuamente o afluente; - fluxo descontínuo, no qual o reator é preenchido com afluente no início e esvaziado ao final das reações.

No que diz respeito à imobilização e retenção de microrganismos ativos em processo de tratamento de resíduos, dentre os sistemas existentes, destacam-se os de biomassa fixa na forma de biofilmes, os quais vêm sendo bastante utilizados nas pesquisas referentes ao tratamento de compostos tóxicos. As seguintes vantagens podem ser arroladas, como a existência de elevada razão entre tempo de retenção celular e tempo de detenção hidráulica, o que proporciona elevada retenção da biomassa dentro do reator; a ocorrência de condições favoráveis para a rápida adaptação, crescimento e retenção da biomassa; a proteção dos microrganismos de compostos inibitórios; a manutenção da atividade catalítica e eficiente mineralização do substrato por meio da retenção de produtos intermediários imobilizados, suportando assim, condições adversas ao processo (Hanaki *et al.*, 1994).

A biodegradação anaeróbia de PCP foi verificada em reatores de mistura completa com fluxo descontínuo (Kennes *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 1992; Madsen & Aamand, 1991) e contínuo tais como o fluxo ascendente com manta de lodo - UASB (Ye *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2000; Tartakovsky *et al.*, 1999; Duff *et al.*, 1995; Hendriksen *et al.*, 1992; Mohn & Kennedy, 1992; Wu *et al.*, 1993; Woods *et al.*, 1989) e reator com leito expandido de carvão ativado granulado (TSUNO *et al.*, 1996; KHODADOUST *et al.*, 1997). No reator de mistura tubular e fluxo contínuo RAHLF (reator anaeróbio horizontal de leito fixo) (BARALDI, 2001; DAMIANOVIC, 1997) e o reator híbrido (MONTENEGRO, 2002 e 2001) a biodegradação anaeróbia do PCP também foi verificada. O reator híbrido de Montenegro (2002, 2001) constituiu-se da combinação de uma unidade do tipo UASB na parte inferior com um leito fixo na parte superior simulando um filtro anaeróbio, no qual o suporte da biomassa foi espuma de poliuretano de 1cm³.

Como comentado no parágrafo anterior, as pesquisas referentes ao tratamento biológico anaeróbio de PCP foram direcionadas ao uso de biorreatores que apresentam fluxo contínuo e células imobilizadas, quer na forma de grânulos (UASB), quer na forma de biofilme aderido a suportes inertes (fluido expandido e RAHLF). Isto porque a biodegradação de compostos tóxicos envolve bactérias sintróficas e consórcios metanogênicos, e estes reatores proporcionam vantagens termodinâmicas e cinéticas quando comparados as demais configurações (Dwyer *et al.*, 1986 *apud* Bolaños, 2001).

De acordo com Kato *et al.* (1999), o Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo – RAHLF, que contém espumas de poliuretana como suporte para a imobilização da biomassa, apresenta características próprias como - partida em pequeno tempo; - operação rápida e estável;- utilização de material de enchimento leve, poroso, de alta superfície específica e de custo atrativo; - fácil colonização e elevada retenção da biomassa ao leito fixo; - contato biomassa-esgoto adequado; - tempos de detenção hidráulica reduzidos para cargas orgânicas relativamente elevadas; - comportamento semelhante ao reator com regime de fluxo pistonado. Estas características tornam o RAHLF bastante promissor no tratamento de diferentes águas residuárias, inclusive as que contêm compostos tóxicos. A Tabela 6 apresenta uma comparação entre os diferentes reatores anaeróbios de fluxo contínuo utilizados na biodegradação do PCP.

Tabela 6. Reatores anaeróbios de fluxo contínuo utilizados na biodegradação do PCP

Autores	Origem do inóculo	Reator	Substratos Orgânicos (g/L)	COV _{máx} -DQO (g/Lreator*dia)	*PCP (mg/L)	COV _{máx} PCP (g/Lreator*dia)	Remoção PCP (%)	Intermediários metabólitos	Produção de CH ₄	Tempo de operação do reator antes e após a adição de PCP (dias)	Morfologias predominantes no fim período de operação PCP
1.1	lodo granuloso de UASB alimentado com água residuária contendo açúcar idem ao item 1.1.	UASB τ_h – 2dias	glicose – 0,9 fenol – 0,0225 DQO-1g/L	0,5	4,5	0,0025	99	DCP	60%	365	-
1.2		UASB τ_h – 2dias	não recebeu substratos orgânicos fenol – 0,5 DQO-1,2g/L		4,5	0,0025	50	DCP	30%	365	-
2	lodos de reatores tratando água residuária de indústria de papel e celulose	UASB τ_h – 3dias		0,4	3	0,001	70	2,3,5-TCP; 3,5-DCP; 3-CP	-	80	-
3	lodo granuloso de UASB alimentado com água residuária de indústria alimentícia e adição de <i>Desulfitobacterium frappieri</i> (PCP-1)	UASB τ_h – 28horas	sacarose, ácido butírico e etanol	-	93	0,080	99	3,4,5 –TCP; 3-CP; fenol	+	70	-
4	grânulos degradadores de ácidos orgânicos voláteis (metanol, butírico, acetato e propiônico) e enriquecimento com PCP de amostras de ambientes e lodos contaminados	UASB	ácido acético, propiônico, butírico e metanol	15	60	0,036	99	abaixo do limite de detecção	+	200	Morfologias semelhantes a <i>Methansaeta sp</i> <i>Methanosarcina sp</i> <i>Methanobacterium</i>
5	-	Reator de leito fluidizado com GAC τ_h – 5dias	acético – 1,5 DQO-1,6 g/L	0,32	400	0,080	60	abaixo do limite de detecção	+	375	-
6.1	mistura de inóculos provenientes de diferentes fontes e adaptados a	RAHLF2 τ_h – 0,75dia	glicose-1 acético-1 fórmico-2,8	1,7	8	0,00415	100	DCP	97%	100	Morfologias semelhantes a <i>Methansaeta sp</i> <i>Methanosarcina sp</i>

0,2mg/L PCP por 2 meses		DQO-3 g/L									como cocos, vibrio bacilos
6.2	idem ao item 6.1.	RAHLF1 t _h - 1,04dia	glicose-1 acético-1 fórmico-2,8 DQO -3 g/L	1,10	8	0,0026	100	DCP	97%	100	Morfologias semelha a <i>Methansaeta sp</i> <i>Methanosarcina sp</i> l como cocobacilos bacilos fluorescent
7	lodo de UASB alimentado com água residuária de indústria de reciclagem de papel e papelão	RAHLF1 t _h - 1,04dia	acético -0,6 fórmico-0,92 glicose- 0,36 metanol- 1,28 DQO-3,26g/L	1,07	13	0,0049	97	abaixo do limite de detecção	0,050mmol es/L	200	• <i>Methansaeta sp</i> <i>Methanosarcina s</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacte</i> <i>Methanospirillum</i>
8	lodo de UASB alimentado com água residuária de indústria de papelão	RAH	acético-2,72 propiónico-0,15 butírico-0,17 lático-1,8 metanol-0,64 DQO-6,88g/L	4,65	21	0,0142	99	abaixo do limite de detecção	85,5(%)	753	• <i>Methansaeta sp</i> <i>Methanosarcina s</i>
9	Lodos de UASB pré- adaptados ao PCP por um período de 6 meses	UASB 1 dia	peptona, sacarose e extrato de carne- 5	7,5	160	0,80	90		2,51/l*dia	240	Bactérias fermentati acetogênicas produ de hidrogênio e metanogênicas

Obs: todos os reatores apresentaram eficiência de remoção de DQO acima de 90%.

Legenda: *PCP: concentração máxima de PCP utilizada; • as morfologias da autora 7 foram confirmadas pela técnica da biologia molecular *slot-blot* e as da autora 8 pela técnica do FISH. (-) parâmetro não avaliado; (+) resultado positivo.

Autores: 1.1 e 1.2-Hendriksen *et al.* (1992); 2-Duff *et al.* (1995); 3-Tartakovsky *et al.* (1999); 4-Wu *et al.* (1993); 5.Tsuno *et al.* (1996); 6.1 e 6.2 Damianovic (1997); 7. Baraldi (2001); 8. Montenegro *et al.* (2002, 2002a.); 9 - Ye *et al.* (2003);

3.4. Determinação analítica de clorofenóis por cromatografia gasosa

Esse capítulo fará considerações sobre métodos cromatográficos e procedimentos de extração e limpeza de amostras em função da demanda experimental da presente pesquisa. Assim, a revisão que se apresenta justifica-se uma vez que a cromatografia gasosa fez parte preponderante da presente tese de doutorado. Ainda que tenha sido somente empregada como ferramenta analítica, várias etapas foram necessárias para a determinação do PCP e sua validação nas amostras estudadas.

Os métodos cromatográficos caracterizam-se por ocupar lugar de destaque no que se refere à separação, identificação e quantificação das espécies químicas, sendo a cromatografia gasosa bastante utilizada na análise de pentaclorofenol (Smith, 1988; Who, 1987; Lanças, 1993).

A cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase fixa de grande área superficial denominada fase estacionária, e a outra um fluido que percola através dela, sendo por isto denominada de fase móvel. Foi desenvolvida pelo botânico russo M. Tswett no início do século passado, estudando pigmentos de cloroplastos. O termo *cromatografia* é usado para descrever zonas coloridas que se moviam dentro da coluna de vidro Lanças (1993).

A Cromatografia Líquida e a Gasosa são atualmente as melhores técnicas para a determinação de traços de resíduos poluentes. A Cromatografia Gasosa (CG) é um instrumento muito importante e largamente utilizado para análises rotineiras de resíduos de compostos tóxicos. Esta técnica é um procedimento físico empregado para separar compostos em seus componentes individuais. A separação se baseia na distribuição dos compostos entre duas fases, uma estacionária, que pode ser sólida ou líquida, e uma móvel gasosa dependente de um gás de arraste ou gás portador, pois trata-se de um gás inerte cuja finalidade é transportar as moléculas a serem separadas na coluna. Uma vez que a fase móvel é gasosa, esta técnica pode ser aplicada para amostras de gases ou compostos voláteis. A amostra líquida ou gasosa, por meio de um sistema de injeção, é introduzida no gás de arraste antes da entrada da coluna contendo a fase estacionária (coluna de separação). O uso de temperaturas apropriadas no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dos compostos que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidos por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de detetor adequado na saída da coluna torna possível mensurar o tempo que um determinado composto leva para emergir da coluna e a quantidade do mesmo presente na amostra, por meio do cromatograma registrado. O gás de arraste normalmente utilizado é o hidrogênio, argônio, hélio ou nitrogênio, sendo que o detetor irá determinar o gás de arraste empregado.

A introdução, ao final da década de cinquenta, de colunas de diâmetro capilar, com a parede do tubo recoberta com filme bastante fino de fase líquida, resultou no aumento do poder de resolução quando comparadas às colunas empacotadas convencionais. Desde então, a Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC) tem sido empregada em larga escala, sendo tradicionalmente utilizada para a determinação de vários compostos (Lanças, 1993).

Devido à complexidade envolvida na análise de amostras por cromatografia gasosa, há uma sequência de etapas como: - amostragem, estocagem e preservação; - extração dos analitos; - “clean-up” quando necessário, para remoção dos interferentes co-extraídos; - derivatização dos analitos se for o caso; - determinação dos analitos de interesse; - detecção e/ou confirmação; - análise quantitativa (Carmo, 2000).

A técnica de amostragem é fundamental para obtenção de resultados válidos. Esse procedimento deve refletir o máximo possível o sistema investigado (Carmo, 2000). O recipiente precisa ser cuidadosamente escolhido para a amostragem, pois pode ser fonte significativa de contaminação. Para amostras contendo organoclorados recomenda-se o uso de recipientes de vidro âmbar com tampa de teflon ou polietileno (Fifield & Haines, 1995). A preservação das amostras é usada para retardar a degradação microbiana, oxidação e/ou perdas de componentes voláteis. Os métodos se limitam ao controle de pH, refrigeração, secagem e isolamento da atmosfera.

De acordo com EPA (1989) *apud* Zuin (1997), amostras de água para análise de pesticidas organoclorados devem estar contidas em frasco de vidro âmbar, serem preservadas adicionando-se 1mL de solução de HgCl_2 (10g/L) e armazenadas sob refrigeração por sete dias. As amostras de solos ou sedimentos por sua vez, são estocadas a -4°C . As amostras coletadas devem ser imediatamente acondicionadas em geladeiras portáteis ou isopores com gelo até o momento da análise, ou armazenadas em “freezer” (Airoidi, 1997). Para amostras de solos ou sedimentos pode-se também realizar a secagem em estufas a temperatura de $40-50^{\circ}\text{C}$ em recipientes de alumínio e armazená-las em frascos âmbar no escuro tampados com teflon por tempo indeterminado (comunicação pessoal com a Profa. Dra. Rosalinda Montone, Instituto Oceanográfico – USP/SP).

A extração deve conduzir a separação dos analitos de interesse presentes na amostra de possíveis interferentes co-eluídos como outros compostos poluentes, pigmentos, etc. Esta etapa é principalmente realizada utilizando-se solventes orgânicos e sua eficiência depende de vários fatores, tais como polaridade dos analitos, pH, volume da amostra e método de extração (Zuin, 1997). Várias técnicas, instrumentos e até mesmo diferentes condições de extração têm sido aplicadas na separação de pesticidas de matrizes líquidas, solo e sedimentos. A escolha formal do extrator depende primeiramente das características do analito de interesse e tipos de sistemas a serem analisados. No que se refere à extração para matrizes líquidas, os principais métodos são a extração líquido-líquido (Carmo, 2000; Zuin, 1997; Peres, 1997; Gabelish *et al.*; 1996;

Abrahamsson & Ekdahl, 1993), em fase sólida (Azevedo *et al.*; 2000; Veningerová *et al.*; 1997; Zuin, 1997; Vicino, 1993; Beltran *et al.*; 1993, Vidal, 1991), microextração em fase sólida (Bras *et al.*; 2000) e com fluido supercrítico (Björklund & Nilson, 2000; Peres, 1997).

A extração de poluentes em matrizes sólidas adota-se, em geral, o Soxhlet, o tratamento ácido e/ou alcalino das amostras e a volatilização seletiva. A extração em Soxhlet é o método mais clássico, e é utilizado para extração de compostos orgânicos em matrizes sólidas, como solos, sedimentos, areia e resíduos orgânicos sólidos (Airoldi, 1997; Bruner, 1993). Embora a extração por Soxhlet seja eficiente e precisa, é uma técnica demorada e emprega grandes volumes de solventes orgânicos, alguns perigosos à saúde e de difícil disposição final (BRAS *et al.*, 2000). Neste contexto, podem-se adotar métodos menos perigosos como a extração em microondas (Llompарт *et al.*; 1997), por ultrassom (Carmo, 2000; Polese e Ribeiro, 1998), agitação com barra magnética (Carmo, 2000), extração em fase sólida (Albanis & Danis, 1999), micro-extração em fase sólida (Brás *et al.*; 2000; Lee *et al.*; 1998) e extração líquido-líquido (Abrahamsson & Ekdahl, 1993). Tanto para matrizes sólidas quanto para líquidas a extração pode ser também realizada no “headspace” (atmosfera livre do sistema amostrado). Esta técnica é simples e não emprega solventes e somente é aplicada quando o analito é volátil. A amostra é colocada em um recipiente selado e os compostos voláteis ocupam a atmosfera livre do sistema amostrado. A amostra é aquecida para se obter equilíbrio entre as fases e, alíquotas do “headspace” são retiradas e analisadas por cromatografia gasosa (Smith, 1988).

O termo “clean-up” define a remoção dos interferentes comumente presentes nas diversas matrizes e é determinado pelas características da amostra, procedimento de extração e método utilizado para determinação do analito alvo (Vicino, 1993). Assim, após a extração do analito da matriz com a metodologia apropriada, pode ser necessária a limpeza do extrato visando à remoção dos interferentes co-extraídos. A limpeza do extrato é que torna possível a determinação quantitativa do analito, principalmente quando se objetiva determinar baixas concentrações (Lanças, 1993).

A análise de um determinado analito por CG se faz sob alguns milímetros de pressão de vapor d’água, na temperatura máxima estável. Pode ser necessária a conversão do analito em outros derivados detectáveis pelo método. Essa conversão recebe o nome de derivatização, ou seja, a transformação de uma substância em outra, com o intuito de conseguir uma análise rápida, conveniente ou mais exata. Nas reações de derivatização é possível proporcionar o aumento da volatilidade e diminuir a polaridade e reatividade química, resultando em picos simétricos e de fácil quantificação. Outra razão freqüente para a derivatização do analito é a introdução de grupos específicos, o que possibilita o uso de detetores mais sensíveis (Smith, 1988; Lanças, 1993).

Os compostos clorofenólicos não apresentam características favoráveis para análise direta por CG devido à sua elevada polaridade, reatividade química e baixa pressão de vapor, podendo

causar adsorção e caudas nos picos cromatográficos. Desta maneira, eles precisam ser derivatizados. Há vários métodos de derivatização estabelecidos, destacando-se a pentafluorobenzilação, acetilação e metilação (Cruz & Wells, 1992).

Como qualquer fenol, o grupo hidroxila dos clorofenóis participa de reações nucleofílicas, podendo formar ésteres com ácidos orgânicos ou inorgânicos (anidrido acético ou tricloroacético) e éteres com agentes alquilantes (brometo de pentafluorobenzila, iodeto de metila ou diazometano). No caso de pentaclorofenol (PCP), o efeito elétron-sacador dos cloros presentes no anel aromático é mais pronunciado que os demais clorofenóis, conferindo a esta molécula inesperado caráter ácido (pK_a próximo ao do ácido acético) e relativa fraca nucleofilicidade. Desta maneira, o rendimento da reação de derivatização de PCP é função, principalmente, do agente derivatizante utilizado. Assim sendo, agentes volumosos como N-heptafluorobutirilimidazol (HFBI) podem ocasionar diminuição do rendimento de derivatização. Como na presente pesquisa avaliou-se a derivatização do PCP por metilação com o uso de diazometano, e por acetilação com uso de anidrido acético, estes dois procedimentos são assim resumidos segundo Lanças (1993):

(a) Metilação - reação de alquilação de clorofenóis utilizando solução de diazometano (CH_2N_2) ocorre em fase orgânica, conforme descrito na eq. (1):

Diferentes solventes tais como acetona, diclorometano, iso-octano ou hexano parecem ter pouco efeito sobre a eficiência da metilação. Rendimentos superiores a 80% para reações otimizadas têm sido encontrados.

(b) Acetilação - a acetilação de compostos clorofenóis utilizando anidrido acético se processa em fase aquosa, convertendo o grupo hidroxil em acetato, conforme descrito na eq. (2):

O pH da solução determina a eficiência da derivatização. Valores de pH acima de 11,5 a hidrólise do anidrido acético é mais acentuada que a acetilação e a valores abaixo de 6,0 a derivatização não ocorre, pois os íons fenóxidos não são formados. O pH ótimo para a reação ser completa difere para cada composto clorofenólico, em função dos diferentes valores de pK_a . Alguns autores concluíram que a metilação é a técnica de derivatização mais efetiva para determinação do PCP por GC/ECD (Cruz & Wells, 1992; Zuin, 1997; Damianovic, 1997).

O diazometano é um bom agente metilante, contudo, é potencialmente cancerígeno e explosivo e, portanto, requer cuidados na sua manipulação, devendo ser usado em solução etérea gelada. É empregado para derivatizar o PCP em amostras de alimentos, tecidos animais, água, etc. (Cruz & Wells, 1992). Outros agentes metilantes menos perigosos tal como o iodeto de metila estão sendo também pesquisados (Veningerová *et al.*; 1997; Cruz & Wells, 1992; Gabelish *et al.*; 1996).

Vários trabalhos utilizaram a acetilação com anidrido acético como técnica de derivatização do PCP com bons resultados (Cruz & Wells, 1992; Abrahamsson & Ekdahl, 1993; Polese & Ribeiro, 1998; Albanis & Danis, 1999). Um inconveniente da acetilação está nos derivados acetilados não estáveis formados, o que dificulta o armazenamento das amostras acetiladas no escuro ou a baixas temperaturas (Cruz & Wells, 1992).

Quanto à detecção, os sistemas mais comumente aplicados para as análises de compostos organoclorados são o detector por ionização de chama (FID) e o detector por captura de elétrons (ECD) (Smith, 1988; Lanças 1993). O FID basicamente trata de um conjunto de eletrodos cuja função é coletar os íons gerados durante a combustão da amostra numa chama de hidrogênio. Por sua vez, o ECD baseia-se na captura de elétrons oriundos da ionização das moléculas do gás de arraste, geralmente nitrogênio, por uma lâmina contendo fonte radioativa (^{63}Ni ou ^3H) (Smith, 1988; Lanças, 1993).

O objetivo primordial da quantificação é determinar o quanto de cada espécie está presente na amostra analisada. Assim, para realizar a análise quantitativa de um composto é necessário relacionar o dados obtidos, na forma de picos, com a concentração. Os principais procedimentos para a análise quantitativa são normalização, normalização da área corrigida, padrão externo ou interno e adição de padrão (Lanças, 1993).

No presente trabalho, ênfase a metodologias utilizadas para a análise do PCP em matrizes sólidas foi necessária a fim de adaptar um método para a realização da análise do sedimento marinho. Dentre os trabalhos consultados estão os de Albanis & Danis (1999); Polese & Ribeiro (1998); Veningerová *et al.* (1997); Abrahamsson & Ekdahl (1993).

Abrahamsson & Ekdahl (1993) analisaram vários compostos orgânicos halogenados, dentre eles o PCP em água e sedimento de um ambiente marinho pela extração líquido-líquido. As amostras passaram por pré-tratamento com bicarbonato de sódio para elevar o pH até 9 e com isso favorecer a forma dissociada dos fenóis. As amostras foram então derivatizadas com anidrido acético por poucos minutos, seguindo a extração líquido-líquido com a utilização de 1 mL de hexano como solvente, por 3 minutos. O padrão interno utilizado foi 2,6 dibromofenol. Os extratos foram analisados por meio de cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. Segundo os autores, este método foi capaz de determinar clorofenóis no sedimento na concentração de 0,1 ng/g de sedimento seco, utilizando apenas 1 g de sedimento. Para as amostras de água, o limite de detecção do pentaclorofenol foi próximo a 1 ng/L. Os autores não mencionaram a recuperação do método.

Veningerová *et al.* (1997) analisaram clorofenóis, benzenos e inseticidas de amostras de água superficial e subterrânea. Estes analitos foram extraídos destas matrizes por meio da extração em fase sólida, com o emprego de discos da marca Empore, utilizando metanol e acetona como solvente. Para amostras de solos e vegetais foi desenvolvido um método simultâneo de destilação/extração com vapor de água e tolueno, e aplicando a extração com

diclorometano. Este método foi elaborado também para amostras de lodos. O padrão interno utilizado foi 2,6 dibromofenol. Os extratos foram derivatizados com brometo de pentafluorobenzila (PFBB_r), sendo a reação catalisada por carbonato de potássio (K₂CO₃) e submetidos à “clean-up” com colunas de florisil. A determinação dos extratos derivatizados foi feita utilizando-se a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. A recuperação dos métodos foi acima de 70% com desvio padrão abaixo de 14%. O limite de detecção para as matrizes líquidas foi de 0,0003-0,0006 µg/L e para as sólidas foi de 0,0005-0,0009 mg/Kg. Ambos os métodos de extração, apesar de apresentarem boa recuperação, são realizados em muitas etapas, sendo bastante complexos.

Albanis & Danis (1999) analisaram vários compostos clorofenólicos, entre eles o PCP, de amostras de solo e sedimento de ambientes que não apresentavam histórico de uso de pesticidas ou emissão de fontes de poluição industrial. Os autores doparam as amostras com concentrações pré-estabelecidas de uma mistura de fenóis e a extração foi realizada por ultrassom e disco “Empore”. Uma fração dos extratos foi acetilada com anidrido acético e outra não sofreu derivatização. Ambos os extratos foram analisados por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG/ECD) e com detector de ionização de chamas (CG/FID). Os autores concluíram que as amostras de solo e sedimento derivatizadas apresentaram melhores resultados que as amostras não derivatizadas, sendo o ECD o melhor detector para a análise de clorofenóis nas condições experimentais estudadas. A recuperação dos clorofenóis, inclusive do pentaclorofenol para amostras de sedimento aumentou após a acetilação, variando de 95,3 - 112,8% quando o pentaclorofenol foi detectado pelo FID e de 103-115% quando detectado pelo ECD.

No trabalho desenvolvido por Polese & Ribeiro (1998), amostras de solo foram analisadas quanto à presença de hexaclorobenzeno (HCB) e pentaclorofenol (PCP) pela extração com hexano e acetona em banho ultrassônico por 40 minutos. Os extratos orgânicos foram transferidos para a fase aquosa com solução alcalina de K₂CO₃ 3% e então submetidos simultaneamente ao processo de derivatização por acetilação e extração dos analitos acetilados para a fase orgânica com a utilização de hexano. A fase orgânica foi analisada em cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. A recuperação do método com relação ao PCP para amostras dopadas com 10, 40 e 200 ng/g foi de 88-101%.

Xie (1983) analisaram amostras de sedimento quanto à presença de clorofenóis e hexaclorobenzenos. Estes analitos foram extraídos da matriz em solução alcalina (Na₂CO₃ 0,1M) e então submetidos simultaneamente ao processo de derivatização por acetilação e extração dos analitos acetilados para a fase orgânica com a utilização de hexano. Em ambos os métodos, os extratos orgânicos foram analisados por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. A recuperação do método com relação ao PCP para amostras dopadas com

55; 25 e 50 ng PCP/g sedimento (ug/Kg) foi na faixa de 96-99%, utilizando-se apenas 1g de sedimento seco.

A determinação de PCP e seus congêneres em matriz líquida por cromatografia gasosa é bem mais simples quando comparada com matriz sólida complexa (sedimentos e solos) e ocorre pela extração líquido-líquido, utilizando-se solventes aquosos alcalinos, como soluções de K_2CO_3 e Na_2HPO_4 ou orgânicos tais como o hexano (Damianovic, 1997; Stuart & Woods, 1998). A derivatização dos analitos pode ser feita com diazometano (DAMIANOVIC, 1997) ou com anidrido acético (Stuart & Woods, 1998).

A grande maioria dos trabalhos pesquisados sobre a análise de PCP e congêneres em efluentes de bioreatores utiliza a acetilação como método de derivatização (Voss *et al.*; 1981; Abrahamsson & Xie, 1983; Nicholson *et al.*, 1992; Perkins *et al.*, 1994; Stuart & WoodS, 1998; Zou *et al.*, 2000). A recuperação do método de extração geralmente é muito boa, em torno de 90-100%, para dopagem de 0,3 ug/L (Abrahamsson & Xie, 1983) e os limites de detecção estão na faixa de 1-2ng/L (Abrahamsson & Xie, 1983; Stuart & Woods, 1998).

Vários autores (Voet *et al.*, 1999; Causon, 1997; Wieling *et al.*, 1996 e Polesello, 1996) enfatizaram que ao desenvolver ou mesmo adotar um método analítico de outrem é fundamental que o mesmo seja validado nas condições de trabalho a ser utilizada. Esta prática assegura a confiabilidade dos resultados obtidos podendo ser interpretados satisfatoriamente, e com isso verificar se o método a ser adotado é aceitável ou não para o objetivo que foi proposto. De acordo com os autores, o processo de validação para métodos cromatográficos envolve a análise de critérios como recuperação, gráfico de calibração, sensibilidade, seletividade ou especificidade, estabilidade, exatidão, precisão e, finalmente, robustez.

A recuperação pode ser absoluta ou relativa. A primeira é definida como sendo a razão da resposta obtida para a matriz dopada e processada seguindo todas as etapas do procedimento analítico com a solução padrão contendo a mesma quantidade do analito a ser analisado na matriz, mas injetada diretamente no cromatógrafo (Buick *et al.*, 1990 *apud* Hubert *et al.*, 1999). A recuperação relativa ocorre quando a solução padrão é submetida à pelo menos uma etapa do procedimento analítico a que a matriz é submetida, incluindo até mesmo a derivatização (Buick, *et al.*; 1990 *apud* Hubert *et al.*; 1999). A fórmula utilizada para o cálculo da recuperação é:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{resposta do analito na matriz dopada (processada)}}{\text{resposta do analito na solução padrão}} \times 100 \quad (3)$$

Assim, caso a solução padrão não tenha sido submetida a nenhuma etapa do procedimento analítico, a fórmula 3 fornece a recuperação absoluta. Quando foi submetida, tem-se a recuperação relativa. A recuperação é estabelecida quando se trabalha com concentrações baixas, médias e altas do analito, com no mínimo cinco réplicas (CAUSON, 1997). Embora seja desejável obter valores de recuperação do analito próximos a 100%, recuperações de no mínimo 50% são aceitáveis nos casos em que não é necessária elevada sensibilidade do método (Causon, 1997). A recuperação do padrão interno utilizado deve ser no mínimo 15% da determinada pelo analito (Causon, 1997).

O gráfico de calibração de um determinado método analítico é a relação existente entre a resposta (sinal) e a concentração (quantidade) do analito na amostra. Para a construção do gráfico de calibração, trabalha-se com réplicas de no mínimo três de soluções padrão com concentrações pré-estabelecidas do analito (amostras padrão). É essencial que as amostras padrão englobem toda a faixa de concentração requerida nas análises subsequentes com as amostras testes (Miller & Miller, 1993). Snyder *et al.* (1991) aconselharam a trabalhar na faixa de 50, 75, 100, 125 e 150% dos níveis esperados nas amostras testes, isto porque, segundo estes mesmos autores, esta faixa de trabalho tem o potencial de demonstrar que o método é linear fora dos limites esperados para uso (entre 90 e 110%).

As soluções padrão devem ser preparadas no mesmo solvente utilizado na extração dos analitos da matriz, devendo ser diretamente injetadas no instrumento analítico sob as mesmas condições a serem empregadas para as amostras testes.

É importante incluir o sinal da “amostra branca” no gráfico de calibração, pois mesmo que o branco por definição não contém nenhum analito adicionado, ele é submetido à mesma sequência de procedimento analítico que as demais amostras, e frequentemente o sinal do instrumento para a amostra branca será diferente de zero (Causon, 1997; Miller & Miller, 1993).

O gráfico de calibração (sinal obtido do equipamento plotado no eixo y e a concentração do analito no eixo x) ao ser estabelecido permite que a concentração do analito em qualquer amostra teste seja obtida por interpolação, dentro de certos limites de confiança (Miller & Miller, 1993). A relação existente entre o sinal e a concentração é então ajustada por modelos matemáticos de regressão. Esta relação pode ser linear, mas algumas vezes, como por exemplo, quando se trabalha com ampla faixa de concentração, modelos não lineares são melhores ajustados. Nos casos em que o gráfico de calibração é construído pelo método da adição de padrão, a concentração do analito é determinada por extrapolação. Este método é utilizado quando a matriz utilizada (amostra padrão) já contenha previamente o analito a ser analisado (Causon, 1997; Miller & Miller, 1993).

A sensibilidade de um método analítico é determinada a partir do coeficiente angular do gráfico de calibração. O método é sensível quando pequenas alterações na concentração causam grandes alterações no gráfico de calibração (Causon, 1997). Na prática a sensibilidade é

avaliada por meio do limite de quantificação (LQ) e do limite de detecção (LD). O primeiro é definido como a concentração mínima que pode ser quantificada pelo método. O segundo é definido como a concentração mínima que pode ser detectada pelo método. Qualquer concentração da amostra teste que esteja fora da faixa utilizada na calibração não pode ser interpolada a partir do gráfico (Miller & Miller, 1993). Ainda, o LD é igual a concentração do analito que resulta em um sinal igual ao sinal do branco (Y_B) mais duas vezes o desvio padrão do branco (S_B), podendo portanto ser calculado pela eq. (4):

$$LD = y = 3S_B + Y_B \quad (4)$$

Polesello (1996) e Causon (1997) comentaram que o limite de quantificação pode ser calculado como sendo a concentração do analito que resulta em relação Sinal/Ruído (S/R) = 10, porém é melhor considerar o LQ como sendo a concentração do analito a qual a precisão do método torna-se inaceitável. Isto ocorre quando o Desvio Padrão Relativo (RSD) se aproxima de 20%. Snyder *et al.* (1991) consideraram a precisão inaceitável com valores de $RSD > 3\%$.

Estes parâmetros são afetados pelas condições de separação: colunas, reagentes, e especialmente pela instrumentação. As trocas na instrumentação, particularmente sistemas de bombeamento e detectores podem afetar os resultados, produzindo alterações na linha de base e com isso alterar o LQ e o LD (Snyder *et al.*, 1991).

Dados de estabilidade são requeridos para demonstrar que a concentração do analito na amostra no tempo da análise corresponde à concentração do analito no tempo da amostragem. É importante também para demonstrar que reagentes, soluções padrão, matriz e amostras processadas são estáveis por determinado tempo. Este parâmetro deverá ser determinado durante a fase de validação do método, armazenando amostras processadas por tempos pré-estabelecidos de acordo com o cronograma de trabalho adotado.

A estabilidade das amostras armazenadas deve ser comparada com amostras processadas e injetadas numa mesma corrida analítica, sendo que variações acima de 10% comprometerão a integridade dos resultados obtidos (Hill, 1994 *apud* Causon, 1997).

A exatidão de um método analítico é a medida do erro sistemático, definido como a relação entre o valor obtido e o valor verdadeiro. O valor verdadeiro pode provir de amostras de referência ou pode-se assumir como sendo a concentração da solução padrão. A exatidão é avaliada para cada concentração utilizada. É reportada como porcentagem de erro calculado a partir da eq.(5). Um erro maior que 15% compromete os resultados (Causon, 1997). Teste t – student são também adotados (Polesello, 1996).

$$\% \text{ Erro} = [(\text{valor obtido} - \text{valor verdadeiro})/\text{valor verdadeiro}] * 100 \quad (5)$$

A precisão de um método analítico é a medida do erro randômico, e é avaliada comparando-se os valores obtidos das réplicas de uma mesma amostra (Causon 1997; Snyder *et al.*, 1991). A precisão considera: - Repetibilidade: é a precisão dentro de um mesmo ensaio, ou seja, é a habilidade de repetir a mesma metodologia com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes em um curto período de tempo, por exemplo, 1 dia; - Precisão intermediária: é a precisão intra-ensaio, ou seja, a habilidade de reproduzir a mesma metodologia sob condições diferentes, troca do analista, reagentes ou equipamentos, mas dentro de um mesmo laboratório; - Reprodutibilidade: examina a precisão entre laboratórios e é freqüentemente determinada em estudos colaborativos ou em transferências de métodos. A precisão é analisada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD), sendo expressa pela eq. (6):

$$\% \text{ CV} = (\text{desvio padrão}/\text{média}) * 100 \quad (6)$$

Um erro maior que 15% compromete os resultados (Causon, 1997). A precisão pode também ser analisada pelo teste de significância F-test (Polesello, 1996).

A robustez de um método analítico é a sua habilidade de não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros do método, tais como trocas nas condições do laboratório, reagentes e outros materiais utilizados. É a última etapa na validação do método, e deve ser avaliada por meio de um planejamento experimental estatístico bem definido, de modo que os parâmetros de relevância que possam afetar a eficiência do método sejam avaliados simultaneamente (Snyder *et al.*, 1991). A robustez é um parâmetro muito importante quando se pretende transferir o método desenvolvido para outros laboratórios (Polesello, 1996).

3.5. Técnicas da biologia molecular utilizadas no estudo da diversidade de microrganismos

3.5.1. Considerações gerais

O estudo das comunidades microbianas levanta questões sobre a composição, estrutura e estabilidade dessas comunidades, bem como a atividade e função de seus componentes. Técnicas microbiológicas tradicionais e observação microscópica são inadequadas para responder a estas questões, uma vez que menos de 1% da diversidade de microrganismos pode ser cultivada empregando-se os métodos tradicionais de isolamento seletivo e cultivo em laboratório (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995).

Neste contexto, a aplicação de técnicas da biologia molecular oferece novas oportunidades para a análise da diversidade microbiana. Para tanto, ácidos nucleicos (DNA ou RNA) são extraídos de populações microbianas mistas e usados em diferentes estratégias de estudo para determinar a complexidade da comunidade e identificar membros na população. A análise do DNA fornece informação sobre a composição de espécies ou “estrutura” de comunidades microbianas, ao passo que a análise do RNA pode revelar a atividade metabólica ou “função” de populações microbianas particulares (Muyzer *et al.*, 1996).

Para estudar a diversidade estrutural de comunidades microbianas, o gene que codifica para RNAr 16S (subunidade 16S do RNA ribossômico) é especialmente útil, pois: (i) está presente em todas as células procarióticas e em grande número, o que facilita a sua detecção; (ii) apresenta regiões altamente conservadas, variáveis e altamente variáveis ao longo da molécula. As regiões conservadas podem ser usadas para ancorar *primers* (oligonucleotídeos sintéticos de 20-30 bases de extensão usados como iniciadores na reação do PCR - “*polymerase chain reaction*”) e comparar organismos dentro de um mesmo reino ou domínio, e as regiões variáveis podem ser usadas para distinguir seqüências umas das outras, e conseqüentemente, identificação genética dos microrganismos; (iii) apresenta informação de seqüência suficiente para inferência filogenética. Além disso, cerca de 10.000 seqüências estão disponíveis em bases de dados de livre acesso, tais como RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA; <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (OLIVEIRA, 2000).

Entretanto, muitas vezes, a molécula de DNAr não oferece variação suficiente para diferenciar linhagens dentro de espécies. A análise de seqüências intergênicas espaçadoras entre o DNAr 16S e 23S pode gerar maior variabilidade a fim de investigar organismos no nível intra-específico (Gürtler & Stanisich, 1996 *apud* Oliveira, 2000).

Dentre as técnicas utilizadas para análise da diversidade microbiana está a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE - “*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”) e

hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH – “*fluorescent in situ hybridization*”). O FISH também é utilizado para identificação filogenética e quantificação de microrganismos.

3.5.2. A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica do DGGE (“*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”) permite a separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Devido a isso, pode-se detectar até 95% de todas as substituições em uma única base (nucleotídeo) entre as seqüências de até 500 pares de base de comprimento (Valleys *et al.*, 1997).

A dissociação ocorre em um assim chamado “domínio de dissociação”, quando há a desnaturação dos pares de base devido ao aumento da concentração do desnaturante. Uma vez no domínio de dissociação com a concentração de dissociação mínima alcançada, ocorre a transição da forma helicoidal do DNA para a forma de um fragmento parcialmente dissociado e a migração então cessa. Esse gradiente de concentração no domínio de dissociação está relacionado com uma posição particular no gel. A variação de seqüências resulta em diferentes domínios de dissociação com diferentes gradientes de concentração. Logo, seqüências variantes de fragmentos particulares irão parar de migrar em diferentes posições no gel, sendo assim, separados (Oliveira, 2000).

Para a separação pelo DGGE, fragmentos específicos do gene para RNAr 16S têm de ser amplificados por PCR. Produtos de PCR obtidos com um conjunto de *primers* que se anelam a regiões conservadas do gene para RNAr 16S e abrangem uma, ou até três, regiões variáveis têm sido utilizados. Se um conjunto de *primers* universais for utilizado, o padrão de bandas obtido (*fingerprint*) representa fragmentos amplificados a partir de cópias das regiões conservadas do gene para RNAr 16S dos organismos mais dominantes nestas populações. O *fingerprint* por DGGE, associado ao seqüenciamento das bandas e análise filogenética, é uma das técnicas que tem sido mais empregada nos estudos da diversidade estrutural de comunidades microbianas (Manfio *et al.*, 1999; Muyzer *et al.*, 1996; Teske *et al.*, 1996). A Figura 4 adaptada de Sanz (2002) e Cattony (2001), ilustra uma representação esquemática do DGGE.

Análise Filogenética

Figura 4. Representação esquemática do DGGE. Os ácidos nucleicos são extraídos da amostra e os genes para DNAr 16S são amplificados por PCR. Fragmentos amplificados são separados mediante eletroforese desnaturante. Para isso, géis de poliacrilamida com diferentes concentrações de uréia-formamida são utilizados. Na Figura, o gel do DGGE apresenta um gradiente de concentração desnaturante de 45-65%. Cada molécula se move até o pólo positivo e deixa de se mover quando a concentração de uréia-formamida provoca a sua desnaturação. Na figura do gel de DGGE, houve a separação de dois fragmentos de DNA que diferem entre si em apenas um par de bases na sua constituição. Idealmente, cada banda obtida no DGGE corresponde a um microrganismo na amostra original. As bandas podem ser recortadas e o DNA seqüenciado. Comparando-se as seqüências resultantes com uma base de dados do 16S DNA de bactérias e arqueas, pode-se fazer afiliações filogenéticas (SANZ, 2002; CATTONY, 2001)

Ainda há a possibilidade de se analisar o RNA ribossômico (RNAr), o que pode ser uma vantagem em certos casos, gerando *fingerprints* das espécies metabolicamente ativas dominantes (Oliveira, 2000).

De acordo com Oliveira (2000), padrões de bandas muito complexos, como ocorre em comunidades microbianas que têm um grande número de espécies igualmente abundantes, podem ser difíceis de analisar. Assim, modificações na técnica para aumentar sua especificidade podem ser aplicadas, incluindo: - o desenvolvimento e emprego de *primers* grupo-específicos

para amplificação do gene para RNAr 16S de componentes específicos da comunidade microbiana (*e.g.*, bactérias redutoras de sulfato ou arqueas metanogênicas). Parece ser a estratégia mais promissora para detalhar uma comunidade complexa e rastrear especificamente a dinâmica de certos grupos, com duas abordagens possíveis: (a) o produto de PCR obtido com *primers* grupo-específicos é analisado diretamente via DGGE; (b) o DNA de comunidades mistas é amplificado primeiro com *primers* grupo-específicos que incluam uma região do gene para RNAr 16S usada para amplificação com os *primers* universais. O produto de PCR obtido é, a seguir, usado como molde para um segundo PCR com os *primers* universais. Em paralelo, o DNA da comunidade pode ser amplificado diretamente com os *primers* universais, permitindo a comparação do padrão de bandas dos constituintes dominantes de um certo grupo com o padrão obtido para os constituintes dominantes da comunidade; - hibridização dos padrões de DGGE com sondas de oligonucleotídeos grupo-específicas. Entretanto, um pré-requisito para o desenho de sondas apropriadas é a disponibilidade de dados sobre a sequência e a presença de DNA específico suficiente dentro o DNA amplificado da comunidade para a análise de DGGE.

Dentre as vantagens e limitações apresentadas pela técnica do DGGE segundo Sanz (2002) e Oliveira (2000), pode-se citar: (a) vantagens: - a técnica permite estudar de maneira relativamente rápida e simples a variabilidade espaço – temporal das populações, pois adota padrões de bandas; - permite de maneira relativamente rápida ter uma idéia global das espécies predominantes no ecossistema que se está estudando; - é adequada para analisar um grande número de amostras quando comparada com outras técnicas tal como a clonagem; - permite enfocar esforços na busca diferencial de representantes dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*; (b) limitações: - dependendo do tipo de amostra, podem aparecer problemas na extração e amplificação de DNA representativo das populações presentes; - genes excepcionalmente ricos em GC não são facilmente analisados, pois é muito difícil de separar as bandas no gel; - o método envolve o uso de substâncias tóxicas como formamida; - de maneira ideal, uma banda observada no gel de DGGE corresponde a uma linhagem de bactéria analisada. Entretanto, para algumas linhagens, duas ou mais bandas têm sido detectadas. Isto pode ser decorrente da heterogeneidade de sequência dos operons RNAr. Por outro lado, existem exemplos onde mobilidades eletroforéticas similares foram observadas entre linhagens proximamente relacionadas ou mesmo entre linhagens filogeneticamente não relacionadas. Isto deve ser levado em consideração quando o número de bandas é usado como uma medida da diversidade; - relações filogenéticas menos confiáveis quando comparado com as obtidas com a sequência completa do gene, uma vez que a informação de sequência obtida com o DGGE é limitada, pois a separação de produtos de PCR maiores que 500 pb (pares de bases) é reduzida; - é uma técnica não quantitativa.

De acordo com Sanz (2002) e outros pesquisadores citados em Oliveira (2000), o DGGE é uma técnica muito apropriada não somente para caracterizar comunidades complexas, como

também para inferir afiliação filogenética dos membros da comunidade, testar pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais e acompanhar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema.

Sanz (2002) utilizou esta técnica para estudar as populações microbianas e sua evolução em perfis de sedimentos marinhos com indícios da ocorrência da degradação anaeróbia de alquilbenzenos sulfonados (LAS), relacionando os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Sakamoto (2001) utilizou a técnica do DGGE para comparar a estrutura de comunidades microbianas complexas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso. Esta autora verificou uma estrutura de comunidade microbiana complexa, e que algumas populações eram semelhantes e persistiram nos três sistemas. As mudanças na estrutura da comunidade possivelmente estavam relacionadas com as alterações operacionais do sistema, como idade do lodo e vazão de recirculação interna.

Cattony (2001) utilizou a técnica do DDGE para avaliar os efeitos do aumento da temperatura, causado pela queima de um canavial, na estrutura da comunidade bacteriana do solo com ênfase no grupo dos actinomicetos. Os resultados obtidos para as populações de actinomicetos não foram conclusivos e os obtidos para a comunidade bacteriana não revelaram alterações na estrutura da mesma após a queima do canavial.

Brucha (2001) utilizou a técnica do DGGE com *primers* do Domínio *Archaea e Bacteria* para verificar a diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno (TCE). No final do experimento, morfologias semelhantes a *Methanosarcina* e *Methanosaeta* estavam presentes. O resultado do DGGE analisado de amostras do sedimento enriquecido antes e após a adição de TCE, demonstrou que não houve uma mudança significativa da comunidade e, portanto a microbiota enriquecida foi resistente às concentrações de TCE estudada (6 e 12 mg/L) podendo ser responsável pelo processo de degradação sob metanogênese.

Tartakovsky *et al.* (2000) correlacionaram os intermediários clorados com o aparecimento de bandas no DGGE de um reator UASB (“*upflow anaerobic sludge bioreactor*”) operado com glicose e com aumentos progressivos de PCP. O seqüenciamento das bandas mais relevantes do gel de DGGE revelaram a proliferação de *Clostridium* e *Sybtrophobacter/Syntrophomonas* spp. durante a degradação do PCP. Estes autores relacionaram o gênero *Clostridium* com a degradação direta do PCP e *Sybtrophobacter/Syntrophomonas* spp. com o consumo dos ácidos orgânicos intermediários e do benzoato.

3.5.3. Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

Outra técnica bastante utilizada pela biologia molecular é o “FISH - *fluorescent in situ hybridization*” – ou hibridização *in situ* com sondas fluorescentes. É um método direto que permite identificar células individuais e morfológicamente intactas, presentes em ecossistemas complexos. Para isso sondas de oligonucleotídeos, que são seqüências curtas de DNA contendo de 17 a 34 nucleotídeos, são utilizadas. Cada célula ativa contém entre 10^3 e 10^5 ribossomos e parte destes são os RNAs ribossomais (RNAr 5S, RNAr 16S e RNAr 23S). Algumas regiões dos RNAs ribossomais, como a 16S, estão acessíveis para a hibridação, que significa que é possível ligar a sonda de oligonucleotídeo, complementar à uma certa região do RNAr. As células hibridadas apresentam sinal fluorescente, sendo facilmente visualizadas por microscopia ótica de fluorescência (Moter & Göbel, 2000).

O FISH é uma técnica que se destaca tanto entre os métodos moleculares quanto entre os tradicionais, pois combina a precisão da biologia molecular com a informação visual da microscopia. Uma vez que a hibridização ocorre com as células íntegras, as mesmas podem ser detectadas, visualizadas e quantificadas em seus microhabitats naturais sem a necessidade de cultivo. Com esta técnica pode-se não somente determinar a morfologia da célula de um organismo não cultivado e a sua abundância, como também analisar a sua distribuição espacial *in situ*. (Moter & Göbel, 2000; Amann *et al.*, 1995). Um importante avanço na aplicação desta técnica em amostras ambientais foi o desenvolvimento de sondas marcadas com compostos fluorescentes - fluorocromos. Tais compostos possuem uma melhor resolução se comparados com o uso de sondas radioativas, não necessitam de passos de detecção adicionais e são mais seguros no manuseio. Além disso, é possível utilizar fluorocromos que são excitados por luz de comprimentos de onda diferentes e, conseqüentemente, emitem luz de cores diversas, permitindo assim a detecção de várias seqüências-alvo em uma única hibridação. Dependendo das sondas utilizadas, o FISH pode ser usado para detectar microrganismos de diferentes níveis filogenéticos. Há sondas desenvolvidas tanto para detecção generalizada de organismos pertencentes a grupos taxonômicos de hierarquia elevada, como os Domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, quanto para detecção de grupos taxonômicos específicos, incluindo organismos pertencentes a um mesmo gênero, espécie e ou ainda em nível linhagem-específica (Amann *et al.*, 1995 *apud* Araújo, 2001; Moter & Göbel, 2000).

Um aspecto importante a ser comentado a respeito das sondas está relacionado à sua aplicação em paralelo com sub-amostras, numa abordagem do geral para o específico, inicialmente usando-se uma sonda universal e três sondas Domínio-específicas, seguidas por outras bem mais específicas (em nível de espécie, por exemplo). Assim, aumenta-se o refinamento da informação sobre a diversidade da comunidade (Araújo, 2001).

A aplicação do FISH pode ser feita em membranas de filtração ou em lâminas de imunofluorescência e segue basicamente os seguintes passos: fixação e preparação da amostra, incluindo passos específicos de pré-tratamento; hibridação com as sondas fluorescentes, lavagem para a remoção de sondas não ligadas ao RNAr 16S, montagem da lâmina; visualização e documentação dos resultados. A Figura 5, baseada em Abe (1998) *apud* Domingues (2001) apresenta um desenho esquemático dos procedimentos da técnica do FISH.

Figura 5. Processo de hibridização *in situ*: fixação, hibridização, lavagem e detecção (Abe, 1998 *apud* Domingues (2001))

A etapa de fixação mantém a integridade celular, especialmente a quantidade ribossomal, uma vez que as células serão sujeitas a altas temperaturas e concentrações de formamida durante o processo de hibridização. Esta etapa também aumenta a permeabilidade da membrana celular facilitando a entrada da sonda no interior da célula. A etapa de hibridização corresponde à ligação específica da sonda à sequência alvo do RNAr. Para tanto, é preciso seguir corretamente o protocolo. A temperatura exigida para cada sonda, corresponde àquela de dissociação, na qual a estrutura secundária da molécula de RNAr é desfeita. A dissociação é necessária para que o oligonucleotídeo fluorescente se ligue às bases complementares da cadeia simples de RNAr. Porém, a molécula de RNAr pode desnaturar-se, caso a temperatura de dissociação seja ultrapassada (Stahl & Amman, 1991 *apud* Domingues *et al.*, 2002).

Os protocolos de fixação foram bem testados para as bactérias gram-negativas. As bactérias gram-positivas podem apresentar problemas de permeabilidade à sonda. Neste caso, pode-se realizar a fixação com etanol, usar tratamento com lisozima e EDTA, ou mutanolisina (no caso de metanogênicas), ou ainda fixar as células por período curto em mistura de álcool/formaldeído (Araújo *et al.*, 2000; Moter & Göbel, 2000).

No caso de biofilmes, a técnica FISH é bastante informativa, pois permite identificar, com os biofilmes fixados no suporte, as células microbianas presentes em cada camada do mesmo (através da utilização de microscópio confocal de varredura a laser – CSLM), refletindo associações metabólicas obrigatórias ou preferenciais, dado o caráter de consórcio microbiano dos biofilmes e inter-dependência de diferentes grupos de microrganismos. Além disso, pode-se com os biofilmes em suspensão, nos quais as células foram removidas do suporte, concentradas e suspensas em meio líquido, quantificar os principais grupos microbianos. Dados obtidos através dessa técnica podem fornecer informações importantes para a avaliação da eficiência de sistemas de tratamento de resíduos (Harmsen *et al.*, 1996). O FISH também possibilita a determinação da atividade metabólica de uma célula por meio da quantificação do sinal fluorescente. Poulsen *et al.* (1993) *apud* Araújo (2002), demonstraram que a diminuição na intensidade do sinal fluorescente estava relacionada com o conteúdo de RNAr da célula procariótica e não com a permeabilidade celular, ou mesmo com problemas na hibridação *in situ*.

Dentre as vantagens e limitações apresentadas pela técnica do FISH pode-se citar, de acordo com os autores (Amann *et al.*, 1995; Sanz, 2002; Araújo, 2002; Moter & Göbel, 2000; Sørensen *et al.*, 1997 *apud* Nakayama, 2002):

(a) vantagens: - método direto e relativamente rápido para caracterizar e quantificar populações microbianas em amostras ambientais e em biorreatores; - permite visualizar microrganismos não cultiváveis; - somente os organismos ativos são detectáveis, ou seja, aqueles que realmente estão participando do processo de degradação de um determinado composto;

(b) limitações: (b.1) existência de amostras autofluorescentes decorrente de qualquer objeto que se interponha no caminho da luz; assim, deve-se ter certeza que as lâminas e lamínulas, o óleo de imersão ou a solução de montagem da lâmina utilizados sejam adequados para o uso em experimentos de FISH; a autofluorescência também pode ser detectada em materiais que rodeiam ou se depositam sobre os microrganismos, como matéria orgânica, fragmentos de plantas ou debris inorgânicos; o maior problema no entanto, está relacionado com a autofluorescência produzida por alguns organismos; -aparentemente, o tipo de meio de cultura, os protocolos de fixação e as soluções de montagem das lâminas parecem ter uma influência considerável na intensidade do sinal; - o uso de filtros com espectros de excitação e emissão mais estreitos também podem diminuir o problema da autofluorescência; (b.2)

inespecificidade de hibridização, que está intimamente ligada à qualidade da sonda; assim, novas sondas devem ser avaliadas com detalhe antes de serem utilizadas rotineiramente; além disso, deve-se garantir a estocagem adequada das mesmas (em temperaturas de -20°C e ao abrigo da luz) para evitar alterações nas moléculas; o uso de linhagens conhecidas que devem produzir sinais positivos e negativos na confirmação da especificidade da sonda também é um controle essencial ao processo; pode-se ainda utilizar sondas que não possuam seqüências complementares a nenhuma espécie conhecida de microrganismo, como é o caso da sonda NON338; ao se fazer a aplicação da sonda NON338 na amostra, a resposta deve ser negativa, garantindo assim que o processo de hibridização foi realizado adequadamente; (b.3) baixa intensidade do sinal: pode ser causada por má qualidade da sonda, ser decorrente do estado fisiológico da célula (quantidade reduzida de ribossomos) ou da dificuldade de acesso da seqüência alvo do RNAr; características da célula, como composição da parede celular, também podem atrapalhar a penetração das sondas, causando redução no sinal; o uso de fluorocromos de sinal mais forte, como o Cy3, ou a adoção de protocolos de pré-tratamento das células podem ajudar a resolver este problema; (b.4) esmaecimento ou perda do sinal do fluorocromo decorrente da exposição à luz durante a observação: a velocidade com que tal fenômeno ocorre depende do corante utilizado e das condições de preparação da lâmina. Como mencionado previamente, o uso de soluções protetoras, o emprego de fluorocromos mais estáveis ou a escolha de filtros com espectros de excitação e emissão de luz mais estreitos podem ajudar a reduzir o problema; (b.5) necessidade de concentração celular próxima a 10^4 células/mL; é importante a concentração celular apresentar-se em torno desse valor, pois também valores muito elevados dificultam a diferenciação e a detecção das células hibridadas e, consequentemente, reduzem a precisão da análise. Assim, é comum as amostras serem concentradas ou diluídas durante sua preparação; (b.6) deve-se ter um conhecimento prévio da amostra para definir quais sondas serão utilizadas ou quais grupos de microrganismos serão monitorados no reator ao longo do tempo de operação; nesse sentido, depende-se de ter a sonda disponível para os grupos de microrganismos de interesse; (b.7) esta técnica é eminentemente taxonômica, não fornecendo informações sobre a função ou características metabólicas dos microrganismos. Uma possibilidade de resolver esta limitação foi empregada por Lee *et al.* (1998) *apud* Sanz (2002), combinando o FISH com microautoradiografias utilizando substratos marcados (^3H , ^{14}C), permitindo assim, localizar atividades metabólicas e identificar os organismos que as realizam. Atualmente, esforços estão sendo centrados para realizar a hibridização *in situ* no RNA mensageiro (RNAm), o que permitirá identificar a presença de microrganismos com uma determinada atividade metabólica; (b.8) a questão da inacessibilidade da região alvo (parte do RNAr 16S) à sonda é um dos problemas mais significativos do FISH, pois infelizmente, a região inacessível compreende locais de maior variação de seqüências do RNAr 16S, as quais seriam altamente valiosas para desenvolver sondas específicas no nível de

gênero e /ou espécie; a utilização de oligonucleotídeos sem marcação fluorescente chamados de “helpers” em conjunto com as sondas fluorescentes, contribuíram para melhorar o sinal de hibridização de sonda que normalmente apresentaram sinal fraco; (b.9) leva-se muito tempo para realizar as contagens sob microscopia de fluorescência, além do que estas estão sujeitas à experiência do observador; (b.10) existência de falsos positivos (células que não apresentam a sequência alvo para a sonda mas que por algum problema na hibridização ou no momento da lavagem, apresentam sinal com a sonda, ou são células autofluorescentes) e falsos negativos.

Montenegro *et al.* (2002a) utilizaram o FISH juntamente com exames microscópicos para caracterizar a comunidade microbiana de um reator anaeróbio híbrido (RAH) alimentado com PCP, uma mistura de ácidos graxos (propiónico, butírico, acético e láctico) e metanol. Os resultados obtidos demonstraram que células de arqueas metanogênicas prevaleceram no RAH antes e após a adição de PCP (2-21 mg/L). Dentre estas células, as da família *Methanosarcinaceae* (MSMX860), morfologicamente semelhantes a *Methanosaeta* e *Methanosarcina* foram as únicas encontradas no reator com PCP na concentração de 21 mg/L. Não foram observadas células das famílias *Methanomicrobiales* (MG1200), *Methanobacteriaceae* (MB1174) e *Methanococcaceae*. (MC1109) Estas autoras observaram ainda, que o PCP selecionou o grupo *Methanosaeta* em detrimento de *Methanosarcina*, uma vez que as porcentagens de células morfologicamente semelhantes a *Methanosaeta* foram iguais a 31,7% e 78,6% e as morfologicamente semelhantes a *Methanosarcina* foram iguais a 16,6% e 2,1%, sem a adição de PCP e com PCP na concentração de 21 mg/L, respectivamente. Este trabalho demonstrou uma possível implicação das metanogênicas acetoclásticas, especificamente *Methanosaeta*, na biodegradação do PCP. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Tsuno *et al.* (1996) e Kennes *et al.* (1996).

Sanz *et al.* (2002) caracterizaram a estrutura de grânulos provenientes de reatores UASB (“upflow anaerobic sludge bioreactor”) de uma indústria de cervejaria alimentados com diferentes substratos, utilizando o FISH e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão para. Estes autores observaram que os grânulos mostraram uma estrutura em multi-camadas, com a presença de bactérias na camada mais externa e arqueias na camada mais interna. A diversidade de bactérias e arqueias metanogênicas aumentou com a complexidade dos substratos. *Syntrophobacteria* (bactéria oxidadora de propionato) hibridada com a sonda SYN 835, foi dominante na biomassa alimentada com propionato. *Methanosaeta* (MX825) foi a espécie dominante na biomassa alimentada com substratos complexos bem como com baixa concentração de acetato. Nos grânulos cultivados com altas concentrações de acetato e formiato, houve o predomínio de *Methanosarcina* (MS1414) e membros da família *Methanobacteriales* (MEB859), respectivamente.

Araújo *et al.* (2000) concluíram que a técnica do FISH em conjunto com a microscopia confocal a laser foram ferramentas adequadas para estudar o desenvolvimento de biofilmes

anaeróbios em diferentes tipos de materiais suportes: hidrofílico (vidro) e hidrofóbico (polipropileno).

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível."*
(São Francisco de Assis)

4. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 6 ilustra um esquema geral do trabalho de pesquisa da presente tese de doutorado.

Figura 6. Esquema geral da proposta de trabalho.

4.1. Procedimentos para preparação e armazenamento de amostras

Limpeza da vidraria - As vidrarias foram lavadas com solução 5% (v/v) de Extran alcalino e enxaguadas em água corrente por diversas vezes para a remoção total do detergente. Após, foram enxaguadas com água destilada (mínimo de três vezes).

Limpeza de tampas de borracha butila com ou sem revestimento de Teflon - As tampas foram fervidas durante 5 minutos em solução de bicarbonato de sódio 1% (m/v). Após resfriamento, a solução de bicarbonato foi descartada e as tampas enxaguadas em água corrente e água destilada. As tampas revestidas de teflon foram utilizadas nos frascos contendo PCP, para evitar a adsorção deste composto.

Mangueiras utilizadas no RAHLF. As mangueiras utilizadas durante a operação do RAHLF com PCP foram as da marca “tygon”, material que não adsorve o composto organoclorado. As mangueiras foram primeiramente autoclavadas. No entanto, este procedimento alterou o diâmetro e estrutura das mesmas, impossibilitando o seu uso. Assim, as mangueiras passaram a ser utilizadas sem prévia esterilização. Elas foram lavadas com solução de Extran 5%, enxaguadas com água corrente e água destilada.

Manutenção das condições de anaerobiose e assepsia das soluções utilizadas no trabalho experimental. As condições de anaerobiose dos ensaios microbiológicos foram mantidas utilizando-se o sistema de distribuição simultânea de gases, baseado no sistema desenvolvido por Balch (1977) detalhadamente descrito em Vazoller (1995), em Sakamoto (1996) e Larizzati (1997).

A assepsia das soluções foi realizada pela esterilização por calor úmido em autoclave ou pela esterilização a frio. A primeira foi utilizada para esterilizar todas as soluções, exceto a de vitaminas. A esterilização em autoclave foi feita a 121°C e 15 psi, por 20 minutos.

O sistema de filtração foi utilizado para esterilizar as soluções de vitaminas. Para a esterilização por filtração, membrana de 0,22 µm foi utilizada. Os procedimentos adotados buscaram manter as condições de assepsia e anaerobiose imediatamente antes e depois das filtrações.

Composição e preparo dos meios de cultivo e soluções estoques

As soluções estoques de bicarbonato de sódio 10% (m/v), sulfeto de sódio 5% (m/v), indicadora de resazurina 0,1% (m/v), anaeróbia de diluição, extrato de levedura 2% (m/v) bem como os meios de cultivo e as soluções de vitaminas foram preparadas segundo procedimentos descritos em Vazoller (1995).

As composições dos meios de cultivo e da solução de vitaminas estão descritas na Tabelas 7 e 7.1.

Tabela 7. Composição dos meios de cultivo Zinder modificado para salino e Biota.

	Meio Basal Zinder 2% salino	Meio Basal Biota
componente	quantidade	quantidade
NH ₄ Cl	0,5 g	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g	0,2 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	1,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g	0,1 g
KCl	-	0,3g
NaCl	17 g	máx 23 g
Solução de resazurina 0,1% m/v	1,0 mL	1,0 mL
Solução traços de metais 1	10,0 mL	-
Solução Traço de metais Vazoller	-	10,0 mL
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL	q.s.p. 1000mL

O volume adicionado da solução traço de metais aos meios de cultivo foi de 0,1 mL para cada 10 mL de meio.

Tabela 7.1. Composição da solução de vitaminas

Solução de vitaminas	
Componente	Quantidade
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g
*Ácido lipóico	0,005 g
*Ácido p-aminobenzóico	0,005 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Fonte: Widdel & Pfennig (1984); Touzel & Albagnac (1983) *apud* Vazoller (1995);
* essencial para BRS

Soluções traço de metais. Duas soluções traço de metais foram preparadas: solução traço de metais 1 solução traço de metais Biota, descritas nas Tabelas 7.2. e 7.3., respectivamente.

Tabela 7.2. Composição da solução traço de metais 1

Solução traço de metais	
Componente	Quantidade
Ácido nitriloacético (NTA)	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,020g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Fonte: Zinder & Koch (1984) *apud* Vazoller (1995).

Tabela 7.3. Composição da solução traço de metais Biota.

Solução traço de metais Biota		
Componente	Quantidade	Ordem
Ácido nitriloacético (NTA)*	1,5g	1
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,556 g	2
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	1,0g	3
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,5g	4
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O.....	0,28g	5
Na ₂ WO ₂ .2 H ₂ O.....	0,165g	6
Na ₂ SeO ₃	0,15g	7
NiCl ₂ .6H ₂ O.....	0,1g	8
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0,1g	9
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1g	10
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,01g	11
AlK (SO ₄) ₂ 12H ₂ O.....	0,02g	12
H ₃ BO ₃	0,01g	13
Água Milli-Q.....	q.s.p.	14
	1000mL	

Procedimentos: dissolver o NTA em 200mL de água padrão Milli-Q; - acertar o pH para 6,5 com uma solução de KOH 10% m/v e adicionar 600mL de água Milli-Q padrão; - dissolver os demais sais na ordem apresentada na Tabela acima e completar o volume para 1000mL com água Milli-Q; - ajustar o pH para 7; - esterilizar a solução por autoclavação, distribuir em frascos Duran de 250mL ou 500 mL e envolver os frascos com papel alumínio; - armazenar sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Soluções de substratos orgânicos - O preparo das soluções estoques de substratos orgânicos está apresentado na Tabela 7.4.

Tabela 7.4. Descrição das soluções estoques das fontes orgânicas

Substratos	Fórmula molecular	Peso molecular	Concent. Final (Molar)	Vol. final (mL)	Massa (g)
Acetato de sódio	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	136,08	2	200	54,432
Formiato de sódio	HCOONa	68,01	2	200	27,204
* Metanol			2	10	
Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	1	100	18,016
Sulfato de sódio	Na_2SO_4	142,04	1	200	28,408
* Lactato de sódio	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	90,05	2	200	-
* Butirato de sódio			0,5	100	-

Solução de metanol 2M - Preparou-se em água Milli-Q, 10 mL de uma solução 2M de metanol. O metanol utilizado apresentou as seguintes características físico-químicas - pureza = 99,9%; - peso molecular = 32,04 g/L; - densidade = 0,799 kg/L = g/mL. A solução foi assim preparada: - distribuir alíquotas de 9,2 mL da água em frascos de antibiótico e transferir 0,8mL de metanol.

Solução de lactato de sódio 2 M – Foi preparada pela mistura de uma solução de ácido láctico 4M com uma solução de hidróxido de sódio 4 M. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 1M.

Solução de butirato de sódio 0,5 M - Foi preparada pela mistura de uma solução de ácido butírico 1M com uma solução de hidróxido de sódio 1 M.

Solução de pentaclorofenol (PCP) em hidróxido de sódio

Esta solução foi preparada para concentração de 5g/L e foi feita em capela como se segue: - pesar 0,25g de pentaclorofenol em um Becker de 50mL; - adicionar 10mL de solução 0,2N de NaOH para dissolver o composto. Caso esteja difícil, adicionar NaOH; - acrescentar água Milli-Q em volume suficiente para cobrir os sensores do eletrodo do pHmetro; manter sob agitação constante em agitador magnético e acertar o pH da solução para cerca de 8, acrescentando ácido fosfórico 5% ou 0,5% (notar que a cada adição de ácido há precipitação de PCP; antes de adicionar mais ácido, deve-se esperar que ocorra novamente a solubilização do composto); - transferir a solução para balão volumétrico de 50mL e completar o volume com água Milli-Q; - transferir a solução final para frascos de

antibiótico, tampar com batoques revestidos de teflon e lacrar com lacres de alumínio; - envolver com papel alumínio; - armazenar no escuro, sob refrigeração.

A utilização das soluções estoques foi feita sob condições de assepsia e anaerobiose.

4.2. Descrição dos pontos e coleta das amostras de sedimento do Estuário de Santos-São Vicente

A Figura 6.1. apresenta os pontos de amostragens das coletas 1 e 2 da região do estuário de Santos – São Vicente (SP). A descrição destes pontos está apresentada na Tabela 7.5. e foram provenientes do relatório da CETESB (2001) que apresenta os resultados do monitoramento desta região no período de 1999 a 2000.

Figura 6.1. Localização dos pontos de amostragem no estuário de Santos – São Vicente (SP).

Tabela 7.5. Descrição dos pontos de amostragem no Estuário de Santos-São Vicente (SP).

Ponto de coleta e descrição	Localização georeferenciada
Ponto 1 – rio Cubatão – barragem da Petrobrás. Água doce, sem influência da cunha salina. Localiza-se à montante de uma barragem, recebe influência do Alto Cubatão e do Canal de Fuga, cuja água vem da Represa Billings, além de receber água da Sabesp e efluentes da Cia Santista de Papel e da Petrobrás.	23° 52' 46,0" S 46° 25' 52,8" W
Ponto 2 – rio Cubatão, à jusante da ponte de ferro. Água doce com influência da cunha salina. Localiza-se perto de uma estrada de ferro, onde há um posto de monitoramento das águas da CETESB. Recebe influência de indústrias como a Ultra Fértil, Fafer, Refinaria Presidente Bernardes, Cia Brasileira de Estireno, além do esgoto de Cubatão.	23° 25' 33,0" S 46° 24' 37,0" W
Ponto 3 – rio Piaçaguera. Água doce com influência da cunha salina. Recebe água do rio Mogi e influência de indústrias como a Coperbrás, Solo Rico, Manah, Ultra Fértil e COSIPA.	23° 52' 22,6" S 46° 23' 34,6" W
Ponto 4 – estuário de Santos, em frente à COSIPA. Água doce com influência da cunha salina, com níveis mais elevados de salinidade, chegando à 21,3‰ no fundo e 3,8‰ na superfície. Recebe influência direta da COSIPA.	23° 52' 31,1" S 46° 22' 35,9" W
Ponto 5 – estuário de Santos, no Largo do Caneus. Água doce com influência da cunha salina. Esta área possui efeito direto de indústrias siderúrgicas.	23° 54' 42,8" S 46° 20' 33,2" W
Ponto 6 – rio Santo Amaro. Água doce com influência da cunha salina, com níveis mais elevados, chegando a 22,6‰ no fundo. Esta área possui um estaleiro que recebe embarcações de pesca.	23° 59' 0,4" S 46° 16' 57,6" W
Ponto 7 – rio Santana. Água doce com influência da cunha salina. Possui boas condições de preservação.	23° 54' 29,8" S 46° 26' 54,6" W
Ponto 8 – rio Branco. Água doce com influência da cunha salina. É relativamente preservado, embora tenha influência de esgoto oriundo de um presídio e de moradores da região.	23° 57' 1,1" S 46° 28' 23,9" W
Ponto 9 – estuário de São Vicente, no canal de Barreiros. Água doce com influência da cunha salina. É influenciado diretamente pelos rios Mariana, Branco e Piaçabuçu, o qual recebe esgoto de São Vicente.	23° 58' 28,4" S 46° 24' 48,7" W

Duas coletas foram realizadas com o apoio da Cesteb, especificamente do Departamento de Análises Ambientais. Ambas as coletas foram realizadas no mês de maio, com intervalo de um ano (2002 e 2003), no período de maré alta.

Na primeira, amostras de sedimento de 7 pontos (pontos 1 ao 7) foram coletadas por pesquisadores do laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). As amostras foram coletadas com pegador de fundo de inox (tipo van Veen), transferidas para um recipiente plástico e estocadas em freezer até o momento de sua utilização. Os sedimentos foram utilizados para os ensaios de determinação cromatográfica de clorofenóis (Etapa 1) e para o cultivo e isolamento de microrganismos na presença e ausência de PCP (Etapa 2 – Enriquecimento 1). O referenciamento geográfico dos pontos foi feito através de aparelho GPS utilizando 6 satélites de referência.

Na segunda coleta, amostras de sedimentos de duas áreas do estuário, uma com menor contaminação - região do Largo do Canéus (ponto 5) e outra com forte contaminação - próximo à Cosipa (ponto 4) foram utilizadas em ensaios de enriquecimento a fim de selecionar inóculos competentes na degradação do PCP em sistemas semi-contínuos (Etapa 3) e contínuo (Etapa 4). Neste sentido, a coleta dos sedimentos foi realizada com cuidados específicos à amostragem e armazenamento de microrganismos anaeróbios.

A coleta foi realizada de barco no dia 23/05/03, no período de maré alta entre 10:00 e 13:00h. As condições de tempo foram boas, sem vento, facilitando o manuseio do amostrador. Os pontos foram georeferenciados com aparelho GPS. Além da coleta de sedimento e água foram realizadas as seguintes análises (aparelho Oring): - no sedimento, pH e temperatura; - na água (superfície e fundo), condutividade, salinidade, oxigênio dissolvido, temperatura e pH. A temperatura do ar também foi medida.

A coleta de sedimento foi feita com amostrador do tipo corer (Figura 6.2 - item a). O amostrador consiste de uma peça de aço inox à qual se prende um tubo de acrílico de 50cm de comprimento e 5,4 cm de diâmetro interno. A peça de aço inox possui uma tampa interna que permanece aberta durante a descida do amostrador e se fecha antes de subir a amostra, formando assim um vácuo que evita que a amostra se perca durante o recolhimento do aparelho. O peso da peça de metal auxilia a penetração do tubo de acrílico no sedimento. Além disso, o aparelho possui um peso móvel, amarrado a uma corda, que pode ser utilizado como um “martelo” e ajudar o tubo a penetrar em sedimentos mais compactos. A fixação do tubo de acrílico na peça de aço inox é feita com o auxílio de duas borboletas e um anel de borracha (O-ring) que promove vedação suficiente para a formação de vácuo no tubo. Durante a coleta, fixou-se o tubo de acrílico no amostrador; arremeteu-se o aparelho até atingir o sedimento; - com o auxílio do peso móvel, forçou-se o tubo a fim de penetrar no sedimento; - removeu-se o amostrador com cuidado, rapidamente evitando-se perder parte da amostra; tampou-se a boca inferior do tubo com tampa de PVC; - desconectou-se o tubo da peça de aço inox e tampou-se imediatamente a outra extremidade;- vedou-se as duas extremidades com fita adesiva e etiquetou. Apesar dos cuidados tomados, por problemas nos orifícios de fixação dos tubos no amostrador, algumas amostras foram afetadas (perda de parte do sedimento) durante a subida do amostrador. Os tubos com as amostras (5 para cada ponto de coleta) foram transportados para o laboratório em isopor com gelo e mantidos assim até o momento do manuseio, no dia seguinte (Figura 6.2)

Para as determinações de pH, temperatura, salinidade, condutividade e oxigênio dissolvido na água, o sensor foi colocado em duas profundidades: perto da superfície e próximo ao sedimento. A profundidade dos pontos de coleta, de 2m, foi determinada utilizando-se um disco. O referenciamento geográfico dos pontos foi feito através de aparelho GPS utilizando 6 satélites de referência.

As amostras coletadas foram transferidas para frascos de vidro do tipo Duran sob fluxo de nitrogênio (100%), seguindo o procedimento: - abriu-se o frasco Duran, acoplou-se um funil de boca larga (no presente trabalho foi uma garrafa de refrigerante PET cortada) e colocou-se o fluxo de nitrogênio através do funil dentro do frasco; - agitou-se o cilindro contendo o sedimento para misturar com a água e formar uma mistura mais líquida; - tirou-se uma das tampas e verteu-se aos poucos o conteúdo do cilindro no funil, cuidadosamente. Antes de verter o sedimento, a pipeta do fluxo de gás foi colocada na boca do funil e manteve-se o fluxo sobre o material; - retirou-se o funil e manteve-se o fluxo de nitrogênio no frasco por 10 minutos no sedimento e 5 na atmosfera livre do frasco; tampou-se o frasco com batoque de butila e tampa de rosca. Os frascos foram estocados sob refrigeração até o momento do uso.

Os cilindros que tinham maior quantidade de sedimento não foram agitados, sendo o conteúdo de água primeiramente transferido para um béquer e mantido sob fluxo de gás. Posteriormente, essa água foi usada para facilitar a passagem do sedimento pelo funil. A Figura 6.2. b ilustra o procedimento adotado para a transferência da amostra de sedimento dos cilindros para os frascos Duran.

Figura 6.2. As fotos mostram: a) amostrador tipo “corer” utilizado para a coleta das amostras de sedimento. b.1.) cilindros com amostras de sedimento do Largo do Canéus (a) e da Cosipa (b); b.2.) procedimento adotado para a transferência das amostras de sedimento para o frascos Duran; c) aspecto geral da região onde foi coletada amostras de sedimento no Largo dos Canéus; d) aspecto geral da região onde foi coletada amostras de sedimento em frente à Cosipa.

4.3. Testes para estabelecimento do protocolo de determinação cromatográfica de clorofenóis no sedimento e na amostra líquida

A partir da pesquisa bibliográfica realizada sobre as metodologias existentes na literatura para a determinação de PCP em matrizes sólidas por cromatografia gasosa, conforme apresentado no item 3.4., e de acordo com a infra-estrutura do laboratório, os métodos descritos em Polese & Ribeiro (1998) e Xie (1983) foram selecionados para a extração de clorofenóis nas amostras compostas de sedimento do Estuário de Santos e São Vicente (coleta 1) e nos sedimentos do Largo de Canéus e da Cosipa (coleta 2), respectivamente. Para as amostras líquidas – meio de cultivo salino – foi utilizada metodologia adaptada de Stuart & Woods (1998).

De modo a obter adequação experimental às amostras de sedimentos analisadas, testes preliminares foram realizados para:

- escolha do melhor veículo de dissolução do PCP e do melhor agente derivatizante: as soluções padrões aquosas de K_2CO_3 3%; Na_2CO_3 3% e NaOH 0,2M foram derivatizadas com anidrido acético (100 μ L ou 200 μ L) e diazometano, segundo metodologia descrita em Damianovic (1997).
- secagem dos sedimentos em estufa à 45⁰C por com e sem anidrido acético ou por centrifugação a 2700rpm por 5 minutos;
- dopagem e extração de clorofenóis do sedimento (coleta 1) acidificado, alcalinizado e alcalinizado/acidificado, conforme Figuras 1A e 2A apresentadas em Anexo A.

4.3.1. Recuperação dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento compostas do Estuário de Santos-São Vicente – coleta 1

Amostras de sedimento pré-centrifugadas, a 2700 rpm por cinco minutos, foram pesadas (5g) em tubos de DQO, dopadas com 200; 50 e 10 μ g de clorofenóis/Kg de sedimento, 2,4 dibromofenol (padrão interno) em concentração de 102 μ g /Kg de sedimento, acidificadas (pH próximo de 1) com 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado 1, agitadas em vórtex por 1 minuto e submetidas ao processo de extração por ultrassom com 5mL de hexano e tempo de extração de 36 minutos, em aparelho Phornton, modelo T7 com potencia 50 W e saída de onda com 40 KHz.

Alíquota de 1mL dos extratos orgânicos foi derivatizada com 1mL de diazometano por 30 minutos, conforme procedimentos descritos em Damianovic (1997). Após, o

volume total de derivatizante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Os extratos orgânicos derivatizados foram armazenados a em freezer até o momento da análise cromatográfica realizada conforme descrito no item 4.7. A Figura 6.3 apresenta um esquema da metodologia aplicada.

Figura 6.3. Fluxograma geral da metodologia aplicada ao sedimento acidificado, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica.

As soluções de clorofenóis foram preparadas em solução aquosa de K_2CO_3 3%. O branco foi preparado dopando-se as amostras de sedimento com a solução aquosa.

Com os cromatogramas obtidos foram calculados os fatores de resposta para cada analito, os quais foram utilizados para a quantificação dos clorofenóis por meio das equações da reta do gráfico de calibração. De posse das concentrações absolutas dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento e das concentrações absolutas das soluções padrão foi possível calcular a recuperação relativa do método de extração, pela fórmula 7 descrita a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{resposta do analito na matriz dopada (processada)}}{\text{resposta do analito na solução padrão}} \times 100 \quad (7)$$

A recuperação do padrão interno foi calculada também pela mesma equação descrita acima.

4.3.2. Recuperação dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa – coleta 2.

Alíquotas de 2mL de amostras de sedimento úmido do Largo do Canéus e da Cosipa, que corresponde à aproximadamente 2,5g, foram dopadas com soluções aquosas de PCP e de PCP e intermediários clorados em NaOH 0,2M de modo a obter 5mg PCP e congêneres/Kg de sedimento. As amostras foram agitadas manualmente, em vórtex por 2 minutos, e mantidas em repouso por 12 horas (tempo observado para adsorção de PCP no enriquecimento do Largo do Canéus e da Cosipa – item 5.5.2.1.). As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3000rpm e a água foi submetida ao processo de extração e derivatização por acetilação pela metodologia utilizada para analisar clorofenóis do meio líquido descrita no item 4.7. Os clorofenóis adsorvidos nos sedimentos foram extraídos em 5mL de solução aquosa alcalina de K_2CO_3 (304g/L), em vórtex por tempos de 3, 5, 10 e 20 minutos. Os clorofenóis na fase líquida foram extraídos e derivatizados (acetilados) segundo os procedimentos descritos no item 4.7. A Figura 6.4. apresenta um fluxograma dos procedimentos de trabalho.

Figura 6.4. Fluxograma geral da metodologia aplicada aos sedimentos, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica. **Legenda:** PCPi (solução de PCP e intermediários).

A eficiência de extração foi obtida utilizando-se a equação (8):

$$\text{Eficiência de extração} = (C1/C2 - C3) * 100 \quad (8)$$

onde: C1: concentração de clorofenóis extraídos do sedimento; C2: concentração de clorofenóis de dopagem; C3: concentração de clorofenóis extraídos da água do sedimento

4.3.3. Recuperação dos clorofenóis extraídos de amostra líquida – meio de cultivo salino

A Tabela 7.6. apresenta os testes realizados com o meio de cultivo Zinder Salino para obtenção de método cromatográfico de análise de clorofenóis para monitoramento dos ensaios microbiológicos.

Tabela 7.6. Descrição dos testes de recuperação dos clorofenóis extraídos do meio de cultivo

Testes	Vol. amostra (mL)	Vol. K ₂ CO ₃ (mL)	Vol. 2,4 DBF (μL)	Vol. H ₂ SO ₄ (μL)	Vol. anidrido acético (μL)	Vol. hexano (mL)	Tempo de acetilação e extração (min)	
							Separadas	Em conjunto
							Acet.	Extr
1	1	0,5	100	100	750	10	10	5
2	0,5	0,250	50	100	375	5	5	5
3	1	0,250	50		375	0,5	3	2
4	1	0,250	50		375	0,5		1

Legenda: Acet – acetilação; Extr – extração; 2,4DBF (2,4dibromofenol)

Nos testes 1 e 2 o meio de cultivo foi dopado com concentrações de clorofenóis iguais a 0,1; 0,25 e 1 mg/L. Nos testes 3 e 4 as concentrações de dopagem foram iguais a 0,025; 0,1 e 1 mg/L de clorofenóis. Em todos os testes, a concentração da solução do padrão interno (2,4dibromofenol) foi de 3,4mg/L e da solução de K₂CO₃ foi de 304 g/L.

No teste 4, foi verificado também o processo de acetilação e extração em conjunto por tempos de 1, 2 e 3 minutos para concentração de clorofenóis de 25 μg/L.

A análise dos resultados foi realizada de acordo com a equação 7 e o teste que apresentou melhor resultado (teste 4) foi utilizado para monitoramento dos ensaios microbiológicos conforme os procedimentos descritos no item 4.7.

4.4. Ensaios microbiológicos

Três ensaios microbiológicos foram realizados a fim de obter culturas degradadoras de pentaclorofenol sob condições metanogênicas e halofílicas. Para tanto, enriquecimentos na ausência e presença de PCP foram realizados em reatores semi-contínuo e contínuo do tipo RAHLF utilizando-se amostras de sedimento coletadas no Estuário de Santos São Vicente.

O enriquecimento 1, realizado com as amostras compostas de sedimento do Estuário (coleta 1) teve por objetivo prover inoculo para o experimento de isolamento, no qual buscou-se a obtenção de culturas de arqueias metanogênicas e bactérias cultivadas na presença e ausência de PCP.

Os sistemas do enriquecimento 2 buscaram selecionar inóculos competentes na degradação do PCP de amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa (coleta 2).

O enriquecimento 3, realizado com o sedimento da Cosipa (coleta 2) foi feito com o objetivo de prover inóculo ativo para a desalogenação redutiva do PCP estudada em reator anaeróbio do tipo RAHLF.

4.5. Descrição dos reatores

4.5.1. Reatores semi-contínuos

Frascos de vidro, com uma parte de seu volume total destinado à produção de gases foram utilizados nos enriquecimentos semi-contínuos e no experimento de isolamento. Nos enriquecimentos 1 e 3, o volume destinado à produção de gases correspondeu à 50% dos volumes totais dos reatores, iguais a 1L e 2L, respectivamente. No enriquecimento 2, o volume destinado à produção de gases correspondeu à 40% do volume total dos reatores, igual a 250mL. No isolamento 33% do volume total do reator (30mL) foi destinado à produção de gases. O volume reacional foi preenchido com meio de cultivo suplementado e inóculo em quantidades indicadas na Tabela 7.7. A Figura 6.5 ilustra os frascos reatores utilizados no enriquecimento 1, 2 e 3.

Figura 6.5. Fotos dos reatores utilizados nos enriquecimentos. (a) enriquecimento 1; (b) enriquecimento 2; (c) enriquecimento 3.

4.5.2. Reator contínuo do tipo RAHLF

Na avaliação da remoção do PCP em sistema contínuo e biomassa imobilizada foi utilizado o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) desenvolvido por Foresti *et. al.* (1995) e apresentado na Figura 6.5.1.

Figura 6.5.1. Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). As letras A, B, C, D e E correspondem ao frasco de alimentação, reservatório de N_2 , bomba peristáltica, reator e sistema coletor de gás, respectivamente. L/D corresponde aos pontos de amostragem nas relações comprimento/diâmetro ao longo do reator.

O reator, confeccionado em vidro de boro silicato, em escala de laboratório, apresentou comprimento (L) de 100 cm, diâmetro interno (D) de 5 cm perfazendo uma relação comprimento por diâmetro (L/D) de aproximadamente 20. O volume total aproximado foi de 1990 mL e volume útil de 800mL. Para a coleta de amostras havia 5 pontos espaçados 20 cm entre si, resultando em L/D de 4, 8, 12, 16 e 20. A coleta do biogás foi feita na mangueira superior, em três pontos: na entrada do reator próximo à L/D = 4 (ponto 1); no meio, entre L/D = 12 e L/D = 16 (ponto 2) e no final próximo à saída do reator (ponto 3). O volume útil foi calculado considerando-se a porosidade do leito de acordo com a fórmula (9):

$$V_u = V_t \cdot \gamma \quad (9)$$

onde:

V_u = Volume de útil; V_t = Volume total ; γ = porosidade do leito (40%)

Para inoculação e alimentação foi utilizada bomba peristáltica da marca Gilson.

Como frasco de alimentação e inoculação foi utilizado o frasco do tipo Duran com volume de 5L. A tampa do frasco, de batoque de butila, apresentava três furos nos quais foram inseridas três cânulas de vidro, uma com comprimento suficiente para atingir o fundo do frasco e ligada à linha de sucção da bomba peristáltica (cânula 1) e duas que permaneciam na parte superior do frasco acima do nível do líquido, como apresentado na Figura 6.6. Uma das cânulas era conectada à uma mangueira de silicone (cânula 2) e a outra à uma bexiga de borracha (cânula 3). Para manter a atmosfera do frasco sob anaerobiose, após o seu fechamento, gás 100% nitrogênio foi injetado pela cânula 2 até encher a bexiga conectada à cânula 3. A mangueira foi então fechada por uma pinça. Durante a injeção de nitrogênio, a cânula 1 permanecia fechada com o auxílio de uma pinça. Desta maneira o gás permeava toda a atmosfera do frasco, garantindo a anaerobiose.

Figura 6.6. Ilustração do frasco utilizado na inoculação e alimentação do RAHLF.

4.6. Meios de cultivo, procedimentos de inoculação e operação

4.6.1. Meios de cultivo e condições nutricionais

Os meios utilizados foram previamente submetidos a fluxo de nitrogênio por 10-15 minutos. Em seguida, a atmosfera foi substituída para N_2/CO_2 (70:30% v/v) e acrescentaram-se as soluções e o inóculo em concentrações indicadas na Tabela 7.7.

Tabela 7.7. Composição final dos meios de cultivo utilizados nos enriquecimentos e no

RAHLF				
Enriquecimentos				
Componentes	1	2	3	RAHLF
Meio basal Zinder salino	-	-		
Meio basal Biota			-	-
Bicarbonato de sódio 10%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Solução de vitaminas	-	-	-	-
Glicose 1 mol/L	2,5 g/L	2,5 g/L	0,3g/L (CP) 0,15g/L (CN)	1g/L
Lactato de sódio 2 moles/L	0,020 moles/L	0,020 moles/L		
Acetato de sódio 1 moles/L	0,020 moles/L	0,020 moles/L		
Formiato de sódio 2 moles/L	0,020 moles/L	0,020 moles/L		
Metanol 2 moles/L	0,010 moles/L	0,010 moles/L		
Sulfato de sódio 1 mol/L	0,010 moles/L			
Extrato de levedura 2%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
PCP (estoque de 5,6g/L)		44mg/L (CP) 22mg/L (CN)		0; 5; 13; 15 e 21mg/L
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Inóculo	25%	25%	25%	10%

Obs. As soluções de bicarbonato de sódio, vitaminas e a redutora foram adicionadas cada uma, em volume de 0,1mL para 10 mL de meio (Vazoller, 1995).

Legenda. CN-Caneus; CP- Cosipa

Em todos os experimentos, exceto no RAHLF, duplicatas de frascos reatores foram montados.

No enriquecimento 2, os seguintes sistemas foram montados: - dois reatores sem a adição de PCP e inoculados, denominados controles positivos; - dois reatores com adição de PCP e inoculados, denominados reatores PCP; - dois reatores com adição de PCP e não inoculados, denominados controles abióticos; - dois reatores com adição de PCP e inoculados com sedimento autoclavado, denominados controles negativos. O meio empregado foi o mineral Zinder salinidade de 5,6% e 3,4% de NaCl, respectivamente para aproximar das condições salinas medidas nos sedimentos de Canéus e Cosipa.

Posteriormente, a salinidade foi mantida a 2% (NaCl). A quantidade de pentaclorofenato de sódio adicionado foi de 2,5mgPCP/gSTV, conforme preconizado por Larizzatti (1997). Para os controles negativos, as amostras de sedimento foram transferidas para frascos reatores e autoclavadas por 3 dias consecutivos a temperatura de 121⁰C, pressão de 1 atm por 1 hora. No 3^o dia, meio Zinder foi adicionado nos frascos e em seguida, procedeu-se a suplementação conforme descrito na Tabela 7.7.

No enriquecimento 3, a quantidade de célula foi estimada com sendo igual a 20% do conteúdo de STV e a carga orgânica aplicada foi de 0,1KgDQO/Kg célula.

No experimento de isolamento foi utilizada a técnica de diluições decimais seriadas. Esta técnica foi adaptada para ser utilizada na avaliação da comunidade de anaeróbios estritos em amostras ambientais e amostras de resíduos e bioreatores (Dubourguier, 1987 *apud* Vazoller, 1995).

A incubação das culturas foi feita a partir de diluições decimais (10^{-2} a 10^{-4}), em triplicatas de frascos de antibiótico de 30mL contendo 10mL de meio basal Zinder com 2% de NaCl suplementado conforme mostrado na Tabela 7.7. (enriquecimento 1). Para o cultivo de arqueias metanogênicas as fontes utilizadas foram metanol e sais de sódio dos ácidos acético e fórmico. No cultivo de bactérias redutoras de sulfato adicionou-se lactato e sulfato de sódio, e no de bactérias apenas o lactato de sódio. Em todos as condições, pentaclorofenol foi adicionado em concentração de 60mg/L. Para cada diluição, foram preparados dois tipos de controle, um controle positivo, contendo inóculo vivo e meio basal suplementado (sem adição de PCP) e um controle negativo, contendo meio basal suplementado, PCP e inóculo autoclavado a temperatura de 121⁰C, pressão de 1 atm por 1 hora e 20 minutos.

4.6.2. Procedimentos de inoculação

Enriquecimentos. Nos experimentos de enriquecimento, alíquotas iguais de sedimento foram transferidas para os frascos reatores, sob fluxo de nitrogênio (100%), que foram fechados sob esta atmosfera e agitados manualmente, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, estes mesmos recipientes foram submetidos a fluxos de uma mistura de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30% v/v), por 5 minutos. Com o auxílio de uma proveta, mediu-se uma determinada quantidade de sedimento, que foi imediatamente transferida para o frasco contendo o meio cultivo suplementado e reduzido. Os procedimentos foram feitos sob condições de assepsia e fluxo constante da

mistura gasosa de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30% v/v). Os frascos foram fechados com batoques de Teflon e rosqueados com tampa de rosca.

A biomassa presente nos sedimentos foi estimada indiretamente pela determinação do teor de sólidos totais voláteis (STV).

Os reatores foram mantidos em estufa com temperatura e agitação controladas iguais a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm, respectivamente.

Isolamento. Para obtenção de culturas de arqueias metanogênicas e bactérias, o inoculo, sedimento enriquecido 1, foi homogeneizado, sob agitação com pérolas de vidro por 20 minutos, sob condição de anaerobiose.

As diluições decimais foram realizadas com 2mL do lodo homogeneizado em frascos de antibiótico contendo 18 mL de meio basal Zinder salino, tamponado e reduzido com 0,1% de bicarbonato de sódio e com 0,05% de redutora de sulfeto de sódio, respectivamente. A partir da diluição 10^{-1} , uma alíquota de 1mL de cada diluição foi transferida para três frascos de antibiótico contendo o meio de cultura suplementado e reduzido (Figura 6.7.). Todos os procedimentos foram realizados sob condições de assepsia e anaerobiose. Os frascos foram armazenados em estufa com temperatura controlada de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período não inferior a 30 dias - em geral, tempo indicado para o crescimento de microrganismos anaeróbios.

Figura 6.7. Esquema da técnica de diluição decimal seriada.

RAHLF. O RAHLF foi preenchido com 1.040 mL (20,8 g) de espuma de poliuretana (densidade 23 kg.m^{-3}), no formato de cubos com 0,3 cm de lado, previamente autoclavados e embebidos em água destilada estéril. O sistema foi submetido à fluxo de

nitrogênio 100% por 10 minutos, através de uma mangueira cuja a extremidade contrária foi mantida aberta. Após, o meio Biota salino suplementado e reduzido, mas sem a presença de PCP, foi bombeado para o reator em sistema de circuito fechado, de modo a umedecer toda a espuma e preencher o volume útil do sistema.

O inóculo foi o sedimento da Cosipa previamente enriquecido (Enriquecimento 3). A escolha pelo sedimento foi de acordo com os resultados apresentados no relatório da CETESB (2001), que focaliza a área como altamente contaminada. Além disso, foram considerados os resultados de degradação do PCP por este sedimento no enriquecimento 2 e aqueles também obtidos na pesquisa de Cristina Rossi Nakayama (relatório FAPESP 3 – processo n. 00-11900-2), conduzida em paralelo com a mesma amostra, dentro dos objetivos maiores do Programa Biota FAPESP.

A imobilização das células foi realizada segundo metodologia descrita em Domingues (2001), com todos os cuidados em relação à manipulação de microrganismos anaeróbios estritos. Nesta metodologia, o reator é operado em circuito fechado, e através de uma bomba peristáltica o conteúdo do frasco de alimentação contendo o sedimento enriquecido (10%) é constantemente recirculado para o reator até observar a ocorrência de biofilme. A inoculação foi feita em um período de 6 dias. No 3º dia, glicose em concentração de 0,5g/L foi adicionada no frasco de alimentação. O inóculo foi bombeado diariamente para o reator por um período de 12 horas, na vazão máxima da bomba.

Durante a inoculação, o conteúdo do frasco foi agitado por meio de uma placa agitadora, a fim de manter o inóculo completamente homogeneizado.

A imobilização da biomassa no reator foi verificada pela coloração na espuma e quantificada pela subtração da biomassa contida no frasco de inoculação, expressa em SSV(g/L), imediatamente antes e após a inoculação.

O reator foi mantido em câmara com temperatura controlada de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.6.3. Operação dos frascos reatores

Enriquecimento 1. Periodicamente, os frascos reatores foram alimentados com fontes de carbono na proporção de 50% da relação inicial de DQO/SSV ou com 50% da DQO repostas na alimentação anterior. Estes procedimentos foram adotados de modo a evitar aumento na concentração de matéria orgânica nos sistemas e de possível acidificação do meio, mantendo-se o equilíbrio ecológico entre os diferentes microrganismos anaeróbios.

Isolamento. Cultivo na presença de PCP. No 55^o dia de incubação, os frascos reatores foram re-inoculados com 0,25 mL de inóculo (sedimento enriquecido, com 158 dias de incubação e com 53 % de produção de metano). Os que não foram re-inoculados, foram sub-cultivados, em réplicas, com 0,1% de inoculo (frasco da diluição 10⁻²) em concentração de PCP de aproximadamente 25 mg/L.

Cultivo na ausência de PCP. As culturas de bactérias e arqueias metanogênicas cultivadas na ausência de PCP foram sub-cultivadas por 5-6 vezes. As caracterizações fisiológica e filogenética foram realizadas nos 5^o e 6^o sub-cultivos, respectivamente. A caracterização fisiológica de arqueias metanogênicas foi realizada com as fontes acetato de sódio (20mM), metanol (10mM), formiato de sódio (20mM) adicionadas em separado. Uma série dos cultivos foi acrescida do antibiótico vancomicina (0,001%), a fim de possibilitar apenas o desenvolvimento das células metanogênicas. Para a cultura de bactéria manteve-se o lactato de sódio (20mM).

A partir do 5^o sub-cultivo, as culturas que deram origem aos sub-cultivos subsequentes foram acrescidas de meio mineral em volume suficiente para completar o volume inicial, suplementado com as fontes orgânicas específicas bem como com as soluções de vitaminas, bicarbonato de sódio, extrato de levedura e cisteína-HCl nas mesmas concentrações utilizadas nos sub-cultivos.

É importante pontuar que as culturas de arqueias metanogênicas crescidas em metanol e acetato de sódio foram sempre repicadas empregando-se agulhas de calibre superior aos comumente usados nas agulhas de seringas de insulina, uma vez que as células obtidas cresciam em grumos celulares visualmente definidos e possivelmente maiores do que o calibre da agulha de insulina.

No cultivo de BRS, com vistas ao isolamento, as células foram sub-cultivadas (5^o sub-cultivo) em diluições decimais seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁷) em tubos Bellco. Após 30 dias de incubação, o crescimento não foi intenso, visualizado pela turvação do meio de cultivo. Assim, optou-se por adicionar extrato de levedura (0,02%), a fim de estimular as condições do desenvolvimento celular pela presença de fatores de crescimento provavelmente não presentes no meio original proposto.

Enriquecimento 2. Frascos reatores controle: Os reatores controle foram realimentados a cada 20-30 dias. Todas as realimentações foram feitas pela adição das fontes de carbono, mantendo-se concentrações 50% inferiores às utilizadas na inoculação (Tabela 7.7). Além disso, foram acrescidas as soluções de bicarbonato de sódio (0,1%), vitaminas e traço de metais em volumes de 1,5 mL. A solução traço de metais utilizada a

partir da 7ª realimentação foi denominada traço de metais Biota. A cada realimentação, o volume dos frascos foi fixado em 150 mL, para isso adicionava-se o meio de cultivo Zinder salino ou não, uma vez que a salinidade do meio era previamente determinada e rigorosamente mantida em torno de 2 a 3%. A partir da 11ª realimentação, a cada realimentação, os reatores controle passaram a receber solução de extrato de levedura a 0,02%.

Particularmente, na 7ª realimentação, no 250^o dia de incubação, as réplicas 2 dos frascos reatores controle positivo Canéus e Cosipa receberam PCP em concentrações iguais às utilizadas na incubação inicial, respectivamente, 20 e 40 mg/L, além de 20 mL de meio Zinder, contendo solução traço de metais Biota. A adição do meio basal foi feita com o objetivo de suplementar o meio reacional com nitrogênio e fósforo. Após a 7ª realimentação, os frascos reatores controles que receberam PCP – denominados doravante – Controle2 PCP, foram realimentados seguindo a mesma estratégia adotada para os reatores com PCP.

Os frascos reatores Canéus e Cosipa PCP receberam 13 realimentações utilizando-se como fonte orgânica apenas glicose. Na 1ª, realizada 134^o dia de incubação, a glicose foi adicionada em concentração de 50% inferior à inicial. Na 2ª realimentação, realizada 250^o dia de incubação, a glicose foi adicionada em concentração teórica igual à utilizada na incubação (2,5g/L), uma vez que, os frascos reatores receberam PCP em concentrações de 10 mg/L (Caneus) e 25 mg/L (Cosipa). Alíquota de 20 mL de meio Zinder contendo a solução traço de metais Biota foi também adicionado. As concentrações de PCP adicionadas foram iguais às determinadas no sobrenadante dos frascos reatores no 1^o dia de experimento. Nas demais realimentações, o meio foi suplementado com glicose em concentração de 0,7-1g/L, a qual foi adicionada a cada 10-15 dias. Da 8ª à 12ª realimentação, os frascos reatores receberam PCP mensalmente, em concentrações iguais a 1,5mg/L (Caneus) e 3-4mg/L (Cosipa), adicionadas durante uma semana com frequência de 3 vezes na semana. Após à 12ª realimentação os frascos reatores receberam PCP a cada realimentação, ou seja a cada 10-12 dias.

Em todas as realimentações, o meio foi acrescido de solução de bicarbonato de sódio (0,1%) e extrato de levedura (0,02%). Alíquotas de 1,5-2mL de vitaminas e de solução traço de metais eram adicionadas aos frascos reatores a cada 20-30 dias ou a cada adição de PCP. A solução traço de metais utilizada a partir da 2ª realimentação foi a solução traço de metais Biota. O volume reacional foi mantido em 150mg/L, com adição do meio quando necessário.

Enriquecimento 3. Neste enriquecimento um total de oito realimentações com intervalos de 7 a 14 dias foi realizada. Na primeira, no 14º dias de incubação, glicose foi adicionada em concentração igual à inicial (0,3g/L). As demais alimentações pela adição da glicose (0,5g/L), extrato de levedura (0,01%) e bicarbonato de sódio (0,05-0,01%). A cada 30 dias, volumes de 30 mL ou 15 mL do sobrenadante eram retirados dos sistemas de reação e substituídos por iguais volumes de meio mineral e das soluções de vitaminas, bicarbonato de sódio e extrato de levedura a concentração igual ou metade da utilizada na incubação inicial (Tabela 7.7.). A adição da glicose foi mantida em 0,5g/L. Optou-se por adicionar a mesma concentração de glicose em ambos os frascos reatores, a partir da 3ª realimentação, pois esta concentração favorecia a metanogênese dos sistemas, condição indicadora da estabilidade do metabolismo anaeróbio e, estabelecida como essencial para a preparação do sedimento como inóculo do RAHLF.

RAHLF. Após a imobilização da biomassa o sistema passou a ser operado de forma contínua com vazão média afluyente de aproximadamente 44 mL/hora, correspondendo ao tempo de detenção hidráulica de 18 horas, tempo este considerado satisfatório por Damianovic (1997) durante pesquisas sobre degradação anaeróbia do PCP em sistema do tipo RAHLF.

O reator operado por um período de 126 dias recebeu como fonte orgânica glicose (1g/L) e adições escalonadas de PCP em concentrações de 0, 5, 13, 15 e 20mg/L adicionadas sempre que a estabilização do sistema em relação à remoção de PCP, DQO e produção de metano ocorria mediante a adição anterior.

A Tabela 7.8. apresenta as cargas orgânicas volumétricas de DQO e de PCP aplicadas ao reator durante a operação do sistema.

Tabela 7.8. Carga Orgânica Volumétrica (COV) de DQO e PCP aplicada no reator durante a operação do sistema

DQO (g/L)	PCP (mg/L)	COV _{DQO} (gDQO/L reator*dia)	COV _{PCP} (gPCP/L reator*dia)
1,1	5	0,6	0,002
1,1	13	0,6	0,007
1,1	15	0,6	0,008
1,1	20	0,6	0,011

COV = $S \cdot Q / V$; S= concentração do substrato (g/L); Q=vazão (L/dia);
V=volume total do reator (L); Q= 44,4 mL/hora = 1,106 L/dia; V = 1,991L.

4.7. Parâmetros e métodos de análise

A Tabela 7.9. demonstra os parâmetros de monitoramento e métodos de análise utilizados em cada ensaio experimental.

Tabela 7.9. Parâmetros monitorados em cada ensaio experimental

Parâmetros	Método	Experimentos				
		Enr. 1	Isol.	Enr. 2	Enr. 3	RAHLF
Salinidade	potenciométrico	X	X	X	X	X
Metano	cromatografia gasosa	X	X	X	X	X
PCP	cromatografia gasosa/ECD		X	X		X
Ácidos voláteis	cromatografia gasosa	X	X	X		X
Ácidos voláteis	titulométrico					X
Alcalinidade						
DQO	potenciométrico	X				X
Glicose	enzimático			X		X
STV e SSV	gravimétrico	X		X	X	X
Exames microscópicos		X	X	X	X	X
DGGE			X			X
FISH			X			X
MEV						X

As concentrações de demanda química de oxigênio (DQO), Sólidos Voláteis Totais e Suspensos (STV e SSV), pH e salinidade foram determinados segundo os procedimentos descritos no *Standart Methods for Examination of Water and Wastewater* (1998).

As concentrações de alcalinidade e ácidos voláteis totais foram determinadas segundo metodologia descrita em Ripley *et al.* (1986) e Dillalo & Albertson (1961), respectivamente.

As concentrações de ácidos voláteis por cromatografia gasosa foram determinadas em cromatógrafo à gás HP 5860 com detector de ionização de chama (FID), através da metodologia descrita em Moraes *et al.* (2000).

As análises cromatográficas de determinação de metano foram realizadas em cromatógrafo a gás Gow-Mac, modelo 69, série 150, equipado com detector de condutividade térmica, coluna empacotada da Porapak-Q, com 2m de comprimento e 1/4" - 8 a 100 de diâmetro interno e integrador HP 3396 série II. O gás de arraste utilizado foi o

H₂ (White Martins). As condições cromatográficas foram: vazão do gás de arraste de 1mL/s; temperatura do detector, coluna e injetor de 55°C; corrente de 150 mA. A amostra de gás era coletada injetando-se a seringa nos frascos reatores, e lavando-a com a atmosfera do sistema por 3 vezes. Após a lavagem, alíquota de 0,5mL da atmosfera do frasco foi retirada e injetada no aparelho (a seringa permaneceu inserida no injetor até a saída do primeiro pico (nitrogênio)).

A determinação de PCP e intermediários clorados foi realizada segundo metodologia adaptada de Stuart & Woods (1998) e validada no item 4.3.3. Os procedimentos descritos a seguir referem-se tanto para o processamento das amostras dos experimentos quanto para a elaboração da curva e calibração.

O processo de extração dos clorofenóis de amostras aquosas e do foi realizado em tubos de ensaio específicos para análise de DQO. A cada tubo foram adicionados 1mL da amostra sem a presença de sólidos, 250 µL de solução de K₂CO₃ (304g/L), 50 µL de solução de 2,4 dibromofenol a 3,4 mg/L (padrão interno), 375 µL de anidrido acético (agente derivatizante) e 0,5 mL de hexano. Os tubos foram fechados imediatamente após a adição de hexano e agitados durante 1 minuto em agitador de tubos tipo Vórtex, à velocidade máxima. As amostras foram armazenadas em freezer até o momento da análise cromatográfica.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett Packard, modelo HP 5890 série II, equipado com detector de captura de elétrons (CG-ECD). O gás de arraste utilizado foi o H₂ com vazão de 1 mL/min e como gás auxiliar foi utilizado o N₂ com vazão de 30 mL/min. A técnica de injeção adotada foi o “splitless” e o volume de amostra injetado foi de 1µL. A seringa utilizada era previamente lavada com metanol, a cada injeção, em limpador de seringas, por 10 vezes.

Para a determinação de clorofenóis extraídos das amostras de sedimento (item 4.3.1) a coluna capilar utilizada foi HP1 (poli-5%-bifenilo-95%-dimetilssiloxano) com 30 m de comprimento, 2,65 µm de espessura de filme e 0,53 mm de diâmetro interno. As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor de 250°C e do detector 280°C. A temperatura inicial do forno foi de 70°C, permanecendo nesta por 2 minutos, elevando-se a 200°C a uma taxa de incremento de 5°C/min, temperatura que permanecia constante por 3 minutos. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 30 minutos.

Para as amostras aquosas – meio de cultivo salino- e de sedimento da coleta 2 , a coluna capilar utilizada foi HP-5 (5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane) com 30m de comprimento, 0,25 µm de espessura de filme e 0,32 mm de diâmetro interno. A temperatura do injetor foi de 250°C e do detector de 320°C. A temperatura inicial do

forno foi de 45⁰C, permanecendo nesta por 2 minutos; em seguida, elevou-se a temperatura para 132⁰C a uma taxa de 15⁰C/min, seguindo-se uma segunda rampa de 5⁰C/min até 204⁰C e, então, elevando-se novamente a temperatura a uma taxa de 70⁰C/min até 260⁰C, mantendo-se a mesma por 3 minutos. O tempo de corrida foi de 26 minutos.

A glicose foi determinada pelo método enzimático utilizando-se o Kit da LABOLARB. Neste método, em tubos de DQO são adicionados 20µL da amostra e 3 mL de solução reativo de trabalho. Após, os tubos são submetidos a banho maria com temperatura de 37⁰C por 10 minutos. A leitura da amostra é realizada em aparelho espectrofotométrico em comprimento de onda de 505 nm. O branco foi constituído somente pela solução reativo de trabalho.

Determinação da DQO para as amostras do RAHLF. Previamente aos procedimentos descritos no *Standard Methods* (1998), os interferentes cloro e sulfeto foram eliminados pela adição de 0,2g de nitrato de prata e 0,1mL de sulfato de zinco (100g/l) a cada 6 mL de amostra. Após agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação a 1minuto e 3000rpm, o sobrenadante foi utilizado para análise.

• Frequência das análises físico-químicas

Nos enriquecimentos, as determinações de ácidos voláteis, DQO e organoclorados foram realizadas a cada 15 ou 20 dias. A porcentagem de metano no biogás foi determinada semanalmente com frequência de 3 vezes por semana. A determinação de glicose no sobrenadante foi feita no tempo zero e a cada 2-3 dias. No enriquecimento 3, nos reatores controle negativo, a concentração de PCP no sobrenadante foi determinada nos tempos: 0; 0,30; 1; 2; 7; 22; 27; 32; 53; 96 horas e após 60 dias de incubação.

No RAHLF, as análises físico químicas foram realizadas no afluente e efluente, semanalmente, com frequência de 2x por semana. Após ser atingida a estabilização, em cada concentração de PCP aplicada, foram realizados os perfis (análises ao longo do reator).

A salinidade do meio de cultivo foi periodicamente determinada de modo a manter nos reatores valores entre 2 – 3%. Este procedimento foi adotado, pois na maioria dos artigos lidos sobre ambientes marinhos a salinidade expressa em NaCl está na faixa de 2 - 3% e segundo Pelczar *et al.* (1993), a água do mar contém, aproximadamente, 2,75% de NaCl e 3,3-3,7% contando com os demais sais existentes no ambiente, tais como carbonatos de sódio, de potássio, de cálcio e de magnésio.

4.8. Análises Microbiológicas

4.8.1. Exames de microscopia óptica

As amostras foram observadas ao microscópio óptico, sob contraste de fase e fluorescência, para visualização de células metanogênicas que possuem a co-enzima F420. As amostras foram fixadas em lâminas com agar 2%, de acordo com os procedimentos descritos em DSM *apud* Vazoller (1995). Nas biopartículas do RAHLF, primeiramente as amostras foram desprendidas da espuma de poliuretano, espremendo as espumas com auxílio de um bastão de vidro. A observação das morfologias foi realizada em microscópio da marca Leica DMLB, com sistema de câmara digital Optronics. O *software* utilizado para a aquisição das imagens foi o *Image Pro-Plus* versão 4.5.0.

4.8.2. Exames de microscopia eletrônica de varredura

As biopartículas (biofilme + espuma) retiradas do RAHLF foram colocadas em tubos de ensaio e submetidas a tratamento de fixação e desidratação das células segundo metodologia descrita em Araújo *et al.* (2003). O microscópio utilizado foi DSM 960 Zeiss equipado com transferidor de imagem DSM U1.7 93 Zeiss

4.8.3. Coloração de Gram.

Os procedimentos para a coloração de gram das culturas de isolamento seguiu o protocolo adaptado da DSM (1991) e a observação das morfologias foi realizada no mesmo equipamento descrito no item 4.8.1.

4.8.4. Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

A técnica da hibridização *in situ* com sondas fluorescentes foi utilizada para a identificação das culturas de arqueias metanogênicas e bactérias anaeróbias obtidas no experimento de isolamento e para a identificação de arqueias metanogênicas no final da operação do RAHLF.

· Sondas de oligonucleotídeos fluorescentes

As sondas de oligonucleotídeos específicas ao RNAr 16S utilizadas e os grupos de microrganismos a que correspondem estão apresentados na Tabela 7.10. A Tabela 7.11, apresenta algumas características destas sondas e em quais culturas foram aplicadas. Dentre as sondas disponíveis, a escolha foi feita mediante as fontes de carbono na qual os

microrganismos estavam sendo cultivados e a morfologia observada em microscopia de contraste de fase e fluorescência. A Tabela 7.12. apresenta o corante e a concentração final de cada sonda. A sonda MSMX860 foi utilizada somente nas amostras do RAHLF.

Tabela 7.10. Sondas utilizadas para as análises de FISH

Sonda	Grupo microbiano alvo e posição no RNAr	Seqüência (5' – 3')	Referência
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i> (RNAr 16S, 338-355)	GCTGCCTCCCGTAGGA GT	Amann et al. (1990)
ARC915	Domínio <i>Archaea</i> (RNAr 16S, 915-934)	GTGCTCCCCCGCCAAT TCCT	Stahl & Amann (1991) <i>apud</i> Pernthaler et al. (2002)
NON338	Nenhum – controle negativo (RNAr 16S, 338-355)	ACTCCTACGGGAGGC AGC	Manz et al. (1992)
MS821	<i>Methanosarcina</i> sp. (RNAr 16S, 821-844)	CGCCATGCCTGACACC TAGCGAGC	Raskin et al. (1994)
MB1174	<i>Methanobacteriaceae</i> (RNAr 16S, 1195-1174)	TACCGTCGTCCACTCC TTCCTC	Raskin et al. (1994)
MB310	<i>Methanobacteriaceae</i> (RNAr 16S 331-310)	CTTGTCTCAGGTTCCA TCTCCG	Raskin et al. (1994)
MSMX860	<i>Methanosarcinaceae</i> (RNAr 16S, 880-860)	GGCTCGCTTCACGGCT TCCCT	Raskin et al. (1994)

Tabela 7.11. Características relevantes das sondas

Sondas	Grupo microbiano alvo	Características	Culturas				RAHLF
			metanol	acetato	formiato	lactato	
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>		X	X	X	X	
NON338	nenhum	detecta hibridização inespecífica	X	X	X	X	
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>		X	X	X	X	
MS821	gênero: <i>Methanosarcina</i>	todas utilizam metanol, acetato e H ₂	X	X		X	
MSMX860	Família: <i>Methanosarcinaceae</i>	Idem MS821					X
MB1174 e MB310	Família: <i>Methanobacteriaceae</i> Gênero I: <i>Methanobacterium</i> Gênero II: <i>Methanobrevibacter</i> Gênero III: <i>Methanosphaera</i>	a maioria utiliza H ₂ e CO ₂ ; algumas utilizam também formiato			X		

Fonte. Raskin et al (1994)

Tabela 7.12. Corante e concentração final de cada sonda

Sonda	Corante	Concentração final (sonda diluída) usada na hibridização (ng/uL)
EUB338	Rodamina	50
ARC915	Rodamina	49,22
NON338	Rodamina	36,2
MS821	CY3	50
MB1174	Rodamina	49,4
MB310	Rodamina	49,296
MSMX860	CY3	49,64

A sonda NON338 foi utilizada como controle negativo visando detectar hibridização inespecífica, como preconizado por Manz *et al.* (1992). Este tipo de hibridização refere-se àquela que ocorre entre a sonda e uma porção do RNAr não complementar a este. Isto pode ser decorrente do uso de temperaturas inadequadas, ou devido à secagem indevida do tampão de hibridização e das células durante o processo de hibridização, ou mesmo da secagem do tampão de lavagem (Araújo, 2001).

Apesar dos cultivos em acetato, metanol e formiato ter sido direcionado para o isolamento de arqueias metanogênicas, as culturas apresentaram sob microscopia de contraste de fase morfologias como bacilos não fluorescentes, provavelmente do Domínio *Bacteria*. Assim, a sonda EUBI 338 foi utilizada para verificar a ocorrência de microrganismos deste Domínio.

A cultura crescida em formiato de sódio foi hibridizada primeiramente com a sonda MB1174. Entretanto, devido a resultados não satisfatórios, hibridizações duplas foram realizadas com três sondas com o mesmo fluorocromo, ARC915+MB310; ARC915+MB1174 e MB1174+MB310. Esse procedimento visou melhorar a intensidade do sinal fluorescente e diminuir problemas oriundos do baixo conteúdo de RNA ribossômico ou de reduzida disponibilidade das seqüências alvo. Quando da hibridização dupla, a sonda que necessitou de maior concentração de formamida para alta estringência (MB1174 e MB310) foi primeiramente empregada e depois do procedimento de lavagem, seguiu-se a hibridização com a sonda ARC915. A hibridização dupla com MB1174+MB310 foi realizada em uma única etapa, em função da similaridade dos protocolos de hibridização.

· Preparo das amostras

Isolamento. Alíquotas de 1,5mL das culturas de isolamento retiradas com seringas e agulhas estéreis foram transferidas, em duplicata, para tubos de microcentrifuga estéreis para o procedimento de fixação. A agulha utilizada para retirar as células das culturas de arqueias metanogênicas cultivadas em acetato e metanol foi do tipo HACH uma vez que as células destas culturas cresceram na forma de grumos celulares bem definidos, que não passavam por agulhas de menor calibre.

RAHLF. No RAHLF, para cada ponto estudado, foram retiradas de 3-5 matrizes de biopartículas, com auxílio de pinça estéril, transferidas para frasco de antibiótico contendo 2,5g de pérolas de vidro e 2,5 mL de tampão salino fosfato (PBS: 130mM NaCl; 7mM Na_2HPO_4 ; 3mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$). Este sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30) por 5 minutos e submetido à agitação manual em ângulo de 45°C, durante 20 minutos, para adequada separação dos arranjos celulares. Após o desprendimento, 1,5mL das amostras foram acondicionadas, em duplicata, em tubos de microcentrifuga para o procedimento de fixação.

· Fixação das amostras

Para a fixação, as amostras foram centrifugadas sob refrigeração a 9000 rpm por 6 minutos a 15°C e lavadas duas vezes, em vórtex por 1 minuto, com o mesmo volume de PBS. O pellet foi ressuspenso em 200 μL de PBS e 600 μL de tampão de fixação com paraformaldeído 4%, por 15-16 horas a 4°C. Após, as amostras foram centrifugadas a 9000rpm por 6 minutos a 15°C, lavadas 2 vezes, em vórtex por 1 minuto, em PBS e armazenadas a -20°C em tubos de microcentrifuga contendo 50% de PBS e 50% de etanol absoluto gelado (100 μL de PBS1X e 100 μL de etanol absoluto gelado).

· Tratamento das lâminas de vidro

A hibridização das amostras foi realizada em lâminas de imunofluorescência revestidas com teflon (Cel-Line/Erie Scientific Co), com 12 pocinhos de 8mm de diâmetro (Figura 6.8.). Anteriormente ao uso, as lâminas foram mantidas em solução etílica de hidróxido de potássio 10%, durante 40 minutos, enxaguadas com água destilada, secas em estufa a 45°C e mergulhadas rapidamente em etanol absoluto para o processo de

desidratação. (Domingues, 2001). A seguir, as lâminas foram tratadas com solução de gelatina 0,1% e secas a temperatura ambiente na posição vertical.

Figura 6.8. Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridização *in situ*.

• Hibridização

As amostras fixadas foram retiradas do freezer e homogeneizadas em vórtex por 1 minuto. Alíquotas de 1 μL foram distribuídas nos poçinhos da lâmina hidrofóbica e secas em forno de hibridização a 45°C por 20 minutos, para aumentar a adesão das células na lâmina. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries gradativas de etanol 50%, 70% e 100%, por 3 minutos cada.

Após a desidratação, as amostras foram cobertas com 9 μL de tampão de hibridização pré-aquecido em banho-maria na temperatura de hibridização específica para cada sonda (Tabela 7.13.) e 1 μL de sonda. A lâmina foi inserida em uma câmara úmida (Tubo Falcon de 50mL, revestidos de papel alumínio) contendo papel de filtro umedecido com o próprio tampão de hibridização previamente aquecido na temperatura de hibridização e colocada no forno de hibridização por tempo e temperatura apropriados para a estringência de cada sonda (Tabela 7.13.).

Após a hibridização, a lâmina foi mergulhada e mantida em tubos Falcon contendo 50mL dos respectivos tampões de lavagem, em temperaturas e tempos apresentados na Tabela 7.13. Em seguida, a lâmina foi lavada delicadamente com água destilada, para remoção dos sais, e seca a temperatura ambiente no escuro por 10 minutos.

Tabela 7.13. Protocolos de hibridização e lavagem das amostras.

Sondas	Temperaturas de hibridização	Soluções tampão para hibridização	Temperaturas de lavagem	Soluções tampão para lavagem	Referências
ARC915	45 ⁰ C por 2 horas	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida*	48 ⁰ C por 20 minutos	20mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 0,01% SDS (pH 7,2) *com 225 mM de NaCl	Hahn <i>et al.</i> , 1992 <i>apud</i> Araújo (2001)
EUB338 NON338	46 ⁰ C por 1 hora e 30 minutos	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida*	48 ⁰ C por 15 minutos	20mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 0,01% SDS (pH 7,2) *com 225 mM de NaCl	Abe (1998) <i>apud</i> Araújo(2001)
MB1174 MB310 MS821 MSMX860	37 ⁰ C por 4 horas	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl; 0,1% SDS (pH 7,2) + 40% formamida*	37 ⁰ C por 30 minutos	igual ao tampão de hibridização mas sem formamida	Raskin <i>et al.</i> , 1994 <i>apud</i> Araújo (2001)

* A formamida é inserida no tampão de hibridização e o NaCl é inserido no tampão de lavagem no momento do uso.

· Observação Microscópica

Para a visualização microscópica, as amostras foram submetidas à coloração com 9 µL de DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindol) em concentração de 3,8 µg/mL. A lâmina foi mantida no escuro a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi lavada gentilmente com água destilada para retirar o excesso do corante e seca nas mesmas condições anteriores. Antes de cobrir a lâmina com a lamínula, 1µL de solução de glicerol:PBS (80:20 v/v) pH 8,5 foi colocado sobre cada amostra para evitar a perda da fluorescência das sondas e do DAPI. Quando não observada no mesmo dia, a lâmina foi guardada na geladeira ao abrigo da luz.

As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência marca Olympus BH2-RFCA utilizando-se filtros específicos para DAPI, rodamina/CY3 e autofluorescência. Estes filtros foram UG 1 (com excitação na região UV do espectro) para visualizar células coradas com DAPI; BP-545 (excitação na região verde do espectro) específico para rodamina e CY3 e, BP-490 (excitação na região azul do espectro), usado para visualizar a autofluorescência (em 420nm) das *Archaea* metanogênicas. O processamento das imagens foi feito através do software Image pro-

plus versão 3.0.1. Imagens digitais do mesmo campo microscópico foram feitas, observando a amostra primeiro com filtro para DAPI e depois com o filtro para rodamina/CY3.

4.8.5. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A diversidade da comunidade microbiana das culturas do experimento de isolamento e das amostras do RAHLF foi verificada pelo DGGE. Nesta técnica, é necessário primeiramente realizar a extração de DNA total da amostra, amplificar, com *primers* específicos, segmentos específicos do DNA total pela reação em cadeia da polimerase e então separar as bandas no gel de DGGE.

· Preparo da amostras

Alíquotas de 1,5mL das amostras das culturas de isolamento previamente homogeneizadas foram transferidas sob condições de assepsia e anaerobiose para tubos Falcon (15mL) estéreis e então centrifugadas a 6000rpm por 10 minutos a temperatura de 4°C.

Ns amostras do RAHLF, um total de 10 biopartículas foram inseridas em tubos Falcon contendo 5mL de tampão fosfato (PBS) e maceradas com espátula de vidro por 10 minutos para desprendimento das células. As células ressuspendidas foram centrifugadas a 6000rpm por 10 minutos a 4°C e o *pellet* lavado por 3x, em vórtex por 10 segundos, em 10 mL de PBS.

· Extração de DNA das culturas puras e das biopartículas do RAHLF

O DNA foi extraído com fenol e clorofórmio segundo metodologia descrita em Griffiths *et al.* (2000), com algumas modificações para melhor se adequar às amostras estudadas.

Nos tubos Falcon contendo o *pellet* das amostras, inseriu-se 0,5g de pérolas de vidro “glass beads” (150-212 microns-Sigma), tampão de extração (tampão fosfato de sódio - PBS pH 8,0), fenol pH 8,0 e clorofórmio, em quantidade de 1mL cada. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, inseridas em caixa de isopor com gelo e centrifugadas a 6000 rpm por 10min a 4°C para separar a fase aquosa (contém os ácidos nucleicos) das demais fases. A fase aquosa foi transferida para tubos de microcentrífuga estéreis e lavada, em vórtex por 10 segundos, pela adição de igual

volume de fenol e clorofórmio, separadamente. Os procedimentos de lavagem foram repetidos 2x para cada solução. O extrato bruto, a fase aquosa, foi armazenado a -20°C em tubos de microcentrífuga.

· Amplificação dos genes pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os *primers* empregados dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, nas reações de amplificação dos os extratos brutos de DNA estão descritos na Tabela 7.14.

Tabela 7.14. *Primers* dos Domínios *Archaea* e *Bacteria* utilizados nas reações de PCR das amostras das culturas e do RAHLF

Amostras	<u>Primers</u>		Sequência (5'-3')	Fonte
Culturas	Domínio <i>Archaea</i>	1100F _{GC}	<u>CGC CCG CCG CGC GCG</u> <u>GCG GGC GGG GCG GGG</u> <u>GCA CGG GGGG AAC CGT</u> CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG	Kudo <i>et al.</i> (1997)
RAHLF		1400R	CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC	
Culturas	Domínio <i>Bacteria</i>	968F _{GC}	AAC GGA AGA ACC TTAC <u>CGC CCG GGG CGC GCC</u> <u>CCG GGC GGG GCG GGG</u> <u>GCA CGG GGGG</u>	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
		1392R	ACG GGC GGT GTC TAC	
RAHLF	Domínio <i>Bacteria</i>	341F _{GC}	<u>CGC CCG CCG CGC GCG</u> <u>GCG GGC GGG GCG GGG</u> GCA CGG GGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG	Tartakvosky <i>et al.</i> (2001)
		758R	CTA CCA GGG TAT CTA ATC C	

Os *primers* foram ressuspensos em água padrão Milli-Q estéril e a concentração de 0,5nmoles foi utilizada para todas amostras em ambos os *primers*, exceto para os *primers* do Domínio *Bacteria* das amostras do RAHLF, onde concentração de 2p/mol foi utilizada.

Uma mistura de reação a partir do Kit taq DNA polimerase da invitrogen foi preparada seguindo os procedimentos descritos no Kit. Os procedimentos foram realizados em capela sob fluxo laminar e com material estéril.

A quantidade de DNA utilizada para as culturas foi de 4uL. Para as mostras do RAHLF foi necessário, primeiramente, realizar uma série de diluições (1:5; 1:10; 1:20 ou

1:30; 1:40; 1:60; 1:80 e 1:100) para determinar a quantidade ideal para cada ponto de amostragem em cada perfil longitudinal do reator, apresentada na Tabela 7.15.

Tabela 7.15. Diluições de DNA utilizadas na mistura de reação: volumes para as reações de PCR das amostras do RAHLF para os *primers* dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*

Concentrações de PCP (mg/L) usadas no RAHLF	Melhores diluições de DNA para cada ponto de amostragem do RAHLF – <i>primers</i> do Domínio <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>							
	Pt1		Pt2		Pt3		Pt4	
	ARCH	BACT	ARCH	BACT	ARCH	BACT	ARCH	BACT
0	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
5	1:10	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
15	1:40	1:80	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
20	1:40	1:80	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10

Como controle positivo para a reação de PCR com *primers* do Domínio *Archaea*, utilizou-se DNA extraído de cultura pura de *Methanosarcina sp* e para os *primers* do Domínio *Bacteria*, DNA extraído de cultura pura de *Rhodopseudomonas*. Em ambos os controles foram utilizados volume de 2uL de DNA e 48uL da mistura de reação. O branco das reações de PCR foi composto somente pela mistura de reação.

A Tabela 7.16. apresenta as condições de amplificação utilizadas no trabalho experimental.

O equipamento utilizado na amplificação foi o termociclador *Gene Amp. PCR System 2400* (Perkin-elmer Cetus, Norwalk, Conn).

Tabela 7.16. Programas de amplificação por PCR para os *primers* dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*

Numero de ciclos	Condição do PCR	<u>Archaea</u> Cultura e RAHLF	<u>Bacteria</u> Cultura	<u>*Bacteria</u> RAHLF
	Ativação da Taq	94 ⁰ C 5 minutos	94 ⁰ C 5 minutos	95 ⁰ C 5 minutos
35 20*	Desnaturação	94 ⁰ C 30 segundos	94 ⁰ C 45 segundos	94 ⁰ C 30 segundos
	Anelamento	55 ⁰ C 30 segundos	38 ⁰ C 45 segundos	45 ⁰ C 40 segundos
	Extensão	72 ⁰ C 1min e 30s	72 ⁰ C 1 minuto	72 ⁰ C 1 minuto
15	Desnaturação	-	-	94 ⁰ C 30 segundos
	Anelamento	-	-	40 ⁰ C 40 segundos
	Extensão	-	-	72 ⁰ C 1 minuto
	Final da extensão	72 ⁰ C 5 minutos	72 ⁰ C 5 minutos	72 ⁰ C 7 minutos
	Resfriamento	4 ⁰ C	4 ⁰ C	4 ⁰ C

* somente para o *primer* de *Bacteria* das amostras do RAHLF.

· Avaliação da extração do ácido nucléico e da amplificação do gene por PCR

O DNA total extraído das amostras e os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, utilizando marcadores moleculares de 1000 a 10.000 pares de bases e de 100 a 2000 para quantificar o DNA e os produtos de PCR, respectivamente.

As condições de corrida foram de 60V, 400Ma por tempo de 1 hora. Após, os géis foram corados em brometo de etídeo (1uL/mL), lavados em tampão TAE 1X e observados em fotodocumentador Eagle Eye TM III (Stratagene) equipado com “software” Eagle Sight.

- **Separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR utilizando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**

Os fragmentos de DNA 16S amplificados pela reação de PCR foram separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE), permitindo a avaliação do perfil da diversidade microbiana através do padrão de bandas obtidos (Muyzer et al., 1993).

Foi utilizado o formador de gradiente modelo 475 da Bio-Rad laboratories, com gradiente de desnaturação de 25%- 65%, para as culturas, e de 25%-70% para as amostras do RAHLF. Estes gradientes foram os que apresentaram melhor separação das bandas dentre os testados: 40% - 60% (culturas) e 30%-70% (amostras do RAHLF). Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (1 μ L/mL), lavados em tampão TAE 1X e observados em fotodocumentador *Eagle Eye TM III* (Stratagene) equipado com “software” *Eagle Sight*.

Os procedimentos detalhados de todas as etapas do DGGE e preparo de soluções estão descritos em Brucha (2001) e na Apostila de Métodos Moleculares para a Caracterização de Diversidade Microbiana (2000).

- **Frequência das análises microbiológicas**

Nos enriquecimentos 1 e 3, os exames microscópicos foram realizados mensalmente. No enriquecimento 2, reatores com e sem PCP, os exames microscópicos foram realizados nos 393^o e 483^o dias de incubação. Nos reatores com PCP, as amostras eram retiradas sempre após as realimentações com este organoclorado. No RAHLF, a observação microscópica das células por microscopia de contraste de fase e fluorescência e por microscopia eletrônica de varredura foi realizada em cada perfil longitudinal.

No isolamento, as morfologias celulares foram observadas mensalmente. O FISH e o DGGE foram utilizados no final do experimento, para identificação e verificação da pureza das culturas, respectivamente.

No RAHLF, o FISH foi aplicado no final de operação do reator e o DGGE em cada perfil longitudinal.

4.9. Ensaios de adsorção de PCP na espuma de poliuretana do RAHLF.

Para verificar eficiência do RAHLF em tratar o PCP é necessário determinar a quantidade deste organoclorado e seus congêneres que pode ficar retida na biopartícula (espuma + lodo imobilizado) pelo processo de adsorção. Para tanto, anteriormente à cada adição de PCP, biopartículas foram retiradas do reator para a quantificação do PCP adsorvido.

A metodologia utilizada para a extração do PCP e intermediários clorados das biopartículas foi a desenvolvida pelo aluno de Doutorado Gunther Brucha do Laboratório de Processos Biológicos/ EESC/USP, cuja eficiência de extração é de 90-100%. Por esta metodologia, um total de 10 biopartículas foram transferidas para Tubos de DQO contendo 10 mL da solução de NaOH (0,1M). A extração foi feita em banho ultrassônico por 9 minutos, permanecendo na solução por 12 horas. Após esse período, as amostras foram submetidas novamente a banho ultrassônico por 9 minutos e posteriormente levadas ao vórtex por 1 minuto, à velocidade máxima. Os cubos de biopartículas foram pressionados contra a parede do tubo para a drenagem da fração líquida, transferidos para um béquer e enviados à estufa à 80 °C por 24 horas para secagem e posterior pesagem. Alíquota de 1mL da fase líquida foi utilizada para a extração e derivatização do PCP e intermediários clorados.

Ser jovem é ter a capacidade do perdão, é andar com os olhos cheios de capim-cheiroso. É ter tédios passageiros, é amar a vida, é ter uma palavra de compreensão.

(Artur da Távola)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente trabalho de pesquisa. A apresentação se dará em etapas de acordo com o cronograma experimental desenvolvido (item 4 – Figura 6).

Na etapa 1, esforços foram centrados nas análises cromatográficas na busca de um protocolo simples e que fornecesse resposta confiável para a determinação e quantificação de PCP e congêneres menos clorados nas amostras de sedimento e do meio de cultivo utilizado nos ensaios de biodegradação do PCP. As estratégias experimentais para a determinação e quantificação do PCP no meio de cultivo mostraram-se adequadas, ao passo que as adotadas para o sedimento não foram adequadas nas condições estudadas.

Na Etapa 2, foi possível constatar o elevado potencial metanogênico das amostras compostas de sedimento do Estuário de Santos-São Vicente (coleta 1) e obter culturas de arqueias metanogênicas do gênero *Methanosarcina* utilizadoras do metanol e acetato, da família *Methanobacteriaceae* utilizadoras de formiato, e bactérias fermentadoras do lactato. Esta etapa foi de grande importância para nortear as condições de cultivo das demais Etapas. Na Etapa 3, através do enriquecimento sob condições sob condições halofílicas e estimulando-se a metanogênese a partir da glicose como fonte energética, foi possível selecionar microrganismos degradadores de PCP de dois sítios do Estuário, um severamente contaminado – Cosipa e outro com menor contaminação – Largo do Canéus e cultivá-los para processos biológicos de tratamento de resíduos. Na Etapa 4, sob as mesmas condições nutricionais descritas anteriormente, a remoção de PCP no RAHLF inoculado com microrganismos do sedimento da Cosipa foi verificada.

5.1. ETAPA 1: Análises Cromatográficas – Protocolos Testados

Os estudos para determinar o protocolo mais adequado para as medidas cromatográficas do pentaclorofenol, triclorofenóis e diclorofenóis foram realizados em função das matrizes a serem analisadas, no caso sedimentos e meio de cultivo, cujas condições de salinidade devem ser levadas em conta nas etapas de extração e derivatização, bem como na busca de métodos de extração mais seguros. Foi fundamental, portanto, procurar a melhor performance das determinações cromatográficas para a apresentação confiável dos dados. Estudos anteriores realizados no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP (Damianovic, 1997 e Carmo, 2000), além dos artigos de Polese & Ribeiro (1998), Stuart & Woods (1998) e Xie (1983), foram fundamentais nesta busca.

Por não se tratar de um trabalho de pesquisa na área química, o conjunto dos resultados dos protocolos testados, por vezes, é apresentado em detalhes no corpo do texto; mas, alguns valores estão tabelados e mostrados nos Anexos (A-H).

5.1.1. Escolha do melhor veículo de dissolução de PCP e agente derivatizante

Os resultados de derivatização do PCP com anidrido acético para as soluções em K_2CO_3 e Na_2CO_3 estão mostrados na Tabela 8. Na tabela observa-se que as amostras derivatizadas com 200 μL de anidrido acético apresentaram melhores resultados para ambas as soluções de PCP quando comparadas com as amostras derivatizadas com 100 μL ; portanto, o uso desse volume foi descartado. A solução de K_2CO_3 3% foi o melhor veículo para a dissolução do PCP. Esta solução foi então empregada para os testes de metilação e acetilação do organoclorado na presença do padrão interno (2,4dibromofenol). Os Anexos A1 a A4 apresentam os valores das réplicas analisadas.

Tabela 8. Valores médios, de desvio padrão e de coeficiente de variação das áreas das soluções de PCP em K_2CO_3 3% e em Na_2CO_3 3%, empregando-se 100 e 200 μL de anidrido acético.

Soluções de PCP – 40 $\mu g/L$	Media e desvio padrão das áreas dos cromatogramas					
	100 mL de anidrido acético			200 mL de anidrido acético		
	Média	Desvio Padrão	CV (%)	Média	Desvio Padrão	CV (%)
Na_2CO_3 3%	162706	25499	15,6	499602	40136	8
K_2CO_3 3%	84839	2002	2,3	588026	5963	1

CV – coeficiente de variação

Os resultados obtidos e mostrados na Tabela 8.1. permitiram concluir que as soluções de PCP em K_2CO_3 3% foram melhores recuperadas quando metiladas, em comparação com a acetilação. Portanto, nos ensaios com as amostras de sedimento, o veículo de dissolução do PCP usado foi solução de K_2CO_3 3% e as amostras foram metiladas. Os Anexos A.5 e A.6 apresentam os valores das réplicas analisadas

Tabela 8.1. Valores médios, de desvio padrão e de coeficiente de variação dos fatores de resposta obtidos dos cromatogramas das soluções de PCP em K_2CO_3 3% acetiladas com 200 μ L de anidrido acético e metiladas com 1mL de diazometano.

Soluções de PCP	Médias dos	Desvio	CV
40 μ g/L	Fatores de resposta	Padrão	(%)
Metilada	0,88	0,01	1,1
Acetilada	0,22	0,02	9,1

CV – coeficiente de variação

Em relação ao uso da solução de NaOH 0,2M os resultados da Tabela 8.2. ilustram que a média do fator de resposta foi próxima à encontrada para a solução de PCP em K_2CO_3 3%. Portanto, a solução aquosa de NaOH 0,2M apresentou-se eficiente como veículo de dissolução deste clorofenol, podendo ser também utilizada. Ainda de acordo com os dados desta Tabela, pode-se perceber, pelo valor do coeficiente de variação e pelo desvio padrão, que as réplicas apresentaram boa reprodutibilidade. Os Anexos A.6 e A.7 apresentam os valores das réplicas analisadas.

Tabela 8.2. Valores médios, de desvio padrão e de coeficiente de variação dos fatores de resposta obtidos dos cromatogramas das soluções de PCP em NaOH 0,2M, e K_2CO_3 3% metiladas.

Soluções de PCP	Médias dos	Desvio	CV
40 μ g/L	Fatores de resposta	Padrão	(%)
NaOH 0,2M	0,78	0,02	2,5
K_2CO_3 3%	0,88	0,01	1,1

CV – coeficiente de variação

5.2. Determinação de PCP nas amostras de sedimento das coletas 1 e 2

5.2.1. Amostras compostas de sedimento da coleta 1

5.2.1.1 Ensaios para verificar a perda de PCP em amostras submetidas à secagem e à centrifugação, com e sem a adição de sulfato de sódio anidro

As Tabelas 8.3 e 8.4. apresentam os resultados para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica em termos de fatores de resposta do PCP extraído pelo método do ultrassom dos sedimentos secos na estufa e posteriormente centrifugados, na presença e ausência do sulfato de sódio anidro. Os cálculos dos fatores de resposta estão apresentados nas Tabelas B1 a B3 do Anexo B.

Tabela 8.3. Valores dos fatores de resposta dos sedimentos dopados e sem adição de sulfato de sódio.

Sedimento	Acidificado		Alcalinizado		Alcalinizado/Acidificado	
	FR		FR		FR	
	am1	am2	am1	am2	am1	am2
Seco na estufa	n.d	n.d	2,77	0,83	-	-
Centrifugado	0,70	0,81	-	-	1,55	-

Legenda: n.d. – não detectado; (-) - injeções não foram realizadas; FR – Fator de resposta

Tabela 8.4. Valores dos fatores de resposta dos sedimentos dopados e com adição de sulfato de sódio

Sedimento	Acidificado		Alcalinizado		Alcalinizado/Acidificado	
	FR		FR		FR	
	am1	am2	am1	am2	am1	am2
Seco na estufa	0,82	n.d	-	-	-	-
Centrifugado	1,03	0,94	-	-	n.d.	-

Legenda: n.d. – não detectado; (-) - injeções não foram realizadas; FR – Fator de resposta

Nas amostras de sedimento não dopadas (controle), não foram detectados picos cromatográficos de PCP.

De acordo com os resultados das Tabelas 8.3. e 8.4, para as amostras de sedimento acidificado, as submetidas à secagem apresentaram fatores de resposta menores que as submetidas à centrifugação. Assim, no processo de secagem, tanto com a utilização ou não de sulfato de sódio anidro, ocorreu provavelmente maior perda do PCP ao se comparar com as amostras submetidas à centrifugação. O mesmo pode ser observado para os sedimentos alcalinizados e alcalinizados/ acidificados sem a adição de sulfato de sódio anidro. Esta resposta é reforçada ao observar os resultados obtidos com as amostras de água dos tubos centrifugados. Nestas amostras não foram detectados picos cromatográficos no tempo de retenção do PCP e nem do padrão interno (2,4DBF), para todos os tratamentos. Estes resultados indicam que os analitos

PCP e 2,4DBF nas amostras centrifugadas ficaram retidos na matriz. O pH das amostras dos sedimentos antes da dopagem, em cada tratamento, era de aproximadamente 8,0. Em meio alcalino, o PCP tende a se desprender da matriz e ir para o meio aquoso. Pelos resultados obtidos, isto provavelmente não ocorreu nas condições experimentais realizadas. Portanto, nestes tratamentos, muito provavelmente, não ocorreu perda dos analitos do sedimento para a água.

Sem a utilização de sulfato de sódio anidro, os resultados foram melhores para as amostras de sedimento acidificado em relação aos demais tratamentos. Em vista disso, no ensaio com sulfato de sódio anidro optou-se por analisar somente o sedimento acidificado.

Os resultados mostrados nas tabelas ilustram, que para as amostras de sedimento acidificado, os fatores de resposta com e sem a utilização de sulfato de sódio anidro estiveram muito próximos. Como as amostras de sedimento foram pré-centrifugadas para a retirada de excesso de água, a umidade restante não interferiu no processo de extração.

5.2.1.2. Análise das curvas de calibração e da recuperação dos clorofenóis extraídos das amostras de sedimento

As curvas de calibração apresentadas na Figura 7 foram elaboradas com os fatores de resposta das soluções - padrão, cujos valores estão apresentados na Tabela C1 (Anexo C). A partir da equação da reta obtida, as concentrações absolutas de cada clorofenol foram calculadas, tanto para a solução padrão quanto para a matriz dopada (Tabelas 8.5 e 8.7, respectivamente).

De acordo com os resultados da Tabela C1 (Anexo C) e observando-se os valores de Q e dos coeficientes de variação (CV), pode-se concluir que as réplicas apresentaram boa repetibilidade. Pelo teste de Dixon's (Q), não foi necessário retirar nenhuma réplica para o cálculo da média. Os valores dos coeficientes de variação ficaram abaixo de 15 %, limite de erro máximo permitido para o aceite das réplicas.

Os valores do coeficiente de correlação (r) dos gráficos de calibração (Figura 7), demonstraram boa exatidão entre os fatores de resposta e as concentrações teóricas de clorofenóis utilizadas, uma vez que os valores de r foram próximos a 1, exceto para o pentaclorofenol e para o 2,3 diclorofenol, em que os valores de r foram iguais a 0,9863 e 0,9805, respectivamente. Estes dois últimos resultados poderiam comprometer a correlação entre as concentrações absolutas dos clorofenóis na solução padrão com as concentrações teóricas, conforme ilustrado na Tabela 8.5. Assim, é importante utilizar as concentrações determinadas ao invés das teóricas no cálculo da recuperação do método de extração. A tabela também mostra as médias dos fatores de resposta (FR) das soluções padrão utilizadas para

calcular as concentrações determinadas, a partir das equações da curva de calibração (Figura 7). O cálculo da média dos fatores de resposta das soluções padrão encontra-se no Anexo C (Tabelas C1.1-C.1.6).

Figura 7. Representação esquemática das curvas de calibração de cada clorofenol.

Tabela 8.5. Valores das concentrações teóricas e absolutas dos clorofenóis na solução padrão, calculadas a partir das equações da curva de calibração

Pentaclorofenol			2,6 diclorofenol			2,3 diclorofenol		
CT	Média	CD	CT	Média	CD	CT	Média	CD
(µg/L)	FR	(µg/L)	(µg/L)	FR	(µg/L)	(µg/L)	FR	(µg/L)
5	3,3	5,2	50	0,2	48,8	50	0,2	45,6
10	2,9	11,5	100	0,4	96,8	100	0,23	91,1
50	4,7	40,3	200	0,6	216,8	200	0,40	218,4
100	8	97,1	300	0,9	296,8	300	0,44	282
200	15,1	224,6						
300	18,6	286,2						

2,4,6Triclorofenol			2,3,6, triclorofenol			2,3,4 triclorofenol		
CT	Média	CD	CT	Média	CD	CT	Média	CD
(µg/L)	FR	(µg/L)	(µg/L)	FR	(µg/L)	(µg/L)	FR	(µg/L)
5	0,3	3,3	5	0,6	11,6	5	0,8	1,4
10	0,4	8,1	10	0,6	11,6	10	1	23,1
50	1,7	53,4	50	1,4	39,3	50	1,2	39,1
100	3,2	96,8	200	6,6	202,2	100	2	94,8
200	6,6	207,5				200	3	208
300	9,3	294,8				300	4	295,7

Legenda. CT- concentração teórica; CD – concentração determinada ou absoluta

A Tabela 8.6. apresenta os valores médios, desvios padrão e coeficientes de variação dos fatores de resposta obtidos com a extração dos clorofenóis por ultrassom das amostras de sedimento dopadas. A Tabela 8.7 apresenta as concentrações absolutas (determinadas) dos clorofenóis na matriz dopada e as concentrações teóricas. Essa tabela também mostra a média dos fatores de resposta (FR) da matriz dopada, utilizada para calcular as concentrações absolutas, a partir das equações do gráfico de calibração (Figura 7). O cálculo da média dos fatores de resposta da matriz dopada está ilustrado no Anexo (Tabelas C2.1-C2.6).

As concentrações absolutas dos clorofenóis da curva de calibração e da matriz dopada foram utilizadas para o cálculo da recuperação relativa do método de extração, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8.8 e Figura 7.1. A equação utilizada para o cálculo da recuperação do método de extração está apresentada na equação 7.

Tabela 8.6. Valores das médias, dos desvios-padrão (DP) e dos coeficientes de variação (CV) dos fatores de respostas (FR) das réplicas das amostras de sedimento.**Pentaclorofenol**

µg/Kg sedimento	10	50	200
Média FR	0,3	1,2	4,2
DP	0,03	0,06	0,08
CV	8,06	4,64	1,9

2,6 diclorofenol

µg/Kg sedimento	10	50	200
Média FR	-	0,2	0,5
DP	-	0,01	0,04
CV	-	2,6	8,1

2,3 diclorofenol

µg/Kg sedimento	10	50	200
Média FR	-	-	0,4
DP	-	-	0,03
CV	-	-	6,6

2,4,6 triclorofenol

µg/Kg sedimento	10	50	200
Média FR	0,30	1,1	3,8
DP	-	0,03	0,3
CV	0,05	2,3	8,7

2,3,6 triclorofenol

µg/Kg sedimento	10	50	200
Média FR	0,3	1,4	4,4
DP	0,02	0,1	0,4
CV	4,9	10,8	8,8

2,3,4 triclorofenol

µg/Kg sedimento	10	50	200
Média FR	0,2	0,6	1,6
DP	-	0,01	0,1
CV	1,3	2,3	6

Tabela 8.7. Comparação entre as concentrações absolutas dos clorofenóis na matriz dopada, calculadas a partir das equações da curva de calibração (Figura 7) e as concentrações teóricas.**Pentaclorofenol**

CT (µg clorof./Kg sedimento)	Média FR	CD (µg clorof./Kg sedimento)
10	0,3	-
50	1,2	-
200	4,2	29

2,6 diclorofenol

CT (µg clorof./Kg sedimento)	Média FR	CD (µg clorof./Kg sedimento)
10	-	-
50	0,2	19
200	0,5	149

2,3 diclorofenol

CT (µg clorof./Kg sedimento)	Média FR	CD (µg clorof./Kg sedimento)
10	-	-
50	-	-
200	0,4	254,7

2,4,6 triclorofenol

CT (µg clorof./Kg sedimento)	Média FR	CD (µg clorof./Kg sedimento)
10	0,3	2,9
50	1,1	30,4
200	3,8	118

2,3,6 triclorofenol

CT (µg clorof./Kg sedimento)	Média FR	CD (µg clorof./Kg sedimento)
10	0,3	4
50	1,4	38,6
200	4,4	133,6

2,3,4 triclorofenol

CT (µg clorof./Kg sedimento)	Média FR	CD (µg clorof./Kg sedimento)
10	0,2	-
50	0,6	-
200	1,6	76,8

Legenda: CT: concentração teórica; CD: concentração absoluta; **média RF:** média dos fatores de resposta da matriz dopada utilizada para calcular a CR; -: abaixo do limite de quantificação.

Tabela 8.8. Resultados da recuperação (%) do método de extração dos clorofenóis das amostras de sedimento da coleta 1, dopadas com 10, 50 e 200 µg/L de clorofenóis.

ANALITOS	CD Sed	CD CC	Recuperação
Concentração de dopagem - 10mg/L (mg clorofenol/Kg sedimento) (mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(%)
Pentaclorofenol	-		-
2,6 diclorofenol	-		-
2,3 diclorofenol	-		-
2,4,6 triclorofenol	3	8	36
2,3,6 triclorofenol	4	11	35
2,3,4 triclorofenol	-		-

Concentração de dopagem - 50mg/L (mg clorofenol/Kg sedimento) (mg/L)	(mg/L)	(%)
Pentaclorofenol	-	40
2,6 diclorofenol	29	49
2,3 diclorofenol	-	45
2,4,6 triclorofenol	30	53
2,3,6 triclorofenol	38	39
2,3,4 triclorofenol	-	39

Concentração de dopagem-200mg/L (mg clorofenol/Kg sedimento)	(mg/L)	(%)
Pentaclorofenol	29	224
2,6 diclorofenol	149	217
2,3 diclorofenol	255	218
2,4,6 triclorofenol	118	207
2,3,6 triclorofenol	133	202
2,3,4 triclorofenol	77	208

Legenda. CD Sed: concentração determinada das amostras de sedimento; **CD CC:** concentração determinada das amostras da curva de calibração; -: abaixo do limite de quantificação.

Figura 7.1. Representação esquemática dos valores de recuperação da extração de clorofenóis das amostras de sedimento da região estuarina da Baixada Santista, dopadas com 10, 50 e 200 µg clorofenóis/ Kg de sedimento.

A Tabela 8.9. apresenta a recuperação da extração do padrão interno 2,4 dibromofenol utilizado em concentração de 100 µg/L, para as matrizes dopadas com concentrações de 10, 50 e 200 µg clorofenóis/Kg sedimento.

Tabela 8.9. Resultados da recuperação (%) da extração do padrão interno das amostras de sedimento coleta 1

Padrão interno	µg clorofenóis/Kg sedimento		
	10	50	200
Área PI	137126	122597	130245
Área SED	102189	117034	112594
REC (%)	74,5	95,5	86,4

Legenda. **área PI:** área do padrão interno obtida com a solução padrão; **área SED:** área do padrão interno obtida com o sedimento dopado; **REC:** recuperação

De acordo com Causon (1997) e Pollese (1996), a recuperação dos analitos de uma matriz dopada deve situar-se entre 50 e 150%. Valores acima e abaixo destes limites invalidam o método de extração utilizado. Os resultados apresentados na Tabela 8.8 e na Figura 7.1 demonstraram que para as concentrações de 10 e 50 µg clorofenóis/Kg sedimento, o emprego do ultrassom não foi capaz de extrair a maioria dos analitos da matriz estudada e os valores obtidos ficaram abaixo do limite aceitável.

Para a concentração de 200 µg clorofenóis/Kg de sedimento, os procedimentos utilizados foram adequados para extrair todos os analitos. A recuperação para esta concentração, para os compostos 2,3; 2,6 diclorofenóis; 2,4,6 e 2,3,6 triclorofenóis apresentou-se na faixa aceitável. Entretanto, para o pentaclorofenol e 2,3,4 triclorofenol a recuperação ficou abaixo do limite aceitável. As dopagens da matriz foram realizadas em réplicas, com valores de coeficiente de variação dentro do faixa aceitável (15%), demonstrando boa repetibilidade das réplicas e descartando, portanto, possíveis erros no processamento das amostras.

Assim sendo, o método de extração avaliado nas condições estudadas foi válido somente na recuperação de concentração mínima de 200 µg clorofenóis/Kg de sedimento para os analitos 2,3; 2,6 diclorofenóis; 2,4,6 e 2,3,6 triclorofenóis. Para o PCP e 2,3,4 triclorofenol este método poderá ser aplicado em amostras de sedimento que apresentem concentrações mais elevadas destes clorofenóis. Necessitando neste caso verificar previamente a concentração mínima que o método consegue detectar.

Os resultados apresentados na Tabela 8.9. demonstram uma boa recuperação do padrão interno, não interferindo, portanto, nos resultados da recuperação da matriz dopada.

5.2.2. Extração de PCP e congêneres em amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa

Neste item serão apresentados os resultados de extração de PCP e congêneres de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa. As amostras de sedimento foram dopadas com PCP e PCP e congêneres em concentração de 5mg/Kg de sedimento úmido e deixadas em repouso por 12 horas, quando então amostras de sedimento e água foram analisados quanto à presença de clorofenóis. A Figura 7.2 e Tabela 8.10. apresentam os valores de eficiência (Tabelas C.3.1 e C.3.3 do ANEXO C) da extração de PCP e intermediários das amostras de sedimentos do Largo do Canéus e da Cosipa.

Figura 7.2. Eficiências de extração de PCP e intermediários clorados das amostras de sedimento do Largo de Caneus (a) e da Cosipa (b), para cada tempo de extração

Tabela 8.10. Recuperação (%) para cada tempo de extração dos analitos extraídos das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa dopadas com 5mg clorofenóis/Kg sedimento

Amostras	Analitos	Recuperação (%) para cada tempo de extração			
		3 minutos	5 minutos	10 minutos	20 minutos
Largo do Canéus	PCP	0,7	1	1	1
	2,3-DCP	11	13	15	16
	2,6-DCP	23	27	33	41
	2,4,6-TCP	17	22	15	18
	2,3,6-TCP	17	23	18	22
	2,3,4-TCP	19	21	23	19
Cosipa	PCP	2	2	2	2
	2,3-DCP	11	14	19	23
	2,6-DCP	42	42	54	56
	2,4,6-TCP	25	29	25	29
	2,3,6-TCP	24	29	28	33
	2,3,4-TCP	25	27	25	29

Os resultados apresentados na Figura 7.2 (a) e (b) e Tabela 8.10. demonstram que a extração do PCP foi inadequada para ambos os sedimentos, sob todos os tempos de extração empregados. Nos sedimentos dopados apenas com PCP a quantidade extraída ficou abaixo do limite de detecção da curva de calibração (0,025 mg/L), o que não é satisfatório. Para os demais clorofenóis, apesar dos resultados terem sido melhores, a eficiência de recuperação também ficou inferior ao mínimo aceitável (50 e 150%) para a utilização do método.

Os valores máximos obtidos para as amostras de sedimento do Largo Canéus e da Cosipa foram iguais 2% e 5% (PCP); 15 e 20% (2,3DCP); 40 e 50% (2,6DCP); 25% (2,4,6TCP); 25 e 30% (2,3,6TCP) e 20% (2,3,4TCP), respectivamente.

O método de extração utilizado foi o descrito por Xie (1983). Este autor obteve eficiências de extração, em tempo de 10 minutos, da ordem de 96, 90 e 85% para 1g de sedimento respectivamente dopado com 5µg PCP, 40µg 2,4,6, triclorofenol e 10µg 2,4 diclorofenol /Kg sedimento. Para o presente trabalho, este método não foi eficaz para os sedimentos do Largo do Canéus e da COSIPA dopados com 5mgPCP/Kg de sedimento e tempo de extração de até 20 minutos.

Os resultados apresentados nesta Tese para as amostras de sedimento das coletas 1 e 2 demonstraram que o método do ultrassom não foi adequado para extrair os clorfenóis nas condições estudadas. Nakayama (2001), utilizando o método de extração por Soxhlet obteve eficiência de extração de PCP de 28%; bastante superior aos obtidos nesse trabalho com ultrassom por 36 minutos. Pollese & Ribeiro (1998) pela extração com ultrassom obtiveram recuperação de 80-110% para amostras de 5g de solo dopadas com 10, 40 e 200 ugPCP/Kg solo.

5.3. Implementação de metodologia analítica para a determinação de PCP e seus congêneres em matriz líquida

5.3.1. Análise de clorofenóis por cromatografia gasosa sem derivatização

O Anexo D apresenta a Figuras D2, D3 e D4 que representam os cromatogramas obtidos durante a avaliação das colunas cromatográficas HP1, HP17 e HP608, respectivamente. Os resultados apresentados quando do emprego da coluna HP1 revelaram que devido a coluna ser apolar, os compostos se acumularam em um mesmo pico, não havendo separação dos analitos na corrida cromatográfica. Por sua vez, os testes com as colunas HP17 e HP 608, de polaridade intermediária e de maior comprimento que a HP1 foram realizados para avaliar a melhor estrutura de retenção dos compostos, a fim de aprimorar a separação dos analitos. Como as respostas foram negativas para todas as colunas testadas, pôde-se melhor avaliar que a estrutura química dos compostos clorados confere aos mesmos a necessidade de derivatização para proporcionar o aumento da volatilidade e diminuir a polaridade e reatividade química, resultando em picos simétricos e de fácil quantificação. Assim sendo, o método de derivatização por anidrido acético baseado em Stuart e Woods (1998) em substituição ao diazometano foi então testado, obtendo-se os resultados descritos nos itens a seguir.

5.3.2. Determinação de clorofenóis no meio de cultivo Zinder salino a 2%

5.3.2.1 Análise da recuperação dos clorofenóis extraídos do meio cultura

A Tabela 8.11 e a Figura 7.3 mostram os valores de recuperação dos clorofenóis pelos diferentes testes realizados. Estes valores foram calculados considerando-se as concentrações absolutas da curva de calibração preparada com água Milli-Q e as da matriz dopada, conforme apresentado na Tabela E.15 Anexo E (Teste1), Tabela F.15 Anexo F (Teste 2); Tabela G.13 Anexo G (Teste 3) e Tabela H.14 Anexo H (Teste 4). Os Anexos também apresentam para cada teste os valores Q, as médias, os desvios padrão e o coeficiente de variação dos fatores de resposta calculados para as curvas de calibração e para a matriz dopada. As Tabelas do Anexo E, E.1.a E.9 (curva de calibração) e E.11 a E.13 (matriz dopada) referem-se ao Teste 1; as Tabelas do Anexo F, F.1.a F.9. (curva de calibração) F.11 a F.13 (matriz dopada) referem-se ao Teste 2; as Tabelas do Anexo G, G.1.a G. 7 (curva de calibração) e G.9 a G.11 (matriz dopada) referem-se ao Teste 3; as Tabelas do Anexo H, H.1.a H.8 (curva de calibração) e H.10 a H.12. (matriz dopada) referem-se ao Teste 4. Observando-se estas Tabelas, pode-se concluir que em todos os testes, os resultados apresentaram boa repetibilidade, uma vez que somente para algumas amostras, tanto para a elaboração da curva de calibração quanto para a análise do meio de cultura, foi necessário retirar uma das réplicas para o cálculo da média dos fatores de reposta.

Isto se fez necessário, pois o valor de Q (Teste de Dixon's) excedeu o valor crítico ou por estas réplicas resultarem em valores de coeficiente de variação superior a 15%. Em todos os testes, os resultados obtidos apresentaram boa exatidão, uma vez que os valores do coeficiente de correlação (r) dos gráficos de calibração foram próximos de 1 (Figuras E1 e E2 – Anexo E (Teste 1); Figura F1 – Anexo F (Teste 2); Figura G1 – Anexo G (Teste 3); Figura H1 – Anexo H (Teste 4)).

Tabela 8.11. Valores das recuperações (%) dos clorofenóis extraídos das amostras do meio de cultura pelos testes 1 a 4.

Analitos	Recuperação (%) Testes			
Concentração de dopagem -0,025mg/L	3			4
Pentaclorofenol			66	
2,6 diclorofenol			-	
2,3 diclorofenol			-	
2,4,6 triclorofenol			81	
2,3,6 triclorofenol			100	
2,3,4 triclorofenol			35	51
Concentração de dopagem - 0,1mg/L	1	2	3	4
Pentaclorofenol	88	91	99	87
2,6 diclorofenol	161	100	136	108
2,3 diclorofenol	201	65	132	-
2,4,6 triclorofenol	159	178	114	104
2,3,6 triclorofenol	158	57	106	106
2,3,4 triclorofenol	134	149	98	91
Concentração de dopagem - 0,25 mg/L	1	2		
Pentaclorofenol	87	79		
2,6 diclorofenol	137	92		
2,3 diclorofenol	161	107		
2,4,6 triclorofenol	145	130		
2,3,6 triclorofenol	125	56		
2,3,4 triclorofenol	120	109		
Concentração de dopagem - 1 mg/L	1	2	3	4
Pentaclorofenol	86	77	93	135
2,6 diclorofenol	111	81	114	118
2,3 diclorofenol	129	102	107	97
2,4,6 triclorofenol	151	115	110	124
2,3,6 triclorofenol	61	65	108	99
2,3,4 triclorofenol	118	99	100	122

TESTE 1

TESTE 2

TESTE 3

TESTE 4

Figura 7.3. Representação esquemática dos valores de recuperação dos clorofenóis na matriz líquida pelos testes de extração estudados

A Tabela 8.12. apresenta os valores de recuperação do padrão interno 2,4DBF utilizado na concentração de 340 µg/L (Testes 1 e 2) e 170 µg/L (Testes 3 e 4). Os valores foram obtidos das Tabelas E.3, E.4. e E.7.(curva de calibração) e de E.11 a E.13. (matriz) do Anexo E - Teste 1; F.3, F.4. e F.7.(curva de calibração) e de F.11.a F.13. (matriz) do Anexo F - Teste 2; G.2, G.4. e G.7.(curva de calibração) e de G.9. a G.11.(matriz) do Anexo G - Teste 3; H.1, H.3. e H.6.(curva de calibração) e de E.10. a E.12.(matriz) do Anexo E - Teste 4.

Tabela 8.12. Valores de recuperação (%) do padrão interno, obtidos nos métodos de extração das amostras do meio de cultura dopadas com clorofenóis.

Concentração de dopagem dos clorofenóis (mg/L)	Recuperação (%) 2,4 DBF			
	Testes			
	1	2	3	4
0,025			81	201
0,1	77	152	82	81
0,25	80	154		
1	78	147	91	102

De acordo com Pollese (1996) e Causon (1997), a recuperação dos analitos de uma matriz dopada deve situar-se entre 50 e 150%. Valores acima e abaixo destes limites comprometem o método de extração utilizado. Nos testes de 1 a 4 trabalhou-se com baixas concentrações de clorofenóis com o objetivo de verificar o limite de quantificação apresentado em cada teste. Os resultados apresentados na Tabela 8.11 e na Figura 7.3 demonstram que os testes 2, 3 e 4 apresentaram boa recuperação de todos os analitos em todas as concentrações de dopagem, exceto para a de 0,025 mg/L (testes 3 e 4). As Tabelas G.8. e H.9. (Anexos G e H) mostram que esta concentração está muito próxima do limite de quantificação da curva de calibração do teste 3, ou abaixo dele no caso do teste 4, não podendo, portanto, ser considerada. O teste 1, na concentração de dopagem de 0,1 mg/L, apresentou recuperação acima do limite aceitável para a maioria dos analitos (valores em negrito na Tabela 8.11), a qual não é adequada. Nas demais concentrações os resultados foram semelhantes aos outros testes.

Visto que o procedimento do teste 4 foi o mais simples, rápido e econômico, pois consumiu menos solvente, bem como os resultados demonstraram que não houve perda na recuperação dos analitos, ele foi aplicado para as análises de clorofenóis nos ensaios microbiológicos de degradação do PCP.

Os resultados apresentados na Tabela 8.12 mostram que a recuperação do padrão interno (entre 74 e 86%) esteve dentro do limite aceitável (50-150%), não interferindo, portanto nos resultados dos clorofenóis recuperados da matriz dopada (meio de cultura).

O teste 4, para concentração de dopagem de 0,025 mg/L, foi observado valor de recuperação do padrão interno igual 201%. A concentração utilizada do padrão interno, tanto no meio de cultura quanto na curva de calibração, para todas as concentrações de clorofenóis, tem de ser muito parecida, conforme observado nas Tabelas do Anexo E, E1 a E8 (curva de calibração) e E11 a E12 (matriz dopada). O valor elevado da recuperação do padrão interno significa que a concentração do composto utilizada no meio de cultura foi superior à utilizada na curva de calibração, conforme mostrado nas Tabelas do Anexo E (E1 – curva de calibração e E10 – matriz dopada). Este procedimento resulta em valores de recuperação dos clorofenóis extraídos do meio de cultura sub-estimados. No entanto, como esta concentração de clorofenóis (0,025 mg/L) esteve abaixo do limite de quantificação da curva de calibração, conforme ilustrado na Tabela E9 (Anexo E), não foi necessário repetir o ensaio de dopagem da matriz para esta concentração.

A Tabela 8.13 mostra os valores dos fatores de resposta dos procedimentos realizados no Teste 4, para verificar se a acetilação e extração realizadas juntas por tempo de reação de 1 minuto eram iguais aos obtidos com a acetilação e extração realizadas juntas por tempos de reação de 2 e 3 minutos.

Tabela 8.13. Valores dos fatores de resposta obtidos com solução de clorofenóis de 25 µg/L, com o processo de acetilação e extração realizadas juntas por tempos de reação de 1, 2 e 3 minutos.

Clorofenóis	Tempos de reação (minuto)		
	1	2	3
2,6	0,11	0,12	0,10
2,3	0,19	0,12	0,12
2,4,6	0,21	0,24	0,20
2,3,6	0,21	0,20	0,17
2,3,4	0,18	0,19	0,17
PCP	0,35	0,32	0,27

De acordo com os resultados apresentados na Tabela acima, observa-se que os valores dos fatores de resposta para os três tempos de reação foram bastante parecidos. O tempo de reação de 1 minuto foi o escolhido para realizar o teste 4, cujos resultados já foram previamente discutidos.

De acordo com os procedimentos apresentados na Tabela 62 observa-se que o protocolo empregado nesta Tese utilizou menor volume de solvente em relação à demais metodologias apresentadas na Tabela apesar de um maior volume de derivatizante ser utilizado. Ainda, o tempo para análise foi menor, uma vez que a acetilação e a extração foram realizadas em conjunto no tempo total de 1 minuto.

Tabela 8.14. Comparação dos protocolos de extração e derivatização do PCP de matriz líquida

Métodos	Volume de amostra (mL)	Concent. K ₂ CO ₃ (g/L)	Concent. do PI	Volume de anidrido acético (μL)	Volume de hexano (mL)	Tempo de acetilação e extração (min)		
						Separadas		Em conjunto
						Acet	Extr	
1	1	1,8	5ppm	25	1	2	2	
2	0,1	152	250 ug/L	75	1	20	10	
3	10	70	-	1000	5	2	2	
4	2	70	28ug/L	200	2	2	-	
5	1	76	170 ug/L	375	0,5			1

1. Perkins *et al.* (1994) – entre a acetilação e a extração a amostra permanece 30 minutos em repouso; 2. Stuart & Woods (1998); 3. Nicholson *et al.*; (1992) - ; 4. Juteau *et al.*; (1995). Nos métodos 2, 3 e 4, entre a acetilação e a extração a amostra permanece 20 minutos em repouso; 5. metodologia desenvolvida neste trabalho ; PI (padrão interno – 2,4dibromofenol)

O limite de quantificação do método desenvolvido neste trabalho foi de 50 μg/L para todos os clorofenóis. A recuperação apresentou valores da ordem de 84 a 130% para o meio de cultivo dopado com concentrações de 0,1 e 1mg/L de PCP e congêneres. A repetibilidade para a curva de calibração (Tabelas H1-H8 – Anexo H) e para a matriz dopada com 0,1 e 1mg/L, foram adequadas, com valores de desvio padrão variando, respectivamente, entre 0,04-0,11 (CV: 7-14) e 0,3-0,5 (CV: 8-11). Estes valores estão apresentados nas Tabelas H11 e H12 do Anexo.

O protocolo desenvolvido para a análise da recuperação do clorofenóis extraídos do meio cultivo pelo método empregado foi adequado mediante os resultados obtidos, podendo ser empregado no monitoramento dos ensaios de biodegradação do PCP.

5.4. ETAPA 2. Isolamento e caracterização de culturas de bactérias e arqueias metanogênicas crescidas na presença e na ausência de PCP

O conhecimento do metabolismo e bioquímica de culturas puras de microrganismos envolvidos na fermentação do metano é muito importante para a aplicação biotecnológica na solução de problemas ambientais. Por isso, o enfoque no enriquecimento seguido de isolamento de culturas metanogênicas e não-metanogênicas.

O potencial metanogênico das amostras compostas de sedimento da coleta 1 foi verificado através do enriquecimento em condições metanogênicas e halofílicas. Este resultado possibilitou a utilização deste enriquecimento como inóculo na obtenção de culturas de arqueias metanogênicas e bactérias cultivadas na ausência e presença de PCP.

5.4.1. Enriquecimento das amostras compostas de sedimento da região estuarina do Porto de Santos-São Vicente : Enriquecimento 1

Os frascos reatores inoculados com amostras compostas dos sedimentos da região estuarina de Santos-São Vicente provenientes da coleta 1 foram operados por aproximadamente 200 dias. As alimentações, realizadas com os substratos orgânicos lactato, acetato e formiato de sódio nos dias 60^o; 70^o; 84^o, 104^o, 136^o e 198^o de incubação, foram feitas sempre a cada redução na produção de metano, como observado na Figura 8 e Tabela 9. No 70^o dia de incubação, a salinidade foi alterada. As alimentações dos sistemas foram feitas com base na relação DQO/SSV, de acordo com os procedimentos esclarecidos em Material e Métodos. Nessa figura observa-se que os frascos reatores apresentaram produção de metano em torno de 50%, mesmo após a correção da salinidade do meio de cultivo, ou seja, de 0,84% para 2% pela adição de uma solução de NaCl. As quedas bruscas na produção do gás deveram-se às operações dos dois sistemas, como pode ser visto na legenda da figura. Ainda, pode-se afirmar que os microrganismos adaptaram-se à condição salina mais elevada, pois em período de dois dias a produção de metano se restabeleceu, atingindo valores na atmosfera dos frascos-reatores 1 e 2, respectivamente de 40% e 30% em 30 dias de incubação. O maior valor do metano no reator R1 pôde ser relacionado à frequência da adição de substrato após a correção da salinidade.

Figura 8. Produção do gás metano (%) em cada frasco reator em função do período de incubação.

Tabela 9. Procedimentos de operação dos frascos reatores apresentados na Figura 8

Legendas	Tempos de incubação (d)	Procedimentos
a	52	Troca de atmosfera dos reatores
R1	60	primeira alimentação
R2;b	70	correção da salinidade do reator R1 e segunda alimentação
R3	84	terceira alimentação
c	93	retirada de inóculo do reator R1 para o experimento de isolamento
R4	104	quarta alimentação
R5;d	136	correção da salinidade do reator R2 (d) e quinta alimentação
R6	198	sexta realimentação dos reatores

A determinação da presença de ácidos orgânicos no meio de cultivo anaeróbico (Tabela 9.1.) indica a degradação dos substratos acrescidos ao meio, com atividade fermentativa e de troca entre os consórcios microbianos característicos da metanogênese dos resíduos. No presente trabalho, as medidas foram feitas com a intenção de evitar que a forma de alimentação proposta para o enriquecimento não provocasse desequilíbrio na metanogênese. Ainda que os teores dos ácidos orgânicos medidos tenham sido baixos, a concentração de ácido propiônico determinada no 33º dia de incubação, da ordem de 600mg/L, aparentemente não afetou a metanogênese. O ácido propiônico, em geral, é um dos compostos que, se acumulados no meio anaeróbico, pode ocasionar desequilíbrio na metanogênese (Speece, 1996). É interessante notar que a degradação desse ácido é realizada por microrganismos acetogênicos produtores de hidrogênio, o qual é utilizado pelas arqueias metanogênicas na redução do CO₂ a metano. Como a degradação do propiônico é termodinamicamente desfavorável ($\Delta G' = +76,1$ kJ/mol), o acúmulo pode ter ocorrido, inicialmente, pela atividade das arqueias hidrogenotróficas que estaria se estabelecendo e, portanto, com a remoção do hidrogênio menos efetiva. Posteriormente, uma vez a atividade metanogênica estabelecida, o ácido passou a ser totalmente degradado. Ainda, o ácido propiônico certamente foi derivado pela quebra das moléculas como

glicose e lactato, esse último passível de ser utilizado por microrganismos redutores do íon sulfato (BRS).

Tabela 9.1. Valores das concentrações de ácidos orgânicos voláteis em cada frasco reator ao longo do tempo de incubação

Tipo dos Ácidos Orgânicos	Períodos e concentrações dos ácidos orgânicos (mg/L)					
	33°. dia		83°. dia		150°. dia	
	Reator1	Reator2	Reator1	Reator2	Reator1	Reator2
Acético	21	26	5	9	18	68
Propiônico	662	607	0,5	-	-	99
Isobutírico	8	9,3	2,6	-	-	-
Butírico	1	0,8	0,2	0,2	-	-
isovalérico	5	5,5	0,2	-	-	-
valérico	0,5	-	0,2	0,3	-	-

Legenda. - não detectado

As medidas de DQO ao longo do tempo não descreveram a redução da matéria orgânica adequadamente, uma vez que, foram realizadas na amostra retirada homogeneizada. Assim, a DQO inicial de 6,6g/L e os valores a cada retirada dos sistemas de reação 1 e 2 na faixa de 1,5 a 3,0 g/L não mostraram as variações constatadas na produção do metano e nos baixos valores de ácidos orgânicos no meio.

Interessante é atestar que, provavelmente, a produção do metano biogênico verificada pela ativação dos sedimentos através de meios controlados e sob condições anaeróbias, seja a primeira resposta já descrita sobre metanogênese dos sedimentos estudados. Os substratos estudados, glicose, lactato, acetato, formiato e metanol foram adequados para o desenvolvimento de um consórcio que envolve todas as etapas para a geração final do metano de amostras que de alguma forma foram originadas de ambientes influenciados por maiores teores de sal. Em ambientes marinhos, no entanto, o fluxo de elétrons é usualmente dominado por bactérias redutoras de sulfato (BRS) em detrimento da atividade das arqueias metanogênicas, devido à presença de concentrações da ordem de 27mM (2522mg/L) de sulfato nos sedimentos. Nesse caso, ambos os grupos competiriam por substratos comuns, no caso, acetato e metanol. Porém, mesmo que a presença de lactato possa também ter facilitado o desenvolvimento das BRS, a ausência de sulfato no meio de cultivo evitou a competição entre os dois grupos microbianos.

É certo que a estratégia de enriquecimento resultou positiva para estimular a atividade metanogênica dos sedimentos, revelando a existência da cadeia alimentar anaeróbia metanogênica. Nesse sentido, a condução do enriquecimento resultou em amostras a serem submetidas ao isolamento de culturas, cultivadas na presença e ausência do PCP.

5.4.2. Isolamento e caracterização de culturas

5.4.2.1. Resposta de culturas microbianas em meio de cultivo na presença e ausência de PCP

A tentativa de isolar as culturas oriundas do enriquecimento, através de cultivos na presença do PCP conduzidos com elevados teores deste composto (60 e 20 mg/L), não resultou adequada. Certamente, as concentrações de PCP utilizadas no meio de cultivo foram responsáveis pela ausência de crescimento celular. O monitoramento do consumo de PCP, dos ácidos voláteis e da produção do metano durante o tempo de incubação estabelecido, de 3 meses, revelaram que para todos os substratos estudados nenhuma das diluições decimais seriadas resultou em cultivo de culturas degradadoras. Ao longo deste período, as maiores diluições 10^{-2} a 10^{-4} inoculadas, monitoradas quinzenalmente, tiveram respostas semelhantes aos controles inoculados com sedimento enriquecido inativado por autoclavação. Nesse último caso, pode-se afirmar que não houve perda abiótica por adsorção ou volatilização do clorofenol.

Como se constatou a turbidez dos frascos de diluição, ainda que os parâmetros de monitoramento não tenham indicado atividade celular, foram feitas observações microscópicas após 145 dias de incubação, como pode ser visto nas Figuras 8.1. e 8.2. Muito embora os exames microscópicos revelassem a presença de estruturas celulares integras, não se pôde relacioná-las aos parâmetros avaliados sobre o metabolismo celular anaeróbico.

Figura 8.1. Morfologias predominantes nos frascos reinoculados contendo meio de cultivo para arqueias e bactéria na presença de PCP, após 145 dias de incubação. Observação no aumento de 1500x e microscopia de contraste de fase. a) cocos e filamentos; b) filamentos; c) cocos pequenos.

Figura 8.2. Morfologias predominantes nos frascos Repique 2 contendo meio de cultivo para arqueias e bactéria na presença de PCP, após 145 dias de incubação. Observação no aumento de 1500x e microscopia de contraste de fase. a) células disformes; b) filamento; c) cocos pequenos.

Com estes resultados pode-se concluir que, as concentrações de PCP de 60 e 25 mg/L foram tóxicas para as culturas nas condições estudadas, ainda mais se comparando com trabalhos em literatura (Tabela 4 do Capítulo Revisão da Literatura). A toxicidade pôde muito provavelmente ser relacionada com a baixa densidade celular utilizada na inoculação, resultando em elevada relação inicial tóxico/microrganismo. As concentrações escolhidas no presente trabalho basearam-se na possibilidade do sedimento ter um maior número de células potencialmente degradadoras e, portanto, a seleção poderia ser mais efetiva. Apesar dos resultados alcançados não terem sido adequados, o experimento permitiu refazer o protocolo para o isolamento de culturas, que foi precisamente empregado no trabalho de doutorado realizado em paralelo de Nakayama, C.R. (2005), dentro do Programa BIOTA FAPESP. Particularmente, recomendou-se para obtenção de culturas puras: utilizar inóculo previamente enriquecido na presença de compostos organoclorados ou de compostos indutores da desalogenação e com resultado positivo para atividade desalogenadora; - caso o inóculo não tenha sido previamente enriquecido ou exposto a compostos clorofenólicos ou a indutores da desalogenação aumentar a relação microrganismo/organoclorado; verificar frente a literatura quais os doadores de elétrons que favoreçam a desalogenação e quais concentrações mais adequadas, de modo a utilizá-las tanto no enriquecimento quanto no isolamento.

As culturas crescidas na ausência do PCP, por sua vez, revelaram bom desenvolvimento e presença do metano, ao longo de todos os sub-cultivos realizados ao longo de 8 meses de incubação. Os valores iniciais de metano para os frascos cultivados para crescimento metanogênico (substratos acetato, formiato e metanol) foram de 20 a 30%; para as bactérias redutoras de sulfato-BRS (substrato lactato e aceitor de elétron sulfato) e para o cultivo de

bactérias em geral (substrato lactato) de 10 a 30% . Os sub-cultivos posteriores das mesmas amostras mantiveram, em intervalos regulares de incubação de cerca de 40 dias, valores de metano de 20%. Uma das culturas, denominada Cultura A, mostrava regularidade na produção do metano em acetato, metanol e formiato, aproximadamente 20% em intervalos dos sub-cultivos de 30 a 40 dias e, por isso, foi escolhida para estudos visando a caracterização de culturas de arqueias metanogênicas. Foram de 5 a 6 os repiques para os três grupos selecionados de crescimento, de acordo com os substratos estudados. Assim, as culturas obtidas a partir desse número de sub-cultivos, ainda que não totalmente puras, foram submetidas a ensaios para identificação de fontes orgânicas preferenciais de crescimento e caracterização filogenética pelas técnicas FISH e DGGE. Esta última pode também mostrar o estado de purificação das culturas pela presença das bandas de DNA obtidas.

5.4.2.2 Ensaios fisiológicos e caracterização filogenética das culturas de arqueias metanogênicas e de bactérias cultivadas na ausência de PCP

Os resultados de produção de metano das culturas de arqueias metanogênicas e de bactérias para a Cultura A em meios contendo metanol e os ácidos acético e fórmico a 30°C, estiveram na faixa de 50 a 65% em intervalos quinzenais de sub-cultivos ou de adição dos substratos nos frascos incubados e com metano. A Cultura A cultivada em metanol e ácido acético, nos mesmos intervalos, atingiram 70%. Quando a Cultura A foi submetida ao crescimento com fontes em separado, a produção do metano foi, respectivamente de 70% para o meio contendo acetato (Cultura C), de 35 a 40% para o meio contendo metanol (Cultura D) e de 20 a 30% em meio com formiato (Cultura E). Ainda que o cultivo em lactato de sódio e sulfato privilegiasse as BRS, metano da ordem de 20 a 30% foi encontrado para intervalos de 15 dias de sub-cultivo (Cultura F). O crescimento microbiano em todos os frascos foi satisfatório e os exames microscópicos demonstraram que a estratégia adotada para o isolamento resultou na seleção de tipos microbianos bastante semelhantes às morfologias geralmente encontradas para as metanogênicas. As morfologias observadas sob contraste de fase na cultura em meio com acetato de sódio foi grumos de tétrades semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp, fluorescentes sob luz ultra-violeta. Bacilos não fluorescentes foram também observados na mesma cultura. O antibiótico vancomicina foi empregado nas etapas finais de crescimento das culturas metanogênicas, pois inibem apenas outros anaeróbios, facilitando a purificação da cultura.

A Figura 8.3 ilustra a extração de DNA e os produtos de PCR e a Figura 8.4. as fotografias dos géis de agarose (DGGE) das culturas de arqueias metanogênicas e de bactérias dos últimos sub-cultivos das Culturas C, D, E e F (as letras representam as condições originais de crescimento em substratos específicos).

Figura 8.3. Fotos dos géis de agarose 1% ilustrando a extração de DNA (a) e os produtos de PCR (b-d) das culturas de arqueias metanogênicas e bactérias do sedimento do estuário de Santos-São Vicente. **Legenda.** (a) extração de DNA; (b) PCR com *primer* do Domínio *Archaea* utilizando 2µl de DNA; (c) PCR com *primer* Domínio *Archaea* utilizando 4µl de DNA; (d) PCR com *primer* Domínio *Bacteria* utilizando 4µl de DNA.

Em cada foto da Figura 8.3. as letras nas canaletas representam os cultivos em: C; C₁: acetato de sódio; D: metanol; E;E₁: formiato de sódio; F; F₁: lactato de sódio. Os símbolos + e -, representam os controles positivo e o branco, respectivamente. A letra L representa o marcador molecular (DNA “ladder”).

Figura 8.4. Fotos dos géis de DGGE das culturas de arqueias metanogênicas e bactérias do sedimento do estuário de Santos-São Vicente. **Legenda.** (a) e (b) DGGE dos produtos de PCR usando *primers* para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente, com gradientes dos géis iguais a 40% e 60%. (c) e (d) DGGE dos produtos de PCR usando *primers* para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente, com gradientes dos géis iguais a 25% e 65%.

Em cada foto da figura 8.4. as letras nas canaletas representam os cultivos em: C; C₁: acetato de sódio; D: metanol; E;E₁: formiato de sódio; F; F₁: lactato de sódio.

A quantidade de DNA total extraída das culturas apresentou bandas muito fracas, como pode ser observado ao comparar com o marcador molecular (Figura 8.3 (a)), indicando, portanto, pouca quantidade extraída de DNA. Assim, alíquota de 2µL de DNA não foi suficiente para a amplificação pelo PCR nas condições estudadas usando *primers* de arqueia (Figura (b)). A amplificação da cultura pura utilizada como controle positivo e a não amplificação do branco (somente os reagentes sem DNA), demonstram que a reação de PCR estava adequada. Deste modo, alíquota maior de DNA (4µL) foi utilizada resultando em boa amplificação tanto para os *primers* de arqueia quanto para os de bactéria (Figura 8.3. (c); (d)). Estes produtos de PCR foram então utilizados para a separação das bandas pelo gel de DGGE.

A adequada separação de bandas é essencial para a análise do DGGE. O gradiente de separação de 40-60% inicialmente adotado não resultou em boa separação, tanto para os *primers* de arqueia quanto para os de bactéria (Figura 8.4. (a); (b)). Com o gradiente de 25-65% as bandas foram melhores separadas (Figura 8.4. (c); (d)).

A Tabela 9.2 apresenta um resumo dos resultados da identificação filogenética das culturas pela técnica do FISH, cujos resultados serão discutidos no decorrer do texto para cada cultura. A coluna de porcentagem do metano é para revelar que os cultivos avaliados apresentavam atividade de arqueias metanogênicas. As culturas estão apontadas também por letras (relacionam-se às usadas no DGGE).

Em todas as culturas foi utilizada a sonda NON338, que por não possuir seqüências complementares a nenhuma espécie conhecida de microrganismo, detecta hibridização inespecífica. Em todas as culturas o sinal de hibridização foi negativo, demonstrando, portanto, a ausência de hibridização inespecífica.

Tabela 9.2. Resumo dos resultados da técnica FISH, a partir das culturas da região do estuário de Santos-São Vicente

Cultura	Substrato Orgânico	CH ₄ (%)	Microscopia contraste de fase / fluorescência e DAPI	Resultados de FISH ¹
C	acetato	50	Cultura praticamente pura de cocos fluorescentes muito semelhantes à <i>Methanosarcina</i> presença de alguns bacilos e víbrios	EUB338. sinal negativo para os grumos de cocos e para os bacilos e víbrios
				ARC915. sinal positivo para grumos de cocos e negativo para os bacilos e víbrios
				MS821. sinal positivo para os grumos de cocos e negativo para os bacilos e víbrios.
D	metanol	35	Idem à cultura C mas com a presença de alguns bacilos fluorescentes	Idem cultura C
E	formiato	20	Cultura pura de bacilos fluorescentes	EUB338. sinal negativo para os bacilos e cocos
				MB1174. sinal muito fraco
				ARC915+ MB1174. sinal fraco ARC915+ MB310. sinal fraco MB1174+ MB310. sinal positivo
F	lactato	20	predomínio de cocos fluorescentes e presença de alguns bacilos	EUB338. sinal fraco para os bacilos e negativo para os cocos
				ARC915. sinal positivo para os cocos e negativo para os bacilos
				MS821. sinal positivo para os cocos e negativo para os bacilos

Muito embora compostos haloaromáticos sejam naturalmente produzidos em ambientes marinhos (Gribble, 1992), são ainda poucos os tipos microbianos isolados dos sedimentos desses sistemas que estejam envolvidos com a desalogenação anaeróbia de moléculas. Em 1992, Gribble (1992) obteve isolados desalogenadores de bromofenóis e, em 2000, Sun *et al.* (2000) isolaram a primeira espécie desalogenante, atuante no 2-CP a fenol, com concentrações salinas equilibradas em meios de cultivo com NaCl de 0,16 a 2,5% (p/v), denominando-a *Desulfovibrio dechloroacetivorans* linhagem SF3. Em 2001, Cole & Tiedje (2001) identificaram a *Desulfomonile limimaris* de sedimentos marinhos, uma bactéria degradadora de 3-clorobenozato em meios contendo metade da concentração de NaCl encontrada no mar. A tentativa no presente trabalho de isolar culturas anaeróbias desalogenadoras do PCP a partir dos sedimentos

enriquecidos não resultou adequada. Ainda que com um foco semelhante aos trabalhos de pesquisa citados principalmente para as condições salinas, a concentração elevada dos clorofenóis foi inadequada, como anteriormente comentado. Contudo, um protocolo mais apropriado foi definido para que o grupo de pesquisas do Programa Biota FAPESP efetivasse a busca desses isolados moderadamente halófilos ou halófilos.

Assim, os experimentos nessa etapa direcionaram-se na obtenção das culturas metanogênicas, sob condições salinas de 2%, uma vez que a metanogênese dos resíduos oriundos de áreas contaminadas do estuário foi verificada, tanto no ensaio de enriquecimento, como nos passos de isolamento de culturas.

A região estuarina de Santos- São Vicente recebeu no período de 1966 a 1988 resíduos contendo compostos organoclorados e ainda está sujeita ao impacto causado pela presença de numerosas indústrias, como as das áreas petroquímica, siderúrgica e de produção de fertilizantes (CETESB, 2001). Neste contexto, o conhecimento do potencial anaeróbio do sedimento desta região é de grande importância para o estuário, pois fornece não somente informações relevantes da diversidade microbiana presente em ambiente estuarino contaminado e desconhecido como também contribui para o entendimento dos processos anaeróbios de degradação que ocorrem na área de estudo.

Sabe-se que o isolamento e o cultivo de arqueias metanogênicas é um trabalho árduo, uma vez que estes microrganismos requerem longos períodos de incubação para seu desenvolvimento sob baixíssimos potenciais de óxi-redução - anaeróbios estritos, e alguns membros são de difícil separação de outros organismos sintróficos (Garcia *et al.*, 2000).

No presente trabalho, as culturas de arqueias metanogênicas e as de bactérias utilizadoras de lactato foram obtidas após sucessivos sub-cultivos.

· Cultura em acetato de sódio

A cultura crescida em acetato de sódio (Cultura C) apresentou grumos celulares que ao serem examinados sob microscopia de contraste de fase e fluorescência constatou-se fluorescência e arranjo das células de arqueias metanogênicas de tétrades gram positivos, do gênero *Methanosarcina* (Figura 8.5 a-d), confirmado pelas hibridizações positivas com as sondas para Domínio *Archaea* (ARC915) e para o gênero *Methanosarcina* sp (MS821) (Figuras 8.6 e 8.7 respectivamente). Este microrganismo consome entre outros substratos o acetato para produzir metano, segundo a reação (1):

Figura 8.5. Morfologias observadas na cultura de arqueia metanogênica cultivada em meio com acetato de sódio. (a) e (c) grumos de tétrades semelhantes ao gênero *Methanosarcina*, sob contraste de fase - aumento de 1000x e 1500x, respectivamente; (b) e (d) grumos de tétrades semelhantes ao gênero *Methanosarcina*, sob microscopia de fluorescência, observadas no aumento de 1000x e 1500x, respectivamente; (e) e (f) bacilos não fluorescentes observados no aumento de 1000x e 1500x, respectivamente

Figura 8.6. Hibridização com a sonda ARC915 da cultura cultivada em acetato de sódio: (a);(c);(e) coloração com DAPI; (b); (d); (f) cocos hibridizados com a sonda ARC915. (a);(b) aumento de 1500x; (c)–(f) aumento de 1000x

Figura 8.7. Hibridização com a sonda MS821 da cultura de arqueia metanogênica cultivada em acetato de sódio: (a);(c) coloração com DAPI; (b); (d) cocos hibridizados com a sonda MS821. Aumento de 1000x

O acetato é um dos principais intermediários da decomposição anaeróbia da matéria orgânica em ambientes aquáticos. Apesar de ser considerado um dos principais precursores de metano na natureza, poucas espécies, como por exemplo *Methanosarcina* sp e *Methanosaeta* sp são capazes de utilizar este substrato, sendo que *Methanosaeta* sp é capaz de utilizar somente acetato enquanto *Methanosarcina* sp utiliza uma ampla variedade de substratos além do acetato (Garcia *et al.*, 2000).

O grupo das sarcinas metanogênicas é o mais metabolicamente versátil dentre as metanogênicas, uma vez que é capaz de consumir acetato, metanol e hidrogênio, os quais podem ser obtidos diretamente como produto do metabolismo das bactérias fermentativas ou em associação obrigatória (sintrofismo) com os microrganismos produtores de hidrogênio. Estudos recentes citados em Garcia *et al.* (2000) demonstram a capacidade destes microrganismos em

oxidar piruvato à metano e dióxido de carbono, compostos nitroaromáticos na presença de formiato e algumas linhagens de *Methanosarcina* têm sido usadas para a descloração de tetracloetileno, clorofórmio e desalogenação de triclorofluormetano.

A presença de bacilos não fluorescentes gram negativos (Figura 8.5 (e)-(f)) na cultura crescida em acetato pode indicar conversão sintrófica do acetato à H_2 e CO_2 , catalisada por uma bactéria homoacetogênica. Zinder & Koch (1984) *apud* Schink (1997), por exemplo, isolaram uma bactéria homoacetogênica termófila ($58^{\circ}C$) capaz de oxidar ou sintetizar acetato dependendo da concentração de hidrogênio no meio, e liberar o hidrogênio para uma metanogênica reduzi-lo a metano. As reações descritas a seguir, segundo Schink (1997) resumem essa interação:

A ausência de crescimento celular no meio com vancomicina, após 45 dias de incubação, e a presença de bacilos não fluorescentes (Figura 8.5 (e);(f)) no meio sem vancomicina, bem como as bandas de bactéria no gel de DGGE (Figura 8.4 (d), corroboram com essa suposição. Vazoller (1995) também descreveu uma co-cultura semelhante oriunda de biodigestores operados com vinhaça, sob condições termofílicas. Não há descrição de tais co-culturas oriundas de ambientes estuarinos.

Pela técnica FISH, entretanto, os bacilos não hibridizaram com a sonda específica para o Domínio *Bacteria* (EUB338) e também com a sonda específica para o Domínio *Archaea* (ARC915). O substrato utilizado no meio de cultivo, acetato, foi muito provavelmente prontamente consumido pela *Methanosarcina* para produção de CH_4 , que no momento da fixação das amostras estava em torno de 50%, indicando elevada atividade do metabolismo metanogênico. Como estes bacilos não hibridizaram com a sonda ARC915 e não fluoresciam (característica das arqueias metanogênicas), provavelmente no momento da fixação da amostra, pela baixa atividade metabólica e/ou ou pelo baixo número em relação ao dos grupos celulares fluorescentes em forma de sarcinas,, não foram hibridizados com a sonda EUB338. De acordo Sanz (2002) e Amann *et al.*, (1995), a técnica FISH detecta somente os organismos metabolicamente ativos e em concentração celular próxima a 10^4 células/mL.

· Cultura em metanol

Na natureza, o metanol é derivado da biodegradação de compostos aromáticos metoxilados, pectina e hemicelulose. Atividade antropogênica também é responsável para a liberação de metanol no ambiente. Este composto é um dos constituintes orgânicos encontrados em águas residuárias de indústrias de produção de fibras de poliésteres, na precipitação de policlorofenóis altamente clorados e em processos de condensação (Florencio, 1994). As arqueias metanogênicas utilizadoras de metanol se encontram distribuídas amplamente na natureza, em sedimentos aquáticos e biodigestores de resíduos, como exemplos. Porém, são poucos os gêneros descritos até o momento capazes de converter o metanol a metano, retirando também energia para seu crescimento.

No presente trabalho, a cultura D cultivada em metanol apresentou grumos celulares visíveis a olho nu. Estes grumos quando observados sob microscopia de contraste de fase e fluorescência apresentaram-se como arranjos celulares em forma de cocos fluorescentes gram positivos do gênero *Methanosarcina* (Figura 8.8), constatado pelas hibridizações positivas com as sondas para Domínio *Archaea* (ARC915) e para o gênero *Methanosarcina* sp (MS821) (Figura 8.9). Este microrganismo é uma arqueia metanogênica que realiza a conversão direta do metanol à metano, segundo a seguinte reação (4):

Certamente, de todos os resultados até o momento obtidos, chama atenção a obtenção de células fluorescentes (Figura 8.8.d) em formato de bacilos gram negativos crescidas em metanol, na presença e ausência de vancomicina. Estes bacilos fluorescentes não foram possíveis de serem observados sob microscopia de contraste de fase uma vez que eram mascarados pelos cocos. Este efeito foi atenuado em fluorescência, possibilitando a observação dos bacilos. A presença destes microrganismos conduz à provável metanogênese do metanol por organismos metanogênicos em formato de bacilos, o que não há ampla descrição a respeito na literatura especializada. Particularmente no The Prokaryotes – An Evolving Electronic Resource for The Microbial Community (<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>), indicam-se alguns gêneros da Família *Methanosarcinaceae* que incluem cocos característicos em sua habilidade em utilizar compostos com um carbono (o que pode incluir o metanol – CH_3OH) como substrato para metanogênese, tais como *Methanolobus*, *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Halomethanococcus*, and *Methanohalophilus*. Os três últimos compreendem espécies halófilas moderadas e extremas, mas não estão bem caracterizadas dentro dessa

família. A espécie *Methanococcus halophilus* também poderia ser considerada nesse grupo. Porém, bacilos metanogênicos utilizadores de metanol não são conhecidos. A presença de acentuada banda de bactéria no DGGE (Figura 8.4 (d)), revela que a associação em co-cultura não deve ser descartada, na qual a transformação do metanol por um grupo não metanogênico gera hidrogênio e ou acetato para o metanogênico (Florencio, 1994), conforme reações (5) e (6) descritas abaixo:

As reações de conversão de acetato e hidrogênio à metano estão descritas nas equações (1) e (3)

Pela técnica FISH, estes bacilos não hibridizaram com a sonda para o Domínio *Bacteria* (EUB338) e nem com a sonda para o Domínio *Archaea* (ARC915). O substrato utilizado no meio de cultivo, metanol, foi muito provavelmente prontamente consumido pela *Methanaosarcina* para produção de CH_4 , que no momento da fixação das amostras estava em torno de 35%. Conforme já explicado anteriormente, para a cultura cultivada em acetato de sódio, a técnica FISH detecta somente os organismos metabolicamente ativos e em concentração celular próxima a 10^4 células/mL. Assim, devido provavelmente à limitação pelo substrato para os bacilos, estes estavam em baixa atividade metabólica e/ou em baixo número, não podendo ser detectados pela técnica FISH com as sondas utilizadas.

Os resultados do DGGE demonstram que nas culturas de arqueias metanogênicas cultivadas em meio com acetato de sódio e metanol, a espécie isolada de arqueia do gênero *Methanosarcina*, detectado pelo FISH, muito provavelmente não foi a mesma, uma vez que a banda mais acentuada no gel foi detectada em posição diferente (8.4.(c)). Para o Domínio *Bacteria*, como o padrão de bandas foi o mesmo para as duas culturas, muito provavelmente a espécie isolada foi a mesma, mesmo considerando que os bacilos presentes na cultura em acetato não fluoresciam e os da cultura em metanol fluoresciam.

Figura 8.8. Morfologias observadas na cultura de arqueia metanogênica cultivada em meio com metanol: (a) e (b) grumos de cocos e bacilos observados em meio de cultivo com vancomicina em contrastes de fase e fluorescência, respectivamente. Aumento de 1000x; (c) e (d) grumos de cocos e bacilos observados em meio de cultivo sem vancomicina em contrastes de fase e fluorescência, respectivamente. Aumento de 1000x. (e) e (f) grumos de cocos observados em meio de cultivo com vancomicina em contrastes de fase e fluorescência, respectivamente. Aumento de 1000x

Figura 8.9. Hibridização com a sonda MS821 da cultura de arquea metanogênica cultivada em metanol: (a);(c);(e) coloração com DAPI; (b);(d);(f) cocos hibridados com a sonda MS821. Aumento de 1000x

· Cultura em formiato de sódio

A cultura crescida em formiato de sódio (Cultura E) apresentou produção de metano em torno de 20%. O exame microscópico revelou a presença de bacilos longos fluorescentes gram negativos semelhantes ao gênero *Methanobacterium* (Figura 8.10). Todas as espécies deste gênero podem crescer em meio com H₂ e CO₂. Mas somente seis espécies (*M. formicicum*, *M. defluvii*; *M. oryzae*; *M. palustre*; *M. subterraneum*; *M. thermoflexum*) podem usar formiato. O formiato de sódio é convertido à metano pela seguinte reação (7):

Pela técnica FISH, após as tentativas de hibridização com a sonda da família *Methanobacteriaceae* (sonda MB1174), dupla hibridização com a sonda do Domínio *Archaea* (sonda ARC915) e com as sondas MB1174 e MB310 (*Methanobacteriaceae*), esta última resultou em sinal positivo, confirmando que os bacilos pertencem realmente à família *Methanobacteriaceae* (Figura 8.11) na qual o gênero *Methanobacterium* está inserido. Ambas as sondas MB1174 e MB310 pertencem à mesma família, o que difere é a região do RNAr 16 que elas hibridizam e conseqüentemente a sequência de nucleotídeos (Tabela 7.10, item 4.8). A sonda MB310 é específica para a região 331-310 e a MB1174 é específica para a região 1195-1174. Assim ao fazer a dupla hibridização ampliou-se a possibilidade de regiões do RNAr possíveis de serem hibridizadas. Nesta hibridização, apesar de sinal positivo, as células estavam muito pequenas, decorrente muito provavelmente da desidratação das mesmas durante a etapa de fixação. Células em formato de cocos pequenos também hibridizaram com as sondas MB1174 + MB310. Esta morfologia não foi observada ou passou despercebida nos exames microscópicos realizados nos sub-cultivos anteriores, devido muito provavelmente à grande quantidade de grumos de bacilos que eram observados.

A Figura 8.4 (d) ilustra a detecção de banda do Domínio *Bacteria* na cultura cultivada em formiato de sódio. Como esta cultura cresceu muito bem em meio com vancomicina, e os dois últimos repiques foram realizados sem este antibiótico, muito provavelmente ocorreu contaminação da cultura.

Figura 8.10. Morfologias observadas na cultura de arqueia metanogênica cultivada em meio com formiato de sódio com vancomicina: (a) e (c) grumos de bacilos semelhantes ao gênero *Methanobacterium* em contrates de fase; (b) e (d) grumos de bacilos fluorescentes semelhantes ao gênero *Methanobacterium*.

Figura 8.11. Hibridização dupla com as sondas MB1174+MB310 da cultura cultivada em formiato de sódio: (a);(c); coloração com DAPI; (b);(d) amostra hibridizada com as sondas MB1174+MB310. Aumento de 1000x.

A família *Methanobacteriaceae* contém sete gêneros com uma variedade de morfologias incluindo pequenos bacilos, cocos irregulares e planas (“planed-shapes cells”). Esta família está inserida na ordem *Methanomicrobiales* que compreende as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. A grande maioria dos microrganismos da família *Methanobacteriaceae* são capazes de utilizar o formiato e alguns álcoois secundários. Dentre os utilizadores do formiato, o gênero *Methanobacterium*, por exemplo, incluem células mesofílicas em forma de bacilos e os gêneros *Methanogenium*, *Methanoculleus* e *Methanocalculus* incluem os cocos irregulares gram negativos (Garcia *et al.*; 2000).

Shilmon *et al.* (2004) isolaram de ambiente marinho a arqueia metanogênica hidrogenotrófica - *Methanobacterium aarhusense*, uma nova espécie mesofílica com células em forma de filamentos capaz de crescer em pH 7,5-8,0 e concentração de NaCl de 100-900mM.

Zhao *et al.* (1986) isolaram uma arqueia metanogênica relacionada ao gênero *Methanobacterium* linhagem CB-12, cultivada em meio contendo formiato. Este microrganismo foi proveniente de uma amostra de digestor anaeróbico mesofílico alimentado com mistura de fezes suína e humana.

· Cultura em lactado de sódio

O lactato é um importante intermediário metabólico na digestão anaeróbia de compostos orgânicos e pode ser degradado através de diferentes rotas bioquímicas anaeróbias (Vazoller, 1995). As bactérias podem degradar o lactato pela respiração anaeróbia do sulfato ou pela fermentação. A cultura em meio com lactato de sódio (1,8g/L) - Cultura F - apresentou metano da ordem de 20%. As morfologias celulares observadas no frasco foram bacilos (Figura 8.12). Apesar das arqueias metanogênicas não terem sido visualizadas através do exame de fluorescência, principalmente nos últimos sub-cultivos, pode-se afirmar a existência de sintrofismo entre a bactéria fermentadora do lactato e arqueias metanogênicas consumidoras de acetato e/ou hidrogênio (produtos da fermentação), uma vez que os sub-cultivos mostraram a presença de grumos celulares que pela técnica FISH hibridizaram com a sonda MS821, confirmando a presença de células do gênero *Methanosarcina* (Figura 8.13).

Os bacilos ao hibridizarem com a sonda EUB338 apresentaram sinal muito fraco. Este resultado pode ter sido decorrente da má qualidade da sonda, do estado fisiológico da célula (quantidade reduzida de ribossomos) ou da dificuldade de acesso da seqüência alvo do RNAr. Características da célula, como composição da parede celular, também podem atrapalhar a penetração das sondas, causando redução no sinal. O uso de fluorocromos de sinal mais forte, como o Cy3, ou a adoção de protocolos de pré-tratamento das células podem auxiliar na solução

desse problema (Moter & Göbel, 2000). A utilização de oligonucleotídeos sem marcação fluorescente chamados de “helpers” em conjunto com as sondas fluorescentes, poderiam ter contribuído para a melhora do sinal da sonda, uma vez que são utilizados para melhorar o sinal de hibridização de sondas que normalmente apresentaram sinal fraco (Fuchs *et al.*, 2000 *apud* Araújo, 2002).

Mc Inerney & Bryant (1981) observaram a degradação sintrófica anaeróbia do lactato entre *Desulfovibrio desulfuricans* e *Methanosarcina barkeri*. Nesta co-cultura, o lactato foi degradado completamente à metano e dióxido de carbono. Os ensaios realizados em meio de cultivo suplementado com acetato (20mM) mais lactato (20mM), os autores verificaram que a degradação do acetato não ocorreu até que todo o lactato fosse completamente catabolizado.

A acentuada banda nos géis de DGGE para os Domínios *Archaea* e *Bacteria* (Figura 8.4 (c); (d) comprova a existência destes dois grupos de microrganismos na cultura cultivada em lactato de sódio.

Figura 8.12. Morfologias observadas no meio de cultivo com lactato de sódio: (a) e (b) bacilos sob e cocos em microscopia de contraste de fase e fluorescência, respectivamente. Aumento de 1500x.

Figura 8.13. Hibridização com as sondas MS821 e ARC915 da cultura cultivada em lactato de sódio: (a);(c) coloração com DAPI; (b);(d) cocos hibridizados com as sondas MS821 e ARC915, respectivamente. Aumento de 1000x (a); (b); aumento de 1250x (c);(d).

Os resultados do DGGE demonstram que o mesmo padrão de bandas ocorreu nas réplicas de DNA extraído de uma mesma cultura indicando, portanto, que não houve contaminação durante o processamento das amostras. Acentuada banda foi detectada usando *primers* dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*. Entretanto, bandas de menor intensidade foram também separadas (Figuras 8.4 (c) e (d)). Como as culturas foram provenientes de sucessivos sub-cultivos com fontes orgânicas específicas e pela observação microscópica estavam praticamente puras com detecção de um único tipo morfológico de células de arqueia e de bactéria, pode-se inferir que a banda de maior intensidade é a espécie isolada e as de menor intensidade, muito provavelmente são resultantes da heterogeneidade de sequência dos *operons* do RNAr. Esta heterogeneidade faz com que, para uma determinada linhagem, duas ou mais bandas sejam detectadas.

5.5. ETAPA 3. Enriquecimento das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa – Enriquecimento 2

Interessante comentar, pois a presente tese de doutorado integra os estudos sobre diversidade microbiana com vistas ao saneamento ambiental, algumas peculiaridades observadas na região da coleta, na qual se localizam o Largo do Canéus e a Cosipa. O ponto de partida do barco para a realização das coletas ocorreu em um bairro de Cubatão próximo a palafitas, no qual a quantidade de lixo na água era bastante grande. No caminho para os pontos de coleta constataram-se nas águas em menor quantidade restos de plástico, latas e garrafas. Ainda que o gerenciamento ambiental dessa região tenha ao longo dos anos apresentados avanços consideráveis (Cetesb, 2001), é evidente a baixa qualidade dos aspectos sanitários da população. Pode-se inferir que além da contaminação química provocada por lançamentos ou descaso das indústrias no passado, a área carece ainda de cuidados essenciais de disposição de resíduos sólidos e tratamento de esgotos sanitários.

As coletas realizadas nessa etapa do projeto foram feitas com corer, um amostrador que garante mais apropriadamente a retirada dos sedimentos do fundo de sistemas aquáticos. Como observado na Figura 6.2., percebe-se que o cilindro de acrílico pode retirar “fatias” definidas de acordo com a profundidade requerida, mantendo-se as características da amostra e evitando o contato do sedimento com a coluna d’água ao percorrer a mesma em direção à superfície. O uso do corer foi indicado para os trabalhos com anaeróbios estritos, como descrito em Nakayama (2005) e, portanto, procedeu-se à essa nova amostragem com vistas a um enriquecimento (2) de amostras apropriadamente coletadas. Os pontos amostrados, Largo do Canéus e frente da COSIPA foram escolhidos com base às características de áreas menos e mais contaminadas, respectivamente. Como pode ser visto na Tabela 7.5, os pontos amostrados correspondem à descrição 4 e 5.

O enriquecimento 2 teve como finalidade verificar a degradação do PCP sob metanogênese, comparando-se dois sedimentos com características diferentes. Com base nos resultados da biodegradação, optou-se pelo sedimento a ser inoculado no reator RAHLF, operado na Etapa 4 da presente tese de doutorado.

5.5.1. Coleta das amostras e resultados dos fatores abióticos no Largo do Canéus e na Cosipa

Os valores de condutividade e salinidade determinados nas amostras da Cosipa e do Largo do Canéus foram diferentes entre si (Tabelas 10 e 10.1.). Os valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas na superfície e próximo ao sedimento (fundo) da região da Cosipa foram também diversos. O mesmo não foi observado para o Largo do Canéus. O ponto em frente à Cosipa é bastante próximo das máquinas utilizadas para carregar os navios (Figura 6.2d – item 4.2.). Foi possível observar manchas de óleo na superfície da água, formando uma película fina. As amostras de água coletadas apresentaram coloração ligeiramente amarelada. O sedimento coletado teve aspecto lodoso, consistência viscosa (semelhante à graxa), coloração preta, com brilho furta cor indicando a presença de óleo (confirmada depois pela presença de manchas no tubo de acrílico). A amostragem foi feita a 2m de profundidade. O sedimento emanava um forte odor de óleo.

O ponto 5 - Largo dos Canéus (Figura 6.2c – item 4.2.) possui uma paisagem no entorno composta principalmente de mata de mangue e um pouco mais distante verifica-se o porto da Petrobrás. As amostras foram coletadas em dois pontos bem próximos. Duas amostras foram obtidas, uma do canal do Largo na profundidade de 2,3m e a outra foi retirada em três parcelas das laterais a 1,5m de profundidade. Nesse último caso, a alteração de local foi devida a necessidade de maior quantidade de material nos cores.

A água no Largo do Canéus apresentava aspecto límpido, sem a presença de manchas e com a cor mais clara que a coletada no ponto da Cosipa. O sedimento também apresentou aspecto comum, com coloração marrom, presença de fragmentos de conchas e plantas e odor característico de regiões estuarinas.

Tabela 10. Valores dos parâmetros abióticos determinados no ponto de coleta da Cosipa.

Parâmetros	Água / Superfície		Água / Fundo		Sedimento	Ar
		*		*		
Condutividade (ms/cm)	9,36	24	30	34,1	-	-
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,3	6,15	3,9	4,63	-	-
Salinidade (‰)	5,3	15,2	19,4	21,3	-	-
PH	7,6	7,6	-	7,6	7,7	-

* parâmetros determinados por BRUCHA (2005).

Tabela 10.1. Valores dos parâmetros abióticos determinados no ponto de coleta do Largo dos Canéus

Parâmetros	Água / Superfície	Água / Fundo	Sedimento	Ar
Condutividade (ms/cm)	41,3	41,4	-	-
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4,4	4,3	-	-
Salinidade (‰)	26,4	26,5	-	-
pH	7,6	-	7,2	-

A condutividade elétrica é a capacidade de uma solução conduzir corrente elétrica, sendo esta a função da concentração de íons presentes na água (Esteves, 1988). É de se esperar que uma solução de maior concentração de íons apresente uma maior condutividade. Os valores de condutividade da água do Largo do Canéus foi muito próxima à do hipolímínio (41,3ms/cm) e maiores que a apresentada para o ponto 5 em frente à Cosipa (30 ms/cm-hipolimnio e 9,36 – água superfície). Esta diferença, muito provavelmente, pode ser relacionada aos valores de salinidade nestes mesmos pontos. Os valores de salinidade para água e hipolímínio no ponto 6 (Canéus) foram muito próximos e iguais a 26,5‰ . Já, para o ponto 5, estes valores foram iguais a 19,4‰ (hipolímínio) e 5,3‰ (água superfície).

A temperatura na superfície e na interface água/sedimento tanto para o ponto 5 (24,5°C) quanto para o ponto 6 (23,5°C) foram próximos 25°C, exceto para a água de superfície do ponto 5, onde a temperatura foi de 26°C. A falta de estratificação térmica no local se deve a baixa profundidade.

O teor de oxigênio dissolvido na superfície (4,4 mg/L) e no hipolímínio (4,3mg/L) do ponto 6 esteve próximo ao do determinado no hipolímínio do ponto 5 (3,9 mg/L); porém, menor daquele observado na água de superfície do ponto 5, de 6,3 mg/L. Brucha (2005), um ano após, obteve valores de oxigênio dissolvido de 6,15 mg/L na superfície e 4,63 mg/L no hipolímínio, também na região do ponto 5, o que pode ser característico do local.

5.5.2. Enriquecimento 2 das amostras de sedimento do Largo do Canéus e da Cosipa

Neste item os resultados dos reatores com e sem PCP serão apresentados e discutidos.

As Figuras 9.1 e 9.2. apresentam, respectivamente, a variação temporal da porcentagem de metano no biogás e da concentração de PCP nas réplicas dos reatores contendo os sedimentos de Canéus e Cosipa.

A Figura 9.3. apresenta a variação temporal da porcentagem de metano no biogás e da concentração de PCP nas réplicas 2 dos reatores controles Canéus e Cosipa.

Os valores determinados de PCP das Figuras 9.1., 9.2. e 9.3. estão no Anexo I, Tabelas I9 (Canéus) e I10 (Cosipa).

A Figura 9.4 (a) apresenta as concentrações de PCP nos reatores abióticos e a 9.5 (b), a concentração deste organoclorado no sobrenadante dos reatores controle negativo.

A Figura 9.5. apresenta a variação temporal da concentração de glicose nas réplicas dos reatores Canéus e Cosipa, operados com PCP desde o início da incubação e nas réplicas 2 dos reatores controles Canéus e Cosipa com PCP.

As Tabelas 10.2 e 10.3 apresentam a remoção (%) e velocidade de remoção entre cada realimentação, para cada reator. A Tabela 10.4 apresenta as concentrações máximas e mínimas de ácidos determinadas nos reatores Canéus e Cosipa durante o período experimental. Os valores dos ácidos nos reatores Canéus e Cosipa PCP estão no Anexo I, Tabelas I1 – I2 (Canéus) e Tabelas I5-I6 (Cosipa). Os das réplicas 2 controle positivo estão na Tabela I3 - reator Canéus e Tabela I7 - reator Cosipa. A Tabela 10.5 apresenta a porcentagem de metano no biogás e as concentrações mínimas e máximas de PCP nos sobrenadantes dos reatores Canéus e Cosipa durante o período de cada realimentação.

A Figura 10.6 e Tabela 10.6, apresentam respectivamente a produção de metano e consumo de ácidos dos reatores controle positivos. Os valores determinados dos ácidos orgânicos estão no Anexo I, Tabelas I4 (Canues) e I8 (Cosipa).

A Figura 9.6 apresenta os resultados da porcentagem de metano no biogás dos reatores controle positivo (sem PCP).

As Figuras 9.7 e 9.8 ilustram as morfologias celulares dos reatores operados com PCP.

a)

b)

Figura 9.1. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás e na concentração de PCP nas réplicas dos reatores Canéus com PCP. Canéus PCP1 (a) e Canéus PCP2 (b). A seta lilás indica adição de redutora de sulfeto de sódio.

Realimentações		
setas pretas	seta verde	setas pêssegos
R1. glicose 1,25g/L R3-R11. glicose 0,7-1g/L 3x por semana	R2. glicose 3g/L e PCP 10mg/L	R8-R13. glicose 0,7-1g/L e PCP 1,5mg/L 3x por semana

Figura 9.2.. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás e na concentração de PCP nas réplicas dos reatores Cosipa com PCP. Cosipa PCP1 (a) e Cosipa PCP2 (b). A seta lilás indica adição de redutora de sulfeto de sódio.

Realimentações		
setas pretas	seta verde	setas pêssegos
R1. glicose 1,25g/L R3-R11. glicose 0,7-1g/L 3x por semana	R2.glicose 3g/L e PCP 25mg/L	R8-R14.glicose 0,7-1g/L e PCP 3-4mg/L 3x por semana

a)

b)

Figura 9.3. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás e na concentração de PCP nas réplicas 2 dos reatores controle Canéus (a) e Cosipa (b). A seta lilás indica adição de redutora de sulfeto de sódio.

Realimentações		
setas pretas	seta rosa	R3 –R14- setas pêssegos
R1-R6. 50% das concentrações iniciais de substratos R8-R19. glicose 0,7-1g/L 3x por semana	R7. glicose 3g/L e PCP 10mg/L (CN) 25 mg/L (CP)	R13-R19. glicose 0,7-1g/L e PCP 3-4mg/L (CP) e 1,5mg/L (CN) 3x por semana

Tabela 10.2. Valores de remoção (%) de PCP por período de cada realimentação

Real.	Tempo (dias)	CN PCP1	CN PCP2	CNC2 PCP	CP PCP1	CP PCP2	CP C2PCP
		REMOÇÃO (%)					
A1	11	42	38		55	19	
	22	32	23		43,6	32	
	134	43	19		29	23,4	
1-2	134	44	58		56,5	39	
	215						
2-3	252	26	39	16*	31	29,6	39*
	324			18,5			45
4-7	340	-	12	28,6	27	12,5	-
	409						
8-10	425	27	18	8,5	31,6	20	9
	453						
10-11	455	-	20	10	22,2	9	22,7
	475						

Legenda. *valores obtidos após 10 dias da adição de PCP; Real. – realimentações
CN: Canéus; CP: Cosipa

Tabela 10.3. Valores da velocidade de consumo de PCP por período de cada realimentação

Real.	Tempo (dias)	CN PCP1	CN PCP2	CNC2 PCP	CP PCP1	CP PCP2	CP C2PCP
		Velocidade (mg/L*dia)					
A1	11	0,37	0,28		1,43	0,45	
	22	0,13	0,09		0,51	0,34	
	134	0,03	0,01		0,06	0,04	
1-2	134	0,03	0,05		0,13	0,09	
	215						
2-3	252	0,03	0,05	0,15*	0,13	0,11	1,6*/0,26
	324			0,02			
4-7	340	-	0,01	0,02	0,09	0,03	-
	409						
8-10	425	0,05	0,05	0,01	0,21	0,11	0,07
	453						
10-11	455	-	0,08	0,04	0,20	0,08	0,25

Legenda. *valores obtidos após 10 dias da adição de PCP; Real. – realimentações
CN: Canéus; CP: Cosipa

Tabela 10.4. Concentrações mínimas e máximas dos ácidos nos frascos reatores Canéus e Cosipa durante os períodos de realimentação

	Acético (g/L)						Propiônico (g/L)						Butírico (g/L)					
	REATORES						REATORES						REATORES					
Real.	CN P1	CN P2	CN C2	CP P1	CP P2	CP C2	CN P1	CN P2	CN C2	CP P1	CP P2	CP C2	CN P1	CN P2	CN C2	CP P1	CP P2	CP C2
A1	6,5-4	3,9-3,8	2,6 – 1d	2,4-3,3	6,7-5,4	3,3-1d	0,4-0,3	0,1-1,2	1,2-1d	3,4-1,4	3,7-2	1,2-1d	0,1-0,15	0,3-0,4		1,4-2,2	0,2-0,1	0,7-1d
1-2	6-4	5-3	1,5-1	1,5-2,8	6,2-2,5	1-1,5	0,3-0,2	1-0,7	0,8-0,5	2-1	2,5-1,2	0,7-0,3	0,15-0,3	0,3-0,2	-	2,1-1,9	2-1,5	-
2-3	5-2,8	4,5-2,5	3-1,7	4,5-2,5	4,5-2	2-1,5	0,2-0,3	0,6-0,7	1,6-1	1-0,4	1,5-0,6	1-0,6	1,5-0,4	2,7-0,7	1,9-0,1	2-4	1-2,6	0,8
4-7	2,8-0,9	3-1,5	2,3-1	1,5-0,9	2,5-1,2	2,1-1,5	0,7-0,2	0,6-0,1	1,6-0,8	0,5-0,2	0,7-0,3	0,7-0,3	1,5-0,5	0,8-0,4	0,1-1d	0,5-1,8	0,6-1	1
8-9	2,6-4	3,5-0,7	2,5-1,8	2-0,4	3-0,6	3,8-0,8	0,5-0,3	0,6-1d	1,3-0,9	0,4-0,07	0,6-0,1	0,7-1d	1,1-0,1	0,2-0,1	0,1-1d	0,2-0,7	0,3-1d	0,2
10-11	3-1,6	5,2-2	4,2-2	3,3-1,5	4-2	4-2,3	1,6-1	0,8-0,3	2,3-0,9	0,5-0,3	0,8-0,2	0,9-0,4	1-0,9	1,3-0,7		2,7-1,6	2-1,6	0,2
12-13	1,7	2,2	2,2	1,7-4,5	2-5	2,5-6	1	0,3	1	0,2-0,3	0,3-0,5	0,5-0,7	0,8	0,9		1,6-3,1	1,2-2	0,2-0,6

Legenda. A1 - período anterior à 1ª alimentação (até o 134^o dia de incubação); 1-13 – realimentações; CN: Canéus; CP: Cosipa; P1 e P2-réplicas dos reatores com PCP; C1-C2- réplicas dos reatores sem PCP

Tabela 10.5. Valores de metano no biogás em porcentagem e concentrações mínimas e máximas de PCP nos frascos reatores Canéus e Cosipa durante os períodos de realimentação

	CH ₄ (%)						PCP (mg/L)					
	REATORES						REATORES					
Real.	CN P1	CN P2	CN C2	CP P1	CP P2	CP C2	CN P1	CN P2	CN C2	CP P1	CP P2	CP C2
A1	18	5	70	5	5	70	*8,8-5	*8,3-6,7	-	*26-18	*23-18	-
1-2	15	15	70	12	10	70	5-2,8	6,7-2,8	-	18,4-8	18-11	-
2-3	10	-	40	10	-	40	7,3-5,4	9,8-6	*9,2-7,5	29-20	27-19	*40-22
4-7	10	10	25	15	15	10	4,2-4,7	6,8-6	5,6-4	22-16	16-14	18-19
8-10	12	20	20	10	20	15	5,5-4	8,2-6,7	4,7-4	19-13	15-12	22-20
10-11	9	20	20	15	20	24	6-6	8-6,4	7-6,3	18-14	16,5-15	22-17
										28-34	27-33	28-28

Legenda: - oxidação do meio de cultivo; * as concentrações iniciais são as determinadas no sobrenadante após a adsorção do PCP no sedimento; A1 - período anterior à 1ª alimentação (até o 134^o dia de incubação); 1-13: realimentações

Os valores apresentados nas Tabelas são referentes aos períodos entre as realimentações. O período das realimentações 1-2 foi entre o 134^o e 215^o dias de incubação; o das realimentações 2-3 foi entre o 252^o-324^o dias de incubação; o das realimentações 4-7 foi entre o 340^o-409^o dias de incubação; o das realimentações 8-10 foi entre o 425^o-453^o dias de incubação; o das realimentações 10-11 foi entre o 455^o-475^o dias de incubação; e o das realimentações 12-13 foi entre o 491^o-505^o dias de incubação. Os valores dos ácidos, metano e PCP estão nas Tabelas do Anexo I.

Figura 9.4. Variação na concentração de PCP nos frascos reatores Canéus e Cosipa (a) controles negativos e (b) controles abióticos

Figura 9.5. Variação temporal na concentração de glicose nas réplicas dos reatores Canéus e Cosipa PCP e réplicas 2 dos reatores controles após a adição de PCP.

a)

b)

Figura 9.6. Variação temporal na porcentagem de metano no biogás das réplicas 1 dos reatores controles Canéus e Cosipa. Canéus C1 (a) e Cosipa C1 (b). As setas pretas indicam as realimentações e a lilás a adição de redutora de sulfeto de sódio.

Tabela 10.6. Valores das concentrações máximas e mínimas dos ácidos orgânicos, determinados entre as realimentações das réplicas 1 dos reatores controle positivo Canéus e Cosipa.

Período (dias)	Canéus C1		Cosipa C1	
	Acético (mg/L)	Propiônico (mg/L)	Acético (mg/L)	Propiônico (mg/L)
1-52	2813-422	1157-542	3571-nd	2365-1,2
52-119	656-522	540-170	nd	15-22
137-182	1280-23	765-308	1230-11	800-8
201-229	44-12	609-108	45-9,5	675-21
252-281	1730-nd	1515-nd	1860-nd	735-nd

A compreensão do destino dos compostos aromáticos halogenados naturais ou manufaturados pelas atividades industriais no ambiente é essencial, notadamente, em relação àqueles produzidos artificialmente que são considerados poluentes persistentes ou de difícil degradação. Segundo, Lee *et al.* (1998), a desalogenação reductiva é, certamente, um dos mecanismos metabólicos de maior importância na biodegradação anaeróbia de compostos tóxicos, nos quais se incluem os clorofenóis. Assim, a busca, na presente tese de doutorado de organismos autóctones de ambientes severamente poluídos, como o estuário de Santos-São Vicente, integra esforços mundiais (Cole & Tiedje, 2001) na procura de alternativas de remediação de áreas contaminadas através dos processos biológicos. Além disso, nessa etapa, buscou-se verificar a ocorrência da metanogênese nos sedimentos estudados, uma vez que constitui uma das formas gasosas do carbono, localizada como passo final da cadeia anaeróbia de degradação dos resíduos.

A presença do PCP realmente afetou a metanogênese dos sistemas, tanto dos reatores que receberam este organoclorado desde o início - Canéus e Cosipa PCP-, quanto para os sedimentos previamente enriquecidos nos reatores controle de Canéus e Cosipa - C2PCP-, com retardamento da atividade metanogênica nos primeiros (Figuras 9.1 e 9.2.; Tabela 10.5), queda do metano nos sedimentos previamente enriquecidos (Figuras 9.3.; Tabela 10.5) e acúmulo de ácidos, principalmente acético, propiônico e butírico em ambos (Tabela 10.4). Muito provavelmente, o efeito tóxico inicial do PCP seja decorrente das elevadas concentrações utilizadas para manter a relação de 2,5mgPCP/gSTV, sendo iguais 8,3gSTV/L e 20 mg/L de PCP em Canéus e 17,7g STV /L de e 44mg/L de PCP em Cosipa. A toxicidade do composto foi comprovada ao comparar os reatores com PCP com reatores controles positivos, nos quais elevada atividade metabólica com consumo de ácidos em torno de 20-30 dias e elevada presença de metano no biogás (70%) foi observada (Figura 9.6 e Tabela 10.6). No reator Canéus PCP1, o efeito tóxico do clorado foi menos pronunciado, pois apesar de ter ocorrido acúmulo de ácido acético, o propiônico foi consumido mais rapidamente (Figura 9.1a e Tabela 10.4).

Battacharya & Jin (1996), observaram que 5mg/L de PCP causaram inibição reversível da metanogênese de uma cultura enriquecida com ácido acético na concentração de 1,9-2g/L de SSV. Os resultados apresentados em Ribarova *et al.* (2002) demonstraram que sob concentrações de 10 a 20g/L de sólidos voláteis, a velocidade de degradação do PCP foi de 0,17 e 0,44mg/L*d, respectivamente. Estes autores verificaram também a inibição da desalogenação do PCP quando 19 mg/L do composto foi acrescido ao meio de reação. Montenegro *et al.* (2001) observaram inibição da metanogênese com concentração de PCP de 15mg/L.

A relação 2,5mgPCP/gSTV ou SSV foi usada em trabalhos anteriores de biodegradação anaeróbia de compostos organoclorados, tais como Wu *et al.* (1993); Larizzati (1997) e Brucha

(2003) obtendo-se bons resultados. O parâmetro - sólidos totais voláteis (STV) - e mais especificamente os sólidos suspensos voláteis estima indiretamente a biomassa presente em um sistema. Ele é bastante usado na engenharia sanitária para se calcular a carga orgânica aplicada a um bioreator, estimando lodos com conteúdo em geral elevado de biomassa. Na presente pesquisa, as amostras foram de sedimentos estuários, nas quais uma parcela do material orgânico não é biomassa e sim matéria orgânica. Assim, ao utilizar o STV para determinar indiretamente a quantidade de biomassa no sedimento, este parâmetro foi superestimado. Isto resultou em concentrações elevadas de PCP aplicadas a sedimentos sem prévia adaptação a este composto, ocasionado queda no metabolismo metanogênico.

Nos reatores que receberam PCP desde o início do experimento, a acentuada adsorção ocorrida nas primeiras 12 horas de incubação foi responsável pela remoção de praticamente 50% das concentrações iniciais do organoclorado (Figuras 9.1; 9.2 e Tabela 10.2), com valores de 13mg/L (Canéus PCP); 18-20 mg/L (Cosipa PCP). Estes mesmos resultados foram obtidos nos reatores contendo biomassa inativada (Figura 9.4a), confirmando a remoção inicial por adsorção nos sedimentos. Já, para as réplicas 2 dos reatores controles que receberam PCP após o 252º dia de incubação, a adsorção foi verificada somente para o sedimento do Canéus, com remoção de 13mg/L do PCP (Figura 9.3 e Tabela 10.2). Paaso *et al.* (2002); Lawrence *et al.* (2000), Chen *et al.* (2004) e Nascimento *et al.* (2004) verificaram acentuada adsorção de PCP em sedimentos, relacionando-a ao conteúdo de matéria orgânica, heterogeneidade dos sedimentos e, principalmente, à presença de lipídeos. Piringer & Battacharya (1998) obtiveram acentuada adsorção de PCP em enriquecimentos de culturas acidogênicas. Miksell & Boyd (1986); Bryant *et al.* (1991); Liu *et al.* (1996), Massunaga *et al.* (1996); Kennes *et al.* (1996), Chang *et al.* (1997); Whang *et al.* (1998) não observaram adsorção de PCP em lodos e sedimentos enriquecidos.

Os resultados dos controles abióticos (sem inoculo), apresentados na Figura 9.4b, ilustram que não houve perda do PCP por volatilização.

Em revisão feita por Pak (1994), o autor observou que a degradação de compostos policlorados, principalmente os fenóis altamente clorados, os tipos de substratos orgânicos são muito importantes para os microrganismos desalogenadores, uma vez que estes compostos químicos parecem não sustentar o crescimento celular. Assim, a falta de doadores de elétrons impõe um limite na biotransformação de contaminantes. Entretanto, um excesso pode ser prejudicial à desalogenação uma vez que o metabolismo fermentativo pode vir a prevalecer. Os fatores de crescimento são também de fundamental importância. No presente trabalho, até a 1ª alimentação (R1), no 134º dia de incubação, a glicose e uma mistura de ácidos orgânicos (acético, fórmico e láctico) foram utilizados como doadores de elétrons. A partir da R1, somente

glicose foi utilizada. O meio de cultivo foi suplementado com fatores de crescimento pela adição mensal de solução de vitaminas e traço de metais. Trabalhos de Madsen e Aamand (1992), Woods *et al.* (1989); Hendriksen & Ahring (1992) Hendriksen *et al.* (1992; 1991); Holliger *et al.* (1992), Pak (1994), Tartakovsky *et al.* (2000); Zou *et al.* (2000); Takeuchi *et al.* (2000); Ye & Shen (2004) demonstraram o favorecimento da biodegradação de PCP e de outros organoclorados na presença de glicose.

Na presente pesquisa, a glicose foi prontamente consumida (Figura 9.5) em todas as alimentações, houve o favorecimento da metanogênese com produção e consumo de ácidos (acético, propiônico e butírico – Tabela 10.4) e do metabolismo do PCP (Figuras 9.1 e 9.2; Tabelas 10.2, 10.3 e 10.5). Entretanto, freqüentemente havia acúmulo de ácidos acético e butírico (Tabela 10.4).

O acúmulo de ácidos muito provavelmente foi resultado da toxicidade do PCP principalmente aos microrganismos consumidores de acetato (arqueias metanogênicas acetoclásticas e bactérias acetogênicas), e outros microrganismos consumidores de hidrogênio, como, por exemplo, os próprios desalogenadores, afetando por conseguinte os oxidadores de butirato que vivem em associação sintrófica com os consumidores de hidrogênio, conforme já observado por Wu *et al.* (1993).

Os valores baixos, mas constantes de metano no biogás (15-20%) observados tanto nos reatores que receberam PCP desde a incubação (Canéus e Cosipa PCP) quanto nas réplicas 2 dos reatores controles Cosipa e Canéus que receberam PCP após 252 dias de incubação (Figuras 9.1; 9.2 e 9.3) demonstram que a desalogenação redutiva ocorreu às expensas da metanogênese decorrente do equilíbrio dos consórcios microbianos, indicando que organismos desalogenadores estavam presentes nos sistemas. Estes microrganismos muito provavelmente eram os sintróficos oxidadores de hidrogênio, que dependem das bactérias fermentadoras primárias para a produção de elétrons. Embora a metanogênese não esteja diretamente relacionada à atividade desalogenante, ela exerceu influência indireta, uma vez que a diminuição deste metabolismo afetou não somente o consumo de ácidos, principalmente o acético e butírico, mas também do PCP. Outro grupo de microrganismos que pode ter importância indireta no metabolismo desalogenador é o das as bactérias homoacetogênicas, que consomem hidrogênio para produzir acetato e vice-versa. Ye *et al.* (2003), demonstraram que as bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio e as arqueias metanogênicas acetoclásticas estão diretamente relacionadas no metabolismo do PCP. Nicholson *et al.* (1992); Chang & Yuan (1996); Juteau *et al.* (1995); Takeuchi *et al.* (2000); Ye & Shen (2004) obtiveram bons resultados de degradação de PCP sob condições metanogênicas. Nos exames microscópicos, as morfologias predominantes nos sistemas com PCP foram bacilos formadores de esporos

semelhantes ao gênero *Clostridium* sp., filamentos e filamentos semelhantes a arqueias metanogênicas acetoclásticas relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp. (Figuras 9.7 e 9.8), indicando a provável relação destas células com o metabolismo do PCP.

Figura 9.7. Morfologias predominantes nas réplicas nos reatores Canéus com PCP observadas em microscopia de contraste de fase: (a) e (b) Canéus PCP1 e PCP2 cocos e bacilos não fluorescentes, filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaetas* sp. (aumento de 1500x); (c), (d) e (e) morfologias exclusivas de Canéus P1, (c) filamento (aumento de 1500x); (d) bacilos em cadeia (aumento de 1500x); (e) bacilos e bacilo formador de esporo (aumento de 1500x); (f) bacilos e cocos não fluorescentes presentes no reator Canéus C2 PCP, aumento de 1500x.

Figura 9.8. Morfologias predominantes nos reatores Cosipa com PCP, observadas em microscopia de contraste de fase. Cosipa C2PCP: (a) filamento semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp. (aumento de 1500x) e (b) bacilos em cadeia (1500x). (c) a (f) morfologias observadas em Cosipa PCP1 e PCP2. (c) vários bacilos (aumento de 1500x); (d) cadeia de bacilos (aumento de 1000x); (e) filamento fino (aumento de 1000x); (f) bacilos em cadeia (1000x).

Madsen & Licht (1992) isolaram uma bactéria relacionada ao gênero *Clostridium* capaz de desalogenar o PCP. Esta bactéria, um bacilo curvo formador de esporo, gram positiva e anaeróbia estrita, cresceu em meio contendo piruvato e extrato de carne, produzindo ácido acético como produto da fermentação do ácido pirúvico. Tartakovsky *et al.* (2000), encontraram predomínio de *Clostridium* sp., *Syntrophobacter* sp. e *Syntrophomonas* spp durante a degradação de PCP em reator UASB alimentado com glicose. No entanto, os autores acreditam que somente o gênero *Clostridium* sp. esteja diretamente relacionado com a degradação do PCP. Os demais microrganismos, envolvidos diretamente na oxidação dos ácidos propiônico e butírico formados pela fermentação da glicose, poderiam proliferar em associação sintrófica com os desalogenadores, uma vez que o hidrogênio só é produzido na presença de microrganismos consumidores de hidrogênio, tais como as arqueias metanogênicas, bactérias redutoras de sulfato e os desalogenadores. Ye *et al.* (2003) comentaram que bacilos e filamentos foram predominantes no grânulo. Estes autores acreditam, no de reator UASB tratando PCP, sob adições de sacarose e peptona como substratos.

· Origem do inóculo

Com relação à origem do inóculo, tanto as amostras de sedimento do ponto 4 (em frente à Cosipa), quanto à do ponto 5 (região do Largo do Canéus) apresentam contribuições de vários compostos tóxicos, incluindo bifenilas policloradas (PCBs), tricloroetileno (TCE), benzeno, tolueno, xileno, clorobenzeno e clorofenóis. Entretanto, a contaminação na região do Canéus é 150 vezes menor que em Cosipa (Cetesb, 2000).

Os frascos reatores inoculados com amostras de sedimento coletadas em frente à Cosipa apresentaram capacidade de degradar o PCP superior à apresentada para os inoculados com o sedimento do Largo do Canéus, uma vez que conseguiram degradar num mesmo período de tempo o dobro da concentração do organoclorado (Tabela 10.2 e 10.3). Isto demonstra que o inóculo previamente exposto a compostos tóxicos apresentou maior habilidade em degradar tais compostos. Resultados semelhantes foram obtidos nos trabalhos de Nicholson *et al.* (1992); Liu *et al.* (1996); Takeuchi *et al.* (2000) e Ye & Shen (2004). Segundo estes autores, a velocidade maior de degradação observada em comunidades microbianas previamente expostas a compostos recalcitrantes pode ser atribuída à maior diversidade de rotas metabólicas observadas nestas comunidades, quando comparada com as não expostas a tais compostos.

Takeuchi *et al.* (2000) demonstraram que a desalogenação reductiva do PCP na posição orto predominou sob condições metanogênicas ou sulfidogênicas, tanto para microrganismos previamente expostos ou não a contaminantes. Portanto, ela é inerente em muitas comunidades

anaeróbias. Para a ocorrência da desalogenação nas posições meta e para parece ser necessária a exposição a contaminantes, decorrentes da indução, enriquecimento ou ambos.

Conseqüentemente, a diversidade de rotas metabólicas pode também aumentar a velocidade de desalogenação, eliminando os intermediários de difícil degradação, evitando com isto que se acumulem no meio.

No presente trabalho, picos cromatográficos nos tempo de retenção de 19 minutos e 17 minutos eram detectados, podendo ser um tetraclorofenol e triclorofenol, respectivamente. A rampa utilizada para a separação dos padrões de clorofenóis pode ter limitado a separação dos demais clorofenóis que possam ter se formado durante a desalogenação do PCP. Como citado anteriormente, a desalogenação na posição orto predomina. Os padrões utilizados (2,3; 2,6 DCP; 2,4,6; 2,3,6; 2,3,4TCP) não são os intermediários mais comuns da desalogenação na posição orto.

5.6. ETAPA 4. Biodegradação do PCP no reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)

Apesar dos resultados positivos na seleção de degradadores de PCP principalmente no enriquecimento do sedimento da Cosipa (Etapa 3), a realização de um novo enriquecimento (enriquecimento 3) foi necessária. Isto porque houve um problema no termostato da incubadora elevando a temperatura para valores superiores à 100⁰C, com perda deste experimento.

Muito embora a escolha do sedimento para a operação do reator RAHLF tenha sido realizada previamente, mediante os melhores resultados de degradação de PCP pelo sedimento da COSIPA, os enriquecimentos que ora se apresentam, denominados de enriquecimento 3, foram feitos com os dois sedimentos – Largo do Canéus e da COSIPA.

Sabendo-se que o objetivo principal do enriquecimento 2 era o de obter microrganismos degradadores de PCP sob condições metanogênicas para avaliar o potencial metanogênico e de degradação anaeróbia deste organoclorado em um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), os procedimentos da Etapa 3 foram fundamentais para nortear o enriquecimento 3. Neste enriquecimento, meio halofílico Biota, utilizado com sucesso por Nakayama (2005) dentro do Programa BIOTA FAPESP, e glicose foram empregados. A estratégia de inoculação foi aprimorada, considerando-se como biomassa 20% dos sólidos totais voláteis (STV) determinados nos sedimentos e aplicando-se carga orgânica ao lodo de 0,1KgDQO*kg célula⁻¹.

Com estes procedimentos procurou-se estimular a metanogênese na presença da glicose e obter em um curto interlavo de tempo, microrganismos autóctones e metabolicamente ativos oriundos do sedimento da Cosipa, uma área severamente contaminada do Estuário de Santos-São Vicente, para inocular o reator RAHLF, onde a degradação do PCP foi a avaliada.

O reator foi operado continuamente sob condições metanogênicas, halofílicas, com cargas crescentes de PCP e glicose como fonte de carbono. A busca da diversidade microbiana autóctone no reator foi realizada usando métodos da taxonomia polifásica que certificassem a possível seleção dos tipos alvo.

5.6.1. Enriquecimento das amostras de sedimento da Cosipa com vistas à inoculação do RAHLF

A Figura 10 apresenta a porcentagem de metano no biogás das réplicas dos sedimentos enriquecidos da Cosipa em meio halofílico Biota, com glicose como fonte de carbono e na ausência de PCP.

Figura 10. Produção do gás metano (%) no biogás em cada frasco reator em função do tempo de incubação. **Legenda.** R1-R7: realimentações; a: abertura, sob fluxo de N₂ (100%), da réplica 1 do reator Cosipa (Cos1) para retirada de 200mL de lodo para inocular o RAHLF.

Na Figura 10 observa-se que a produção do metano nos frascos reatores contendo sedimento da Cosipa foi anterior a de Canéus, mantendo sempre valores superiores do gás. O mesmo comportamento foi observado no enriquecimento 2, etapa 3, no qual as amostras em meio Zinder foram estimuladas pela presença de glicose, acetato de sódio, metanol, fórmico, sulfato de sódio e extrato de levedura.

As contínuas realimentações com glicose (0,5g/L de R3 – R7) e adições periódicas de meio basal tamponado, vitaminas e extrato de levedura favoreceram o metabolismo anaeróbio com produção crescente de metano. No reator Canéus observou-se que a produção de metano foi favorecida pela adição de glicose (0,350g/L) na 2ª realimentação (21^o dia de incubação) e 0,5g/L a partir da 3ª realimentação (27^o dia de incubação). Para a montagem do enriquecimento, a relação do processo anaeróbio de 0,1kgDQO/kgcélula foi adotada. Visto que a concentração

de STV nas amostras de sedimento do Canéus (33gSTV/L) foi praticamente a metade da apresentada para COSIPA (70gSTV/L), a concentração de glicose adicionada no reator Canéus (165mg/L) foi a metade da adicionada no reator Cosipa (346 mg/L). A relação DQO/célula descrita foi a recomendada na literatura para partida de reatores anaeróbios utilizando-se como inóculo lodos de sistema de tratamento anaeróbio. No entanto, Canéus provavelmente apresentava uma maior quantidade de célula do que o estimado no STV, tanto que a metanogênese foi favorecida pela adição de glicose, tal como a resposta do sedimento da Cosipa. É preciso realçar que inóculos naturais em geral apresentam uma porcentagem de células no teor medido de STV diferente da apresentada para lodos anaeróbios, sendo inadequada a extrapolação deste parâmetro para sedimentos.

As análises de glicose foram feitas após 2 dias de incubação e a de ácidos voláteis por cromatografia gasosa foram feitas quinzenalmente durante o primeiro mês de incubação. Em ambas, as concentrações de glicose e ácidos voláteis ficaram abaixo do limite de detecção dos métodos (20mg/L- glicose; 4mg/L ácidos), demonstrando que estes substratos foram consumidos rapidamente. O consumo dos ácidos orgânicos e a produção crescente do metano demonstraram o equilíbrio no consórcio microbiano estimulado nos sedimentos, essencial para a ocorrência da metanogênese do sistema.

Verificada a estabilização do sistema pelo consumo da glicose, dos ácidos orgânicos e pela produção do metano no 35º dia de incubação, alíquota de 200mL da réplica 1 do reator Cosipa foi retirada para inocular o RAHLF. Anteriormente, a comunidade microbiana foi examinada sob microscopia de contraste de fase e fluorescência, apresentando grande diversidade dos tipos morfológicos com a presença de bacilos retos, curvos, filamentos finos e células semelhantes à *Methanosaeta* sp.(Figura 10.1). Não foi observada a presença de nenhuma morfologia fluorescente.

Figura 10.1. Morfologias predominantes na réplica 1 do reator Cosipa observadas em microscopia de contraste de fase: (a) bacilos curvos; (b) filamento fino; (c) segmento semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp.; (d) vários tipos de bacilos. Todas as observações foram realizadas em aumento de 1500x.

5.6.2. Inoculação e operação do RAHLF

5.6.2.1. Inoculação do RAHLF

Anteriormente à inoculação, o RAHLF preenchido com os cubos de espumas embebidas em água destilada estéril e submetido a um fluxo de nitrogênio 100% recebeu, por tempo de 2 horas, através de bomba peristáltica, meio salino Biota tamponado, reduzido e suplementado. Após 30 minutos do início deste procedimento, o meio de cultivo dentro do reator ficou com tonalidade cor de rosa, o que indicou oxidação das condições do meio. O uso da solução de resazurina, um indicador do potencial de oxi-redução foi essencial para tal monitoramento, uma vez que o meio completamente reduzido (potencial de óxido-redução de -100mV, para esse indicador) apresenta tonalidade incolor. Entretanto, logo após o início da passagem do inóculo, o meio ficou novamente incolor, demonstrando a recuperação da anaerobiose no sistema. A homeostase das condições anaeróbias pode ser atingida pela própria atividade microbiana de caráter facultativa, bem como pela intensa fermentação geradora de condições redutoras no sistema, tal como a produção de hidrogênio.

A inoculação do reator, com 10% do sedimento metanogênico da Cosipa, realizada em sistema de circuito fechado, em meio basal salino Biota suplementado e reduzido e sob condições assépticas, com todos os cuidados referentes à manipulação de microrganismos anaeróbios, ocorreu seis dias. A quantidade de biomassa retida no reator foi de 0,28g (Tabela 11)

Tabela 11. Valores do conteúdo do SSV no frasco de inoculação no início e final da inoculação do RAHLF

	Início (g/L)	Final (g/L)	Retido no RAHL (g/L)	Massa retida no RAHLF (g)
SSV	0,22	0,08	0,14	0,28

Os resultados de microscopia óptica e de varredura (Figuras 10.3 e 10.4) e a observação visual do reator (Figura 10.2) indicaram que pela própria característica hidrodinâmica de fluxo pistonado do reator, a colonização da biomassa não ocorreu de maneira uniforme. Houve um gradiente decrescente de cor preta (cor do sedimento) ao longo do leito do reator. As Figuras 10.4 (e) e (f) apresentam a baixa colonização nas espumas do ponto L/D=16. Dentre as morfologias observadas estão células em forma de bacilos, filamentos finos, alguns semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. e cocos em grumos como sarcinas (Figuras 10.3 e 10.4). Estas morfologias foram muito semelhantes às observadas no sedimento enriquecido utilizado como inóculo (Figura 10.1).

Com estes resultados a operação contínua do reator foi iniciada, mas sem a presença de PCP.

Figura 10.2. Aspecto do RAHLF após a inoculação demonstrando maior colonização no início do reator

Figura 10.3. Microscopia de contraste do biofilme do RAHLF imediatamente após a inoculação: (a) cocos em pares; (b) filamento fino; (c) segmento semelhante à *Methanosaeta*; (d) vários tipos de bacilos. Todas as observações foram realizadas em aumento de 1500x.

Figura 10.4. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF imediatamente após a inoculação. (a) e (b) cocos; (c) bacilos; d) segmento semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp.; (e) cocos; (f) cocos e bacilos. As fotos de a-d referem-se às morfologias observadas nos pontos L/D = 4 –12 e as fotos e,f às observadas no ponto L/D=16.

5.6.2. Avaliação do desempenho do RAHLF

Neste item, os resultados referentes ao desempenho do RAHLF mediante as adições progressivas de PCP serão apresentados e discutidos.

Verificada a imobilização da biomassa, a operação em sistema contínuo foi iniciada. O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) foi operado por um período de 126 dias com meio basal salino Biota, tamponado reduzido e acrescido de glicose 1g/L e PCP nas concentrações de 0, 5, 13, 15 e 20 mg/L, adicionadas sempre após a estabilização do sistema com relação ao consumo de matéria orgânica (DQO) e clorofenóis.

A Tabela 11.1 apresenta as concentrações médias de PCP afluentes e de DQO afluente e efluente com desvio padrão e número de amostras.

A Figura 10.5 mostra as concentrações iniciais de DQO e glicose no frasco de alimentação (a) e a variação temporal da concentração de DQO afluente e efluente (b).

A Figura 10.6 apresenta a variação temporal da concentração de PCP e DQO efluente (a) e da eficiência de remoção destes parâmetros (b).

A Figura 10.7 ilustra a variação temporal do valor de pH afluente e efluente (a), da concentração de alcalinidade e ácidos voláteis do efluente (b) e da relação alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial do efluente (c).

Tabela 11.1 Valores das concentrações médias de PCP afluente, DQO afluente e efluente, com desvio padrão e número de amostras, durante o período de operação.

PCP afl (mg/L)	Número amostras	DQO afl (mg/L)	Número amostras	DQO efl (mg/L)	Número amostras
0	-	*1348±67	6	353±55	2
4,15 ±0,85	16	*1245±118	7	361±56	5
4,15±0,85	16	901±30	6	-	3
13,31±0,85	13	950±41	12	14±13	6
14,6±0,35	4	956±8,6	4	170±45	3
20,77±0,39	7	1005±65	5	241±44	3

Legenda: - não detectado; *DQO analisada com interferência do cloro e sulfeto.

a)

b)

Figura 10.5. Concentrações iniciais de DQO e glicose no frasco de alimentação (a) e variação temporal da concentração de DQO afluente e efluente (b). **Legenda.** a*: início da análise de DQO sem a interferência do cloro e do sulfeto; a: análise de DQO com interferência de cloro e sulfeto

Figura 10.6. Variação temporal da concentração de PCP e DQO efluente (a) e da eficiência de remoção de PCP e DQO (b). **Legenda.** a*: início da análise de DQO sem a interferência do cloro e do sulfeto.

A Figura 10.5 (a) que ilustra as concentrações de DQO e glicose adicionadas nas alimentações, demonstra que até o 42^o dia de operação, a concentração de DQO determinada no frasco de alimentação no tempo zero foi superior à oriunda da glicose, fonte orgânica principal da determinação da DQO no meio de cultivo. Este resultado confirma a interferência do cloro e do sulfeto nesta análise, uma vez que a relação entre a DQO produzida pela glicose é de

aproximadamente 1. De acordo com as Figuras 10.5b e 10.6. observa-se que ao retirar os interferentes, a partir do 46^o dia de operação, as concentrações de DQO afluente e efluente diminuiram, obtendo-se os valores reais deste parâmetro.

A Tabela 11.2 apresenta os valores mínimos e máximos de remoção de DQO, PCP, e concentração de alcalinidade e ácidos para cada período de adição de PCP. A Tabela 11.3 apresenta os valores mínimos e máximos de porcentagem e concentração de metano para cada período de adição de PCP.

Tabela 11.2. Valores médios de DQO afluente e efluente; valores mínimos e máximos de eficiência das reduções da DQO e do PCP; concentrações de alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis, como ácido acético, durante cada período de adição do PCP

PCP afl (mg/L)	Período do (dias)	DQO afl (mg/L)	DQO efl (mg/L)	Redução DQO (%)	Redução de PCP (%)	Alc. efl (mg/LCaCO ₃)	AVT efl (mg/LHac)
0	28	*1348	353	*69-80	100	161-298	173-348
4,15	15	*1245	361	*67-73	100	228-452	141-421
4,15	11	901	0	100	100		
13,31	39	950	14	98-100	100	357-506	86-155
14,6	10	956	170	78-82	100	459-473	89-92
20,7	12	1005	241	70-80	100	456	41-78

*DQO analisada com interferência do cloro e sulfeto.

Tabela 11.3. Valores mínimos e máximos do metano no biogás, em cada ponto de amostragem durante cada período de adição de PCP

PCP afl (mg/L)	Período (dias)	CH ₄ (%)			CH ₄ (umol/mL)		
		pontos			pontos		
		1	2	3	1	2	3
0	28	16-28	9-18	7,5-19	8-12	5-8	2-7
4,15	15	14-36	16-25	15-24	4-15	5-10	5-10
13,31	39	11-20	15-29	14-27	4-7	4-9	4-9
14,6	10	10-19	20-29	25-35	3-5	4-7	6-10
20,7	12	12-17	11-24	26-28	6-25	4-10	3-11

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11.2, maiores valores de ácidos orgânicos (173-348 mg/L) e menores de alcalinidade (161-298 mg/L) foram observados na ausência do PCP. Os valores do metano oscilaram durante todo o período operacional. Para o ponto 1 houve diminuição no valor deste parâmetro com o decorrer da adição de PCP. Já, para os pontos 2 e 3 houve uma tendência ao aumento (Figura 10.8).

Em determinados períodos durante a adição de 5 a 13 mg/L de PCP, as concentrações de alcalinidade a bicarbonato do efluente sofreram decréscimo em torno de 200mg/L com posterior recuperação (Figura 10.7). Para a concentração afluente de PCP de 5mg/L,

concomitante ao consumo da alcalinidade houve aumento na produção de ácidos voláteis totais, com valor igual a 400mg/L. Com o decorrer da operação houve recuperação nos valores de alcalinidade (400-500mg/L), bem como o consumo de ácidos, cujos valores oscilaram entre 200-90 mg/L. O desequilíbrio no sistema provocado pela adição de 5mg/L de PCP, principalmente no período de operação entre o 40^o e 53^o dias, afetou também a metanogênese com decaimento na produção do metano no ponto 1 (L/D=4).

Ligeiro decréscimo na redução da DQO a partir do 80^o dia de operação (13 mg/L de PCP) foi observado com valores variando de 70-82% e, portanto, um aumento na DQO efluente com concentrações variando de 80-250 mg/L DQO (Tabela 11.2 e Figura 10.6). Apesar do PCP ter afetado a redução da DQO, não afetou a capacidade de tamponamento do sistema (Figura 10.7), e a concentração média deste organoclorado no efluente não foi alterada ao longo de todo o período de operação (Figura 10.6 (a); (b)), ou seja, valores sempre abaixo do limite de detecção do método (0,1mg/L).

No final de operação, o acentuado decaimento na redução da DQO e do metano no biogás, principalmente no ponto 3 (Figuras 10.6 e 10.8), deveu-se a um problema que ocorreu no reator (o reator trincou na relação L/D=16), aproximadamente 14 horas antes de ser realizado o perfil. No momento do perfil, o meio de cultivo no trecho entre L/D=20 à L/D=12 estava oxidado.

O pH do afluente e do efluente não sofreu variação significativa durante todo o período de operação do reator, com valores iguais a 6,2-7,3 (afluente) e 7-8,2 (efluente). Durante todo o período de adição progressiva de PCP, em concentrações afluentes variando de 5; 13; 15 e 21 mg/L a produção de ácidos no decorrer da degradação esteve sempre com valores inferiores ao da alcalinidade a bicarbonato e a relação entre alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial manteve-se na faixa de 1,2 e 1,4, indicando a estabilidade do processo anaeróbio de conversão (Ripley *et al.*, 1986).

Com os resultados apresentados, observa-se que a adição de PCP não afetou significativamente a estabilidade do sistema.

Figura 10.7. Variação temporal da concentração de alcalinidade e ácidos voláteis do efluente

Figura 10.8. Variação temporal na porcentagem (a) e concentração (b) de metano no biogás do reator

5.6.3. Variação espacial dos valores de PCP, DQO e ácidos orgânicos ao longo do reator para cada concentração de PCP aplicada

O perfil de concentração realizado ao longo do comprimento do reator tem como objetivo auxiliar na compreensão do processo, identificando intermediários metabólicos e a relação entre consumo de substrato e do tóxico.

As amostras líquidas do afluente ($L/D=0$), efluente ($L/D=20$) e pontos intermediários ao longo do reator ($L/D=4$; $L/D=8$; $L/D=12$, $L/D=16$) para cada concentração de PCP afluente foram analisadas quanto à DQO, PCP, ácidos orgânicos voláteis, ácidos voláteis totais, alcalinidade a bicarbonato e pH. Os resultados apresentados referem-se à média dos valores obtidos das réplicas de amostras.

Amostras de biopartículas (espuma+biofilme) ao longo do reator também analisadas para quantificação da massa de PCP adsorvida por grama de biopartícula para cada concentração de PCP aplicada.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 10.9 constata-se que no período de 26 dias no qual o reator foi operado com concentração afluente de PCP de 5mg/L, houve avanço da pluma do composto ao longo da seção longitudinal até $L/D=12$, indicando que a adsorção foi o principal mecanismo de remoção do organoclorado. Entretanto, a detecção de intermediários metabólicos adsorvidos nas biopartículas (Figura 10.10) indica que a biodegradação também foi um mecanismo de remoção do organoclorado neste período operacional.

Para as demais concentrações de PCP, acentuada adsorção ocorreu na primeira parte do reator ($L/D=4$) com decréscimo ao longo dos pontos amostrados (Figura 10.9). Estes resultados demonstram ausência de curto-circuitos e ocorrência de biodegradação. O aumento da massa adsorvida de PCP nas biopartículas quando a concentração foi mais alta indica que a adsorção do organoclorado foi um mecanismo que favoreceu a sua posterior biodegradação. Possivelmente, o PCP permaneceu adsorvido no material suporte, que teve como função a imobilização dos microrganismos e o aumento do tempo de retenção do composto no reator, favorecendo a ação dos microrganismos na degradação dos clorofenóis.

A detecção durante todo o período operacional de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos intermediários metabólicos: 2,3DCP-12,5 minutos; 2,6DCP-13,5 minutos; 2,4,6TCP – 14,7 minutos; 2,3,6TCP- 15,6 minutos; 2,3,4TCP-16,8 minutos bem como nos tempos de retenção de 17,8 e 19,1 minutos (Figuras 10.10. e 10.11.), certificaram a atividade metabólica da conversão do PCP a produtos menos clorados, os quais foram também metabolizados.

Gráfico de dispersão mostrando o Fator de Resposta (FR) versus L/D para diferentes configurações de parâmetros. O eixo Y (FR) varia de 0,00 a 0,45. O eixo X (L/D) varia de 0 a 20. A legenda indica: 1 2,3 (círculo), 2 2,6 (quadrado), 3 2,4,6 (triângulo), 4 2,3,6 (cruz), 5 2,3,4 (cruz), 6 17,8 (menos), 7 19,1 (plus).

L/D	1 2,3	2 2,6	3 2,4,6	4 2,3,6	5 2,3,4	6 17,8	7 19,1
4	0,19	0,19					
8	0,08	0,14	0,15	0,25	0,26		
12						0,07	
16						0,06	0,17

Figura 10.10. Representação esquemática da variação espacial no fator de resposta de clorofenóis adsorvidos na biopartícula em cada seção do reator para as concentrações aplicadas de PCP iguais a 5mg/L (a) e 13 mg/L (b)

a)

Figura 10.11. Representação esquemática da variação espacial no fator de resposta de clorofenóis adsorvidos na biopartícula em cada seção do reator para as concentrações aplicadas de PCP iguais a 15mg/L (a) e 21 mg/L (b)

Analisando os resultados de PCP na fase líquida (Figura 10.12. e Tabela 11.4.), acentuada remoção do composto ocorreu na primeira parte do reator, no trecho correspondente da entrada à $L/D=4$, com o remanescente sendo removido entre a relação $L/D=4$ e 8, para todas as concentrações de PCP afluentes. Na relação $L/D=12$, PCP não foi mais detectado. No trecho correspondente até $L/D=4$, a eficiência de remoção na fase líquida aumentou conforme aumentou a concentração aplicada. Os valores removidos foram iguais a 3, 10, 11,6 e 16 mg/L para as concentrações de PCP de 5; 13; 15 e 21 mg/L, respectivamente. Estes resultados mostram que o biofilme formado nesta seção do reator foi capaz de metabolizar eficientemente cargas crescentes de PCP. Traços de 2,3DCP foi detectado na fase líquida na relação $L/D=4$ e $L/D=8$, para PCP afluente de 5mg/L e em $L/D=16$ para 13 mg/L PCP afluente. Em todas as concentrações de PCP, nos pontos do reator $L/D=4$ e $L/D=8$, picos cromatográficos nos tempos de retenção de 16,2 e 18,7 minutos, que poderiam corresponder respectivamente a tri e tetracloforenóis foram detectados. Na concentração de 13 mg/L, um pico cromatográfico no tempo de retenção de 16,2 minutos apareceu em $L/D=12$ e $L/D=16$. Nesta concentração de PCP, um pico cromatográfico no tempo de retenção de 17,7 minutos ocorreu em $L/D=8$ e traços de 2,3DCP foram detectados em $L/D=16$.

Figura 10.12. Representação esquemática da variação espacial na concentração de PCP para cada concentração de PCP afluyente aplicada

Tabela 11.4. Valores da variação espacial na concentração de PCP para cada concentração de PCP afluyente aplicada

	PCP (mg/L) afluyente			
L/D	5	13	15	20
0	4,6	14	15	21,5
4	1,6	4	3,4	5,4
8	0,2	0,6	2,1	3,1
12	ad	ad	ad	1,2
16	ad	ad	ad	ad
20	ad	ad	ad	ad

ad: abaixo do limite de detecção (0,1mg/L)

A contínua adição de PCP afetou a redução da matéria orgânica (DQO) ao longo do reator, conforme observado na Figura 10.13 e Tabela 11.5. Para concentrações afluentes de 5mg/L e 13 mg/L de PCP, uma maior redução dos valores de DQO foi observada no trecho entre L/D=8 e 12, com valores consumidos iguais a 304mg/L e 424 mg/L, respectivamente. Para concentrações de PCP afluyente de 15 e de 21mg/L, acentuado consumo de matéria orgânica foi obtido no trecho do reator entre L/D = 12 à L/D=16, com valores iguais a 367 e 170mg/L, respectivamente. O baixo consumo de matéria orgânica observado para concentração de PCP afluyente igual a 21mg/L, foi acentuado pelo problema estrutural (trinca no reator), como anteriormente mencionado para a relação L/D=16).

Figura 10.13. Representação gráfica da variação espacial na concentração da DQO para cada concentração de PCP afluente aplicada

Tabela 11.5. Variação espacial na concentração da DQO para cada concentração de PCP afluente aplicada

	PCP (mg/L) afluente			
L/D	5	13	15	20
0	888	977	985	1026
4	741	904	945	957
8	522	831	906	917
12	218	406	787	837
16	69	164	420	667
20	17	12	216	550

No que diz respeito aos ácidos orgânicos passíveis de serem detectados por cromatografia gasosa, os de maior importância ao longo de todo o período operacional foram os ácidos acético, propiônico e butírico. O acético foi detectado em maior concentração, seguido do propiônico e butírico (Figura 10.14.).

Para todas as concentrações de PCP, maiores concentrações de acético e butírico foram observadas até o trecho do leito do reator igual a L/D 8 (Figura 10.14.).

O ácido propiônico, concentração em torno de 100 mg/L, foi consumido no final do leito do reator, em L/D 20 (Figura 10.14.).

O acúmulo de ácido acético no trecho do leito do reator da entrada à L/D=8 muito provavelmente elevou a pressão parcial de hidrogênio inibindo a oxidação sintrófica microbiana dos ácidos butírico e propiônico. O consumo destes ácidos, principalmente o butírico, ocorreu na medida em que o acético foi consumido. O propiônico por ser o intermediário da digestão anaeróbia de mais difícil degradação foi consumido somente no final do reator sendo algumas vezes detectado no efluente.

Estes resultados associados à elevada remoção de PCP no início do leito do reator demonstram que é durante a acetogênese que maior degradação do PCP ocorre. Comportamento semelhante foi obtido nos enriquecimentos semi-contínuos dos sedimentos do Largo do Canéus e da Cosipa.

a)

b)

c)

d)

e)

f)

Figura 10.14. Representação gráfica da variação espacial na concentração de ácidos voláteis para cada concentração de PCP afluyente aplicada. (a),(b) 5 mg/L; (c),(d),13 mg/L; (e),(f) 15 mg/L; (g),(h) 21 mg/L.

5.6.4. Análise das características morfológicas dos microrganismos presentes no RHALF

As análises para a determinação das características morfológicas dos microrganismos presentes no RAHLF, particularmente nos filmes microbianos aderidos à espuma de poliuretana, ao longo do reator para cada concentração de PCP estudada foram realizadas através da microscopia ótica comum sob contraste de fase e epifluorescência, bem como da microscopia eletrônica de varredura (MEV), como descrito no item 4.8. do capítulo Material e Métodos.

Através do exame microscópico pôde-se constatar o predomínio de células em formato de sarcinas fluorescentes, que são em ambientes metanogênicos geralmente relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., bem como observaram-se cocos com extremidades afiladas, filamentos finos não fluorescentes, bacilos não fluorescentes e filamentos não fluorescentes cuja morfologia foi bastante semelhante à descrita comumente para o gênero *Methanosaeta* sp (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1988; Sprott & Beveridge, 1993; Whitmann *et al.*, Internet, 2005¹).

A Tabela 12 apresenta a análise da frequência das morfologias encontradas nos quatro pontos do reator sem PCP e quando da adição do composto ao longo do tempo experimental. As considerações semi-quantitativas apresentadas nas tabelas e indicadas através de legenda específica estiveram de acordo com a percepção da examinadora em relação à presença dos

¹ <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

grupos microbianos nos campos microscópicos. Ou seja, o critério considerado foi o de comparação, tendo como base para maior densidade (++++), vários campos repletos com um determinado formato típico de células em relação a outros. O predomínio dos tipos celulares foi, então, estimado pela frequência do aparecimento das morfologias em cada etapa experimental, que se relacionaram as crescentes adições de PCP.

A Figura 11 apresenta as fotomicrografias das morfologias dos procariontes predominantes sob contraste de fase, durante a operação do RAHLF na ausência e na presença do PCP no meio de reação. Uma vez que diferenças na distribuição dos tipos morfológicos não foram constatadas ao longo de todo o experimento, mas o foram em relação à frequência do seu aparecimento, escolheram-se as fotomicrografias das amostras obtidas no ponto 1 do reator operado sem PCP e com 21mg/L do organoclorado (Figura 11 a-f). Cabe salientar que apenas nas maiores concentração de PCP (15 e 21mg/L), o exame microscópico sob contraste de fase revelou a presença marcante de tipos de filamentos com espessura inferior à em geral determinada para os filamentos metanogênicos do gênero *Methanosaeta* sp. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 11(g) e (h) ilustram, respectivamente, os bacilos com inclusões nas extremidades observados principalmente na relação L/D=16 e os bacilos observados em L/D=4 à L/D=16 para todas as concentrações de PCP. As fotomicrografias da Figura 11.1. apresentam as amostras retiradas de biofilmes com as principais morfologias mencionadas, sob MEV.

Tabela 12. Frequência das morfologias celulares observadas sob contraste de fase e fluorescência durante o período operacional do RAHLF

PA	Bacilos	Filamento fino	Filamento Finos 1	Filamentos <i>Methanosaeta</i> sp	Cocos <i>Methanosarcina</i> sp	Cocos pntiagudos
Sem adição de PCP						
L/D =4	++	-		++++	++++	
L/D=8	++++	+++		+++	+++	
L/D=12	-	-		++++	++++	
L/D=16	+++	-		+++	+++	
5mg/L de PCP						
L/D =4	+++	+++		++++	++++	
L/D=8	+++	++		++++	++++	+++
L/D=12	*+++	++++		++++	+++	
L/D=16	*+++	++++		++++	+++	
13mg/L de PCP						
L/D =4	+++	+++		++++	+++++	
L/D=8	++	+++		++++	++++	+++
L/D=12	++++	-		++++	++++	
L/D=16	*++	++		++	++	
15mg/L de PCP						
L/D =4	++	-	++++	++++	+++++	
L/D=8	+++	-	++++	++++	+++	
L/D=12	*++	++	+++	++++	+++	
L/D=16	*+++	++	++	+++	++	
21mg/L de PCP						
L/D =4	++	-	+++	++++	+++++	
L/D=8	++	-	+++	++++	+++	
L/D=12	++	++	-	+++	+++	
L/D=16	++	++	-	+++	+++	

*bacilos com inclusões nas extremidades

A presença de cocos em formato de sarcinas relacionados ao gênero *Methanosarcina* sp e pertencentes à Família *Methanosarcinacea* e de filamentos não fluorescentes relacionados ao gênero *Methanosaeta* sp, ambos grupos metanogênicos, foram observados sob todas as concentrações de PCP adicionadas e em todos os pontos de amostragem, principalmente nas relações L/D=4 e L/D=8 (Tabela 12 e Figura 11 c; d). As células em formato de sarcinas foram as mais frequentes em L/D=4 para todas as concentrações de PCP. Estas células e as semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp também estiveram presentes no reator na ausência do organoclorado, mas com menor frequência (Tabela 12 e Figura 11 a;b). Cocos com extremidades afiladas foram observados em L/D=8 para as concentrações de PCP de 5 e 13 mg/L (Tabela 12 e Figura 11g) . Bacilos também foram observados ao longo do reator, mas em frequência bem menor à observada para os tipos metanogênicos (Tabela 12 e Figura 11 e;h). Nas relações L/D=12 e LD/=16 constatou-se maior frequência de bacilos (Tabela 12 e Figura 11

j), sendo que, principalmente em L/D=16, destacaram-se os bacilos com inclusões nas extremidades (Figura 11 i).

A partir de concentração de 5mg/L de PCP, células com formato de filamentos finos foram observadas em todo o reator. Porém, com maior frequência em L/D=4 e L/D=8 nas concentrações de 5 e 13 mg/L de PCP. Ainda que menos frequentes nas concentrações de 15 e 20 mg/L de PCP, estas morfologias foram observadas apenas em L/D=12 e L/D=16. Porém, nessas condições de PCP, uma outra morfologia, também um filamento pouco espesso, sobressaía-se em L/D=4 e L/D=8 (Tabela 12; Figura 11 f).

Pela técnica *FISH*, a hibridização com a sonda MSX860 – Família *Methanosarcinaceae* foi realizada no final do período operacional, apenas com amostras retiradas do RAHLF operado com PCP afluyente de 21 mg/L. A hibridização de amostras do biofilme retirado da espuma de poliuretana coletada ao longo do leito do reator confirmou o predomínio dos tipos morfológicos metanogênicos anteriormente comentados através dos exames microscópicos diretos e por MEV (Figura 11.1.).

Figura 11. Microscopia de contraste de fase do biofilme do RAHLF na ausência (a-b) e presença (c-j). Aumento de 1500x. (a) e (b) filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. e cocos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp; (c) filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (1000x); (d) cocos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp.; (e) filamento semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp e vários tipos de bacilos; (f) duas morfologias de filamentos finos e cocos; (g) segmentos filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp e coco contendo extremidades afiladas; (h) filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp, cocos e bacilos; (i) filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp e bacilos com inclusões nas extremidades; (j) filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp e bacilos.

Figura 11.1. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF durante a adição de PCP. Aumento de 5000x. (a), (b) e (c) células em formato de cocos relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp.; (d) células em formato de filamentos relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp.; (e) bacilos; (f) bacilos, cocos e filamentos.

5.6.5. Análise da diversidade da comunidade microbiana durante a operação do RAHLF

Os resultados apresentados a seguir referem-se à extração e amplificação do DNA com *primers* específicos para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* e ao padrão de bandas obtido pela técnica do DGGE. Estas análises foram realizadas para o sedimento enriquecido (inóculo do reator RAHLF) e no reator RAHLF para cada concentração de PCP aplicada (0, 5, 13, 15 e 21 mg/L) em todas seções ao longo do comprimento do reator (L/D 4, 8 12 e 16), após atingido o equilíbrio dinâmico aparente.

As Figuras 11.2 e 11.3 apresentam, respectivamente, os resultados da extração e amplificação do DNA por PCR (*polimerase chain reaction*). A Figura 11.4 apresenta a separação, no gel de DGGE, dos fragmentos de DNA amplificados.

Figura 11.2. Fotografias de eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de DNA das amostras do RAHLF em cada seção do reator (L/D) para todas as concentrações de PCP. (a) ausência de PCP; (b) PCP em concentrações de 5, 13, 15 e 21 mg/L. As linhas de cima correspondem à cada seção (L/D) do reator e as linhas de baixo às concentrações de PCP (mg/L). **Legenda.** M: marcador molecular

Figura 11.3. Fotografias do gel de agarose a 1% com amostras do RAHLF e do enriquecimento (Enr) dos produtos de PCR com *primers* dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. (a) amostras do reator sem PCP com *primers* dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*; (a1) enriquecimento com *primers* do Domínio *Archaea*; (b) amostras do reator com PCP e do enriquecimento com *primers* do Domínio *Archaea*; (c) amostras do reator com PCP e do enriquecimento com *primers* do Domínio *Bacteria*. As linhas de cima correspondem à cada seção (L/D) do reator e as linhas de baixo às concentrações de PCP. **Legenda.** C+: controle positivo (culturas puras de *Methanosarcina sp* e *Rhodopseudomonas*, para *primers* dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente.); B: branco; M: marcador molecular.

Figura 11.4. Fotografias dos resultados das análises de DGGE dos fragmentos do produto de PCR amplificados com *primers* dos Domínios *Archaea* (a;b) e *Bacteria* (c;d). Em cada gel, as linhas de cima indicam as concentrações de PCP, as de baixo a seção do reator (L/D) e o enriquecimento.

Sabe-se que a técnica do DGGE é adequada para acompanhar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (Sanaz, 2002). No entanto, dificuldades da técnica podem levar a algumas interpretações errôneas, conforme explanado em Revisão da Literatura. As interpretações a seguir se baseiam na qualidade de resposta metodológica obtida frente aos controles empregados, sem ignorar, no entanto, as limitações da técnica.

De acordo com a Figura 11.2, o método de extração de DNA adaptado de Griffiths *et al.* (2000) foi adequado para a extração de DNA do biofilme formado no RAHLF, observando-se que a presença de PCP não dificultou a extração. As reações de amplificação do DNA após determinada as melhores quantidades de DNA utilizadas apresentaram bons resultados tanto para os *primers* do Domínio *Bacteria* quanto para os de *Archaea*. Os controles positivos dos Domínios *Bacteria* (*Rhodopseudomonas*) e *Archaea* (*Methanosarcina sp.*), apresentaram uma boa amplificação, demonstrando que os *primers* utilizados amplificaram o DNA dos microrganismos pertencentes a estes Domínios. A não amplificação das amostras do branco revelou a ausência de contaminação das amostras (Figura 11.3).

Com os produtos de PCR das diferentes amostras, análises pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante- DGGE foram realizadas para verificar a ocorrência de alterações na comunidade microbiana pertencente aos Domínios *Archaea* e *Bacteria* do sedimento enriquecido e utilizado como inóculo do RAHLF, ao longo das seções (L/D) do reator submetido a adições progressivas de PCP.

Como observado na Figura 11.4a para o Domínio *Archaea*, o enriquecimento em condições halofílicas do sedimento da COSIPA apresentou pouca diversidade de espécies com apenas duas bandas (a1 e a2). Esta diversidade aumentou no RAHLF com o surgimento de pelo menos quatro novas bandas ao longo de todo o comprimento do reator, as quais persistiram durante a adição progressiva de PCP (Figura 11.4a e b).

Considerando semelhantes as condições nutricionais impostas ao enriquecimento e ao RAHLF na ausência de PCP, salvo a concentração do substrato glicose que variou de 0,3 a 0,5mg/L para o enriquecimento e manteve-se em 1g/L para o RAHLF, os resultados de DGGE mostram que a comunidade microbiana anaeróbia crescida suspensa no meio de enriquecimento e sua posterior inoculação no RAHLF, no qual a adesão celular ocorreu na matriz de espuma de poliuretano, sofreu alterações, possibilitando o estabelecimento de um número maior de organismos do Domínio *Archaea*, possivelmente de anaeróbios metanogênicos.

Ao comparar o padrão de bandas das amostras do RAHLF, observa-se que a comunidade microbiana aparentemente manteve-se a mesma no trecho do leito do reator correspondente aos valores da entrada à L/D=8 (Figura 11.4a) para todos os ensaios, uma vez que o padrão de

bandas permaneceu o mesmo na ausência e na presença do PCP. Portanto, as adições de PCP não provocaram alteração na estrutura da comunidade microbiana de arqueias do biofilme formado nos ensaios contínuos no RAHLF sob condições metanogênicas e halofílicas. Apesar do DGGE não ser uma técnica quantitativa, o aumento da intensidade de duas bandas (a2 e a3) no trecho do leito do reator da entrada até $L/D=4$ e de três bandas de em $L/D=8$ (a1, a2 e a3) nas concentrações de 13 e 15 mg/L de PCP, pode indicar o favorecimento de populações específicas de arqueias metanogênicas nestas concentrações de PCP.

Nas seções do reator correspondente a $L/D=12$ e 16, pelo menos sete bandas foram obtidas nas amostras do RAHLF na ausência de PCP. Destas, uma (aIV) desapareceu na presença do organoclorado e outra (aV) surgiu na relação $L/D=12$ e permaneceu durante todas as concentrações de PCP utilizadas (Figura 11.4b). Infelizmente, a amostra da canaleta correspondente à relação $L/D=12$ em 5mg/L não foi obtida, não podendo-se afirmar as condições do surgimento da banda aV. Neste trecho do reator, o PCP na fase líquida não foi detectado em nenhuma das concentrações aplicadas, exceto em 21mg/L quando detectou-se 1,2 mg/L de PCP em $L/D=12$. Uma pequena quantidade de PCP adsorvido nas biopartículas foi constatada em comparação com as seções anteriores do reator (Figura 10.9). Estes resultados aliados à presença de traços de intermediários clorados (Figura 10.10 e 10.11.) e dos ácidos orgânicos acético (80-300mg/L), butírico (2-30mg/L) e propiônico (100mg/L), principalmente em $L/D=12$ (Figura 10.15.), demonstra que, muito provavelmente, o consórcio metanogênico acetotrófico halofílico, na seção do reator entre $L/D=12$ e 16, esteve sempre envolvido com o consumo dos intermediários metabólicos da degradação da glicose, durante a desalogenação redutiva do PCP. Ainda, nessas condições, na seção correspondente à $L/D=12$, o surgimento de uma nova banda (aV) pode corresponder ao favorecimento de um grupo arqueia metanogênico particular.

Para o Domínio *Bacteria*, a presença de pelo menos nove bandas foi observada no enriquecimento sob condições metanogênicas e halofílicas (Figura 11.4c). Destas, três (b1, b4 e b5) desapareceram e pelo menos três novas (bII, bIII, bIV) surgiram em $L/D=4$ no RAHLF sem adição de PCP, bem como de quatro novas bandas (bI, bII, bIII e bV) na seção $L/D=8$ do reator. Como já observado para o Domínio *Archaea*, as semelhantes condições nutricionais impostas ao enriquecimento e ao RAHLF sem PCP mostram resultados de DGGE peculiares em relação à seleção de organismos durante o processo de adesão na espuma de poliuretano.

Ao comparar o padrão de bandas das amostras do reator, observou-se que o PCP alterou a estabilidade da comunidade microbiana halofílica no trecho do leito do reator correspondente a entrada, seção $L/D=8$ (Figura 11.4c). A presença do organoclorado parece ter afetado a estrutura da comunidade do Domínio *Bacteria*, considerando todos as possíveis limitações do DGGE,

uma vez que houve mudança no padrão de bandas. As bandas bI, bII, bIII e bV desapareceram com a adição progressiva de PCP, ao passo que as bandas b2 e b3 mantiveram-se. No entanto, constatou-se o surgimento de pelo menos duas novas bandas (marcação em retângulo na Figura 11.4). As bandas b2 e b3 obtidas das amostras cultivadas em PCP, muito provavelmente, podem indicar grupos microbianos halofílicos relacionados diretamente com a desalogenação redutiva do organoclorado. É notável que a remoção maior do PCP ocorreu nestas seções do reator (Figura 10.12), com o aparecimento de intermediários metabólicos menos clorados (Figuras 10.10 e 10.11.).

Nas seções do trecho do reator correspondente à $L/D=12$ e 16 , pelos menos 11 bandas foram obtidas. Apesar de PCP na fase líquida não ser detectado nestas seções do reator, muito provavelmente a quantidade adsorvida de PCP e de clorofenóis e a presença de ácidos favoreceu determinadas populações do Domínio *Bacteria*.

Comparando-se o padrão de bandas dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, pôde-se constatar uma maior diversidade de microrganismos do Domínio *Bacteria*, tanto nas amostras do reator de enriquecimento quanto no biofilme formado no RAHLF, ao longo do trecho do leito do reator. A possível seleção ocasionada pelo aumento progressivo do PCP foi mais acentuada na comunidade de bactérias halofílicas, principalmente nas duas primeiras seções do reator, com maior variação no padrão de bandas. Estes resultados aliados ao acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente o acético, neste trecho do reator, demonstram que espécies microbianas do Domínio *Bactéria*, muito provavelmente as acetogênicas, estiveram envolvidas diretamente com o metabolismo do PCP, desalogenando a molécula e liberando compostos menos clorados, consumidos ao longo do reator por bactérias e ou arqueias metanogênicas halofílicas. A carga de PCP aplicada ao reator durante o período operacional, apesar de ter afetado o metabolismo das arqueias metanogênicas halofílicas nas duas primeiras seções do reator, verificado pelo acúmulo de ácidos orgânicos, não foi suficiente para provocar mudança na estrutura da comunidade do Domínio *Archaea*.

5.6.6. Crescimento da biomassa e análise da adsorção do PCP na espuma de poliuretana no RAHLF

Os resultados referentes ao crescimento da biomassa no reator, expressa em sólidos totais voláteis, e à adsorção de pentaclorofenol na biopartícula (biofilme + espuma) formada durante a operação do RAHLF com adição progressiva de PCP, foram avaliados para o período final de operação. Os resultados de adsorção do PCP para cada período operacional foram apresentados no item 5.6.3.

As biopartículas foram amostradas nos pontos intermediários ao longo da seção longitudinal do reator (L/D= 4, 8, 12 e 16) logo após a estabilização em concentração aplicada de PCP igual a 21 mg/L.

As Tabelas 12.1 e 12.2 apresentam, respectivamente, os resultados da massa total de PCP e a quantidade de biomassa, representada como sólidos totais voláteis, retidos nas biopartículas no final de operação do reator com concentração afluyente de PCP de 21 mg/L.

Cabe ressaltar que nos resultados da Tabela 12.1 foi considerada a massa total adsorvida, tendo em vista que a parcela fixa dos sólidos também participa do processo de adsorção.

Tabela 12.1 Valores para avaliação da massa de lodo imobilizado presente no RAHLF e da massa total de PCP adsorvida no final de operação

L/D	Massa de PCP/lodo imobilizado (mg/g) A*	Massa de espuma (g) B	Massa de sólidos totais (ST)/massa espuma (g/g) C**	Massa de sólidos totais em 4,1 g de espuma (g) D	Massa de ST + massa de espuma (g) E	Massa de PCP adsorvida por seção do reator (mg) F
4	17,8	4,1	1,80	7,38	11,5	204,5
8	11,6	4,1	0,25	1,23	5,3	59,3
12	3,3	4,1	0,50	2,05	6,2	20,4
16	0,4	4,1	0,45	1,64	5,7	2,6
						Total: 286,9

*dados da Tabela J1d (Anexo A); ** dados da Tabela J2 (Anexo J); D=B*C; E=D+B; F=E*A

Tabela 12.2. Valores da massa de lodo biológico imobilizado no RAHLF no final de operação

L/D	Massa de Sólidos Totais Voláteis (STV)/massa de espuma (g/g) A*	Massa de espuma (g) B	Massa de STV em 4,1 g de espuma (g) C
4	0,7	4,1	2,87
8	0,1	4,1	0,41
12	0,2	4,1	0,82
16	0,1	4,1	0,41
			Total=4,51

* dados da Tabela J2 do Anexo J da Etapa 4.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12.2, constata-se que a biomassa aderida ao meio suporte, em termos de sólidos totais voláteis, foi favorecida durante a operação do reator, com aumento de 0,28g para 4,51g, resultando em carga de PCP aplicada ao lodo igual a 19 mgPCP/gSSV*dia e 4,7mgPCP/gSTV*dia para o início e final de operação, respectivamente. A massa de PCP aplicada durante todo o período operacional foi igual a 1.111,73 mg e adsorvida no reator foi igual a 286,9mg (Tabela 12.1.), com remoção de 824,83 mg de PCP, uma vez que PCP não foi detectado no efluente (limite de quantificação – 0,1mg/l) durante todo o período operacional.

5.6.7. Considerações do Experimento com o RAHLF com e sem adição do PCP

A imobilização e retenção de microrganismos ativos em sistemas anaeróbios de tratamento de resíduos é um dos aspectos chave para que as reações no interior dos reatores resultem em elevada eficiência na remoção da matéria orgânica, uma vez que os microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, as bactérias fermentadoras primárias e secundárias e as arqueias metanogênicas apresentam uma eficiente cooperação entre si (Kato *et al.*, 1999). As arqueias metanogênicas são estritamente anaeróbias necessitando de potencial de óxido-redução entre (-)200 e (-)300mV, consumindo poucos substratos energéticos como o H_2/CO_2 e o formiato pelo grupo hidrogenotrófico, o acetato pelo acetotrófico e os compostos metilados pelo metilotrófico. O rendimento energético deste metabolismo é baixo, sendo provavelmente a razão pela qual é o último da cadeia anaeróbia que reduz os compostos à metano. A pequena quantidade de energia disponível na conversão metanogênica força os microrganismos envolvidos em uma eficiente cooperação, denominada de sintrofismo (Schink, 1997; Garcia *et al.*, 2000).

Neste sentido, na inoculação, a manutenção da anaerobiose e a adequada imobilização da biomassa no reator foram de fundamental importância para a estabilidade do sistema reacional. O RAHLF preenchido com 20,8 g de espuma de poliuretano cortada em cubos com arestas de 3mm foi inoculado com 10% de sedimento da COSIPA previamente enriquecido por um período de 40 dias na presença de glicose (0,7 - 1g/L) e porcentagem estável de metano no biogás em torno de 30-40%. As morfologias predominantes observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência eram arqueias metanogênicas halofílicas relacionadas ao gênero *Methanosaeta*, filamentos finos e bacilos halofílicos. O procedimento de inoculação adaptado de Domingues (2001), em sistema de circuito fechado, com todos os cuidados referentes à manutenção da assepsia e anaerobiose mostrou-se adequado para inoculação do RAHLF, com retenção da biomassa em 6 dias. A quantidade de biomassa, quantificada indiretamente pelo parâmetro sólidos suspensos voláteis (SSV), utilizada para inocular o reator

foi de 0,22gSSV/L e após 6 dias 0,14gSSV/L ficou retida na espuma de poliuretana, totalizando uma massa de 0,28gSSV. Ye *et al.* (2004), ao estudar a influência do tipo de inóculo na granulação de reatores UASB durante a degradação de PCP, utilizaram como inóculo lodo de estação de tratamento de esgoto e de indústria cítrica em concentração de 19,8-20,1gSSV/L. Nos trabalhos de biodegradação de PCP no RAHLF realizados por Baraldi (2001) & Damianovic (1997), uma quantidade de 25gSSV/L foi utilizada para inocular o reator. Estas autoras utilizaram mistura de lodos de UASB tratando águas residuárias industriais e domésticas, empregando procedimentos de inoculação descrito em Zaiat *et al.* (1994).

Zaiat *et al.* (1996) concluíram que matrizes de poliuretana foram completamente adequadas para imobilização de biomassa anaeróbia, ou seja, apresentaram perda de biomassa por arraste da ordem de 9% para velocidades superficiais superiores a 1,5cm/s. Varesche *et al.* (1997) confirmaram que as matrizes de poliuretana foram excelentes suportes de imobilização, retenção e crescimento da biomassa anaeróbia além de favorecer fluxos de substratos e produtos metabólicos.

A retenção de biomassa no reator foi eficiente, uma vez que durante todo o período de operação, na ausência e presença de PCP, não houve perda de sólidos no efluente.

Os morfotipos observados após a inoculação e operação do sistema em fluxo contínuo, sob condições metanogênicas e halofílicas sem a presença de PCP foram os mesmos do inóculo, mas com a observação de arqueias metanogênicas relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp.

Damianovic (1997), Baraldi (2001), Bolaños (2001) e Nardi (2002) também obtiveram bons resultados na imobilização e retenção de biomassa ativa no RAHLF operado com compostos tóxicos utilizando espuma de poliuretana como meio suporte. Os autores (*opt. cit.*) seguiram os procedimentos de inoculação descritos em Zaiat *et al.* (1994).

A glicose, preconizada por diferentes autores nos estudos sobre desalogenação redutiva do PCP e de organoclorados (Hendriksen & Ahring, 1992; Hendriksen *et al.*, 1991 e 1992; Holliger *et al.*, 1992; Pak, 1994; Juteau *et al.*, 1995; Damianaovic, 1997; Van Eekert *et al.*, 1998; Magar *et al.*, 2000; Tartakovsky *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2000; Baraldi, 2001; Montenegro, 2001; Ye & Shen, 2004; Saia *et al.*, 2004), mostrou-se adequada para os fins de exploração tecnológica de inóculos autóctones na biodegradação anaeróbia do PCP, notavelmente, sob condições de salinidade elevada.

Em relação ao uso deste substrato, em sistemas operados com águas não salinas, Hendriksen *et al.* (1992) verificaram que o desempenho do reator foi estável na desalogenação redutiva do PCP, apresentando porcentagem de metano no biogás de 30-60% e com detecção de somente 0,5mg/L de PCP no efluente. Sem glicose, a porcentagem de metano no biogás foi de 10-30% e a concentração de PCP efluente variou de 0,2-5mg/L. A glicose também estimulou a

degradação do PCP, por aumentar a concentração de biomassa ativa no reator, e pelos seus produtos de degradação (hidrogênio; formiato, etanol, propionato ou acetato) servirem como equivalentes redutores para a desalogenação. Na presença de glicose, 2,2mg/L*dia de PCP foi desalogenado, em comparação com 0,6-1,2 mg/L*dia na ausência de glicose.

Saia *et al.* (2004) verificou biodegradação do PCP em meio salino suplementado com glicose.

A remoção do PCP na presente Tese foi atingida sem desestabilizar o reator, uma vez que conforme apresentado nos resultados, PCP e nenhum intermediário metabólico foram detectados no efluente e o reator apresentou-se estável durante todo o período operacional. A retenção de biomassa ativa e do composto no reator e a resistência à transferência de massa foram mecanismos importantes para a biodegradação do PCP, uma vez que a adsorção do PCP e intermediários menos clorados nas biopartículas e a resistência à transferência de massa muito provavelmente favoreceram a ação dos microrganismos halofílicos na degradação dos clorofenóis, pois permitiram que os compostos ficassem retidos no reator por um tempo superior e independente do tempo de detenção hidráulica (18horas) e fossem disponibilizados lentamente à biomassa evitando a toxicidade e dando tempo para reações metabólicas ocorrerem. Siahpush, *et al.*, 1992 relataram a importância da bioadsorção como mecanismo de remoção no período que precedeu a atividade de descloração.

Com relação aos perfis espaciais, acentuada remoção de PCP na fase líquida para todas as concentrações aplicadas ocorreu na primeira parte do reator, no trecho correspondente da entrada à $L/D=4$, coincidindo com a produção de ácidos, principalmente o acético e a custos da metanogênese. Saia *et al* (2004) também verificou a biodegradação do PCP na presença de ácido acético (1-2g/L) em reator semi-contínuo com células suspensas.

Baraldi (2001) e Damianovic (1997) também verificaram acentuada remoção de PCP (80-100%) na primeira terça parte (até $L/D=4$) do reator RAHLF operado com meio de cultivo não salino. Baraldi (2001) não detectou nenhum intermediário metabólico. Damianovic (1997) identificou tetra, tri e diclorofenóis tanto na fase líquida quanto adsorvido nas biopartículas.

A mudança no padrão de bandas do Domínio *Bacteria* no trecho do leito do reator até $L/D=8$ onde acentuada remoção de PCP foi observada, associada à produção de ácidos demonstra que muito provavelmente os microrganismos halofílicos deste Domínio, mais especificamente os acetogênicos, estavam envolvidos diretamente com metabolismo do PCP, realizando a desalogenação de quantidades mais elevadas deste composto. As observações microscópicas indicaram, dentre as morfologias observadas, a presença de dois tipos de filamentos finos nestes trechos do leito do reator na presença de PCP.

A estabilidade na estrutura do padrão de bandas de microrganismos do Domínio *Archaea* durante todo o período operacional no trecho do leito do reator da entrada à L/D=4 e a observação microscópica de células semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* pertencentes à Família *Methanosarcinacea* constata que as arqueias metanogênicas halofílicas provenientes do sedimento de Cubatão no mínimo foram tolerantes ao PCP nas concentrações aplicadas de 5 a 21 mg/L, apesar deste organoclorado ter afetado o metabolismo acetoclástico. Elas podem ter tido contribuição indireta ao metabolismo do PCP, mediando elétrons e cofatores enzimáticos para a reação desalogenação. Resultados semelhantes foram obtidos no enriquecimento em reatores semi-contínuos da Etapa 3 (item 5.5.2).

A partir de L/D=8, a massa de PCP restante que estava adsorvida nas biopartículas, bem como os intermediários menos clorados, os ácidos orgânicos e o hidrogênio, muito provavelmente estavam sendo metabolizados tanto pelos microrganismos dos Domínios *Bacteria* quanto *Archaea*, mais especificamente da Família *Methanosarcinacea*. Particularmente no trecho do leito do reator correspondente aos pontos L/D=12 e L/D=16 para ambos os Domínios houve mudança no padrão de bandas quando da adição do organoclorado. As arqueias metanogênicas na medida em que consumiram o ácido acético influenciaram o metabolismo dos compostos organoclorados, facilitando um fluxo de elétrons para a desalogenação.

A massa de PCP aplicada no reator durante todo o período operacional (126 dias) foi igual a 1111,73 mg, e adsorvida no reator foi igual a 286,9mg, com remoção biológica de 824,83 mg de PCP. O crescimento de biomassa ativa durante o ensaios contínuos no RAHLF com aumento de 0,28g SSV para 4,51g STV, resultou em carga de PCP aplicada ao lodo igual a 19 mgPCP/gSSV*dia e 4,7mgPCP/gSTV*dia para o início e final de operação, respectivamente.

Ao comparar estes resultados com os obtidos por Damianovic (1997) observa-se que o RAHLF nas condições operacionais impostas, sob condições metanogênicas, halofílicas e com microrganismos autóctones provenientes de área estuarina severamente contaminada foi capaz de metabolizar quantidade maior de PCP.

Os resultados apresentados e discutidos nesta tese constataam, portanto, que o biofilme formado durante a operação do RAHLF pelos microrganismos autóctones provenientes da área estuarina estudada, severamente contaminada, foi capaz de desalogenar o PCP, sob condições metanogênicas, halofílicas e com glicose como doador de elétrons, e que este reator na condição operacional estudada foi um sistema reacional adequado para a degradação anaeróbia do PCP. Os resultados apresentados constituem fonte relevante de informações ao planejamento para a recuperação do estuário, uma vez que permite concluir que a tecnologia anaeróbia pode ser aplicada em estratégias de biorremediação da região impactada, na qual microrganismos autóctones foram estimulados em processos controlados de engenharia.

Uma mente que se expande, jamais volta ao seu tamanho original
(Albert Einstein)

6. CONCLUSÕES

ETAPA 1

Quanto à recuperação da extração e análise de clorofenóis nas amostras de sedimento da Região Estuarina da Baixada Santista

1. As soluções aquosas de hidróxido de sódio 0,2N e de carbonato de potássio 3% foram adequadas como veículo de dissolução do PCP;

A metilação com diazometano mostrou-se mais eficiente para a derivatização do PCP em relação à acetilação com anidrido acético. Ainda que a resposta tenha sido favorável, não se recomenda o uso do diazometano devido à sua elevada periculosidade.

Nas condições estudadas, o uso do sulfato de sódio anidro para controle da umidade não é necessário.

Recomenda-se a centrifugação e secagem em estufa a $50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ para retirada de água de amostras compostas de sedimento.

2. O método de extração de clorofenóis por ultrassom pode ser empregado para amostras de sedimento com concentração mínima de 200 μg clorofenóis/Kg de sedimento para os analitos 2,3; 2,6 diclorofenóis; 2,4,6 e 2,3,6 triclorofenóis, para PCP e 2,3,4 triclorofenol

Quanto à recuperação dos clorofenóis extraídos do meio de cultivo

O método de extração por agitação mecânica e derivatização com anidrido acético foi adequado para extrair PCP e intermediários clorados do meio de cultivo salino, com limite de quantificação de 0,1mg/L.

ETAPA 2

Quanto aos procedimentos e obtenção do enriquecimento e isolamento de culturas anaeróbias autóctones do Estuário de Santos-São Vicente

1. Enriquecimento:

- Os microrganismos apresentaram elevado potencial metanogênico nas condições estudadas. Valores de metano estável no biogás de 40-50% foram obtidos dentro de 20 dias de incubação.

- O PCP nas concentrações estudadas (60 e 20 mg/L) foi tóxico para os microrganismos do grupo das bactérias, bactérias redutoras de sulfato e metanogênicas;

- Os controles negativos permitiram concluir que não houve perda abiótica do PCP

2. Isolamento:

- Os procedimentos de diluição seriada decimal foram adequados para a obtenção de culturas halofílicas de arqueias metanogênicas e bactéria;

- A técnica FISH foi adequada para a identificação filogenética das culturas

- O DGGE foi adequado para verificar a pureza das culturas

ETAPA 3

Quanto aos resultados de coleta, procedimentos e obtenção de culturas anaeróbias autóctones do Estuário de Santos-São Vicente na presença e ausência do PCP

- O amostrador corer foi adequado para a coleta dos sedimentos

- O sedimento da Cosipa apresentou capacidade de desalogenação superior à apresentada pelo sedimento do Largo do Canéus.

- A desalogenação redutiva ocorreu na presença de reduzida atividade metanogênica com porcentagem de metano no biogás de 15-20%. No entanto, a atividade metanogênica mesmo que reduzida foi essencial para o metabolismo do PCP.

- O predomínio de bacilos formadores de esporos semelhantes ao gênero *Clostridium* sp., filamentos e filamentos semelhantes a arqueias metanogênicas acetoclásticas relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp. observados nos exames microscópicos de contraste de fase e fluorescência indicaram a provável relação destas células com o metabolismo do PCP.

ETAPA 4

Quanto aos procedimentos e obtenção do enriquecimento de culturas anaeróbias autóctones do Estuário de Santos-São Vicente e sua atividade como inóculo degradador de PCP em reator contínuo com leito fixo

- O meio de cultivo salino Biota suplementado com glicose foi propício para o enriquecimento dos sedimentos do Largo do Canéus e da Cosipa.
- A incolução do RAHLF em sistema de circuito-fechado foi adequada.
- A espuma de poliuretana mostrou-se adequada para a colonização e imobilização da biomassa no reator sem perda de células durante todo o período operacional.
- Os microrganismos autóctones do enriquecimento do sedimento da Cosipa foram inóculos adequados para a biodegradação do PCP de 5 a 20mg/L sob condições salinas, metanogênicas e com glicose como substrato orgânico em um sistema de reação contínuo e com células imobilizadas – RAHLF.
- O meio de cultivo salino Biota e a glicose foram propícios ao crescimento de grupos microbianos dos Domínios *Archaea* e *Bacteria* que predominaram no sistema durante todo o período operacional.
- A adsorção foi o principal mecanismo na remoção inicial de PCP.
- Os perfis espaciais permitiram concluir que acentuada remoção de PCP na fase líquida para todas as concentrações aplicadas ocorreu na primeira parte do reator, no trecho correspondente da entrada à $L/D=4$, com detecção de intermediários menos clorados. PCP e demais clorofenóis adsorvidos foram removidos ao longo do trecho do leito do reator.
- A operação do sistema RAHLF na presença de 5 a 20mg/L de PCP selecionou tipos morfológicos semelhantes aos gêneros metanogênicos *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., células em forma de bacilos não fluorescentes, cocos com extremidades afiladas e filamentos finos foram também observadas.
- A técnica FISH foi adequada para a identificação filogenética de células da família *Methanosarcinaceae* presentes no reator com concentração de PCP de 20mg/L.
- A técnica do DGGE permitiu constatar que microrganismos halofílicos do Domínio *Bacteria*, nas condições de estudo, os quais presumi-se, tiveram seu papel na desalogenação redutiva do PCP. As arqueias metanogênicas halofílicas estiveram relacionadas com o consumo de ácidos orgânicos, principalmente o acético e de intermediários metabólicos menos clorados.

Nunca é tarde para tentar o desconhecido,

nunca é tarde para se ir mais além

(Gabriele d'Annunzio, poeta italiano – 1863-1938)

7. RECOMENDAÇÕES

Tendo este trabalho exploratório apresentado avanços no conhecimento sobre a degradação de compostos clorados a partir de microrganismos encontrados em locais severamente contaminados, propõem-se as seguintes recomendações para futuros trabalhos na área de biorremediação anaeróbia de compostos tóxicos:

- Para a determinação segura de clorofenóis de sedimentos e meios líquidos complexos e salinos, deve-se verificar previamente a concentração mínima do composto que o método de extração poderá disponibilizar para posterior quantificação;
- Na seleção de culturas degradadoras de PCP ou outros compostos tóxicos, iniciar com uma relação baixa composto/biomassa;
- Utilizar métodos complementares como ^{14}C para avaliar o metabolismo anaeróbio na biodegradação de PCP em consórcios metanogênicos;
- O parâmetro Sólidos Totais Voláteis deve ser empregado com cautela como medida indireta da quantidade de biomassa presentes em sedimentos;
- Aprimorar as técnicas de enriquecimento de microrganismos de interesse em maior escala;
- Em reatores como o RAHLF, os estudos sobre Ecologia Microbiana são promissores, inclusive para facilitar a seleção de tipos microbianos de interesse do ambiente; assim, o RAHLF poderá ser útil até mesmo para fins de estudos sobre diversidade microbiana funcional através da taxonomia polifásica; recomenda-se, portanto, esse tipo de sistema para trabalhos com interesse biotecnológico em laboratórios que buscam selecionar grupos específicos de microrganismos para estudos sobre fisiologia e metabolismo bioquímico, aliados a identificação de culturas;
- Recomenda-se a utilização do DGGE e FISH para monitorar a estrutura da comunidade microbiana em reatores anaeróbio.

Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo. (Hermann Hesse)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, D.S. (1998). Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímnio do lago Kizaki, Japão. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ABRAHAMSSON, K & EKDAHL, A. (1993). Gas chromatography determination of halogenated organic compounds in water and sediment in the Skagerrak. *Journal of Chromatography*, v. 643, p. 239-248.
- ABRAHAMSSON, K & XIE, T.M. (1983). Direct determination of trace amounts chlorophenols in fresh water, waste water and sea water. *Journal of Chromatography*. v. 279, p. 199-208.
- AIROLDI, F.P.S. (1997). *Determinação de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em solo contaminado por resíduos industriais*. 60p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos/Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ALBANIS, T. & DANIS, T. (1999). Analysis of phenolic compounds in soils and sediment by using spe-disks and gas chromatography techniques. *International Journal Environment. Analytical. Chemistry*, v. 74, n. 1-4, p. 55-67.
- AMANN, R.I., BINDER, B.G., OLSON, R.J., CHRISHOLM, S.W., DEVEREUX, R. & STAHL, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-target oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p. 1919-1925
- AMANN, R.I., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 01, p. 143-169.
- ARAÚJO, J. C. A (2002). Utilização da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes na Digestão Anaeróbia. In: VII Taller sobre Digestão Anaeróbia. Merida, México.
- ARAÚJO, J.C (2001) “*Biofilmes microbianos em reator anaeróbio: distribuição populacional, interações microbianas e atividades metabólicas*”. 189p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- ARAÚJO, J.C., BRUCHA, G., CAMPOS, J.R. & VAZOLLER, R.F. (2000). Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology*, v.14, n.12, p. 69-77.
- AZEVEDO, D.A., LACORTE, S., VINHAS, T., VIANA, P. & BARCELÓ, D. (2000). Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 879, p. 13-26.
- BARALDI, B. (2001). *Avaliação da comunidade e atividade microbianas em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP) através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares como PCR, ARDRA e SLOT-BLOT*. 149p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- BASU, S.K., OLESZKIEWICZ, J.A. & SPARLING, R. (1996). Dehalogenation of 2-chlorophenol (2CP) in anaerobic batch culture. *Water Research*, v. 30, n. 02, p. 315-322.
- BATTACHARYA, S.K., YUAN, Q. & JIN, P. (1996). Removal of pentachlorophenol from wastewater by combined anaerobic-aerobic treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 49, p. 143-154.
- BELTRAN, J., LÓPEZ, F.J. & HERNANDEZ, F. (1993). Solid-phase extraction of pesticide residues from ground water: comparison between extraction cartridges and extraction discs. *Analytical Chemical Acta*, v. 283, p. 297-303.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1988). Archaeobacteria. 1^o ed (Eds) J.T. Stanley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt. Baltimore, Williams & Wilkins, v.3.
- BJÖRKLUND, E. & NILSSON, T. (2000). Pressurized liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, n. 7, p. 434 – 445.
- BOLAÑOS, R.M.L. (1996). *Estudo comparativo da capacidade de inóculos de diferentes fontes de degradar PCP sob condições anaeróbias*. 134p. Dissertação (Mestrado) –Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- BOLAÑOS, M. L. (2001). *Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. 135p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/ Universidade de São Paulo, São Carlos.
- BONINI, V.L.R. (1997). Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulíticos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Orgs.). *Microbiologia Ambiental*, Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, p. 107-124.
- BOUCHARD, B., BEAUDET, R., VILLEMUR, R., MCSWEEN, G., LÉPINE, F. & BISAILLON, J.-G. (1996). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46, p. 1010-1015.

- BOYLE, A.W., PHELPS, C.D. & YOUNG, L.Y. (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1133-1140.
- BRAS, I., SANTOS, L. & ALVES, A. (2000). Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gas chromatography electron-capture detection after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 891, p. 305-311.
- BRUCHA, G; DAMIANOVIC, M.H.Z.; SAIA, F.T. & VAZOLLER, R.F. (2005). Mecanismos de remoção de pentaclorofenol presente em água residuária sintética em reator anaeróbio de leito fixo. *no prelo*
- BRUCHA, G. (2001). *Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia de tricloroetileno – TCE, empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE*. 130p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- BRUNER, F. (1993). *Gas chromatography environmental analysis: principles, techniques, instrumentation*. Urbino, Vch.
- BRYANT, F.O., HALE, D.D. & ROGERS, J.E. (1991). Regiospecific dechlorination of PCP by dichlorophenol-adapted microorganisms in freshwater, anaerobic sediment slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 08, p.2293-2301.
- BUICK, A.R., DOIG, M.V., JEAL, S.C., LAND, G.S. & McDOWALL (1990). *Journal. Pharm. Biomed. Anal.* v. 629, n. 8.
- CARMO, D.F. (2000) *Avaliação da presença de clorofenóis no reservatório de Salto Grande, situado na região de Americana, estado de São Paulo*. 175p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada/ Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- CATTONY, E. B. M.; CHINALIA, F. A.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; VARESCHE, M. B. A. (2005). Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulphate. *Biotechnoly and Bioengineering* (no prelo)
- CATTONY, E.B. (2001). *Avaliação da diversidade microbiana e das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar*. 81p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada/ Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- CAUSON, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v. 689, p. 175-180.
- CETESB (2001). Relatório do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. CESTEB. Agosto 2001.

- CHANG, V.B., YEH, N.L. & YUAN, Y.S. (1996). Effect of a dichlorophenol-adapted consortium on the dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol in soil. *Chemosphere*, v. 33, n. 02, p.303-311.
- CHANG, V.B., CHIANF, C-W & YUAN, Y-S. (1997). Dechlorination of pentachlorophenol in anaerobic sewage sludge. *Chemosphere*, v. 38, p.537-545.
- CHAU, A.S.Y. & AFGHAN, B.K. (1982). *Analysis of pesticides in water. Significance, principles, techniques and chemistry of pesticides*. Canada, CRC Press.
- CHEN, S.T., DONG, P., BERTHOUEX, P.M. & BOYLE, W.C. (2000). Fate of pentachlorophenol (PCP) in an anaerobic digester. *Water and Environmental Research*, v. 72, n.02, p. 201-206.
- COLE, J.R., CACARELLI, A.L., MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 10, p. 3536-3542.
- COLLINS, C.H. & BRAGA, G.L. (1987). *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas, Ed. Unicamp.
- CROSBY, D.G. (1981). Environmental chemistry of pentachlorophenol . *Pure and Applied Chemistry*, v. 53, p. 1051-1058.
- CRUZ, I. & WELLS, D.E. (1992). Determination of pentachlorophenol by exhaustive methylation and capillary gas chromatography in sewage sludge, contaminated water and suspended particulates. *International Journal Environmental Analytical Chemistry*, v. 48, p. 101-113.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. 176p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/ Universidade de São Paulo, São Carlos.
- DE WEERD, K.A., MANDELCO, L., TANNER, R.S., WOESE, C.R., SUFLITA, J.M. (1990). *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic dehalogenating, sulfate reducing bacterium. *Archives of Microbiology*, v. 154, p. 23-30.
- DWYER, D.F., KRUMME, M.L., BOYD, S.A. & TIEDJE, J.M. (1986). Kinetics of phenol biodegradation by an immobilized methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, p. 345-351.
- DI LALLO, R. & ALBERTSON, O.E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 33, p. 356-365.
- DOLFING, J. & HARRISON, B.K. (1992). Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential as electron acceptors in anaerobic environments. *Environmental Science and Technology*, v. 26, n. 11, p. 2213-2218.
- DOLFING, J. & TIEDJE, J.M. (1986). Hydrogen cycling in a three-tiered food web growing on the methanogenic conversion of 3-chlorobenzoate. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 38, p. 293-298.

- DOMINGUES, M.R., ARAÚJO, J.C., VARESCHE, M.B.A. & VAZOLLER, R.F. (2002). Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Water Science and Technology*, v.45, n.10.
- DOMINGUES, M. R. (2001). *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas*. 164p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- DUFF, S.J., KENNED, K. J. & BRADY, A.J. (1995). Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Research*, v. 29, n. 2, p. 645-651.
- EGLI, C., SCHOLTZ, R., COOK, A.M. & LEISINGER, T. (1987). Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloromethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium sp.* and *Methanobacterium sp.* *FEMS Microbiol. Letters*, v. 43, p. 257-261.
- EL FANTROUSSI S., NAVEAU, H. & AGATHOS, S.N. (1998). Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnology Progress*, v. 14, n. 2, p. 167-188.
- ESTEVES, F.A.; BOZELLI, R.L.; CAMARGO, A.F.M.; ROLAND, F. THOMAZ, S.M. 1988. Variação diária (24 horas) de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade em duas lagoas costeiras do estado do Rio de Janeiro e suas implicações no metabolismo desses ecossistemas. *Acta Limno. Bras.* 2: 99-127.
- FANG, H.H.P., LIU, Y. & CHENT, T. (1997). Effect of sulfate on anaerobic degradation of benzoate in UASB reactors. *Journal of Environmental Engineering*, v. 123, 320-328.
- FATIBELLO, S.H.S.A. (1997). Avaliação da atividade microbiana anaeróbia de sedimentos lacustres e de lodos de um biodigestor anaeróbio termofílico na degradação do tricloroetileno (TCE). Dissertação (Mestrado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- FATHEPURE, B.Z. & BOYD, S.A. (1988). Dependence of tetrachloroethylene dechlorination of methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina sp.* Strain DCM. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 2976-2980.
- FIELD, J.A., STAMS, A.J.M., KATO, M., SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 77, p. 47-77.
- FIELD, J.A. (2002). Anaerobic biodegradation of xenobiotic compounds. In: VII Taller sobre Digestão Anaeróbia. Merida, México.
- FIFIELD, F.W. & HAINES, P.J. (1995). *Environmental Analytical Chemistry*. 4^{ed}. London, Blackie Academic & Professional, 417p.
- FLORA, J.R.V., SUIDAN, M.T., WULLNER, A.M. & BOYER, T.K. (1994). Anaerobic treatment of a simulated high - strength industrial wastewater containing chlorophenols. *Water Environmental Research*, v. 66, n.01, p. 21-31.

- FUCHS, B.M., GLOECKNER, F.O., WULF, J., AMANN, R. (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16s rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 3063-3067.
- GABELISH, C.L., CRISP, P. & SCHNEIDER, R.P. (1996). Simultaneous determination of chlorophenols, chlorobenzenes and chlorobenzoates in microbial solutions using pentafluorobenzylbromide derivatization and analysis by gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 749, p. 165-1671.
- GARCIA, J.L., PATEL, B.K.C. & OLLIVIER, B. (2000). Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe*, v.6, p. 205-226.
- GERRITSE, J. DRZYGA, O.; KLOETSTRA, G.; KEIJMEL, M.; WIERSUM, L.P. HUTSON, R.; COLLINS, M.D. & GOTTSCHAL, J.C. (1999). Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfotobacterium frappieri* TCE1. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.5212-5221.
- GERRITSE, J. RENARD, V., GOMES, T.M.P, LAWSON, P.A., COLLINS, M.D. & GOTTSCHAL, J.C. (1996). *Desulfotobacterium* sp strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.*, 165, p.132-140.
- GIAJ-LEVRA, L.A.(1991). Estudo de metodologia de contagem para bactéria anaeróbia celulolítica. São Carlos. 140p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos/ Universidade de São Paulo, São Carlos.
- GRANZOW, S. (1998). Isolierung und Charakterisierung eines neuen Tetrachlorethen dechlorierenden strikt anaeroben Bakteriums, *Desulfotobacterium frappieri* Stamm PCE-S. Ph.D. Thesis, Universität Stuttgart, Stuttgart, Alemanha.
- GÜRTLER, V. & STANISICH, V.A.(1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, v.142, p. 3-16.
- HARMSSEN, H.J.M; KENGEL, H.M.P.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M. & DE VOS, W.M. (1996). Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16SrRNA-based oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62 p.1656-1663.
- HANAKI, K., HIRUNMASUWAM, S. & MATSUO, T. (1994). Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. *Water Research*, v. 28, p. 877-885.
- HENDRIKSEN, H.V & AHRING, B.K. (1992). Metabolism and kinetics of pentachlorophenol in anaerobic granular sludge. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 37, p. 662-666.
- HENDRIKSEN, H.V., LARSEN, S., AHRING, B.K. (1992). Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n.01. p. 365-370.

- HENDRIKSEN, H.V., LARSEN, S. & AHRING, B.K. (1991). Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors: the influence of an additional substrate. *Water Science and Technology*, v.24, n.3/4, p. 431-436
- HEUER, H., KRSEK, M., BARKER, P., SMALLA, K., WELLINGTON, M.H.E. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n.8, p. 3233-3241.
- HILL, H. (1994). *Proceedings of analytical validation: A practical approach to meet current regulatory requirements, management forum*. London.
- HOLLIGER, C., WOHLFARTH, G., DICKERT, G. (1999). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Review*, v. 22, p. 383-398.
- HOLLIGER, C. HAHN, D., HARMSSENS, H., LUDWIG, W., SCHUMACHER, W., TINDALL, B., VAZQUEZ, F., WEISS, N. & ZEHNDER, A.J.B. (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.*, 169, p. 313-321
- HOLLIGER, C. & SCHUMACHER, W. (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 66, p. 239-246.
- HOLLIGER, C., SCHRAA G., STAMS, A. J. & ZEHNDER, A.J. (1992). Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-Trichlorobenzene to 1,3-Dichlorobenzene. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.05, p. 1636-1644.
- HOLLIGER, C. SCHRAA G.; STAMS, A. J. & ZEHNDER, A.J. (1990). Reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane and chloroethane by cell suspensions of methanogenic bacteria. *Biodegradation*, v.1, p. 253-261.
- HUBERT, P.H., CHIAP, .P., CROMMEN, J., BOULANGER, B., CHAPUZET, E., MERCIER, N., BERVOAS-MARTIN, S., CHEVALIER, P., GRANDJEAN, D., LAGORCE, P., LALLIER, M., LAPARRA, M.C., LAURENTIE, M., NIVET, J.C. (1999). The SFTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 135-148.
- JIN, P. & BHATTACHARYA, S.K. (1997). Toxicity and biodegradation of chlorophenols in anaerobic propionate enrichment culture. *Water Environmental Research*, v. 69, n.05, p. 938-947.
- JUTEAU, P., BEAUDET, R., McSWEEN, G., LÉPINE, F., MILOT, S. & BISAILLON, J.G. (1995). Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 44, p. 218-224.
- KATO, M. T., NETO, C.O.A., CHERNICHARO, C.A.L., FORESTI, E. & CYBIS, L.F. (1999). Configurações de reatores anaeróbios. In: *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. PROSAB, cap. 3, p. 53-99.

- KENNES, C., WU, W-M., BHATNAGAR, L. & ZEIKUS, J.G. (1996). Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic pentachlorophenol degrading granules. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, v. 44, p. 801-806.
- KHODADOUST, A.P., WAGNER, J.A., SUIDAN, M.T. & BRENNER, R.C. (1997). Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. *Water Research*, v. 31, n. 07, p. 1776-1786.
- KOIZUMI, Y., KELLY, J.J., NAKAGAWA, T., URAKAWA, H., EL-FANTROUSSI, S., AL-MUZAINI, S., FUKUI, M., URUSHIGAWA, Y. & STAHL, D.A. (2002). Parallel characterization of anaerobic toluene and ethylbenzene degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization and DNA microarray technology. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 07, p. 3215-3225.
- KUDO, Y., NAKAJIMA, T., MIYAKI, T., OYAIZU, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in japan. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 22, p. 39-48.
- LAINE, M.M., HAARIO, H. & JORGENSEN, K.S. (1997). Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. *Journal of Microbiological Methods*, v. 30, p. 21-32.
- LANÇAS, F. (1993). *Cromatografia em Fase Gasosa.*; ed. Acta (São Carlos). 254p. =
- LARIZATTI, S.F. (1997). *Avaliação da degradação anaeróbia de pentaclorofenol por consórcios metanogênicos enriquecidos*. 138p. Dissertação (Mestrado)–Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- LARSEN, S., HENDRIKSEN, H.V. & AHRING, B.K. (1991). Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.07, p. 2085-2090.
- LAWRENCE, M.A.M., DAVIES, N.A., EDWARDS, P.A., TAYLOR, M.G. & SIMKISS, K. (2000). Can adsorption isotherms predict sediment bioavailability? *Chemosphere*, v. 41, p. 1091-1100.
- LEE, N., NIELSEN, P. H., ANDREASEN, K.H., JURETSCHO, S., NIELSEN, J.L. SCHLEIFER, K.H. & WAGNER, M. (1998). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 03, p. 1289-1297.
- LIU, W.T., CHAN, O.C. & FANG, H.H.P. (2002). Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Research*, v.36, p. 3203-3210.
- LIU, S-M., KUO, C-E. & HSU, T-B. (1996). Reductive dechlorination of chlorophenols and pentachlorophenol in anoxic estuarine sediments. *Chemosphere*, v. 32, n.07, p. 1287-1300.
- LLOMPART, M.P., LORENZO, R.A., CELA, R. & LOCELYN PARÉ, J.R. (1997). Optimization of a microwave-assisted extraction method for phenol and methylphenol isomers in soils samples using a central composite design. *Analyst*, v. 122, p. 133-137.

- LONDROY, K.L. & FEDORAK, P.M. (1992). Benzoic acid intermediates in the anaerobic biodegradation of phenols. *Canadian Journal Microbiology*, v. 38, p. 1-11.
- MACKIEWICZ, N. & WIEGEL, J. (1998). Comparison of energy and growth yields for *Desulfotobacterium dehalogenans* during utilization of chlorophenol and various traditional electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 352-355.
- MADSEN, T. & AAMAND, J. (1992). Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n.02, p. 557-561.
- MADSEN, T. & AAMAND, J. (1991). Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 09, p. 2453-2458.
- MADSEN, T. & AAMAND, J. (1990). Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 09, p. 2453 - 2458.
- MADSEN, T. & LICHT, D. (1992). Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenols – transforming bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 09, p. 2874-2878.
- MAGAR, V.S., STENSEL, H.D., PUHAKKA, J. & FERGUSON, J.F. (2000). Characterization Studies of an Anaerobic Pentachlorophenol –Dechlorinating Enrichment Culture. *Bioremediation Journal*, v. 4, n. 04, p. 285-293.
- MANFIO, G.P., DESTEFANO, S.L., FANTINATTI, F., OLIVEIRA, V. (1999). Métodos moleculares para a caracterização de diversidade microbiana. In: *Métodos moleculares para a caracterização da diversidade microbiana*. Apostila do curso de treinamento (23-27 de outubro de 2000), Fundação André Tosello (Campinas).
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., WAGNER, M., SCHLEIFER, K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 15, p. 593-600.
- MASUNAGA, S., SUSARLA, S., GUNDERSEN, J.L. & YONEZAWA, Y. (1996). Pathway and rate of chlorophenol transformation in anaerobic estuarine sediment. *Environmental and Science Technology*, v.30, p.1253-1260.
- MATHEUS, D.R. (1997). *Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por Basidiomicetos brasileiros*. 162p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- MAYMÓ-GATELL, X., ANGUISH, T. & ZINDER, S.H. (1999). Reductive dechlorination of ethenes and 1,2 dichloroethane by “Dehalococcoides ethenogenes”195. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3108-3113.
- MAYMÓ-GATELL, X., CHIEN, Y.T., GOSSETT, J.M. & ZINDER, S.H. (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, 226, p.1568-1571.

- MCALLISTER, K.A., LEE, H. & TREVORS, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*, v. 07, n. 01, p.1-40.
- Mc INERNEY, M.J. & BRYANT, M.P. (1981) Anaerobic Degradation of Lactate by Syntrophic Associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and Effect of H₂ on Acetate Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n.02, p. 346-354.
- MILLER, J.C.& MILLER, J.N. (1993). Statistics for Analytical Chemistry, 3^{ed}. Ed. Ellis Horwood and Prentice Hall (Nva York). 232p.
- MIKESELL, D.M. & BOYD, A.S. (1986). Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, n. 04, p. 861-865.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. (1991). Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. *Archieves of Microbiology*, v. 157, p. 1-6.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbial Reviews*, v. 56, n. 03, p. 482-507.
- MOHN, W.W. & KENNEDY, K.J. (1992). Reductive dehalogentaion of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 04, p.1367-1370.
- MONTENEGRO,M.A.P., MORAES, E.M.; SOARES, H.M. & VAZOLLER, R.F. (2002). Hybrid reactor performance in pentachlorophenol (PCP) removal by anaerobic granules. *Water Science and Technology*, v. 44, n. 04, p. 137-144.
- MONTENEGRO, M.A.P., ARAUJO, J.C. & VAZOLLER, R.F. (2002a). Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence *in situ* hybridization. In: *VII Taller sobre Digestão Anaeróbia. Merida, México. Biología molecular aplicada a la digestión anaerobia*.
- MONTENEGRO , M.A.P. (2001). Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP). 222p. Tese (Doutorado) – Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada/Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MONTGOMERY, L., ASSAF-ANID, N., NIES, L., ANID, P.J., VOGEL, T.M. (1994). Anaerobic biodegradation of chlorinated organic compounds. In: CHAUDRY, G.R. (Org.) *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. Oregon : Dioscorides Press, p. 256-276.
- MORAES, E.M., ADORNO, M.A.T., ZAIAT, M. & FORESTI, E. (2000). Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. (2000). *Anais da VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia*. Recife/Brasil, 5-9 de novembro de 2000. p. 235-238.

- MOTER, A. & GÖBEL, U.B. (2000) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, p. 85-112.
- MUYSER, G., HOTTENTRÄGER, S., TESKE., WAWER, C. (1996). Denaturing gradient gel eletrophoresis of PCR - amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Methods Ecology Manual*. p. 1 – 23.
- NAKAYAMA, C.R. (2002). Contribuição aos estudos de diversidade funcional de microrganismos realizados no Programa BIOTA FAPESP: Degradação Anaeróbia de Pentaclorofenol em sedimentos estuarinos: resposta metabólica de metanoarqueas e bactérias redutoras do íon sulfato. Relatório FAPESP, 39p.
- NARDI, I.R., RIBEIRO, R., ZAIAT, M. FORESTI, E. (2005). Anaerobic packed-bed reactor. for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. *Process Biochemistry*, v.40, p.587-592.
- NARDI, I. R. *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. 171p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- NEUMAN, A., SCHOLZ-MURAMATSU, H. & DIEKERT, G. (1994). Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Archivies of Microbiology*, v. 162, p. 295-281.
- NEUMAN, A., SCHOLZ-MURAMATSU, H. & DIEKERT, G. (1996). Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *Journal Biol. Chem.*, v. 271, p. 16515-16519.
- NEUMAN, A., SCHOLZ-MURAMATSU, H. & DIEKERT, G. (1998). Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: Cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 4140-4145.
- NI, S., FREDRICKSON, J.K. & XUN, L. (1995). Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 5135-5139.
- NICHOLSON, D.K., WOODS, S.L., ISTOK, J.D. & PEEK, D.C. (1992). Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 07, p. 2280-2286.
- OLIVEIRA, S.V.W.B. (2001). Avaliação da degradação e toxicidade de formiladeído em reator anaeróbio horizontal de leito fixo. 95p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos
- OLIVEIRA, V.M. (2000). Métodos moleculares para a caracterização de comunidades microbianas. In: *Métodos moleculares para a caracterização da diversidade microbiana*. Apostila do curso de treinamento (23-27 de outubro de 2000), Fundação André Tosello (Campinas).

- PAK, D. (1994). Enhanced dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol by anaerobic microbial populations in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters*, v. 18, n. 08, p. 981-984.
- PARKER, W.J., HALL, E.R. & FARQUHAR, G.J. (1993). Evaluation of dechlorination mechanisms during anaerobic fermentation of bleached kraft mill effluent. *Water Research*, v. 27, n. 08, p. 1269 - 1273.
- PERES, R.G. (1997). Extração (LLE, SPE, SFE) e análise cromatográfica de pesticidas organoclorados em água. 107p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- PERKINS, S.P., KOMISAR, J.S., PUHAKKA, A.J. & FERGUSON, F.J. (1994). Effects of electron donors and inhibitors on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. *Water Research*, v. 28, n. 10, p. 2101-2107.
- PERNTHALER, J., GLÖCKNER, F.-O., SCHÖNHUBER, W. & AMANN, R. (2001). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology*, v. 30, p. 207-226.
- PIRINGER, G. & BHATTACHARYA, S.K. (1998). Toxicity and fate of pentachlorophenol in anaerobic acidogenic systems. *Water Research*, v. 33, n. 11, p. 2674-2682.
- POLESE, L. & RIBEIRO, M.L. (1998). Methods for determination of hexachlorobenzene and pentachlorophenol in soil samples. *Talanta*, v. 46, p. 915-920.
- POLESELLO, S. (1996). How to present an analytical method. *Food Chemistry*, v. 58, n. 1-2, p. 145-147.
- POULSEN, L.K., BALLARD, G. & STAHL, D.A. (1993). Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 1354-1360.
- PUHAKKA, A.J., MELIN, S.E., JARVINEN, T.K., KORO, M.P., RINTALA, A.J., HARTIKAINEN, P., SHIEH, K.W. & FERGUSON, F.J. (1995). Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Science and Technology*, v. 31, n. 01, p.227-235
- RASKIN, L., STROMLEY, J.M., RITTMAN, B.E., STAHL, D.A (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 04, p.1232-1240.
- RYDING, J.M., PUHAKKA, J.A., STRAND, S.E. & FERGUSON, J.F. (1993) Degradation of chlorinated phenols by a toluene enriched microbial culture. *Water Research*, v. 28, n.09, p.1897-1906.
- RIPLEY, L. E., BOYLE, W. C. & CONVERSE, L. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, v. 58, p. 406-411.
- SAIA, F.T. NAKAYAMA, C.R.; VARESCHE, M.B.A.; MANFIO, G.P. E VAZOLLER, R.F. (2004). Monitoring anaerobic digestion process of PCP degradation by natural sediments from a very

- polluted area of Brazil, in order to assist anaerobic remediation strategy. *Proceedings of Anaerobic Digestion 2004*, v.2, p. 910-913.
- SAKAMOTO, I.K. (2001). *Comparação da estrutura de comunidades microbianas complexas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)*. 159p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- SAMBROOK, F., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second edition, New York: Cold Spring Harbor Press.
- SANFORD, A.R., COLE, J.R., LÖFFLER, E.F. & TIEDJE, J.M. (1996). Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp.nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 10, p. 3800-3808.
- SANZ, J.L. (2002). Metodos analiticos de biologia molecular en digestion anerobia. *In: VII Taller sobre Digestão Anaeróbia*. Merida, México.
- SANZ, J.L., DIAZ, E. & AMILS, R. (2002). Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *In: VII Taller sobre Digestão Anaeróbia. Merida, México. Biología molecular aplicada a la digestión anaerobia*.
- SÃO PAULO, ESTADO (1992a). Ministério Público do Estado de São Paulo. Ação Civil Pública Ambiental – Processo nº 275/92, da 4ª Vara Cível da Comarca de Cubatão, v.1, p. 1-26.
- SÃO PAULO, ESTADO (1985a). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Processo nº 02/0300/85. São Paulo: CETESB, 1985, numeração irregular. (processo administrativo) CETESB, Secretaria de Obras e do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- SCHINK, B. (1997). Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation, v.61, n.2, p. 262-280.
- SHARMA, P.K. & McCARTY, P.L. (1996). Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachlorethylene to cis-1,2-dichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 761-765
- SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. (1990). *Analytical Chemistry: an introduction*. 5^{ed}. Philadelphia; Saunders College Publishing. 642p.
- SMALLA, K., CRESSWELL, N., MENDONÇA-HAGLER, L.C., WOLTERS, A. & Van ELSAS, J.D. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal Applied Bacteriology*, n. 74, p. 78-85.

- SMIDT, H.; VAN LEEST, M.; VAN DER OOST, J. & DE VOS W. M. (2000). Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in ortho-chlorophenol respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 5683-5691.
- SMIDT, H.; ANTOON, D.L., VAN DER OOST, J. & DE VOS W. M. J. (2000). Halorespiring bacteria-molecular characterization and detection . *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27 p. 812-820.
- SMIDT, H (1999). *Molecular characterization of anaerobic dehalogenation by Desulfitobacterium dehalogenans*. Wageningen. 187 p. Tese (Doutorado) – Wageningen University, Netherlands
- SMITH, R.M. (1988). *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. 402p.
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L. (1991). Quantification (including trace analysis) In: *Practical HPLC Method Development*. 2ed. Ed. Wiley-Interscience Publication (Nova York). Cap. 14, p. 643-685.
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L. (1991). Completing the method validation and transfer. In: *Practical HPLC Method Development*. 2ed. Ed. Wiley-Interscience Publication (Nova York). Cap. 15, p. 685-713.
- SØRENSEN, A.H., TORSVIK, V.L., TORSVIK, T., POULSEN, L.K., AHRING, B.K. (1997). Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 3043-3050.
- SPROTT, D. G.; BEVERIDGE, T.I. Microscopy. In: *Methanogenesis – Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Ed. J.G. Ferry. Cap.2, Pp.81-127. 1993.
- STAHL, D.A. & AMMAN, R.I. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: STACHEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. eds. *In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, v. 8. John Wiley & Sons, Ltd, London, Inglaterra, p.207-248.
- Standard Methods for the Examination of water and wastewater* (1998). 20th ed. APHA/AWWA/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- STUART, S.L. & WOODS, S.L. (1998). Kinetic evidence for pentachlorophenol-dependent growth of a dehalogenating population in a pentachlorophenol—and acetate fed, methanogenic culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 57, n.04, p. 420-429.
- SULFITA, J.M. & TOWNSEND, G.T. (1995). The microbial ecology and physiology of aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation. In: YOUNG, L.Y. & CERNIGLIA, C.E. *Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Willey-Liss, Inc, Cap. 6, p. 243-268.
- SUN, B., COLE, J.R.; SANFORD, R.A. & TIEDJE, J.M. (2000). Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a marine dechlorinating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, n. 06, p. 2408-2413.

- TAKEUCHI, R., SUWA, Y., YAMAGISHI, T. & YONEZAWA, Y. (2000). Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere*, v. 41, p. 1457-1462.
- TARTAKOVISKY, B., LEVESQUE, M. J., DUMORTIER, R., BEAUDET, R. & GUIOT, S.R. (1999). Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 10, p. 4357 - 4362.
- TARTAKOVISKY, B.; MANUEL, M.F.; J.; BEAUMIER, D.; GREER, C.W. & GUIOT, S.R. (2000). Enhanced Selection of an Anaerobic Pentachlorophenol-Degrading Consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, n. 06, junho 20, p. 476-483
- TESKE, A., SIGALEVICH, P., COHEN, S. & MUYSER, G. (1996). Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 11, p. 4210-4215.
- TOUZEL, J.P. & ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, v.16, p. 241-245.
- TSAI, Y.L. & OLSON, B.H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, april, p.1070-1074.
- TSUNO, H., KAWAMURA, M. & SOMIYA, I. (1996). Anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) in a biological expanded-bed reactor. *Water Science and Technology*, v. 34, n. 5-6, p. 335-344.
- UTKIN, I.B., DALTON, D.D & WIEGEL, J. (1995). Specificity of reductive dehalogenation of substituted ortho-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 01, p.346-351.
- UTKIN, I. B., WOESE, C. & WIEGEL, J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen.nov.sp.nov. an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, n. 04, p. 612-619.
- VALLEYS, T., TOPP, E., MUYZER, G., MACHERET, V., LAGUERRE, G., RIGAUD, A. & SOULAS, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 24, p. 279-285.
- VAZOLLER, R. F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. 259p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- VAN DER EEKERT, M.H.A., SCHRÖDER, T.J., STAMS, A.J.M., SHRAA, G. & FIELD, J.A. (1998). Degradation and fate of carbon tetrachloride in unadapted methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 07, p. 2350-2356.

- VENINGEROVÁ, M., PRACHAR, V., KOVACICOVÁ, J. & UHNÁK, J. (1997). Analytical methods for determination of organochlorine compounds: application to environmental samples in the Slovak Republic. *Journal of Chromatography A*, v. 774, p. 333-347.
- VICINO, J.R.L. (1993). *Extração em fase sólida de pesticidas organofosforados e organoclorados de matrizes aquosas*. 151p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- VIDAL, L.H. (1991). *Otimização da análise de pesticidas clorados na presença de PCB's em sistemas aquáticos*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos/Escola de Engenharia de São Carlos/ Universidade de São Paulo, São Carlos.
- VOET, H. RHIJN, J.A & WIEL, H. (1999). Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 159-171.
- VOSS, R.H., WEARING, J.T., WONG, A. (1981). A novel gas chromatographic method for the analysis of chlorinated phenolics in pulp mill effluents. *Advances in the identification and analysis of organic pollutants in water*, v.2, p. 1059-1095.
- WANG, T-Y., MUTHUKRISHNAN, S. & WANG, Z. (1998). Reductive dechlorination of chlorophenols in methanogenic cultures. *Journal of environmental Engineering*, março, p.231-238
- WARD, D.M., WELLER, R., BATESON, M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, n. 345, p. 63-65.
- WACKETT, L.P. (1995). Bacterial co-metabolism of halogenated organic compounds. In: YOUNG, L.Y. & CERNIGLIA, C.E. *Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Willey-Liss, Inc, Cap. 5, p. 217-242.
- WACKETT, L.P. (1997). Biodegradation of halogenated solvents. In: HURST, C.J., KNUDSEN, G.R., McINERNEY, M. J., STETZENBACH, L.D. & WALTER, M.V. (Eds). *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Cap. 86, p. 784-789.
- WALTER, M.V. & CRAWFORD, R.L. (1997). Overview: Biotransformation and Biodegradation. In: HURST, C.J., KNUDSEN, G.R., McINERNEY, M. J., STETZENBACH, L.D. & WALTER, M.V. (Eds). *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Cap. 76, p. 707-708.
- WIDDEL & PFENNIG (1984). Dissimilatory sulfate or sulfur reducing bacteria. In: KRIEG, N.R; HOLT, J.G. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Cap. 1: p. 663-679.
- WIELING, J., HENDRIKS, G., TAMMINGA, W.J., HEMPENIUS, J., MENSINK, C.K., OOSTERHUIS, B. & JONKMAN, J.H.G. (1996). *Journal of Chromatography A*, v. 730, p. 381-394.
- WILD, S.R., HARRARD, S.J & JONES, K.C. (1992). Pentachlorophenol in the UK environment In: A budget and source inventory. *Chemosphere*, v. 24, n. 07, p. 833-845.
- WILDEMAN, S. & VERSTRAETE, W. (2003). The quest for microbial reductive dechlorination of C₂ to C₄ chloroalkanes is warranted. *Applied Microbiol Biotechnol.*, v. 61, p. 94-102.

- WOODS, S.L., FERGUSON, J.F. & BENJAMIN, M.M. (1989). Characterization of chlorophenols and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environmental Science and Technology*, v. 23, n.01, p. 62-68.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. (1987). *Pentachlorophenol. Environmental health criteria*, v. 71, p. 1-236.
- WU, W., BHATNAGAR, L. & ZEIKUS, J.G. (1993). Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n. 02, p. 389-397.
- ZAIAT, M., CABRAL, A.A.C., FORESTI, E. (1994). Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Química*, v. 11, n. 02, p. 33-42.
- ZAIAT, M. (1996). *Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. 156p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ZHAO, Y., ZHANG, H., BOONE, D.R. & MAH, A.R. (1986). Isolation and characterization of a fast-growing, thermophilic *Methanobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, n. 05, p. 1227-1229.
- ZINDER, S. & KOCH, M. (1984). Non acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic co-culture. *Archives of Microbiology*, v. 138, p. 263-272.
- ZINDER, S.H., CARDWELL, T., ANGUISH, M., LEE, M. & KOCH. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotheroxys* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Applied Environmental Microbiology*, v. 47, p. 796-807.
- ZOU, S., ANDERS, K M. & FERGUSON, J.F. (2000). Bioestimulation and Bioaugmentation of Anaerobic Pentachlorophenol Degradation in contaminated Soils. *Bioremediation Journal*, v. 04, n. 01, p. 19-25.
- ZUIN, V.G. (1997). *Determinação de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em águas naturais de subsuperfície de áreas afetadas por resíduos de organoclorados*. 66p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos.
- YE, F.X., SHEN, D.S. & FENG, Z.S. (2003). Anaerobic granule development for removal of pentachlorophenol in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Process Biochemistry*, p.1-8.
- YE, F.X. & SHEN, D.S. (2004). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere*, v. 54, p.1573-1580.
- XIE, T-M. (1983). Determination of trace amounts of chlorophenols and chloroguaiacols in sediment. *Chemosphere*, v. 12, n.9/10, p. 1183-1191.

Dopagem e extração de clorofenóis para análise cromatográfica

Figura 1A. Fluxograma geral da metodologia aplicada ao sedimento alcalinizado, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica.

Figura 2A. Fluxograma geral da metodologia aplicada ao sedimento alcalinizado/acidificado, para obtenção e derivatização dos extratos para análise cromatográfica.

ANEXO A

**Tabela A1. Réplicas das áreas das soluções de PCP em Na₂CO₃ 3%.
Derivatização com 100 mL de anidrido acético.**

tempo de corrida - 25 minutos

Solução PCP em Na ₂ CO ₃ 3% (Réplicas)	tempo de retenção (min)	área
am 1	14,587	170233
am 2	14,583	183595
am 3	14,580	134291
am 4	14,592	74559
am 5	n.d	n.d
média das amostras am1-am3		162706
desvio padrão de am1-am3		25499,2

n.d. – não detectado

**Tabela A3. Réplicas das áreas das soluções de PCP em K₂CO₃ 3%.
Derivatização com 200 mL de anidrido acético**

Solução PCP em K ₂ CO ₃ 3% (Réplicas)	tempo de retenção (min)	área
am 1	25,089	592057
am 2	25,086	590845
am 3	25,086	581176
média das amostras am1-am3		588026
desvio padrão de am1-am3		5963,15

**Tabela A2. Réplicas das áreas das soluções de PCP em K₂CO₃ 3%.
Derivatização com 100 mL de anidrido acético.**

tempo de corrida - 30 minutos

Solução PCP em K ₂ CO ₃ 3% (Réplicas)	tempo de retenção (min)	área
am 1	25,079	122716
am 2	25,101	124483
am 3	25,109	87123
am 4	25,108	83387
am 5	25,104	84006
média das amostras am3-am5		84839
desvio padrão de am3-am5		2002,35

**Tabela A4. Réplicas das áreas das soluções de PCP em Na₂CO₃ 3%.
Derivatização com 200 mL de anidrido acético**

Solução PCP em Na ₂ CO ₃ 3% (Réplicas)	tempo de retenção (min)	área
am 1	25,101	410709
am 2	25,096	480023
am 3	25,094	549762
am 4	25,087	511383
am 5	25,087	457239
média das amostras am2-am5		499602
desvio padrão de am2-am5		40136,35

Tabela A5. Tempos de retenção e áreas do PCP e do 2,4DBP em solução aquosa de K₂CO₃ 3%, utilizados nos cálculo dos fatores de resposta do PCP Derivatização com 200 μ L de anidrido acético

	PCP am 1	2,4 DBP	PCP am 2	2,4 DBP	PCP am 3	2,4 DBP	Branco 2,4DBP
t. retenção	25,089	18,428	25,086	18,425	25,086	18,425	18,402
áera	592057	2611882	590845	2832850	581176	2429144	3189927
FR	0,23		0,21		0,24		
média FR	0,22						
DP FR	0,02						

DP FR – Desvio padrão dos fatores de resposta

Tabela A6. Tempos de retenção e áreas do PCP e do 2,4DBP em solução aquosa de K₂CO₃ 3%,utilizados nos cálculo dos fatores de resposta do PCP das amostras metiladas

	PCP am 1	2,4 DBP	PCP am 2	2,4 DBP	PCP am 3	2,4 DBP	PCP am 4	2,4 DBP	Branco 2,4DBP
t. retenção	23,006	17,010	23,004	17,009	23,005	17,009	23,004	17,009	17,009
áera	637629	720811	629443	710694	567098	653788	626518	702568	539184
f. resposta	0,88		0,89		0,87		0,89		
média FR	0,88								
DP FR	0,01								

Tabela A7 – Áreas do PCP e do 2,4DBP em solução aquosa de NaOH 0,2M, utilizadas nos cálculo dos fatores de resposta do PCP das amostras metiladas

	PCP am 1	2,4 DBP	PCP am 2	2,4 DBP	PCP am 3	2,4 DBP
t. retenção	28.222	21.308	28.227	21.321	28.269	21.337
área	798922	1003622	768434	1003620	1311457	1671338
FR	0,80		0,77		0,78	
média FR	0,78					
DP FR	0,02					

ANEXO B

Tabela B1. Cálculos dos fatores de resposta para as amostras de sedimento acidificado seco na estufa e centrifugado, com e sem sulfato de sódio anidro.

Sedimento acidificado, dopado e sem sulfato de sódio anidro						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
Estufa	227112	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
centrifuga	606803	863437	0,70	317333	391952	0,81
Sedimento acidificado, dopado e com sulfato de sódio anidro						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
estufa	237450	288645	0,82	n.d.	533360	-
centrifuga	607842	592292	1,03	283092	299661	0,94
Sedimento acidificado sem dopar (branco)						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
estufa	n.d.	734485	-	n.d.	707592	-
centrifuga	n.d.	399165	-	n.d.	443324	-

n.d. – não detectado

Tabela B2. Cálculos dos fatores de resposta para as amostras de sedimento alcalinizado seco na estufa e centrifugado e sem sulfato de sódio anidro.

Sedimento alcalinizado, dopado e sem sulfato de sódio anidro						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
estufa	653336	235490	2,77	291880	350566	0,83
centrifuga	-	-	-	-	-	-

OBS: No sedimento branco não foi detectado nem PCP nem 2,4,DBP

Tabela B3. Cálculos dos fatores de resposta para as amostras de sedimento alcalinizado/acidificado seco na estufa e centrifugado, com e sem sulfato de sódio anidro.

Sedimento alcalinizado/acidificado, branco e sem sulfato de sódio anidro						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
estufa	-	-	-	-	-	-
centrifuga	n.d	565846	-	-	-	-

Sedimento alcalinizado/acidificado, dopado e sem sulfato de sódio anidro						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
estufa	-	-	-	-	-	-
centrifuga	855572	550380	1,55	-	-	-

Sedimento alcalinizado/acidificado, dopado e com sulfato de sódio anidro						
	am1			am2		
	Área PCP	Área 2,4DBP	FR	Área PCP	Área 2,4DBP	FR
estufa	-	-	-	-	-	-
centrifuga	n.d.	274886	-	-	-	-

ANEXO C

Tabela C1. Valores de Q, das médias, dos desvios-padrão (DP) e dos coeficientes de variação (CV) dos fatores de respostas (FR) das réplicas das soluções padrão.

Pentaclorofenol								2,4,6 triclorofenol							
Conc. (µg/L)	5	10	50	100	200	300		Conc. (µg/L)	5	10	50	100	200	300	
Q	0,32	0,55	0,55	0,47	0,71	0,81		Q	0,41	0,23	0,56	0,61	0,73	0,63	
Média FR	3,25	2,89	4,86	8,03	15,14	18,58		Média FR	0,31	0,46	1,86	3,20	6,62	9,32	
DP	0,10	0,20	0,07	0,83	1,17	1,47		DP	0,03	0,04	0,07	0,27	0,58	0,45	
CV	3,06	7,09	1,34	10,33	7,75	7,90		CV	10,23	8,47	4,02	8,30	8,78	4,87	

2,3,6 triclorofenol								2,3,4 triclorofenol							
Conc. (µg/L)	5	10	50	100	200	300		Conc. (µg/L)	5	10	50	100	200	300	
Q	0,35	0,35	0,64	0,61	0,69	0,62		Q	0,3	0,17	0,58	0,72	0,45	0,45	
Média FR	0,57	0,57	1,45	7,85	6,63	6,52		Média FR	0,79	1,02	1,19	1,78	2,98	3,91	
DP	0,03	0,05	0,06	0,72	0,54	0,29		DP	0,03	0,11	0,06	0,18	0,20	0,25	
CV	4,59	9,38	4,39	9,18	8,15	4,50		CV	3,30	10,28	4,66	10,02	6,64	6,43	

2,3 diclorofenol						2,6 diclorofenol					
Conc. (µg/L)	50	100	200	300		Conc. (µg/L)	50	100	200	300	
Q	-	0,38	0,66	0,7		Q	0,6	0,64	0,6	0,51	
Média FR	0,18	0,23	0,37	0,44		Média FR	0,24	0,36	0,66	0,86	
DP	0,00	0,02	0,01	0,02		DP	0,01	0,03	0,04	0,05	
CV	1,76	7,39	3,95	3,79		CV	5,96	8,95	6,51	5,61	

TABELAS C1.1. a C1.6. Cálculo da média, desvio padrão, coeficiente de variação e Q dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários derivatizadas com diazometano e utilizadas para a elaboração da curva de calibração. Os valores em **negrito** foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q

C1.1.PCP

Conc. 5ug/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	377650	117510	3,21	0,32
2	380987	121383	3,14	
3	430995	131204	3,28	
4	400703	118842	3,37	
média	397583,8	122234,8	3,25	
DP	24487,1	6191,6	0,10	
CV	6,16	5,07	3,06	

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	382712	124402	3,08	0,55
2	371378	142243	2,61	
3	411941	137214	3,00	
4	414694	144647	2,87	
média	395181,3	137126,5	2,89	
DP	21476,4	9030,6	0,20	
CV	5,43	6,59	7,09	

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	514313	105766	4,86	0,55
2	584883	121171	4,83	
3	640403	133576	4,79	
4	642320	129875	4,95	
média	595479,8	122597,0	4,86	
DP	60311,5	12366,9	0,07	
CV	10,13	10,09	1,34	

Conc. 100ug/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	1021342	128767	7,93	0,47
2	1145030	163788	6,99	
3	1195846	132771	9,01	
4	1188555	145442	8,17	
média	1137693,25	142692,0	8,03	
DP	80746,7	15757,9	0,83	
CV	7,10	11,04	10,33	

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	1965558	135431	14,51	0,71
2	1964261	131169	14,98	
3	1965598	138226	14,22	
4	1955131	116154	16,83	
média	1962637,0	130245,0	15,14	
DP	5042,4	9831,9	1,17	
CV	0,26	7,55	7,75	

Conc. 300ug/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	3142260	151400	20,75	0,81
2	2625491	144728	18,14	
3	2734256	155934	17,53	
4	2255730	125974	17,91	
média	2689434,3	144509,0	18,58	
DP	364805,1	13186,0	1,47	
CV	13,56	9,12	7,90	

C1.2. 2,6 diclorofenol**Conc. 50ug/L**

Réplicas	ÁREA 2,6Diclor.	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	27811	105766	0,26	0,60
2	29291	121171	0,24	
3	30422	133576	0,23	
4	31413	129875	0,24	
média	29734,3	122597,0	0,24	
DP	1547,7	12366,9	0,01	
CV	5,21	10,09	5,96	

Conc. 100ug/L

Réplicas	ÁREA 2,6Diclor.	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	48990	128767	0,38	0,64
2	51357	163788	0,31	
3	50831	132771	0,38	
4	52075	145442	0,36	
média	50813,25	142692,0	0,36	
DP	1318,1	15757,9	0,03	
CV	2,59	11,04	8,95	

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,6Diclor.	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	89085	135431	0,66	0,60
2	87164	131169	0,66	
3	85093	138226	0,62	
4	83739	116154	0,72	
média	86270,3	130245,0	0,66	
DP	2346,3	9831,9	0,04	
CV	2,72	7,55	6,51	

Conc. 300ug/L

Réplicas	ÁREA 2,6Diclor.	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	130460	151400	0,86	0,51
2	125901	144728	0,87	
3	125000	155934	0,80	
4	115870	125974	0,92	
média	124307,8	144509,0	0,86	
DP	6111,8	13186,0	0,05	
CV	4,92	9,12	5,61	

C1.3. 2,3 diclorofenol**Conc. 50ug/L**

Réplicas	ÁREA 2,3Diclor.	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	nd	105766	-	
2	22079	121171	0,18	
3	25138	133576	0,19	
4	23773	129875	0,18	
média	23663,3	122597,0	0,18	
DP	1532,4	12366,9	0,00	
CV	6,48	10,09	1,76	

Conc. 100ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3Diclor.	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	29475	128767	0,23	0,38
2	34416	163788	0,21	
3	33379	132771	0,25	
4	34297	145442	0,24	
média	32891,75	142692,0	0,23	
DP	2324,5	15757,9	0,02	
CV	7,07	11,04	7,39	

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3Diclor.	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	49207	135431	0,36	0,66
2	48137	131169	0,37	
3	49124	138226	0,36	
4	45224	116154	0,39	
média	47923,0	130245,0	0,37	
DP	1863,8	9831,9	0,01	
CV	3,89	7,55	3,95	

Conc. 300ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3Diclor.	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	67543	151400	0,45	0,70
2	64932	144728	0,45	
3	65309	155934	0,42	
4	57675	125974	0,46	
média	63864,8	144509,0	0,44	
DP	4284,4	13186,0	0,02	
CV	6,71	9,12	3,79	

C1.4. 2,4,6 triclorofenol

Conc. 5ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	31721	117510	0,27	0,41
2	38450	121383	0,32	
3	45337	131204	0,35	
4	35764	118842	0,30	
média	37818,0	122234,8	0,31	
DP	5725,0	6191,6	0,03	
CV	15,14	5,07	10,23	

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	58314	124402	0,47	0,23
2	58990	142243	0,41	
3	68925	137214	0,50	
4	62880	144647	0,43	
média	62277,3	137126,5	0,46	
DP	4867,2	9030,6	0,04	
CV	7,82	6,59	8,47	

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	205255	105766	1,94	0,56
2	228450	121171	1,89	
3	235303	133576	1,76	
4	241823	129875	1,86	
média	227707,8	122597,0	1,86	
DP	15933,2	12366,9	0,07	
CV	7,00	10,09	4,02	

Conc. 100ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	419017	128767	3,25	0,61
2	464866	163788	2,84	
3	461643	132771	3,48	
4	469667	145442	3,23	
média	453798,3	142692,0	3,20	
DP	23420,7	15757,9	0,27	
CV	5,16	11,04	8,30	

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	878497	135431	6,49	0,73
2	841139	131169	6,41	
3	845826	138226	6,12	
4	866194	116154	7,46	
média	857914,0	130245,0	6,62	
DP	17509,4	9831,9	0,58	
CV	2,04	7,55	8,78	

Conc. 300ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	1442963	151400	9,53	0,63
2	1351778	144728	9,34	
3	1353703	155934	8,68	
4	1225118	125974	9,73	
média	1343391	144509,0	9,32	
DP	89591,2	13186,0	0,45	
CV	6,67	9,12	4,87	

C1.5. 2,3,6 triclorofenol**Conc. 5ug/L**

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	65702	117510	0,56	0,35
2	72145	121383	0,59	
3	70950	131204	0,54	
4	70420	118842	0,59	
média	69804,3	122234,8	0,57	
DP	2828,4	6191,6	0,03	
CV	4,05	5,07	4,59	

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	78216	124402	0,63	0,35
2	74926	142243	0,53	
3	80866	137214	0,59	
4	74752	144647	0,52	
média	77190,0	137126,5	0,57	
DP	2923,2	9030,6	0,05	
CV	3,79	6,59	9,38	

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	162711	105766	1,54	0,64
2	174587	121171	1,44	
3	185225	133576	1,39	
4	186311	129875	1,43	
média	177208,5	122597,0	1,45	
DP	11017,7	12366,9	0,06	
CV	6,22	10,09	4,39	

Conc. 100ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	1032783	128767	8,02	0,61
2	1124050	163788	6,86	
3	1140580	132771	8,59	
4	1150536	145442	7,91	
média	1111987	142692,0	7,85	
DP	53920,9	15757,9	0,72	
CV	4,85	11,04	9,18	

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	880684	135431	6,50	0,69
2	852471	131169	6,50	
3	844742	138226	6,11	
4	858017	116154	7,39	
média	858978,5	130245,0	6,63	
DP	15460,5	9831,9	0,54	
CV	1,80	7,55	8,15	

Conc. 300ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	1012493	151400	6,69	0,62
2	943649	144728	6,52	
3	952555	155934	6,11	
4	852499	125974	6,77	
média	940299	144509,0	6,52	
DP	66036,0	13186,0	0,29	
CV	7,02	9,12	4,50	

C1.6. 2,3,4 triclorofenol

Conc. 5ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	91564	117510	0,78	0,30
2	98693	121383	0,81	
3	107143	131204	0,82	
4	90664	118842	0,76	
média	97016,0	122234,8	0,79	
DP	7647,2	6191,6	0,03	
CV	7,88	5,07	3,30	

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	144595	124402	1,16	0,17
2	137126	142243	0,96	
3	143437	137214	1,05	
4	133605	144647	0,92	
média	139690,8	137126,5	1,02	
DP	5218,6	9030,6	0,11	
CV	3,74	6,59	10,28	

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	134029	105766	1,27	0,58
2	144442	121171	1,19	
3	151972	133576	1,14	
4	151538	129875	1,17	
média	145495,3	122597,0	1,19	
DP	8387,4	12366,9	0,06	
CV	5,76	10,09	4,66	

Conc. 100ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	241582	128767	1,88	0,72
2	249506	163788	1,52	
3	255006	132771	1,92	
4	263370	145442	1,81	
média	252366,0	142692,0	1,78	
DP	9174,8	15757,9	0,18	
CV	3,64	11,04	10,02	

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	412400	135431	3,05	0,45
2	386453	131169	2,95	
3	377522	138226	2,73	
4	372216	116154	3,20	
média	387147,8	130245,0	2,98	
DP	17830,4	9831,9	0,20	
CV	4,61	7,55	6,64	

Conc. 300ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	623650	151400	4,12	0,45
2	554056	144728	3,83	
3	559528	155934	3,59	
4	516320	125974	4,10	
média	563389	144509,0	3,91	
DP	44530,5	13186,0	0,25	
CV	7,90	9,12	6,43	

Legenda: IS: internal standard (padrão interno); FR: fator de resposta; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

TABELAS C2.1. à C2.6. Cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta dos extratos derivatizados do sedimento dopado com clorofenóis nas concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g/L}$.

OBS: os valores em negrito dos fatores de resposta foram desconsiderados no cálculo da média por apresentarem valores muito diferentes dos demais. Não foi calculado o Q, pois é necessário o mínimo de 4 réplicas

C2.1. Pentaclorofenol

Conc. 10 $\mu\text{g/L}$

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	30339	105597	0,29
3	41008	122536	0,33
2	25685	78434	0,33
média	32344,0	102189,0	0,32
DP	7855,8	22247,6	0,03
CV	24,29	21,77	8,06

Conc. 50 $\mu\text{g/L}$

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	189596	122760	1,54
2	151435	120488	1,26
3	126949	107854	1,18
média	170515,5	121624,0	1,22
DP	26983,9	1606,5	0,06
CV	15,82	1,32	4,64

Conc. 200 $\mu\text{g/L}$

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	438695	105111	4,17
2	482713	111835	4,32
3	505819	120838	4,19
média	475742,3	112594,7	4,23
DP	34100,6	7891,0	0,08
CV	7,17	7,01	1,87

C2.2. 2,3 diclorofenol

Conc. 200 $\mu\text{g/L}$

Réplicas	ÁREA 2,3 Dicl	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	43909	105111	0,42
2	47792	111835	0,43
3	45542	120838	0,38
média	45747,7	112594,7	0,41
DP	1949,7	7891,0	0,03
CV	4,26	7,01	6,58

Conc. 50 $\mu\text{g/L}$

Réplicas	ÁREA 2,6 Dicl	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	23948	122760	0,20
2	22542	120488	0,19
3	21212	107854	0,20
média	23245,0	121624,0	0,19
DP	994,2	1606,5	0,01
CV	4,28	1,32	2,66

Conc. 200 $\mu\text{g/L}$

Réplicas	ÁREA 2,6 Dicl	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	48441	105111	0,46
2	57831	111835	0,52
3	170002	120838	1,41
média	53136,0	108473,0	0,49
DP	6639,7	4754,6	0,04
CV	12,50	4,38	8,13

C2.3. 2,6 diclorofenol

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	25256	105597	0,24
3	29866	122536	0,24
2	329882	78434	4,21
média	27561,0	102189,0	0,24
DP	3259,8	11977,7	0,00
CV	11,83	11,72	1,34

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	78884	122760	0,64
2	74519	120488	0,62
3	66502	107854	0,62
média	73301,7	117034,0	0,63
DP	6280,1	8030,9	0,01
CV	8,57	6,86	2,32

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,4 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	3651197	105111	34,74
2	185189	111835	1,66
3	183749	120838	1,52
média	184469,0	112594,7	1,59
DP	1018,2	6366,1	0,10
CV	0,55	5,65	6,02

C2.4. 2,3,4 triclorfenol

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	79850	105597	0,76
3	38602	122536	0,32
2	26482	78434	0,34
média	59226,0	114066,5	0,33
DP	29166,7	11977,7	0,02
CV	49,25	10,50	4,90

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	189011	122760	1,54
3	142568	107854	1,32
2	1090586	120488	9,05
média	165789,5	115307,0	1,43
DP	32840,2	10540,1	0,15
CV	19,81	9,14	10,76

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,3,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	436796	105111	4,16
2	547606	111835	4,90
3	519073	120838	4,30
média	501158,3	112594,7	4,45
DP	57536,2	7891,0	0,39
CV	11,48	7,01	8,85

C2.6. 2,4,6 triclorofenol

Conc. 10ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	31598	105597	0,30
3	36639	122536	0,30
2	27631	78434	0,35
média	34118,5	114066,5	0,30
DP	3564,5	11977,7	0,00
CV	10,45	10,50	0,05

Conc. 50ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	166451	122760	1,36
3	122465	107854	1,14
2	141441	120488	1,17
média	143452,3	117034,0	1,15
DP	22061,9	8030,9	0,03
CV	15,38	6,86	2,35

Conc. 200ug/L

Réplicas	ÁREA 2,4,6 Tri	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	373347	105111	3,55
2	471916	111835	4,22
3	459637	120838	3,80
média	434966,7	112594,7	3,86
DP	53716,2	7891,0	0,34
CV	12,35	7,01	8,74

Legenda: IS: internal standard (padrão interno); FR: fator de resposta; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

Tabela C3.1. Eficiência de extração de PCP e congêneres nas amostras de sedimento do Largo do Caneus para os tempos de extração de 3,5, 10 e 20 minutos.

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,03	4,3	0,70
2,3 Diclorofenol	0,4	3,1	11,55
2,6 Diclorofenol	1,0	4,2	23,16
2,4,6 Triclorofenol	0,4	2,5	17,07
2,3,6 Triclorofenol	0,4	2,6	17,28
2,3,4 Triclorofenol	0,8	4,2	19,09

a) 3 minutos de extração

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,04	4,1	0,98
2,3 Diclorofenol	0,4	2,7	13,31
2,6 Diclorofenol	1,0	3,7	27,13
2,4,6 Triclorofenol	0,5	2,0	22,62
2,3,6 Triclorofenol	0,5	2,0	23,24
2,3,4 Triclorofenol	0,8	3,8	21,32

b) 5 minutos de extração

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,04	4,6	0,87
2,3 Diclorofenol	0,5	3,4	14,85
2,6 Diclorofenol	1,2	3,5	32,95
2,4,6 Triclorofenol	0,5	3,4	15,52
2,3,6 Triclorofenol	0,6	3,0	18,48
2,3,4 Triclorofenol	1,00	4,3	23,26

c) 10 minutos de extração

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,04	4,5	0,89
2,3 Diclorofenol	0,5	3,0	15,93
2,6 Diclorofenol	1,3	3,1	41,57
2,4,6 Triclorofenol	0,6	3,0	18,52
2,3,6 Triclorofenol	0,6	2,5	22,61
2,3,4 Triclorofenol	0,80	4,2	19,05

d) 20 minutos de extração

Legenda: Conc Sed – concentrações de clorofenóis extraídas do sedimento; Conc. T-H₂O: concentração de dopagem (5mg/l) – a quantidade extraída da água (ver Tabela C.3.2)

Tabela C.3.2. Quantidade (mg/l) de clorofenóis remanescentes na água das amostras dopadas de sedimento do Largo do Caneus, após 12 horas de adsorção.

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	3 mg/l	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l
Pentaclorofenol	0,74	0,9	0,40	0,5
2,3 Diclorofenol	1,89	2,3	1,6	2,0
2,6 Diclorofenol	0,81	1,3	1,5	1,9
2,4,6 Triclorofenol	2,47	3,0	1,6	2,0
2,3,6 Triclorofenol	2,38	3,0	2,0	2,5
2,3,4 Triclorofenol	0,81	1,2	0,7	0,8

Tabela C.3.3. Eficiência de extração de PCP e congêneres nas amostras de sedimento da Cosipa para os tempos de extração de 3, 5, 10 e 20 minutos.

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,1	4,1	2,44
2,3 Diclorofenol	0,3	2,9	11,51
2,6 Diclorofenol	1,5	3,5	42,39
2,4,6 Triclorofenol	0,6	2,2	25,10
2,3,6 Triclorofenol	0,5	2,2	24,63
2,3,4 Triclorofenol	0,9	3,5	25,71

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,1	4,0	2,50
2,3 Diclorofenol	0,4	2,7	13,76
2,6 Diclorofenol	1,4	3,4	42,43
2,4,6 Triclorofenol	0,6	1,9	29,21
2,3,6 Triclorofenol	0,6	1,9	29,28
2,3,4 Triclorofenol	0,9	3,3	27,27

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,10	4,4	2,27
2,3 Diclorofenol	0,6	2,9	19,72
2,6 Diclorofenol	1,2	2,2	54,55
2,4,6 Triclorofenol	0,7	2,9	24,73
2,3,6 Triclorofenol	0,7	2,5	27,71
2,3,4 Triclorofenol	0,90	3,6	25,00

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	Conc. Sed (mg/l)	Conc. T - H ₂ O (mg/l)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,10	4,3	2,33
2,3 Diclorofenol	0,6	2,4	23,25
2,6 Diclorofenol	1,3	2,3	56,52
2,4,6 Triclorofenol	0,7	2,5	29,09
2,3,6 Triclorofenol	0,7	2,1	33,48
2,3,4 Triclorofenol	1,00	3,4	29,41

Legenda: Conc Sed – concentrações de clorofenóis extraídas do sedimento; Conc. T-H₂O: concentração de dopagem (5mg/l) – a quantidade extraída da água (ver Tabela C.3.4)

Tabela C.34. Quantidade (mg/l) de clorofenóis remanescentes na água das amostras dopadas de sedimento do Largo do Caneus, após 12 horas de adsorção.

ANALITOS Conc.dopagem - 5mg/l	3 mg/l	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l
Pentaclorofenol	0,9	1,0	0,6	0,7
2,3 Diclorofenol	2,1	2,3	2,1	2,6
2,6 Diclorofenol	1,5	1,6	2,8	2,7
2,4,6 Triclorofenol	2,8	3,1	2,1	2,5
2,3,6 Triclorofenol	2,8	3,1	2,5	2,9
2,3,4 Triclorofenol	1,5	1,7	1,4	1,6

ANEXO D

Tabela 1D. Condições cromatográficas utilizadas para cada coluna testada.

Testes	Coluna	polaridade	Comprimento (m)	Espessura de filme (μm)	Diâmetro interno (mm)	Fase estacionária	Condições cromatográficas		
							T ⁰ C injetor	T ⁰ C detector	T ⁰ C coluna
1.1	HP1	apolar	5	2,65	0,53	Crosslinked Methylsiloxane	280	300	150 ⁰ C(0') $\xrightarrow{10^0\text{C/min}}$ 280 ⁰ C (20') $\xrightarrow{\quad}$
1.2	HP1	apolar	5	2,65	0,53	Crosslinked Methylsiloxane	280	300	70 ⁰ C(0') $\xrightarrow{10^0\text{C/min}}$ 280 ⁰ C (20') $\xrightarrow{\quad}$
1.3	HP1	apolar	5	2,65	0,53	Crosslinked Methylsiloxane	280	300	70 ⁰ C(3') $\xrightarrow{5^0\text{C/min}}$ 280 ⁰ C (5') $\xrightarrow{\quad}$
1.4	HP1	apolar	5	2,65	0,53	Crosslinked Methylsiloxane	280	300	50 ⁰ C (5') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 150 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 280 ⁰ C (3')
1.5	HP1	apolar	5	2,65	0,53	Crosslinked Methylsiloxane	280	300	45 ⁰ C (5') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 150 ⁰ C(0') $\xrightarrow{10^0\text{C/min}}$ 200 ⁰ C (0') 20 ⁰ C/min 280 ⁰ C (3') $\xrightarrow{\quad}$
2.1	HP1	apolar	5	2,65	0,53	Crosslinked Methylsiloxane	250	280	60 ⁰ C (3') $\xrightarrow{5^0\text{C/min}}$ 150 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (3')
2.2	HP17	Polaridade intermediária	10	2	0,53	Crosslinked 50% Methylsiloxane	250	280	50 ⁰ C (3') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 150 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (10')
2.3	HP17	Polaridade intermediária	10	2	0,53	Crosslinked 50% Methylsiloxane	230	280	45 ⁰ C (7') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 130 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (10')
2.4	HP17	Polaridade intermediária	10	2	0,53	Crosslinked 50% Methylsiloxane	200	280	110 ⁰ C (20') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 250 ⁰ C(15')
2.5	HP17	Polaridade intermediária	10	2	0,53	Crosslinked 50% Methylsiloxane	200	280	40 ⁰ C (5') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 130 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (10')
2.6	HP17	Polaridade intermediária	10	2	0,53	Crosslinked 50% Methylsiloxane	180	280	40 ⁰ C (5') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 130 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (10')
2.7	HP17	Polaridade intermediária	10	2	0,53	Crosslinked 50% Methylsiloxane	200	280	60 ⁰ C (2') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 130 ⁰ C(0') $\xrightarrow{20^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (10')

ANEXO D

... continuação da **Tabela 1D**. Condições cromatográficas utilizadas para cada coluna testada.

3.1	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	60 ⁰ C (1') $\xrightarrow{5^0\text{C/min}}$ 110 ⁰ C(0') $\xrightarrow{0,5^0\text{C/min}}$ 120 ⁰ C (1') 70 ⁰ C/min 280 ⁰ C (5')
3.2	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	60 ⁰ C (1') $\xrightarrow{10^0\text{C/min}}$ 112 ⁰ C(5') $\xrightarrow{70^0\text{C/min}}$ 230 ⁰ C (2')
3.3	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	60 ⁰ C (1') $\xrightarrow{7^0\text{C/min}}$ 128 ⁰ C(2') $\xrightarrow{0,5^0\text{C/min}}$ 140 ⁰ C (2') 70 ⁰ C/min 280 ⁰ C (5')
3.4	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	60 ⁰ C (1') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 105 ⁰ C(0') $\xrightarrow{1^0\text{C/min}}$ 125 ⁰ C 30 ⁰ C/min 150 ⁰ C (5')
3.5	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	45 ⁰ C (1') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 150 ⁰ C(10') $\xrightarrow{30^0\text{C/min}}$ 280 ⁰ C (5')
3.6	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	45 ⁰ C (1') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 110 ⁰ C(0') $\xrightarrow{1^0\text{C/min}}$ 120 ⁰ C (2') 30 ⁰ C/min 280 ⁰ C (5')
3.7	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	45 ⁰ C (1') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 150 ⁰ C(10') $\xrightarrow{30^0\text{C/min}}$ 280 ⁰ C (5')
3.8.	HP 608	Polaridade intermediária	30	0,5	0,53		280	320	45 ⁰ C (3') $\xrightarrow{3^0\text{C/min}}$ 135 ⁰ C(5') $\xrightarrow{25^0\text{C/min}}$ 260 ⁰ C (5')

OBS: a coluna HP 608, segundo o catálogo da HP é específica para análise de compostos halogenados.

Figura D2. Cromatograma obtido durante a avaliação das colunas cromatográficas HP1. Condições cromatográficas: temperaturas dos injetores de detector, 280°C e 300°C, respectivamente; temperatura do forno (70°C) por 3 min; rampa da coluna: 280°C por 5 min a 5°C/min

Figura D3. Cromatograma obtido durante a avaliação das coluna cromatográfica HP17

Figura D4. Cromatograma obtido durante a avaliação das colunas cromatográficas HP608. Condições cromatográficas: temperaturas dos injetores de detector, 280°C e 320°C, respectivamente; temperatura do forno (60°C) por 1 min, rampa da coluna:

$10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$
 (60°C) por 1 min → (111°C) → (128°C) → (129°C) por 2min

ANEXO E – TESTE 1

Tabelas E.1. a E.9. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.

Os valores em **negrito** foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em **vermelho** foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas). Os valores marcados com * foram desconsiderados para o cálculo da média, pois apesar de Q estar dentro do limite aceitável, estes valores resultavam em CV acima de 16%.

Obs: IS: “internal standard” (padrão interno); FR: fator de resposta

E.1. PCP 10 mg/L

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	20329	92086	0,22
2	19636	100112	0,20
3	15577	71280	0,22
4		62663	-
média	18514,0	81535,3	0,21
DP	2567,0	17490,4	0,01
CV	13,87	21,45	6,43

E.2. 50 mg/L 2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	22478	85216	0,26	0,71
2	21453	102287	0,21	
3	18370	91966	0,20	
4	12785	68007	0,19	
média	1877.2	8686.9	0,22	
DP	435.6	1440.1	0,03	
CV	23,21	16,58	15,56	

E.2. 50 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	49667	85216	0,58	0,49
2	70154	102287	0,69	
3	47149	91966	0,51	
4	23555	68007	0,35*	
média	4763.1	8686.9	0,59	
DP	1907.3	1440.1	0,09	
CV	40,04	16,58	14,67	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	12035	85216	0,14	0,93
2	13586	102287	0,13	
3	27387	91966	0,30	
4	9874	68007	0,15	
média	1572.1	8686.9	0,14	
DP	792.5	1440.1	0,01	
CV	50,41	16,58	4,52	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	20344	85216	0,24	0,96
2	26053	102287	0,25	
3	57412	91966	0,62	
4	16200	68007	0,24	
média	3000.2	8686.9	0,24	
DP	1871.4	1440.1	0,01	
CV	62,38	16,58	3,84	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	19155	85216	0,22	0,16
2	20375	102287	0,20	
3	30948	91966	0,34	
4	24701	68007	0,36*	
média	2379.5	8686.9	0,21	
DP	533.0	1440.1	0,02	
CV	22,40	16,58	8,53	

E.3. 100 mg/L de clorofenóis
pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	91619	88467	1,04	0,49
2	88085	87593	1,01	
3	130612	94851	1,38*	
4	72242	89880	0,80	
5	49540	72124	0,69*	
média	86419,6	86583,0	0,95	
DP	29765,3	8556,6	0,13	
CV	34,44	9,88	13,30	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	21027	88467	0,24	0,39
2	17403	87593	0,20	
3	19527	94851	0,21	
4	24369	89880	0,27	
5	17536	72124	0,24	
média	19972,4	86583,0	0,23	
DP	2880,0	8556,6	0,03	
CV	14,42	9,88	12,75	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	20121	88467	0,23	0,56
2	16964	87593	0,19	
3	17710	94851	0,19	
4	16441	89880	0,18	
5	14618	72124	0,20	
média	17170,8	86583,0	0,20	
DP	2005,4	8556,6	0,02	
CV	11,68	9,88	8,93	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	43320	88467	0,49	0,11
2	35158	87593	0,40	
3	38423	94851	0,41	
4	44981	89880	0,50	
5	29561	72124	0,41	
média	38288,6	86583,0	0,44	
DP	6246,9	8556,6	0,05	
CV	16,32	9,88	11,18	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	37351	88467	0,42	0,24
2	32629	87593	0,37	
3	33133	94851	0,35	
4	51847	89880	0,58	
5	46853	72124	0,65*	
média	40362,6	86583,0	0,38	
DP	8590,1	8556,6	0,04	
CV	21,28	9,88	9,76	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	40675	88467	0,46	0,34
2	37001	87593	0,42	
3	35422	94851	0,37	
4	31393	89880	0,35	
5	25325	72124	0,35	
média	33963,2	86583,0	0,39	
DP	5865,8	8556,6	0,05	
CV	17,27	9,88	12,36	

E.4. 250 mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	195656	82126	2,38	0,35
2	209404	97163	2,16	
3	187290	88183	2,12	
4	139653	74327	1,88	
5	123163	70831	1,74	
média	171033,2	82526,0	2,06	
DP	37480,5	10611,3	0,25	
CV	21,91	12,86	12,23	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	40115	82126	0,49	0,13
2	39899	97163	0,41	
3	35196	88183	0,40	
4	36365	74327	0,49	
5	35615	70831	0,50	
média	37438,0	82526,0	0,46	
DP	2383,5	10611,3	0,05	
CV	6,37	12,86	10,71	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA (2,3/IS)	FR (2,3/IS)	Q
1	40162	82126	0,49	0,14
2	40557	97163	0,42	
3	34745	88183	0,39	
4	31905	74327	0,43	
5	33703	70831	0,48	
média	36214,4	82526,0	0,44	
DP	3920,4	10611,3	0,04	
CV	10,83	12,86	9,08	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	95203	82126	1,16	0,58
2	98535	97163	1,01	
3	80072	88183	0,91	
4	68764	74327	0,93	
5	65078	70831	0,92	
média	81530,4	82526,0	0,99	
DP	15098,7	10611,3	0,11	
CV	18,52	12,86	10,78	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	84445	82126	1,03	0,10
2	83465	97163	0,86	
3	64817	88183	0,74*	
4	100981	74327	1,36*	
5	101329	70831	1,43*	
média	87007,4	82526,0	0,94	
DP	15098,8	10611,3	0,12	
CV	17,35	12,86	12,68	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	90463	82126	1,10	0,51
2	95693	97163	0,98	
3	78166	88183	0,89	
4	64954	74327	0,87	
5	61351	70831	0,87	
média	78125,4	82526,0	0,94	
DP	15130,3	10611,3	0,10	
CV	19,37	12,86	10,71	

E.5. 500 mg/Lde clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	406948	106140	3,83	0,42
2	389753	95226	4,09	
3	358780	78183	4,59	
4	331618	89505	3,71	
5	262825	77290	3,40	
média	34998.5	8926.9	3,92	
DP	5665.2	1211.0	0,45	
CV	16,19	13,57	11,40	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	76756	1E+05	0,72	0,25
2	61369	78183	0,78	
3	66984	95226	0,70	
4	79758	89505	0,89	
5	65264	77290	0,84	
média	7002.6	8926.9	0,79	
DP	785.6	1211.0	0,08	
CV	11,22	13,57	10,05	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	198648	106140	1,87	0,62
2	161809	78183	2,07	
3	170458	95226	1,79	
4	168633	89505	1,88	
5	136807	77290	1,77	
média	16727.1	8926.9	1,88	
DP	2210.4	1211.0	0,12	
CV	13,21	13,57	6,31	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	187962	1E+05	1,77	0,18
2	152923	78183	1,96	
3	137512	95226	1,44*	
4	216364	89505	2,42*	
5	203857	77290	2,64*	
média	17972.4	8926.9	1,86	
DP	3351.5	1211.0	0,13	
CV	18,65	13,57	7,02	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	78356	106140	0,74	0,55
2	62239	78183	0,80	
3	68909	95226	0,72	
4	63942	89505	0,71	
5	69208	77290	0,90	
média	6853.1	8926.9	0,77	
DP	628.1	1211.0	0,08	
CV	9,16	13,57	9,72	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	192204	106140	1,81	0,53
3	175287	95226	1,84	
2	160465	78183	2,05	
4	154833	89505	1,73	
5	127748	77290	1,65	
média	16210.7	8926.9	1,82	
DP	2406.1	1211.0	0,15	
CV	14,84	13,57	8,28	

E.6. 750 mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	320132	58316	5,49	0,32
2	348319	74970	4,65	
3	299872	71947	4,17	
4	470367	92775	5,07	
5	318687	63446	5,02	
média	351475	72290,8	4,88	
DP	68676,0	13232,8	0,50	
CV	19,54	18,30	10,20	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	86434	58316	1,48	0,58
2	93203	74970	1,24	
3	82885	71947	1,15	
4	104144	92775	1,12	
5	80626	63446	1,27	
média	89458	72290,8	1,25	
DP	9487,6	13232,8	0,14	
CV	10,61	18,30	11,29	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	85637	58316	1,47	0,19
2	109975	74970	1,47	
3	80920	71947	1,12	
4	96614	92775	1,04	
5	91937	63446	1,45	
média	93017	72290,8	1,31	
DP	11208,0	13232,8	0,21	
CV	12,05	18,30	15,99	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	179241	58316	3,07	0,42
2	204536	74970	2,73	
3	194147	71947	2,70	
4	223244	92775	2,41	
5	170629	63446	2,69	
média	194359	72290,8	2,72	
DP	20794,4	13232,8	0,24	
CV	10,70	18,30	8,72	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	259147	58316	4,44	0,37
2	299854	74970	4,00	
3	271560	71947	3,77	
4	312443	92775	3,37	
5	268733	63446	4,24	
média	282347	72290,8	3,96	
DP	22650,6	13232,8	0,42	
CV	8,02	18,30	10,53	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	166273	58316	2,85	0,38
2	187096	74970	2,50	
3	161804	71947	2,25	
4	221788	92775	2,39	
5	166192	63446	2,62	
média	180631	72290,8	2,52	
DP	25023,9	13232,8	0,23	
CV	13,85	18,30	9,10	

E.7. 1mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	435085	63378	6,86	0,26
2	450022	74129	6,07	
3	386250	69399	5,57	
4	550528	84319	6,53	
5	501959	85163	5,89	
média	464769	75277,6	6,18	
DP	63248,6	9446,5	0,52	
CV	13,61	12,55	8,33	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	109753	63378	1,73	0,47
2	112318	74129	1,52	
3	101208	69399	1,46	
4	116537	84319	1,38	
5	108571	85163	1,27	
média	109677	75277,6	1,47	
DP	5634,4	9446,5	0,17	
CV	5,14	12,55	11,59	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	119304	63378	1,88	0,84
2	107040	74129	1,44	
3	99749	69399	1,44	
4	124021	84319	1,47	
5	118403	85163	1,39	
média	113703	75277,6	1,44	
DP	9987,9	9446,5	0,03	
CV	8,78	12,55	2,33	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	246474	63378	3,89	0,39
2	256350	74129	3,46	
3	233238	69399	3,36	
4	261963	84319	3,11	
5	236107	85163	2,77	
média	246826	75277,6	3,32	
DP	12444,8	9446,5	0,42	
CV	5,04	12,55	12,52	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	348035	63378	5,49	0,44
2	360004	74129	4,86	
3	329838	69399	4,75	
4	371961	84319	4,41	
5	345578	85163	4,06	
média	351083	75277,6	4,71	
DP	15862,1	9446,5	0,54	
CV	4,52	12,55	11,37	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	230409	63378	3,64	0,55
2	235651	74129	3,18	
3	203319	69399	2,93	
4	265057	84319	3,14	
5	238457	85163	2,80	
média	234579	75277,6	3,14	
DP	22020,9	9446,5	0,32	
CV	9,39	12,55	10,16	

E.8. 1,5mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	622123	70066	8,88	0,46
2	560094	74847	7,48	
3	624280	79463	7,86	
4	786003	77987	10,08	
5	712071	80596	8,84	
média	660914,20	76591,8	8,63	
DP	88424,8	4238,3	1,01	
CV	13,38	5,53	11,76	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	160431	70066	2,29	0,81
2	143171	74847	1,91	
3	154273	79463	1,94	
4	154907	77987	1,99	
5	156342	80596	1,94	
média	153825	76591,8	1,95	
DP	6419,8	4238,3	0,03	
CV	4,17	5,53	1,57	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	181814	70066	2,59	0,56
2	164319	74847	2,20	
3	149002	79463	1,88	
4	170783	77987	2,19	
5	171776	80596	2,13	
média	167538,8	76591,8	2,20	
DP	12106,2	4238,3	0,26	
CV	7,23	5,53	11,74	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	361234	70066	5,16	0,63
2	322107	74847	4,30	
3	359324	79463	4,52	
4	359986	77987	4,62	
5	348949	80596	4,33	
média	350320,0	76591,8	4,59	
DP	16518,7	4238,3	0,34	
CV	4,72	5,53	7,52	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	543774	70066	7,76	0,79
2	488946	74847	6,53	
3	539502	79463	6,79	
4	517616	77987	6,64	
5	526427	80596	6,53	
média	523253,0	76591,8	6,62	
DP	21817,2	4238,3	0,12	
CV	4,17	5,53	1,84	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	346998	70066	4,95	0,24
2	305282	74847	4,08	
3	336491	79463	4,23	
4	370157	77987	4,75	
5	364732	80596	4,53	
média	344732,0	76591,8	4,51	
DP	25864,0	4238,3	0,36	
CV	7,50	5,53	7,95	

E.9. 2mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	758723	65635	11,56	0,47
2	703012	71194	9,87	
3	754918	78610	9,60	
4	894764	85695	10,44	
5	980797	92212	10,64	
média	818443	78669,2	10,42	
DP	115228,0	10706,8	0,76	
CV	14,08	13,61	7,29	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	186933	65635	2,85	0,58
2	173862	71194	2,44	
3	188897	78610	2,40	
4	194583	85695	2,27	
5	198084	92212	2,15	
média	188472	78669,2	2,42	
DP	9297,0	10706,8	0,26	
CV	4,93	13,61	10,93	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	209055	65635	3,19	0,84
2	201569	71194	2,83	
3	617243	78610	7,85	
4	212913	85695	2,48	
5	212200	92212	2,30	
média	290596,0	78669,2	2,70	
DP	182656,5	10706,8	0,39	
CV	62,86	13,61	14,47	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	427608	65635	6,51	0,62
2	399664	71194	5,61	
3	441641	78610	5,62	
4	461222	85695	5,38	
5	467349	92212	5,07	
média	439496,8	78669,2	5,64	
DP	27296,2	10706,8	0,54	
CV	6,21	13,61	9,55	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	625684	65635	9,53	0,47
2	602106	71194	8,46	
3	670317	78610	8,53	
4	702536	85695	8,20	
5	682002	92212	7,40	
média	656529,0	78669,2	8,42	
DP	41439,4	10706,8	0,77	
CV	6,31	13,61	9,10	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	409588	65635	6,24	0,81
2	384394	71194	5,40	
3	414833	78610	5,28	
4	459803	85695	5,37	
5	480206	92212	5,21	
média	429764,8	78669,2	5,31	
DP	39163,7	10706,8	0,09	
CV	9,11	13,61	1,63

Figura E.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis – baixas concentrações

Figura E.2. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis – altas concentrações

Tabela E.10. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das Figuras E.1 e E.2

Pentaclorofenol			2,6 diclorofenol		
CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)	CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,21	0,00	0,01	-	-
0,05	0,59	0,05	0,05	0,14	0,04
0,1	0,95	0,10	0,1	0,23	0,10
0,25	2,06	0,25	0,25	0,46	0,26
0,5	3,92	0,50	0,5	0,79	0,49
0,75	4,88	0,72	0,75	1,25	0,76
1	6,18	1,01	1	1,47	0,99
1,5	8,63	1,56	1,5	1,95	1,50
2	10,42	1,96	2	2,42	2,00

2,3 diclorofenol			2,4,6 triclorofenol		
CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)	CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	-	-	0,01	-	-
0,05	-	-	0,05	0,24	0,05
0,1	0,21	0,09	0,1	0,44	0,10
0,25	0,44	0,26	0,25	0,99	0,25
0,5	0,77	0,50	0,5	1,88	0,50
0,75	1,31	0,80	0,75	2,72	0,74
1	1,44	0,91	1	3,32	1,00
1,5	2,2	1,56	1,5	4,59	1,53
2	2,7	1,98	2	5,64	1,98

2,3,6 triclorofenol			2,3,4 triclorofenol		
CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)	CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	-	-	0,01	-	-
0,05	0,21	0,05	0,05	0,22	0,05
0,1	0,38	0,10	0,1	0,39	0,10
0,25	0,94	0,25	0,25	0,94	0,25
0,5	1,86	0,50	0,5	1,82	0,50
0,75	3,96	0,77	0,75	2,52	0,72
1	4,71	0,98	1	3,14	0,99
1,5	6,62	1,50	1,5	4,51	1,59
2	8,42	2,00	2	5,31	1,95

Legenda: CT: concentração teórica; CR: concentração real ou absoluta

Tabela E.11 a E.13. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada.

Os valores em **negrito** foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em **vermelho** foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas).

Obs: IS: “internal standard” (padrão interno); FR: fator de resposta

E.11. 0,100 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	64915	78032	0,83	0,50
2	58310	61108	0,95	
3	51222	59259	0,86	
4	54315	69979	0,78	
Média	57190,5	67094,5	0,86	
DP	5910,8	8663,8	0,07	
CV	10,34	12,91	8,70	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	52081	78032	0,67	0,54
3	44890	61108	0,73	
2	36211	59259	0,61	
4	43370	69979	0,62	
média	44138,0	67094,5	0,66	
DP	6508,6	8663,8	0,06	
CV	14,75	12,91	8,60	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	24881	78032	0,32	0,41
2	20273	61108	0,33	
3	20230	59259	0,34	
4	21212	69979	0,30	
média	21649,0	67094,5	0,32	
DP	2201,8	8663,8	0,02	
CV	10,17	12,91	5,12	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	45357	78032	0,58	0,73
3	39302	61108	0,64	
2	33505	59259	0,57	
4	39099	69979	0,56	
média	39315,8	67094,5	0,59	
DP	4841,1	8663,8	0,04	
CV	12,31	12,91	6,56	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	25803	78032	0,33	0,47
2	22152	61108	0,36	
3	24193	59259	0,41	
4	21774	69979	0,31	
média	23480,5	67094,5	0,35	
DP	1877,8	8663,8	0,04	
CV	8,00	12,91	12,01	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	39655	78032	0,51	0,77
3	34104	61108	0,56	
2	29255	59259	0,49	
4	34049	69979	0,49	
média	34265,8	67094,5	0,51	
DP	4251,5	8663,8	0,03	
CV	12,41	12,91	6,30	

E.12. 0,250 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	143683	68443	2,10
3	112507	64490	1,74
2	102771	65226	1,58
média	119653,7	66053,0	1,81
DP	21371,8	2102,3	0,27
CV	17,86	3,18	14,80

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)
1	115052	68443	1,68
2	88235	64490	1,37
3	82236	65226	1,26
média	95174,3	66053,0	1,44
DP	17473,9	2102,3	0,22
CV	18,36	3,18	15,20

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)
1	46594	68443	0,68
2	37388	64490	0,58
3	34643	65226	0,53
média	39541,7	66053,0	0,60
DP	6259,8	2102,3	0,08
CV	15,83	3,18	12,78

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)
1	91674	68443	1,34
2	73260	64490	1,14
3	66522	65226	1,02
média	77152,0	66053,0	1,17
DP	13019,9	2102,3	0,16
CV	16,88	3,18	13,88

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	50943	68443	0,74
2	40902	64490	0,63
3	38333	65226	0,59
média	43392,7	66053,0	0,66
DP	6663,8	2102,3	0,08
CV	15,36	3,18	12,27

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	88808	68443	1,30
2	68482	64490	1,06
3	64642	65226	0,99
média	73977,3	66053,0	1,12
DP	12986,5	2102,3	0,16
CV	17,55	3,18	14,37

E.13. 1 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	580383	70272	8,26	0,55
3	281717	61816	4,56	
2	300157	48329	6,21	
4	317546	53795	5,90	
média	369950,8	58553,0	5,56	
DP	141048,9	9576,9	0,88	
CV	38,13	16,36	15,82	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	452615	70272	6,44	0,55
3	232194	61816	3,76	
2	239916	48329	4,96	
4	261798	53795	4,87	
média	296630,8	58553,0	4,53	
DP	104742,6	9576,9	0,67	
CV	35,31	16,36	14,82	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	157782	70272	2,25	0,63
3	85149	61816	1,38	
2	82261	48329	1,70	
4	88241	53795	1,64	
média	103358,3	58553,0	1,57	
DP	36364,6	9576,9	0,17	
CV	35,18	16,36	10,96	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	330099	70272	4,70	0,58
2	175935	61816	2,85	
3	172871	48329	3,58	
4	194543	53795	3,62	
média	218362,0	58553,0	3,35	
DP	75104,3	9576,9	0,43	
CV	34,39	16,36	12,96	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	174471	70272	2,48	0,58
3	94469	61816	1,53	
2	93387	48329	1,93	
4	96257	53795	1,79	
média	114646,0	58553,0	1,75	
DP	39900,9	9576,9	0,20	
CV	34,80	16,36	11,71	

2,3,4 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	365128	70272	5,20	0,61
2	183741	61816	2,97	
3	184196	48329	3,81	
4	206899	53795	3,85	
média	234991,0	58553,0	3,54	
DP	87429,0	9576,9	0,49	
CV	37,21	16,36	13,96	

Tabela E.14. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta das Figuras B.1 e B.2.

PCP

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,86	0,09
0,25	1,81	0,22
1	5,56	0,87

2,6 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,32	0,17
0,25	0,6	0,36
1	1,57	1,10

2,3 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,35	0,19
0,25	0,66	0,42
1	1,75	1,17

2,4,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,66	0,16
0,25	1,44	0,38
1	4,53	1,51

2,3,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,59	0,15
0,25	1,17	0,31
1	3,35	0,60

2,3,4 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,51	0,13
0,25	1,12	0,30
1	3,54	1,17

Legenda: CT: concentração teórica; CR: concentração real ou absoluta

Tabela E.15. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela B.10.) e da matriz dopada (Tabela B.14)

ANALITOS	CR CC	CR matriz	Recuperação
Conc.dopagem - 0,1mg/L	(mg/L)	(mg clorofenol/L matriz)	(%)
Pentaclorofenol	0,1	0,09	88,72
2,6 diclorofenol	0,10	0,17	161,02
2,3 diclorofenol	0,09	0,19	201,86
2,4,6 triclorofenol	0,10	0,16	159,56
2,3,6 triclorofenol	0,10	0,15	158,53
2,3,4 triclorofenol	0,10	0,13	134,32
ANALITOS	CR CC	CR matriz	Recuperação
Conc.dopagem - 0,25 mg/L	(mg/L)	(mg clorofenol/L matriz)	(%)
Pentaclorofenol	0,25	0,22	86,8
2,6 diclorofenol	0,26	0,36	137,09
2,3 diclorofenol	0,26	0,42	160,94
2,4,6 triclorofenol	0,25	0,38	148,94
2,3,6 triclorofenol	0,25	0,31	125,03
2,3,4 triclorofenol	0,25	0,30	120,01
ANALITOS	CR CC	CR matriz	Recuperação
Conc.dopagem- 1 mg/L	(mg/L)	(mg clorofenol/L matriz)	(%)
Pentaclorofenol	1	0,87	86,2
2,6 diclorofenol	0,99	1,10	110,73
2,3 diclorofenol	0,91	1,17	129,03
2,4,6 triclorofenol	1,00	1,51	151,63
2,3,6 triclorofenol	0,98	0,60	61,41
2,3,4 triclorofenol	0,99	1,17	118,18

Legenda: CR CC: concentração real da curva de calibração; CR matriz: concentração real no meio de cultura (matriz).

Valores dos Tempos de Retenção de cada analito obtido das soluções padrão de PCP e intermediários

Analitos	Tempo de retenção (minutos)
2,3 diclorofenol	12,2
2,6 diclorofenol	13,1
2,4,6 triclorofenol	14,3
2,3,6 triclorofenol	15,2
2,4 dibromofenol (Padrão interno)	16
2,3,4triclorofenol	16,4
PCP	22,2

Figura E.3. Cromatograma obtido com a solução padrão de clorofenóis a 1mg/L acetilada. Coluna HP5.

ANEXO F –TESTE 2

Tabelas F.1. a F.9. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.

Os valores em negrito foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em *italico* foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas). Os valores marcados com * foram desconsiderados para o cálculo da média, pois apesar de Q estar dentro do limite aceitável, estes valores resultavam em CV acima de 16%.

OBS: IS: “internal standard” (padrão interno); FR: fator de resposta

F.1. 10 mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	23783	43824	0,54*
2	11173	43824	0,25*
3	8941	65391	0,14
4	7711	63793	0,12
média	1290.2	5420.8	0,13
DP	739.4	1200.8	0,01
CV	57,31	22,15	8,70

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	8762	43824	0,20	
2	8480	43824	0,19	
3	8908	65391	0,14*	
4	6666	63793	0,10*	
média	820.4	5420.8		
DP	104.1	1200.8		
CV	12,68	22,15		

2,4,6 triclорofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)
1	13824	43824	0,32*
2	13206	43824	0,30*
3	9273	65391	0,14
4	7055	63793	0,11
média	1084.0	5420.8	0,13
DP	322.9	1200.8	0,02
CV	29,79	22,15	17,49

2,3,6 triclорofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	12147	43824	0,28	
2	14797	43824	0,34*	
3	17274	65391	0,26	
4	14632	63793	0,23	
média	1471.3	5420.8	0,26	
DP	209.4	1200.8	0,02	
CV	14,23	22,15	9,62	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	3850	43824	0,09
2	6285	43824	0,14
3	5084	63793	0,08
média	507.3	5420.8	0,08
DP	121.8	1200.8	0,01
CV	24,00	22,15	6,88

F.2. 50 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	37554	62471	0,60*	0,71
2	25790	52260	0,49	
3	25376	56567	0,45	
4	25007	51968	0,48	
média	2843.2	5581.7	0,47	
DP	609.0	490.9	0,02	
CV	21,42	8,80	4,89	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	21369	62471	0,34	
2	12564	52260	0,18	
3	11322	56567	0,20	
4	-	-	-	
média	1508.5	5581.7	0,19	
DP	547.7	490.9	0,01	
CV	36,31	8,80	6,70	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	46062	62471	0,74	0,85
2	15446	52260	0,30	
3	14440	56567	0,26	
4	11363	51968	0,22	
média	2182.8	5581.7	0,26	
DP	1624.9	490.9	0,04	
CV	74,44	8,80	15,00	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	29633	62471	0,47	0,73
2	22592	52260	0,43	
3	26842	56567	0,47	
4	25484	51968	0,49	
média	2613.8	5581.7	0,47	
DP	292.8	490.9	0,02	
CV	11,20	8,80	5,32	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	9513	62471	0,15	0,88
2	8381	52260	0,16	
3	9013	56567	0,16	
4	11047	51968	0,21	
média	948.9	5581.7	0,16	
DP	113.8	490.9	0,00	
CV	11,99	8,80	2,80	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	17428	62471	0,28	0,55
2	12774	52260	0,24	
3	12861	56567	0,23	
4	11210	51968	0,22	
média	1356.8	5581.7	0,24	
DP	268.3	490.9	0,03	
CV	19,77	8,80	11,41	

F.3. 100 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	38242	41915	0,91	0,33
2	40827	49824	0,82	
3	44014	53994	0,82	
4	37567	42697	0,88	
média	4016.3	4710.8	0,86	
DP	292.7	580.9	0,05	
CV	7,29	12,33	5,54	

2,6diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	18535	41915	0,44	0,80
2	16278	49824	0,33	
3	16096	53994	0,30	
4	12714	42697	0,30	
média	1590.6	4710.8	0,31	
DP	240.0	580.9	0,02	
CV	15,09	12,33	5,40	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	22323	41915	0,53	0,83
2	21380	49824	0,43	
3	22650	53994	0,42	
4	18753	42697	0,44	
média	2127.7	4710.8	0,43	
DP	176.6	580.9	0,01	
CV	8,30	12,33	2,30	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	30523	41915	0,73	0,53
2	33100	49824	0,66	
3	41609	53994	0,77	
4	38052	42697	0,89	
média	3582.1	4710.8	0,76	
DP	496.5	580.9	0,10	
CV	13,86	12,33	12,52	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	10642	41915	0,25	0,58
2	12002	49824	0,24	
3	13743	53994	0,25	
4	11657	42697	0,27	
média	1201.1	4710.8	0,26	
DP	129.1	580.9	0,01	
CV	10,75	12,33	5,17	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	18393	41915	0,44	0,30
2	19458	49824	0,39	
3	21984	53994	0,41	
4	18124	42697	0,42	
média	1949.0	4710.8	0,42	
DP	176.0	580.9	0,02	
CV	9,03	12,33	5,05	

F.4. 250 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	86516	42791	2,02	0,56
2	87320	45483	1,92	
3	101531	51882	1,96	
4	88020	49230	1,79	
média	9084.7	4734.7	1,92	
DP	714.9	401.4	0,10	
CV	7,87	8,48	5,13	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	27804	42791	0,65	0,49
2	25163	45483	0,55	
3	31254	51882	0,60	
4	27370	49230	0,56	
média	2789.8	4734.7	0,59	
DP	251.9	401.4	0,05	
CV	9,03	8,48	7,72	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	49896	42791	1,17	0,58
2	43512	45483	0,96	
3	53092	51882	1,02	
4	45285	49230	0,92	
média	4794.6	4734.7	1,02	
DP	436.0	401.4	0,11	
CV	9,09	8,48	10,68	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	70007	42791	1,64	
2	73922	45483	1,63	
3	87613	51882	1,69	
4	80048	49230	1,63	
média	7789.8	4734.7	1,64	
DP	768.3	401.4	0,03	
CV	9,86	8,48	1,84	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	23624	42791	0,55	0,73
2	23982	45483	0,53	
3	28568	51882	0,55	
4	27620	49230	0,56	
média	2594.9	4734.7	0,55	
DP	251.2	401.4	0,01	
CV	9,68	8,48	2,63	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	43975	42791	1,03	0,26
2	46091	45483	1,01	
3	49406	51882	0,95	
4	45584	49230	0,93	
média	4626.4	4734.7	0,98	
DP	228.1	401.4	0,05	
CV	4,93	8,48	4,96	

F.5. 500 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	157207	39370	3,99	0,49
2	150472	34289	4,39	
3	215022	51289	4,19	
4	186982	51685	3,62	
média	17742.1	4415.8	4,05	
DP	2966.5	871.5	0,33	
CV	16,72	19,73	8,13	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	45683	39370	1,16	0,89
2	48049	34289	1,40	
3	58542	51289	1,14	
4	50826	51685	0,98	
média	5077.5	4415.8	1,23	
DP	558.8	871.5	0,14	
CV	11,01	19,73	11,74	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	82752	39370	2,10	0,58
2	87821	34289	2,56	
3	112195	51289	2,19	
4	99163	51685	1,92	
média	9548.3	4415.8	2,19	
DP	1308.5	871.5	0,27	
CV	13,70	19,73	12,33	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	132322	39370	3,36	0,65
2	138184	34289	4,03	
3	168472	51289	3,28	
4	155390	51685	3,01	
média	14859.2	4415.8	3,42	
DP	1647.7	871.5	0,43	
CV	11,09	19,73	12,69	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	38847	39370	0,99	0,56
2	41714	34289	1,22	
3	53294	51289	1,04	
4	46401	51685	0,90	
média	4506.4	4415.8	1,04	
DP	630.9	871.5	0,13	
CV	14,00	19,73	12,98	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	84662	39370	2,15	0,66
2	78934	34289	2,30	
3	107316	51289	2,09	
4	87330	51685	1,69	
média	8956.1	4415.8	2,06	
DP	1234.4	871.5	0,26	
CV	13,78	19,73	12,70	

F.6. 750 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	180572	31758	5,69	0,42
2	263030	51440	5,11	
3	282151	50307	5,61	
4	304918	49961	6,10	
média	25766.8	4586.7	5,63	
DP	5417.4	942.7	0,41	
CV	21,02	20,55	7,21	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	54807	31758	1,73	0,35
2	71987	51440	1,40	
3	75612	50307	1,50	
4	80468	49961	1,61	
média	7071.9	4586.7	1,56	
DP	1116.2	942.7	0,14	
CV	15,78	20,55	9,00	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	103517	31758	3,26	
2	140689	51440	2,74	
3	149303	50307	2,97	
4	165813	49961	3,32	
média	13983.1	4586.7	3,07	
DP	2635.8	942.7	0,27	
CV	18,85	20,55	8,83	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	163445	31758	5,15	
2	218112	51440	4,24	
3	223013	50307	4,43	
4	250153	49961	5,01	
média	21368.1	4586.7	4,71	
DP	3633.4	942.7	0,44	
CV	17,00	20,55	9,31	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	48354	31758	1,52	0,45
2	64862	51440	1,26	
3	69334	50307	1,38	
4	74198	49961	1,49	
média	6418.7	4586.7	1,41	
DP	1122.3	942.7	0,12	
CV	17,48	20,55	8,34	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	98442	31758	3,10	2,37
2	136770	51440	2,66	
3	141980	50307	2,82	
4	148266	49961	2,97	
média	13136.5	4586.7	2,89	
DP	2244.6	942.7	0,19	
CV	17,09	20,55	6,57	

F.7. 1 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	334174	41312	8,09	0,28
2	319666	45898	6,96	
3	383451	49340	7,77	
4	391132	51419	7,61	
média	35710.6	4699.2	7,61	
DP	3549.4	441.9	0,47	
CV	9,94	9,40	6,22	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	90174	41312	2,18	0,49
2	84971	45898	1,85	
3	99699	49340	2,02	
4	101134	51419	1,97	
média	9399.5	4699.2	2,01	
DP	773.6	441.9	0,14	
CV	8,23	9,40	6,87	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	168015	41312	4,07	
2	170247	45898	3,71	
3	202460	49340	4,10	
4	209311	51419	4,07	
média	18750.8	4699.2	3,99	
DP	2142.3	441.9	0,19	
CV	11,43	9,40	4,67	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	247213	41312	5,98	
2	264413	45898	5,76	
3	295761	49340	5,99	
4	311522	51419	6,06	
média	27972.7	4699.2	5,95	
DP	2921.0	441.9	0,13	
CV	10,44	9,40	2,18	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	72411	41312	1,75	0,51
2	76863	45898	1,67	
3	90235	49340	1,83	
4	93234	51419	1,81	
média	8318.6	4699.2	1,77	
DP	1011.2	441.9	0,07	
CV	12,16	9,40	3,96	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	172596	41312	4,18	0,15
2	167116	45898	3,64	
3	192367	49340	3,90	
4	191400	51419	3,72	
média	18087.0	4699.2	3,86	
DP	1291.9	441.9	0,24	
CV	7,14	9,40	6,16	

F.8. 1,5 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	383788	47244	8,12	0,76
2	447420	43491	10,29	
3	472796	45439	10,41	
4	523636	47759	10,96	
média	45691.0	4598.3	9,95	
DP	5814.2	193.7	1,25	
CV	12,73	4,21	12,57	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	105280	47244	2,23	0,79
2	118834	43491	2,73	
3	129023	45439	2,84	
4	129615	47759	2,71	
média	12068.8	4598.3	2,63	
DP	1140.2	193.7	0,27	
CV	9,45	4,21	10,36	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	214045	47244	4,53	0,87
2	245885	43491	5,65	
3	264852	45439	5,83	
4	277129	47759	5,80	
média	25047.8	4598.3	5,76	
DP	2747.9	193.7	0,09	
CV	10,97	4,21	1,64	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	346832	47244	7,34	0,67
2	392200	43491	9,02	
3	384856	45439	8,47	
4	410534	47759	8,60	
média	38360.6	4598.3	8,36	
DP	2678.8	193.7	0,72	
CV	6,98	4,21	8,57	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	94030	47244	1,99	0,84
2	107921	43491	2,48	
3	117044	45439	2,58	
4	118983	47759	2,49	
média	10949.5	4598.3	2,52	
DP	1138.2	193.7	0,05	
CV	10,40	4,21	2,06	

2,3,4 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	208861	47244	4,42	0,87
2	233899	43491	5,38	
3	238890	45439	5,26	
4	252189	47759	5,28	
média	23346.0	4598.3	5,31	
DP	1812.5	193.7	0,06	
CV	7,76	4,21	1,21	

F.9. 2 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	497276	41353	12,03	0,30
2	544089	42003	12,95	
3	684453	47784	14,32	
4	675795	44688	15,12	
média	60040.3	4395.7	13,61	
DP	9408.3	293.1	1,38	
CV	15,67	6,67	10,17	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	133753	41353	3,23	0,69
2	145793	42003	3,47	
3	170216	47784	3,56	
4	159923	44688	3,58	
média	15242.1	4395.7	3,46	
DP	1597.3	293.1	0,16	
CV	10,48	6,67	4,58	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	276494	41353	6,69	0,38
2	304123	42003	7,24	
3	359156	47784	7,52	
4	358828	44688	8,03	
média	32465.0	4395.7	7,37	
DP	4122.8	293.1	0,56	
CV	12,70	6,67	7,60	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	447737	41353	10,83	0,43
2	478677	42003	11,40	
3	534953	47784	11,20	
4	528502	44688	11,83	
média	49746.7	4395.7	11,31	
DP	4161.1	293.1	0,42	
CV	8,36	6,67	3,68	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	121009	41353	2,93	0,57
2	132163	42003	3,15	
3	158442	47784	3,32	
4	147135	44688	3,29	
média	13968.7	4395.7	3,17	
DP	1645.9	293.1	0,18	
CV	11,78	6,67	5,65	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	268925	41353	6,50	0,37
2	283370	42003	6,75	
3	339010	47784	7,09	
4	319964	44688	7,16	
média	30281.7	4395.7	6,88	
DP	3230.5	293.1	0,31	
CV	10,67	6,67	4,48

Figura F.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis.

Tabela F.10. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das retas da Figura F.1.**Pentaclorofenol**

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,13	-0,03
0,05	0,47	0,02
0,1	0,86	0,08
0,25	1,92	0,24
0,5	4,05	0,56
0,75	5,63	0,79
1	7,61	1,09
1,5	9,95	1,43
2	13,61	1,98

2,6 diclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,2	-0,01
0,05	0,19	-0,02
0,1	0,31	0,06
0,25	0,59	0,22
0,5	1,23	0,61
0,75	1,56	0,81
1	2,01	1,08
1,5	2,63	1,45
2	3,46	1,95

2,3 diclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,08	-0,04
0,05	0,16	0,01
0,1	0,26	0,07
0,25	0,55	0,26
0,5	1,04	0,57
0,75	1,41	0,81
1	1,77	1,04
1,5	2,52	1,52
2	3,17	1,93

2,4,6 triclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,13	-0,01
0,05	0,26	0,03
0,1	0,43	0,07
0,25	1,02	0,23
0,5	2,19	0,55
0,75	3,07	0,79
1	3,99	1,04
1,5	5,76	1,51
2	7,37	1,95

2,3,6 triclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,26	0,00
0,05	0,47	0,04
0,1	0,76	0,09
0,25	1,64	0,25
0,5	3,42	0,58
0,75	4,71	0,82
1	5,05	0,88
1,5	8,36	1,49
2	11,31	2,03

2,3,4 triclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01		
0,05	0,24	0,01
0,1	0,42	0,07
0,25	0,98	0,23
0,5	2,06	0,54
0,75	2,89	0,79
1	3,86	1,07
1,5	5,31	1,49
2	6,88	1,95

Legenda: CT: concentração teórica; CR: concentração real ou absoluta

Tabela F.11 a F.13. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada

Os valores em **negrito** foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em *italico* foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas).

OBS: IS: “internal standard” (padrão interno); FR: fator de resposta

F.11. 0,100 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	65211	78793	0,83	0,65
2	55588	66105	0,84	
3	54143	71762	0,75	
4	57470	70891	0,81	
média	58103,0	71887,8	0,81	
DP	4930,6	5232,3	0,04	
CV	8,49	7,28	4,70	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	51563	78793	0,65	0,85
2	44200	66105	0,67	
3	41241	71762	0,57	
4	46444	70891	0,66	
média	45862,0	71887,8	0,66	
DP	4357,2	5232,3	0,01	
CV	9,50	7,28	1,21	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	24744	78793	0,31	0,53
2	22604	66105	0,34	
3	21585	71762	0,30	
4	20521	70891	0,29	
média	22363,5	71887,8	0,31	
DP	1800,5	5232,3	0,02	
CV	8,05	7,28	7,26	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	44096	78793	0,56	0,69
2	37798	66105	0,57	
3	35606	71762	0,50	
4	41713	70891	0,59	
média	39803,3	71887,8	0,55	
DP	3817,2	5232,3	0,04	
CV	9,59	7,28	7,28	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	22063	78793	0,28	
2	20320	66105	0,31	
3		71762	0,00	
4	21379	70891	0,30	
média	21254,0	71887,8	0,22	
DP	878,2	5232,3	0,15	
CV	4,13	7,28	66,88	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	47284	78793	0,60	0,58
2	33527	66105	0,51	
3	34586	71762	0,48	
4	37707	70891	0,53	
média	38276,0	71887,8	0,53	
DP	6262,0	5232,3	0,05	
CV	16,36	7,28	9,58	

F.12. 0,250 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	155601	81630	1,91	0,15
2	102437	75425	1,36	
3	122827	67320	1,82	
4	86353	68615	1,26	
média	116804,5	73247,5	1,59	
DP	29861,7	6623,3	0,33	
CV	25,57	9,04	20,54	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	123351	81630	1,51	0,11
2	83013	75425	1,10	
3	97487	67320	1,45	
4	72132	68615	1,05	
média	93995,8	73247,5	1,28	
DP	22155,2	6623,3	0,24	
CV	23,57	9,04	18,42	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	54512	81630	0,67	0,22
2	36987	75425	0,49	
3	42104	67320	0,63	
4	32346	68615	0,47	
média	41487,3	73247,5	0,56	
DP	9554,0	6623,3	0,10	
CV	23,03	9,04	17,30	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	99037	81630	1,21	0,02
2	66299	75425	0,88	
3	81103	67320	1,20	
4	59863	68615	0,87	
média	76575,5	73247,5	1,04	
DP	17415,8	6623,3	0,19	
CV	22,74	9,04	18,46	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	55798	81630	0,68	0,14
2	36809	75425	0,49	
3	44151	67320	0,66	
4	33304	68615	0,49	
média	42515,5	73247,5	0,58	
DP	9941,8	6623,3	0,11	
CV	23,38	9,04	18,38	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	108024	81630	1,32	0,30
2	66626	75425	0,88	
3	79286	67320	1,18	
4	56940	68615	0,83	
média	77719,0	73247,5	1,05	
DP	22178,6	6623,3	0,24	
CV	28,54	9,04	22,41	

F.13. 1 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	484561	76799	6,31	0,44
3	335032	58399	5,74	
2	370578	70879	5,23	
4	448064	70059	6,40	
média	409558,8	69034,0	5,92	
DP	68754,9	7699,6	0,54	
CV	16,79	11,15	9,20	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	387732	76799	5,05	0,42
3	269337	58399	4,61	
2	291896	70879	4,12	
4	316122	70059	4,51	
média	316271,8	69034,0	4,57	
DP	51327,8	7699,6	0,38	
CV	16,23	11,15	8,36	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	140716	76799	1,83	0,36
3	100862	58399	1,73	
2	107898	70879	1,52	
4	114536	70059	1,63	
média	116003,0	69034,0	1,68	
DP	17395,6	7699,6	0,13	
CV	15,00	11,15	7,86	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	291094	76799	3,79	0,37
2	199295	58399	3,41	
3	214790	70879	3,03	
4	232267	70059	3,32	
média	234361,5	69034,0	3,39	
DP	40148,3	7699,6	0,31	
CV	17,13	11,15	9,27	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	146814	76799	1,91	0,21
3	108503	58399	1,86	
2	117142	70879	1,65	
4	123881	70059	1,77	
média	124085,0	69034,0	1,80	
DP	16407,9	7699,6	0,11	
CV	13,22	11,15	6,30	

2,3,4 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	320678	76799	4,18	0,47
2	219006	58399	3,75	
3	238842	70879	3,37	
4	280194	70059	4,00	
média	264680,0	69034,0	3,82	
DP	45203,9	7699,6	0,35	
CV	17,08	11,15	9,14	

Tabela F.14. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta da Figura F.1.

PCP

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,81	0,07
0,25	1,59	0,19
1	5,92	0,83

2,6 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,31	0,06
0,25	0,56	0,21
1	1,68	0,88

2,3 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,22	0,05
0,25	0,58	0,28
1	1,8	1,06

2,4,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,66	0,14
0,25	1,28	0,30
1	4,57	1,19

2,3,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,55	0,05
0,25	1,04	0,14
1	3,39	0,57

2,3,4 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,53	0,10
0,25	1,05	0,25
1	3,82	1,06

Legenda: CT: concentração teórica; CR: concentração real ou absoluta

Tabela F.15. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela F.10.) e da matriz dopada (Tabela F.14)

ANALITOS	CR CC	CR matriz	Recuperação
Conc.dopagem - 0,1mg/L	(mg/L)	(mg clorofenol/L matriz)	(%)
Pentaclorofenol	0,08	0,07	90,73
2,6 diclorofenol	0,06	0,06	100,00
2,3 diclorofenol	0,07	0,05	64,79
2,4,6 triclorofenol	0,07	0,13	177,72
2,3,6 triclorofenol	0,09	0,05	56,84
2,3,4 triclorofenol	0,07	0,10	149,39
ANALITOS	CR CC	CR matriz	Recuperação
Conc.dopagem - 0,25 mg/L	(mg/L)	(mg clorofenol/L matriz)	(%)
Pentaclorofenol	0,24	0,19	79,37
2,6 diclorofenol	0,22	0,21	91,97
2,3 diclorofenol	0,26	0,28	107,43
2,4,6 triclorofenol	0,23	0,30	130,23
2,3,6 triclorofenol	0,25	0,14	56,10
2,3,4 triclorofenol	0,23	0,25	108,94
ANALITOS	CR CC	CR matriz	Recuperação
Conc.dopagem- 1 mg/L	(mg/L)	(mg clorofenol/L matriz)	(%)
Pentaclorofenol	1,09	0,83	76,82
2,6 diclorofenol	1,08	0,88	81,60
2,3 diclorofenol	1,04	1,06	101,85
2,4,6 triclorofenol	1,04	1,19	115,14
2,3,6 triclorofenol	1,04	0,57	65,05
2,3,4 triclorofenol	1,07	1,06	98,91

Legenda: CR matriz: concentração real das amostras do meio de cultura (matriz)
CR CC: concentração real da curva de calibração

ANEXO G –TESTE 3

Tabelas G.1. a G.7. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.

Os valores em **negrito** foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em *itálico* foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas e 0,717 para 5 réplicas). Os valores marcados com * foram desconsiderados para o cálculo da média, pois apesar de Q estar dentro do limite aceitável, estes valores resultavam em CV acima de 16%.

OBS: IS: “internal standard”(padrão interno); FR: fator de resposta

G.1. 10 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	75717	587379	0,13
2	74318	629602	0,12
3	87519	684218	0,13
4	93260	692508	0,13
5	101725	736224	0,14
média	8650.8	66598,6	0,13
DP	1165.3	5803.5	0,01
CV	13,47	8,71	5,93

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	75717	587379	0,05	
2	74318	629602	0,04	
3	87519	684218	0,04	
4	93260	692508	0,05	
5	101725	736224	0,04	
média	2874.2	66598.6	0,04	
DP	368.2	5803.5	0,01	
CV	12,81	8,71	15,50	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	32654	587379	0,06
2	29503	629602	0,05
3	34344	684218	0,05
4	35014	692508	0,05
5	39142	736224	0,05
média	3413.1	66598,6	0,05
DP	351.9	5803.5	0,00
CV	10,31	8,71	6,42

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	52881	587379	0,09	
2	49807	629602	0,08	
3	59042	684218	0,09	
4	61321	692508	0,09	
5	62633	736224	0,09	
média	5713.7	66598,6	0,09	
DP	554.9	5803.5	0,00	
CV	9,71	8,71	4,91	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)
1	46814	587379	0,08
2	48084	629602	0,08
3	52663	684218	0,08
4	52461	692508	0,08
5	55608	736224	0,08
média	5112.6	66598,6	0,08
DP	360.8	5803.5	0,00
CV	7,06	8,71	2,19

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	42535	587379	0,07	0,57
2	60610	629602	0,10	
3	70219	684218	0,10	
4	59596	692508	0,09	
5	65886	736224	0,09	
média	5976.9	66598.6	0,09	
DP	1054.0	5803.5	0,01	
CV	17,63	8,71	12,78	

G.2. 25 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	193948	559657	0,35	0,61
2	182029	652674	0,28	
3	202695	663322	0,31	
4	212684	680875	0,31	
média	19783.9	63913.2	0,31	
DP	1302.6	5424.4	0,03	
CV	6,58	8,49	8,96	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	50621	559657	0,09	
2	54809	652674	0,08	
3	60400	663322	0,09	
4	59799	680875	0,09	
média	5640.7	63913.2	0,09	
DP	460.0	5424.4	0,00	
CV	8,16	8,49	3,65	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	56163	559657	0,10	
2	66084	652674	0,10	
3	75033	663322	0,11	
4	75642	680875	0,11	
média	6823.1	63913,2	0,11	
DP	915.5	5424.4	0,01	
CV	13,42	8,49	6,19	

2,4 ,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	117211	559657	0,21	0,74
2	133185	652674	0,20	
3	149293	663322	0,23	
4	138499	680875	0,20	
média	13454.7	63913,2	0,21	
DP	1336.0	5424.4	0,01	
CV	9,93	8,49	4,79	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	117985	559657	0,21	0,61
2	125274	652674	0,19	
3	146846	663322	0,22	
4	129598	680875	0,19	
média	12992.6	63913.2	0,20	
DP	1225.6	5424.4	0,02	
CV	9,43	8,49	7,39	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	103273	559657	0,18	0,97
2	106014	652674	0,16	
3	122819	663322	0,19	
4	119370	680875	0,18	
média	11286,9	63913.2	0,18	
DP	966.7	5424.4	0,01	
CV	8,56	8,49	6,00	

G.3. 50 mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	243622	341396	0,71	
2	418776	580795	0,72	
3	334536	552804	0,61	
4				
média	33231.1	49166.5	0,68	
DP	8759.8	13088.7	0,06	
CV	26,36	26,62	9,54	

2,6diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	66363	341396	0,19	
2	119918	580795	0,21	
3	103314	552804	0,19	
4				
média	9653.2	49166.5	0,20	
DP	2741.4	13088.7	0,01	
CV	28,40	26,62	5,04	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	72252	341396	0,21	
2	134897	580795	0,23	
3	126726	552804	0,23	
4				
média	11129.2	49166.5	0,22	
DP	3405.5	13088.7	0,01	
CV	30,60	26,62	4,96	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	138707	341396	0,41	
2	299819	580795	0,52	
3	272961	552804	0,49	
4				
média	23716.2	49166.5	0,47	
DP	8631.6	13088.7	0,06	
CV	36,40	26,62	12,30	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	141733	341396	0,42	
2	265144	580795	0,46	
3	241647	552804	0,44	
4				
média	21617.5	49166.5	0,44	
DP	6553.0	13088.7	0,02	
CV	30,31	26,62	4,74	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	128757	341396	0,38	
2	246897	580795	0,43	
3	209966	552804	0,38	
4				
média	19520.7	49166.5	0,39	
DP	6043.7	13088.7	0,03	
CV	30,96	26,62	6,84	

G.4. 100 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	812707	717927	1,13	
2	669775	612937	1,09	
3	643896	584105	1,10	
4				
média	70879.3	63832.3	1,11	
DP	9091.8	7043.0	0,02	
CV	12,83	11,03	1,85	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	160875	717927	0,22	
2	163655	612937	0,27	
3	154710	584105	0,26	
4				
média	15974.7	63832.3	0,25	
DP	457.8	7043.0	0,02	
CV	2,87	11,03	9,60	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	196443	717927	0,27	
2	201146	612937	0,33	
3	200486	584105	0,34	
4				
média	13935,8	63832.3	0,32	
DP	254.6	7043.0	0,04	
CV	1,28	11,03	11,63	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	474546	717927	0,66	
2	450836	612937	0,74	
3	424425	584105	0,73	
4				
média	44993.6	63832.3	0,71	
DP	2507.3	7043.0	0,04	
CV	5,57	11,03	5,75	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	462040	717927	0,64	
2	402824	612937	0,66	
3	389478	584105	0,67	
4				
média	41811.4	63832.3	0,66	
DP	3862.2	7043.0	0,01	
CV	9,24	11,03	1,78	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	426119	717927	0,59	
2	388335	612937	0,63	
3	379835	584105	0,65	
4				
média	39809,6	63832.3	0,63	
DP	2463.8	7043.0	0,03	
CV	6,19	11,03	4,66	

G.5. 250 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	1408789	481658	2,92	
2	1474725	636477	2,32	
3	1575469	646789	2,44	
4				
média	148632,8	58830,8	2,56	
DP	8394,4	9250,5	0,32	
CV	5,65	15,72	12,59	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	257735	481658	0,54	
2	317829	636477	0,50	
3	379737	646789	0,59	
4				
média	31843,4	58830,8	0,54	
DP	6100,3	9250,5	0,04	
CV	19,16	15,72	8,16	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	316340	481658	0,66	
2	415963	636477	0,65	
3	470781	646789	0,73	
4				
média	40102,8	58830,8	0,68	
DP	7829,6	9250,5	0,04	
CV	19,52	15,72	6,18	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	769666	481658	1,60	
2	907787	636477	1,43	
3	1081834	646789	1,67	
4				
média	91976,2	58830,8	1,57	
DP	15642,8	9250,5	0,13	
CV	17,01	15,72	8,07	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	709897	481658	1,47	
2	823838	636477	1,29	
3	955625	646789	1,48	
4				
média	82978,7	58830,8	1,42	
DP	12297,2	9250,5	0,10	
CV	14,82	15,72	7,40	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	715841	481658	1,49	
2	829558	636477	1,30	
3	884185	646789	1,37	
4				
média	80986,1	58830,8	1,39	
DP	8588,3	9250,5	0,09	
CV	10,60	15,72	6,70	

G.6. 500 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	2891711	596380	4,85	
2	2332264	543976	4,29	
3	1990371	415836	4,79	
4				
média	240478.2	51873.1	4,64	
DP	45502.5	9288.2	0,31	
CV	18,92	17,91	6,63	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	554974	596380	0,93	
2	588852	543976	1,24	
3	420991	415836	1,01	
4				
média	52160.6	51873.1	1,06	
DP	8876.6	9288.2	0,16	
CV	17,02	17,91	15,17	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	675173	596380	1,13	
2	718429	543976	1,32	
3	606360	415836	1,46	
4				
média	66665.4	51873.1	1,30	
DP	5651.8	9288.2	0,16	
CV	8,48	17,91	12,56	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	1738743	596380	2,92	
2	1725173	543976	3,17	
3	1218087	415836	2,93	
4				
média	156066.8	51873.1	3,01	
DP	29676.1	9288.2	0,14	
CV	19,02	17,91	4,79	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	1595177	596380	2,67	
2	1505120	543976	2,77	
3	1091608	415836	2,63	
4				
média	139730.2	51873.1	2,69	
DP	26854.1	9288.2	0,07	
CV	19,22	17,91	2,68	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	1470602	596380	2,47	
2	1249418	543976	2,30	
3	1107204	415836	2,66	
4				
média	127574.1	51873.1	2,48	
DP	18312.3	9288.2	0,18	
CV	14,35	17,91	7,40	

G.7. 1 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	5676237	589825	9,62	0,39
2	8252481	806382	10,23	
3	6158305	710706	8,67	
4	6533698	716698	9,12	
média	665518.0	70590.3	9,41	
DP	112121.1	8890.0	0,67	
CV	16,85	12,59	7,17	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	1065640	589825	1,81	0,57
2	1267691	806382	1,57	
3	1245381	710706	1,75	
4	1354325	716698	1,89	
média	123325.9	70590.3	1,76	
DP	12122.4	8890.0	0,13	
CV	9,83	12,59	7,66	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	1300919	589825	2,21	0,59
2	1471615	806382	1,82	
3	1518017	710706	2,14	
4	1686081	716698	2,35	
média	149415.8	70590.3	2,13	
DP	15838.1	8890.0	0,22	
CV	10,60	12,59	10,44	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	3420381	589825	5,80	
2	4139875	806382	5,13	
3	3706722	710706	5,22	
4	3967524	716698	5,54	
média	380862.6	70590.3	5,42	
DP	31416.2	8890.0	0,31	
CV	8,25	12,59	5,64	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	3077054	589825	5,22	
2	3713975	806382	4,61	
3	3419618	710706	4,81	
4	3640807	716698	5,08	
média	346286.4	70590.3	4,93	
DP	28603.0	8890.0	0,27	
CV	8,26	12,59	5,54	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	2865128	589825	4,86	
2	3987328	806382	4,94	
3	3368763	710706	4,74	
4	3525501	716698	4,92	
média	343668.0	70590.3	4,87	
DP	46274.1	8890.0	0,09	
CV	13,46	12,59	1,87

Figura G.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis.

Tabela G.8. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das retas da Figura G.1.**Pentaclorofenol**

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,13	0,00
0,025	0,31	0,02
0,05	0,68	0,06
0,1	1,11	0,11
0,25	2,56	0,26
0,5	4,64	0,49
1	9,41	1,00

2,6 diclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,04	-0,02
0,025	0,09	0,00
0,05	0,2	0,07
0,1	0,25	0,10
0,25	0,54	0,26
0,5	1,06	0,56
1	1,76	0,97

2,3 diclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,05	-0,03
0,025	0,11	0,00
0,05	0,22	0,05
0,1	0,32	0,10
0,25	0,68	0,27
0,5	1,3	0,57
1	2,13	0,96

2,4,6 triclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,09	-0,01
0,025	0,21	0,01
0,05	0,47	0,06
0,1	0,71	0,10
0,25	1,57	0,26
0,5	3,01	0,53
1	5,42	0,98

2,3,6 triclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,09	-0,01
0,025	0,2	0,01
0,05	0,44	0,06
0,1	0,66	0,11
0,25	1,42	0,26
0,5	2,69	0,52
1	4,93	0,98

2,3,4 triclorofenol

CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,01	0,08	-0,01
0,025	0,18	0,01
0,05	0,39	0,06
0,1	0,63	0,11
0,25	1,39	0,27
0,5	2,48	0,50
1	4,87	1,00

Legenda: CT: concentração teórica; CR: concentração real ou absoluta

Tabela G.9. a G.11. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada

Os valores em **negrito** foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em **vermelho** foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas).

OBS: IS: “internal standard”(padrão interno) ; FR: fator de resposta

G.9. 0,025 mg/L

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	198364	661950	0,30	0,58
2	137492	552404	0,25	
3	114275	539957	0,21	
4	73485	310395	0,24	
média	130904,0	516176,5	0,25	
DP	52178,3	147731,6	0,04	
CV	39,86	28,62	14,86	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	137677	661950	0,21	
2	108102	552404	0,20	
3	111822	539957	0,21	
4	59517	310395	0,19	
média	104279,5	516176,5	0,20	
DP	32611,7	147731,6	0,01	
CV	31,27	28,62	4,06	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	60933	661950	0,09	1,00
2	48246	552404	0,09	
3	49487	539957	0,09	
4	54113	310395	0,17	
média	53194,8	516176,5	0,09	
DP	6994,2	147731,6	0,00	
CV	13,15	28,62	2,89	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	125252	661950	0,19	0,57
2	103922	552404	0,19	
3	112324	539957	0,21	
4	72649	310395	0,23	
média	103536,8	516176,5	0,20	
DP	10744,7	147731,6	0,02	
CV	10,38	28,62	10,50	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	78551	661950	0,12	1,00
2	66814	552404	0,12	
3	63283	539957	0,12	
4	51271	310395	0,17	
média	64979,8	516176,5	0,12	
DP	11230,2	147731,6	0,00	
CV	17,28	28,62	1,59	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	113619	661950	0,17	0,80
2	87481	552404	0,16	
3	74331	539957	0,14	
4	51120	310395	0,16	
média	81637,8	516176,5	0,16	
DP	26087,5	147731,6	0,01	
CV	0,00	28,62	9,27	

G.10. 0,100 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	846363	622675	1,36	0,32
2	350046	295765	1,18	
3	624737	587591	1,06	
4	483684	602894	0,80	
média	576207,5	527231,3	1,02	
DP	212170,3	154977,7	0,19	
CV	36,82	29,39	19,18	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	520921	622675	0,84	0,34
2	223553	295765	0,76	
3	498073	587591	0,85	
4	427674	602894	0,71	
média	417555,3	527231,3	0,79	
DP	135285,9	154977,7	0,07	
CV	32,40	29,39	8,40	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	169571	622675	0,27	0,52
2	108879	295765	0,37	
3	185097	587591	0,32	
4	160778	602894	0,27	
média	156081,3	527231,3	0,31	
DP	33035,3	154977,7	0,05	
CV	21,17	29,39	15,37	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	457168	622675	0,73	0,51
2	200171	295765	0,68	
3	437042	587591	0,74	
4	365894	602894	0,61	
média	365068,8	527231,3	0,69	
DP	116696,7	154977,7	0,06	
CV	31,97	29,39	9,13	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	204694	622675	0,33	0,36
2	138878	295765	0,47	
3	246111	587591	0,42	
4	213831	602894	0,35	
média	200878,5	527231,3	0,39	
DP	44990,2	154977,7	0,06	
CV	22,40	29,39	16,18	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	445987	622675	0,72	0,62
2	205969	295765	0,70	
3	372417	587591	0,63	
4	300597	602894	0,50	
média	331242,5	527231,3	0,64	
DP	102460,1	154977,7	0,10	
CV	30,93	29,39	15,45	

G.11. 1 mg/L de clorofenóis

Pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	7067088	662050	10,67	0,87
3	5914282	682355	8,67	
2	6883533	773676	8,90	
4	4029897	466258	8,64	
média	5973700,0	646084,8	8,74	
DP	1391066,0	129341,4	0,14	
CV	23,29	20,02	1,60	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	4078862	662050	6,16	0,45
3	3689847	682355	5,41	
2	4028933	773676	5,21	
4	3240087	466258	6,95	
média	3759432,3	646084,8	5,93	
DP	386965,8	129341,4	0,79	
CV	10,29	20,02	13,37	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	1263587	662050	1,91	0,78
3	1260643	682355	1,85	
2	1361287	773676	1,76	
4	1135972	466258	2,44	
média	1255372,3	646084,8	1,99	
DP	92321,2	129341,4	0,31	
CV	7,35	20,02	15,35	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	3710298	662050	5,60	0,38
2	3293098	682355	4,83	
3	3618410	773676	4,68	
4	2877746	466258	6,17	
média	3374888,0	646084,8	5,32	
DP	376670,8	129341,4	0,70	
CV	11,16	20,02	13,13	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	1548879	662050	2,34	0,84
3	1560894	682355	2,29	
2	1712415	773676	2,21	
4	1391135	466258	2,98	
média	1553330,8	646084,8	2,28	
DP	131266,0	129341,4	0,06	
CV	8,45	20,02	2,78	

2,3,4 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	3472944	662050	5,25	0,29
2	3146760	682355	4,61	
3	3606991	773676	4,66	
4	2359564	466258	5,06	
média	3146564,8	646084,8	4,90	
DP	559132,1	129341,4	0,31	
CV	17,77	20,02	6,30	

Tabela G.12. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta da Figura G.1.

PCP

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,25	0,01
0,1	1,02	0,10
1	8,74	0,93

2,6 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,09	0,00
0,1	0,31	0,13
1	1,99	1,10

2,3 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,12	0,01
0,1	0,39	0,14
1	2,28	1,03

2,4,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,2	0,01
0,1	0,79	0,12
1	5,93	1,08

2,3,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,2	0,01
0,1	0,69	0,11
1	5,32	1,07

2,3,4 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,16	0,01
0,1	0,64	0,11
1	4,9	1,00

Legenda: CR: concentração determinada ou absoluta; CT: concentração teórica

Tabela G.13. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela G.8.) e da matriz dopada (Tabela G.12.)

ANALITOS Conc.dopagem - 0,025mg/L	CR CC (mg/L)	CR matriz (mg clorofenol/L matriz)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,02	0,01	65,89
2,6 diclorofenol	-	-	-
2,3 diclorofenol	-	-	-
2,4,6 triclorofenol	0,01	0,01	81,38
2,3,6 triclorofenol	0,01	0,01	100,00
2,3,4 triclorofenol	0,01	0,01	35,10

ANALITOS Conc.dopagem - 0,1 mg/L	CR CC (mg/L)	CR matriz (mg clorofenol/L matriz)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,11	0,10	98,98
2,6 diclorofenol	0,10	0,13	135,89
2,3 diclorofenol	0,10	0,14	132,50
2,4,6 triclorofenol	0,10	0,12	114,45
2,3,6 triclorofenol	0,11	0,11	105,85
2,3,4 triclorofenol	0,11	0,11	97,92

ANALITOS Conc.dopagem- 1 mg/L	CR CC (mg/L)	CR matriz (mg clorofenol/L matriz)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	1,00	0,93	92,75
2,6 diclorofenol	0,97	1,10	113,71
2,3 diclorofenol	0,96	1,03	107,17
2,4,6 triclorofenol	0,98	1,08	110,13
2,3,6 triclorofenol	0,98	1,07	108,15
2,3,4 triclorofenol	1,00	1,00	100,33

Legenda: CR matriz - concentração real ou absoluta das amostras do meio de cultura (matriz); CR CC – concentração real da curva de calibração

ANEXO H

Tabelas H.1. a H.8. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta das soluções padrão de PCP e intermediários utilizadas para a elaboração da curva de calibração.

Os valores em negrito foram os valores suspeitos utilizados para o cálculo de Q, os valores em itálico foram os desconsiderados no cálculo da média por resultarem em Q acima do crítico (0,81 para 4 réplicas; 0,717 para 5 réplicas e 0,570 para 7 réplicas). Os valores marcados com * foram desconsiderados para o cálculo da média, pois apesar de Q estar dentro do limite aceitável, estes valores resultavam em CV acima de 16%.

OBS: IS: “internal standard”(padrão interno); FR: fator de resposta

H.1. 25 mg/L de clorofenóis**Pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	149254	310423	0,48
2	150496	351020	0,43
3	145301	372669	0,39
média	14835.0	34470.4	0,43
DP	271.3	3160.0	0,05
CV	1,83	9,17	10,53

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)
1	39492	310423	0,13
2	36783	351020	0,10
3	40460	372669	0,11
média	3891.2	34470.4	0,11
DP	190.6	3160.0	0,01
CV	4,90	9,17	10,58

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	34395	310423	0,11
2	50083	351020	0,14
3	43987	372669	0,12
média	4282.2	34470.4	0,12
DP	790.9	3160.0	0,02
CV	18,47	9,17	13,50

2,4,6, triclofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)
1	85253	310423	0,27
2	81839	351020	0,23
3	93620	372669	0,25
média	8690.4	34470.4	0,25
DP	606.2	3160.0	0,02
CV	6,97	9,17	8,22

2,3,6 triclofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)
1	73858	310423	0,24
2	78438	351020	0,22
3	90671	372669	0,24
média	8098.9	34470.4	0,23
DP	869.2	3160.0	0,01
CV	10,73	9,17	4,37

2,3,4 triclofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	80830	310423	0,26
2	80382	351020	0,23
3	90234	372669	0,24
média	8381.5	34470.4	0,24
DP	556.3	3160.0	0,02
CV	6,64	9,17	6,47

H.2. 50 ug/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	188859	328501	0,57
2	209934	282732	0,74
3	219150	320977	0,68
média	20598.1	31073.7	0,67
DP	1552.8	2454.3	0,08
CV	7,54	7,90	12,74

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)
1	63552	328501	0,19
2	59650	282732	0,21
3	63677	320977	0,20
média	6229.3	31073.7	0,20
DP	229.0	2454.3	0,01
CV	3,68	7,90	4,50

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)
1	98176	328501	0,30
2	75894	282732	0,27
3	78479	320977	0,24
média	8418.3	31073.7	0,27
DP	1218.7	2454.3	0,03
CV	14,48	7,90	10,07

2,4,6 triclofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)
1	172054	328501	0,52
2	141377	282732	0,50
3	156548	320977	0,49
média	15666.0	31073.7	0,50
DP	1533.9	2454.3	0,02
CV	9,79	7,90	3,63

2,3,6 triclofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)
1	160977	328501	0,49
2	136736	282732	0,48
3	153561	320977	0,48
média	15042.5	31073.7	0,48
DP	1242.1	2454.3	0,01
CV	8,26	7,90	1,20

2,3,4 triclofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	162795	328501	0,50
2	133183	282732	0,47
3	145846	320977	0,45
média	14727.5	31073.7	0,47
DP	1485.8	2454.3	0,02
CV	10,09	7,90	4,37

H.3. 100 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	236389	268089	0,88	0,30
2	339369	346260	0,98	
3	455702	393450	1,16	
4	414825	344051	1,21	
média	34382.0	33593.3	1,06	
DP	10972.4	6331.5	0,15	
CV	31,91	18,85	14,35	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	78204	268089	0,29	
2	92646	346260	0,27	
3	110548	393450	0,28	
4	96076	344051	0,28	
média	9379.9	33593.3	0,28	
DP	1620.3	6331.5	0,01	
CV	17,27	18,85	3,53	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	121951	268089	0,45	0,47
2	141113	346260	0,41	
3	169153	393450	0,43	
4	155259	344051	0,45	
média	14407.2	33593.3	0,44	
DP	2374.0	6331.5	0,02	
CV	16,48	18,85	5,02	

2,4,6 triclorofenol (2,4,6triclór.)

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	215281	268089	0,80	0,52
2	240361	346260	0,69	
3	307175	393450	0,78	
4	258282	344051	0,75	
média	25427.2	33593.3	0,76	
DP	4750.0	6331.5	0,05	
CV	18,68	18,85	6,23	

2,3,6 triclorofenol (2,3,6triclór.)

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	198076	268089	0,74	0,65
2	225152	346260	0,65	
3	298146	393450	0,76	
4	247788	344051	0,72	
média	24045.8	33593.3	0,72	
DP	5176.1	6331.5	0,05	
CV	21,53	18,85	6,55	

2,3,4 triclorofenol (2,3,4triclór.)

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	191519	268089	0,71	0,62
2	234555	346260	0,68	
3	276469	393450	0,70	
4	247060	344051	0,72	
média	23418.1	33593.3	0,70	
DP	4247.6	6331.5	0,02	
CV	18,14	18,85	2,61	

H.4. 250 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	411448	281625	1,46	0,74
2	650813	289411	2,25	
3	774501	352413	2,20	
4	892118	362771	2,46	
média	61225.4	30781.6	2,30	
DP	18457.2	3881.8	0,14	
CV	30,15	12,61	6,02	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	202472	281625	0,72	0,69
2	171972	289411	0,59	
3	189800	352413	0,54	
4	205612	362771	0,57	
média	18808.1	30781.6	0,57	
DP	1532.2	3881.8	0,03	
CV	8,15	12,61	4,91	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	291468	281625	1,03	0,87
2	235344	289411	0,81	
3	278047	352413	0,79	
4	282495	362771	0,78	
média	26828.6	30781.6	0,79	
DP	2930.7	3881.8	0,02	
CV	10,92	12,61	2,23	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	562224	281625	2,00	0,83
2	470287	289411	1,62	
3	546619	352413	1,55	
4	584093	362771	1,61	
média	52637.7	30781.6	1,60	
DP	4919.8	3881.8	0,04	
CV	9,35	12,61	2,45	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	518471	281625	1,84	0,79
2	442204	289411	1,53	
3	516427	352413	1,47	
4	560826	362771	1,55	
média	49236.7	30781.6	1,60	
DP	4345.5	3881.8	0,17	
CV	8,83	12,61	10,50	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	356429	281625	1,27	0,48
2	450420	289411	1,56	
3	494950	352413	1,40	
4	562317	362771	1,55	
média	43393.3	30781.6	1,44	
DP	7071.7	3881.8	0,14	
CV	16,30	12,61	9,57	

H.5. 500 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	895913	268959	3,33	0,61
2	1112446	277997	4,00	
3	1533674	345798	4,44	
4	1598978	366176	4,37	
média	1180677,7	29758.5	4,03	
DP	324309,18	4199.8	0,51	
CV	27,468054	14,11	12,53	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	327484	268959	1,22	0,58
2	303924	277997	1,09	
3	363361	345798	1,05	
4	367167	366176	1,00	
média	33159.0	29758.5	1,09	
DP	2993.0	4199.8	0,09	
CV	9,03	14,11	8,44	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	422976	268959	1,57	0,37
2	428130	277997	1,54	
3	498069	345798	1,44	
4	498628	366176	1,36	
média	44972.5	29758.5	1,48	
DP	4194.6	4199.8	0,10	
CV	9,33	14,11	6,50	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	960068	268959	3,57	0,72
2	867052	277997	3,12	
3	1061163	345798	3,07	
4	1077288	366176	2,94	
média	96276.1	29758.5	3,17	
DP	9708.4	4199.8	0,27	
CV	10,08	14,11	8,61	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	881400	268959	3,28	0,84
2	783897	277997	2,82	
3	999882	345798	2,89	
4	1031266	366176	2,82	
média	88839.3	29758.5	2,84	
DP	10816.2	4199.8	0,04	
CV	12,18	14,11	1,49	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	720826	268959	2,68	0,60
2	766466	277997	2,76	
3	973491	345798	2,82	
4	1010911	366176	2,76	
média	82026.1	29758.5	2,75	
DP	13464.9	4199.8	0,06	
CV	16,42	14,11	2,02	

H.6. 1 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	1932062	331960	5,82	0,68
2	2212621	320215	6,91	
3	2357435	325213	7,25	
4	2705713	364374	7,43	
média	216737.3	33544.1	6,85	
DP	21626.6	1988.0	0,72	
CV	9,98	5,93	10,51	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	649723	331960	1,96	0,59
2	574213	320215	1,79	
3	572503	325213	1,76	
4	611380	364374	1,68	
média	59881.3	33544.1	1,80	
DP	4409.8	1988.0	0,12	
CV	7,36	5,93	6,52	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	890096	331960	2,68	0,68
2	749639	320215	2,34	
3	712085	325213	2,19	
4	793484	364374	2,18	
média	78394.0	33544.1	2,35	
DP	9383.2	1988.0	0,23	
CV	11,97	5,93	10,00	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	1923635	331960	5,79	0,70
2	1669014	320215	5,21	
3	1694056	325213	5,21	
4	1806250	364374	4,96	
média	176223.5	33544.1	5,29	
DP	14033.6	1988.0	0,36	
CV	7,96	5,93	6,71	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	1779562	331960	5,36	0,74
2	1526205	320215	4,77	
3	1586888	325213	4,88	
4	1717858	364374	4,71	
média	163088.5	33544.1	4,93	
DP	13228.5	1988.0	0,30	
CV	8,11	5,93	5,99	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	1444522	331960	4,35	0,90
2	1524281	320215	4,76	
3	1534364	325213	4,72	
4	1728696	364374	4,74	
média	150105.6	33544.1	4,64	
DP	4921.8	1988.0	0,20	
CV	3,28	5,93	4,21	

H.7. 2,5 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	5241609	324880	16,13	0,41
2	7036598	458646	15,34	
3	5740936	320378	17,92	
4	5818041	345170	16,86	
média	595929.6	36226.9	16,56	
DP	76229.7	6515.0	1,10	
CV	12,79	17,98	6,61	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	1451251	324880	4,47	0,49
2	1625643	458646	3,54	
3	1285991	320378	4,01	
4	1293966	345170	3,75	
média	141421.3	36226.9	3,94	
DP	16018.2	6515.0	0,40	
CV	11,33	17,98	10,10	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	2139537	324880	6,59	0,69
2	2131162	458646	4,65	
3	1684040	320378	5,26	
4	1666863	345170	4,83	
média	190540.1	36226.9	5,33	
DP	26563.7	6515.0	0,88	
CV	13,94	17,98	16,43	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	4369037	324880	13,45	0,53
2	4884047	458646	10,65	
3	3831176	320378	11,96	
4	3872265	345170	11,22	
média	423913.1	36226.9	11,82	
DP	49457.4	6515.0	1,21	
CV	11,67	17,98	10,25	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	4274709	324880	13,16	0,53
2	4587465	458646	10,00	
3	3681138	320378	11,49	
4	3706746	345170	10,74	
média	406251.5	36226.9	11,35	
DP	44445.4	6515.0	1,35	
CV	10,94	17,98	11,91	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	3522441	324880	10,84	
2	4780166	458646	10,42	
3	3400784	320378	10,61	
4	3671960	345170	10,64	
média	384383.8	36226.9	10,63	
DP	63399.4	6515.0	0,17	
CV	16,49	17,98	1,62	

H.8. 5 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	7050891	347966	20,26*	0,50
2	1,20E+07	400523	29,96	
3	1,30E+07	367510	35,37	
4	1,60E+07	410957	38,93	
5	1,20E+07	373861	32,10	
6	1,40E+07	418638	33,44	
7	1,30E+07	379803	34,23	
média	1243584.2	38560.8	34,01	
DP	274359.8	2540.4	3,05	
CV	22,06	6,59	8,97	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	2002135	347966	5,75*	0,36
2	2480884	400523	6,19*	
3	3045046	367510	8,29	
4	3176581	410957	7,73	
5	2771241	373861	7,41	
6	3349311	418638	8,00	
7	3134593	379803	8,25	
média	285139.9	38560.8	7,94	
DP	47193.1	2540.4	0,37	
CV	16,55	6,59	4,65	

2,3 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	1,96E+06	347966	5,63*	0,20
2	2,40E+06	400523	6,00*	
3	3121507	367510	8,49	
4	3146562	410957	7,66	
5	2783641	373861	7,45	
6	3477522	418638	8,31	
7	3164306	379803	8,33	
média	286513.9	38560.8	8,05	
DP	52441.5	2540.4	0,46	
CV	18,30	6,59	5,77	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)	Q
1	4819104	347966	13,85*	0,09
2	6243741	400523	15,59*	
3	9033661	367510	24,58	
4	1,06E+07	410957	25,79	
5	9116297	373861	24,38	
6	1,09E+07	418638	26,04	
7	1,01E+07	379803	26,59	
média	868754.3	38560.8	25,48	
DP	230174.2	2540.4	0,96	
CV	26,49	6,59	3,75	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)	Q
1	8097392	347966	23,27	0,44
2	1,06E+07	400523	26,47	
3	8558021	367510	23,29	
4	8,57E+06	410957	20,85	
5	7157252	373861	19,14	
6	8629534	418638	20,61	
7	7793416	379803	20,52	
média	848614.1	38560.8	22,02	
DP	107219.9	2540.4	2,48	
CV	12,63	6,59	11,25	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)	Q
1	5826035	347966	16,74*	0,49
2	7528733	400523	18,80*	
3	8145256	367510	22,16	
4	1,08E+07	410957	26,28	
5	8947086	373861	23,93	
6	1,00E+07	418638	23,89	
7	9211913	379803	24,25	
média	863700.3	38560.8	24,10	
DP	164998.0	2540.4	1,47	
CV	19,10	6,59	6,08

Figura H.1. Gráficos de calibração dos compostos de clorofenóis.

Tabela H.9. Concentrações reais da curva de calibração calculadas a partir das equações das retas da Figura H.1.

Pentaclorofenol			2,6 diclorofenol		
CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)	CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,025	0,43	0,01	0,025	0,11	-0,03
0,05	0,67	0,04	0,05	0,2	0,02
0,1	1,06	0,10	0,1	0,28	0,08
0,25	2,3	0,29	0,25	0,57	0,26
0,5	4,03	0,55	0,5	1,09	0,60
1	6,85	0,97	1	1,8	1,05
2,5	16,56	2,42	2,5	3,94	2,43
5	34,01	5,04	5	7,94	5,01

2,3 diclorofenol			2,4,6 triclorofenol		
CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)	CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,025	0,12	-0,20	0,025	0,25	0,00
0,05	0,27	-0,11	0,05	0,5	0,05
0,1	0,44	0,00	0,1	0,76	0,10
0,25	0,79	0,21	0,25	1,6	0,27
0,5	1,48	0,64	0,5	3,17	0,59
1	2,35	1,18	1	5,29	1,01
2,5	5,33	3,02	2,5	11,82	2,33
5	8,05	4,70	5	25,48	5,07

2,3,6 triclorofenol			2,3,4 triclorofenol		
CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)	CT (mg/L)	média FR	CR (mg/L)
0,025	0,23	-0,04	0,025	0,24	0,03
0,05	0,48	0,02	0,05	0,47	0,08
0,1	0,72	0,07	0,1	0,7	0,12
0,25	1,6	0,28	0,25	1,44	0,28
0,5	2,84	0,56	0,5	2,75	0,56
1	4,93	1,04	1	4,74	0,99
2,5	11,35	2,52	2,5	10,63	2,25
5	22,02	4,98	5	24,1	5,12

Legenda: CT: concentração teoria; CR: concentração rela ou absoluta

Tabelas H.10. a H.12. Cálculo de Q, da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos fatores de resposta da análise de clorofenóis da matriz dopada

H.10. 0,025 mg/L de clorofenóis

pentaclorofenol

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)
1	203471	737655	0,28
2	175162	657658	0,27
3	175934	684998	0,26
média	184855,7	693437,0	0,27
DP	16126,0	40660,7	0,01
CV	8,72	5,86	3,57

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (2,4,6/IS)
1	156304	737655	0,21
2	126299	657658	0,19
3	128595	684998	0,19
média	137066,0	693437,0	0,20
DP	16700,1	40660,7	0,01
CV	12,18	5,86	6,53

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)
1	110092	737655	0,15
2	58489	657658	0,09
3	63034	684998	0,09
média	77205,0	693437,0	0,11
DP	28571,5	40660,7	0,03
CV	37,01	5,86	30,86

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,3,6/IS)
1	128760	737655	0,17
2	112690	657658	0,17
3	110551	684998	0,16
média	117333,7	693437,0	0,17
DP	9953,1	40660,7	0,01
CV	8,48	5,86	4,06

2,3 DICLOROFENOL

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	77556	737655	0,11
2	72289	657658	0,11
3	76978	684998	0,11
média	75607,7	693437,0	0,11
DP	2888,5	40660,7	0,00
CV	3,82	5,86	3,37

2,3,4 TRICLOROFENOL

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3,4/IS)
1	139067	737655	0,19
2	112918	657658	0,17
3	120351	684998	0,18
média	124112,0	693437,0	0,18
DP	13474,1	40660,7	0,01
CV	10,86	5,86	4,92

H.11. 0,1 mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	300604	297612	1,01	0,28
2	299911	285928	1,05	
3	177764	199787	0,89	
4	285584	305416	0,94	
média	265965,8	272185,8	0,97	
DP	59207,3	48925,7	0,07	
CV	22,26	17,98	7,40	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	203093	297612	0,68	0,70
2	217522	285928	0,76	
3	188126	199787	0,94	
4	224491	305416	0,74	
média	208308,0	272185,8	0,78	
DP	16137,9	48925,7	0,11	
CV	7,75	17,98	14,44	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	78705	297612	0,26	0,65
2	83772	285928	0,29	
3	69308	199787	0,35	
4	82059	305416	0,27	
média	78461,0	272185,8	0,29	
DP	6454,7	48925,7	0,04	
CV	8,23	17,98	12,93	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	195890	297612	0,66	0,69
2	207115	285928	0,72	
3	174603	199787	0,87	
4	210326	305416	0,69	
média	196983,5	272185,8	0,74	
DP	16152,9	48925,7	0,10	
CV	8,20	17,98	12,99	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	111154	297612	0,37	0,70
2	121081	285928	0,42	
3	124437	199787	0,62	
4	136627	305416	0,45	
média	123324,8	272185,8	0,41	
DP	10509,5	48925,7	0,04	
CV	8,52	17,98	9,09	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	192171	297612	0,65	
2	202457	285928	0,71	
3	119746	199787	0,60	
4	202547	305416	0,66	
média	179230,3	272185,8	0,65	
DP	39954,1	48925,7	0,04	
CV	22,29	17,98	6,87	

H.12. 1 mg/L de clorofenóis**pentaclorofenol**

Réplicas	ÁREA PCP	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	3428092	409155	8,38	0,49
2	3070708	354587	8,66	
3	3065365	330387	9,28	
4	2773538	273276	10,15	
média	3084425,8	341851,3	9,12	
DP	267898,7	56350,1	0,78	
CV	8,69	16,48	8,60	

2,4,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,4,6	ÁREA IS	FR (PCP/IS)	Q
1	2426257	409155	5,93	0,6
2	2155526	354587	6,08	
3	2128421	330387	6,44	
4	2057539	273276	7,53	
média	2191935,8	341851,3	6,50	
DP	161584,6	56350,1	0,72	
CV	7,37	16,48	11,12	

2,6 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	775803	409155	1,90	0,62
2	696202	354587	1,96	
3	694904	330387	2,10	
4	666708	273276	2,44	
média	708404,3	341851,3	2,10	
DP	46947,9	56350,1	0,24	
CV	6,63	16,48	11,52	

2,3,6 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,6	ÁREA IS	FR (2,6/IS)	Q
1	1819782	409155	4,45	0,6
2	1624082	354587	4,58	
3	1619933	330387	4,90	
4	1548216	273276	5,67	
média	1653003,3	341851,3	4,90	
DP	116512,7	56350,1	0,55	
CV	7,05	16,48	11,13	

2,3 diclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	844845	409155	2,06	0,59
2	760168	354587	2,14	
3	764873	330387	2,32	
4	729959	273276	2,67	
média	774961,3	341851,3	2,30	
DP	49090,2	56350,1	0,27	
CV	6,33	16,48	11,72	

2,3,4 triclorofenol

Réplicas	ÁREA 2,3,4	ÁREA IS	FR (2,3/IS)	Q
1	2201505	409155	5,38	0,6
2	1977784	354587	5,58	
3	1895866	330387	5,74	
4	1753381	273276	6,42	
média	1957134,0	341851,3	5,78	
DP	187450,1	56350,1	0,45	
CV	9,58	16,48	7,78	

Tabela H.13. Concentrações reais da matriz dopada, calculadas a partir das equações da reta da Figura H.1.

PCP

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,27	-0,02
0,1	0,97	0,09
1	9,12	1,31

2,6 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,11	-0,03
0,1	0,29	0,08
1	2,1	1,25

2,3 diclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,11	-0,21
0,1	0,41	-0,02
1	2,3	1,14

2,4,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,025	0,2	-0,01
0,1	0,78	0,11
1	6,5	1,26

2,3,6 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,17	-0,05
0,25	0,74	0,08
1	4,9	1,04

2,3,4 triclorofenol

CT (mg/L)	FR	CR (mg/L)
0,1	0,18	0,01
0,25	0,65	0,11
1	5,78	1,21

Legenda: CT: concentração teórica; CR: concentração real ou absoluta

Tabela H.14. Recuperação do método de extração calculada a partir das concentrações reais da curva de calibração (Tabela H.9.) e da matriz dopada (Tabela H.13.)

ANALITOS Conc.dopagem - 0,025mg/L	CR CC (mg/L)	CR matriz (mg clorofenol/L matriz)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,01	-0,02	-
2,6 diclorofenol	-0,03	-0,03	-
2,3 diclorofenol	-0,20	-0,21	-
2,4,6 triclorofenol	0,00	-0,01	-
2,3,6 triclorofenol	-0,04	-0,05	-
2,3,4 triclorofenol	0,03	0,01	51,38

ANALITOS Conc.dopagem - 0,1 mg/L	CR CC (mg/L)	CR matriz (mg clorofenol/L matriz)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,10	0,09	86,93
2,6 diclorofenol	0,08	0,08	108,58
2,3 diclorofenol	0,00	-0,02	-
2,4,6 triclorofenol	0,10	0,11	103,93
2,3,6 triclorofenol	0,07	0,08	106,30
2,3,4 triclorofenol	0,12	0,11	91,43

ANALITOS Conc.dopagem- 1 mg/L	CR CC (mg/L)	CR matriz (mg clorofenol/L matriz)	Recuperação (%)
Pentaclorofenol	0,97	1,31	135,04
2,6 diclorofenol	1,05	1,25	118,33
2,3 diclorofenol	1,18	1,14	97,37
2,4,6 triclorofenol	1,01	1,26	124,01
2,3,6 triclorofenol	1,04	1,04	99,34
2,3,4 triclorofenol	0,99	1,21	122,49

Legenda: CR matriz: concentração real das amostras do meio de cultura (matriz)
CR CC: concentração real da curva de calibração

ANEXO I

Tabela I1. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus PCP 1. As colunas em amarelo referem-se à realimentações

ÁCIDOS	13/09/02 1	24/09/02 11	05/10/02 22	17/10/02 34	04/11/02 52	12/12/02 91	09/01/03 119	24/01/03 134	27/01/03 137	06/02/03 146	16/02/03 156	27/02/03 167	12/03/04 182
LÁTICO						95	50					2	
FÓRMICO												-	
ACÉTICO	2384	5338,2	6272	6069	4264	3365	3700	5019,5	4011,5	5295	5693	3638	3249
PROPIÔNICO	29	404,5	553,5	417	300	250	275	305,5	254	380,5	390,7	386	287
ISOBUT	-	4,45	15	2,6	-	11	15	-	-	-	-	38	19
BUT	-	107,5	187,5	206	152	161	189	147	127	401,5	465,7	329	290
ISOVAL	-	7,5	21,5	7,9	8	360	160	-	-	-	-	188	188
VALÉRICO	-	-	-	-	-	17	20	-	-	-	-	-	
CAPRÓICO	-	-	-	-	1,3	10	5	-	-	-	-	-	

31/03/03 201	14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262	18/06/03 281	23/06/03 286	16/07/03 309	01/08/03 324	14/08/03 337	17/08/03 340	02/09/03 355	19/09/03 372	15/10/03 399
4		8	641	979	1582	1745		-	475	-	-	-	
-	9	9	-	-	-	-	860	-	-	-	-	-	
3671	3682	3398	4061,5	4226	3846	4172	4700	2415	2820	2970	2569	2645	795
301	297	268	237,5	252	502	586	510	320	685	465	434	700	170
23	22	22	-	-	102	163	170	210	-	430	290	316	-
371	344	308	275	272	1144	1322	1130	420	1500	605	566	911	431,7
187	213	148	103	97	363	218	20	-	-	-	81	423	-
-	-	35	-	-	10	19		115	50	75	66	40	-
-	49	-	-	-	-	16		-	70	150	70	80	-

25/10/03	10/11/03	26/11/03	10/12/03	12/12/03	30/12/03	07/01/04	26/01/04	29/01/04
409	425	441	455	457	475	483	502	505
				220				
964	2630	454	3050	2560	1600	1700	4645	5625
185	490	274	1170	1600	1030	1045	1050	1435
-	824	-	43	100	50	45	-	20
520	1140	130	1070	1360	900	885	780	1050
-	289	-	20	400	170	215	70	90
-	359	-	110	90	60	55	50	-
-		-	200				135	195

Tabela I2. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus PCP2. As colunas em amarelo referem-se à realimentações

ÁCIDOS	13/09/02	24/09/02	05/10/02	17/10/02	04/11/02	12/12/02	09/01/03	24/01/03	27/01/03	06/02/03	16/02/03	27/02/03	12/03/03
	1	11	22	34	52	91	119	134	137	146	156	167	182
LÁTICO						149	44					-	
FÓRMICO						15	14					-	
ACÉTICO	1648	3967,5	3155,25	3173	2568	2741	2802	3873,35	3590	4500	5048,5	3317	2765
PROPIÔNICO	42	97,5	1066	1086	848	790	803	1159	1035	963,5	1070,75	694	574
ISOBUT	-	-	-	-	-	15	15	-	-	-	-	14	12
BUT	-	337,5	424	395	286	295	304	373,2	315,5	300	363	267	314
ISOVAL	-	1,85	-	-	1	385	88	-	-	-	-	83	147
VALÉRICO	-	-	30	25	14	30	47	-	-	-	-	36	54
CAPRÓICO	-	28,35	175	161	113	120	127	116,2	85,65	95	116,5	84	96

31/03/03 201	14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262	18/06/03 281	23/06/03 286	16/07/03 309	01/08/03 324	14/08/03 337	17/08/03 340	02/09/03 355	19/09/03 372
3	59	6	43	941	187,5	180	25	-	-	-	-	-
-	8		-	55	-	-	-	-	-	-	-	-
3069	3900	2725	3678	4500	3418,75	3427	3690	2200	2545	2770	2393	2544
659	873	551	717,5	655	737,5	919	985	575	590	640	540	613
25	73	18	21	34	-	148	10	-	50	250	44	46
262	427	234	242	340	2762,5	1746	1785	750	770	835	706	800
109	342	69	37,5	-	1900	466	40	-	-	-	61	544
44	87	35	-	-	-	68	15	105	110	420	371	106
82	121	76	11	13	18,75	126	100	125	165	200	227	200

15/10/03 399	25/10/03 409	10/11/03 425	26/11/03 441	10/12/03 455	12/12/03 457	30/12/03 475	07/01/04 483
		80			190		
918,85	982	3500	609	5280	1720	2000	2270
180	166,6	603	17	860	190	270	350
-	-	61	-	20	50	20	35
426,5	398,7	85	103	1320	650	770	890
-	-	150	-	40	76	130	100
-	-	200	-	60	40	160	12,5
-	-	109	-	170			

Tabela I3. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus C 2. As colunas em amarelo referem-se à realimentações

ÁCIDOS	13/09/02 1	24/09/02 11	05/10/02 22	17/10/02 34	04/11/02 52	12/12/02 91	09/01/03 119	24/01/03 134	27/01/03 137	06/02/03 146	16/02/03 156	27/02/03 167	12/03/03 182
LÁTICO							75					105	27
FÓRMICO												-	9
ACÉTICO	2681	2007,5	485,5	94,4	100	172	529,5	-	1545	-	-	69	23
PROPIÔNICO													
O	24	1126	952	1054	-	6	65	-	813	636	707,6	314	764
ISOBUT	-	16,5	20,5	18,4	-	-	17,5	-	-	-	-	8,5	19
BUT	83	4,3	6	2,2	-	-	26,5	-	-	-	-	32,5	-
ISOVAL	-	7,5	10	20,2	-	2	137,5	-	-	-	-	398	-
VALÉRICO	-	9	8,5	6,16	-	-	11,5	-	-	-	-	6	40
CAPRÓICO	-	2,3	-	-	-	-	4,285	-	-	-	-	-	-

31/03/03 201	14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262	18/06/03 281	23/06/03 286	16/07/03 309	01/08/03 324	14/08/03 337	17/08/03 340	02/09/03 355	19/09/03 372	15/10/03 399
117	95	122	1195	-	14	4	12	322	320	380	68	100	
-	-	-	560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	18	17	1100	2687	2821	2720	2750	1705	2030	2335	2214	2271	333,7
12	500	340	485	1640	1691	1678	1680	1050	1070	1695	1072	1120	158
2	29	14	-	90	43	76	-	55	115	71	60	63	-
5	-	21	-	1190	500	400	-	85	165	105	84	89	-
83	219	170	-	-	130	164	80	-	-	285	200	314	-
5,5	-	7	-	-	10	-	-	45	375	-	-	18	-
-	-	-	-	104	-	-	-	-	-	-	76	-	-

25/10/03	10/11/03	26/11/03	10/12/03	12/12/03	30/12/03	07/01/04
409	425	441	455	457	475	483
	74					
1255	2670	1815	4200	1980	2080	2235
760	1300	899	2300	870	930	1065
-	106	-	56	120	30	40
-	150	-	82	60	70	85
-	150	-	130	130	100	150
-	35	-	-	100	100	48,5

Tabela I4. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Caneus C1. As colunas em amarelo referem-se às realimentações

ÁCIDOS	13/09/02	24/09/02	05/10/02	17/10/02	04/11/02	12/12/02	09/01/03	24/01/03	27/01/03	06/02/03	16/02/03	27/02/03
	1	11	22	34	52	91	119	134	137	146	156	167
LATICO							93					58
FÓRMICO												-
ACÉTICO	2813	1234,85	1411	357,8	422,5	656	522,5	-	1280	-	-	14
PROPIÔNICO	26	1157,5	1229	1401	542	18	170	-	765	732	606,5	146
ISOBUT	-	5,45	28	35,4	-	5	7,5	-	-	-	-	11
BUT	102	-	2,3	5,6	-	3	-	-	-	-	-	30
ISOVAL	-	5,7	12,5	24	15	6	217,5	-	-	-	-	42
VALÉRICO	-	2,95	11	11	0,75	-	10	-	-	-	-	46
CAPRÓICO	-	-	2,5	0,78	-	-	-	-	-	-	-	-

12/03/03 182	31/03/03 201	14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262	18/06/03 281
14	145	223	205	2175	32	-
-	-	9	-	525	-	-
23	13	44	12	1730	12	20
308	31	609	108	670	1515	2
-	2	45	5	105	8	-
-	8,5	-	81	-	-	175
-	140	706	49	-	31	38
-	3	39	21	-	47	43
24	-	-	-	-	-	-

Tabela I5. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa PCP 1. As colunas em amarelo referem-se às realimentações

ÁCIDOS	13/09/02 1	24/09/02 11	05/10/02 22	17/10/02 34	04/11/02 52	12/12/02 91	09/01/03 119	24/01/03 134	27/01/03 137	06/02/03 146	16/02/03 156	27/02/03 167	12/03/03 182
LÁTICO	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
FÓRMICO	-	-	-	-	-	13	16	-	-	-	-	5	5
ACÉTICO	2381	5644	4870	3578	3423	2756	2612	3365,4	3116	4128	4863	2532	2502
PROPIÔNICO	28	3416,9	2280	1798	1358	1111	1047	1411,8	1279	1378,5	1767	948	903
ISOBUT	-	21	15	3,7	0,89	48	19	-	-	-	-	28	21
BUT	4,8	1483	1417,5	2361	1833	1658	1518	2206,75	1904	2063,5	3871,5	2048	1932
ISOVAL	-	11	10	11	5,4	81	66	-	-	4	25	50	55
VALÉRICO	-	9,2	7	5,3	75	110	103	75	55	70	105	88	93
CAPRÓICO	-	-	-	-	4,2	6	22	-	-	-	-	-	-

31/03/03	14/04/03	28/04/03	20/05/03	30/05/03	18/06/03	23/06/03	16/07/03	01/08/03	17/08/03	02/09/03	19/09/03	15/10/03
201	215	229	252	262	281	286	309	324	340	355	372	399
1	-	-	-	16	7	14	15	-	-	72	76	
15	37	15	-	-	122	120	-	-	-	-	-	
2230	2667	2440	3030	3095	1876	1867	1935	1100	1505	1343	1380	771
823	934	857	927	780	868	868	850	465	575	476	485	227
24	31	27	-	6	176	191	150	60	385	52	44	-
1690	2012	1844	2140	2090	4702	4770	4750	90	545	73	63	1737,5
61	101	93	-	-	670	497	140	-	80	217	480	-
102	444	143	-	-	91	100	420	105	155	117	160	-
32	39	140	-	-	4,2	10		-	70	47	35	-

25/10/03	10/11/03	26/11/03	10/12/03	12/12/03	30/12/03	07/01/04	26/01/04	29/01/04
409	425	441	455	457	475	483	502	505
	97							
915	2000	488	3370	1380	1650	1730	5000	4555
217,5	376	42	500	150	300	215	315	315
-	200	-	30	100	110	40	15	20
1815	276	698	2720	1520	1660	1660	3070	3105
-	300	-	60	230	220	230	90	100
-	125	-	80	110	140	110	105	115
19	86	-	80				105	120

Tabela I6. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa PCP 2. As colunas em amarelo referem-se às realimentações

ÁCIDOS	13/09/02 1	24/09/02 11	05/10/02 22	17/10/02 34	04/11/02 52	12/12/02 91	09/01/03 119	24/01/03 134	27/01/03 137	06/02/03 146	16/02/03 156	27/02/03 167	12/03/03 182
LÁTICO						26,24	31					-	-
FÓRMICO						-	14					15	-
ACÉTICO	2526	6751,2	6384	5758	3402	3538	3817	5423	5406,1	6185	5788	2278	2199
PROPIÔNICO	47	3705,15	2605	2218	1309	1256	1301	1957,5	1889	1932,5	2150	896	850
ISOBUT	-	32,5	21,5	9,5	-	33	20	-	-	-	-	18	17
BUT	12	214	215	179	110	164	141	131,5	112	281,5	2032,5	967	933
ISOVAL	-	8,25	10	8	4,8	78	92	-	-	-	-	26	39
VALÉRICO	-	1,2	-	-	-	19	31	-	-	-	-	-	16
CAPRÓICO	-	-	-	-	2	-	9	-	-	-	-	-	-

31/03/03 201	14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262	18/06/03 281	23/06/03 286	16/07/03 309	01/08/03 324	14/08/03 337	17/08/03 340	02/09/03 355	19/09/03 372
10	5	4	-	50	139	80	60	350	355	360	107	110
8	16	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2644	3747	2829	3548	4070	3368	3243	3260	2000	2270	2380	2452	2506
1032	1368	1229	1244	1028	1089	1170	1150	680	705	725	744	673
30	35	42	-	-	62	91	-	70	100	450	63	60
1163	1473	1192	1417	1104	2767	2761	2830	100	150	620	88	85
90	105	46	-	142	100	226	700	-	25	100	183	216
126	73	27	-	-	-	47	-	50	45	105	20	12

25/10/03	10/11/03	26/11/03	10/12/03	12/12/03	30/12/03	07/01/04	26/01/04	29/01/04
409	425	441	455	457	475	483	502	505
	114			17				
1222	3000	629	4120	1710	1860	2000	6600	5290
300	605	51	780	230	270	310	525	490
-	280	-	50	110	110	50	30	30
1065	389	373	2080	1030	1260	1260	2180	2170
-	390	-	58	230	250	250	75	80
-	131	-	27	200	80	85	20	25
-	-	-	-					

Tabela I7. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa C2. As colunas em amarelo referem-se às realimentações

ÁCIDOS	13/09/02	24/09/02	05/10/02	17/10/02	04/11/02	12/12/02	09/01/03	27/01/03	27/02/03	12/03/03	31/03/03
	1	11	22	34	52	91	119	137	167	182	201
LÁTICO						11	29		7	-	6
FÓRMICO						3	14		4	8	4,529
ACÉTICO	3343	345	60	11,4	-	7	21	1080	6	14	5,752
PROPIÔNICO	49	1229,5	1100	19	-	17	12	767	19	-	17,621
ISOBUT	-	27	35	-	-	9	5	-	20	21	14,481
BUT	735	-	-	-	-	20	-	14	-	-	8,56
ISOVAL	4,19	26	5,1	-	-	14	-	-	-	398	14,219
VALÉRICO	-	3,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAPRÓICO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262	18/06/03 281	23/06/03 286	16/07/03 309	01/08/03 324	14/08/03 337	17/08/03 340	02/09/03 355	19/09/03 372	15/10/03 399
9	11	1340	522	27	5	-	-	-	-	-	-	891 235,8
11	20	82	-	-	-	-	-	-	-	70	-	
14	85	1566,5	2076	2368	2350	2400	1500	1645	2130	2087	2145	
24	31	335	790	1168	1181	1155	650	590	770	636	723	
18	35	-	-	21	22	35	85	100	125	74	57	
-	12	-	-	17	23	-	840	770	1005	831	944	
-	22	-	-	76	482	75	-	-	-	46	381	
-	3	-	-	-	-	-	-	50	75	26	55	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	13	

25/10/03 409	10/11/03 425	26/11/03 441	10/12/03 455	12/12/03 457	30/12/03 475	07/01/04 483	26/01/04 502	29/01/04 505
1560	3800	799	4170	2340	2360	2540	6600	6075
365	772	86	960	410	430	525	770	755
-	90	-	33	60	360	40	-	-
43,5	126	-	260	80	230	280	620	600
-	136	-	73	40	60	230	140	140
-	51	-	-			40	-	
-	-	-	-			-	-	

Tabela I8. Variação temporal nas concentrações de ácidos voláteis (mg/L) no reator Cosipa C1. As colunas em amarelo referem-se às realimentações

ÁCIDOS	13/09/02 1	24/09/02 11	05/10/02 22	17/10/02 34	04/11/02 52	12/12/02 91	09/01/03 119	27/01/03 137	06/02/03 146	16/02/03 156	27/02/03 167	12/03/03 182
LÁTICO						85	-				13	2
FÓRMICO						-	-				3	10
ACÉTICO	3571	207,3	115	45	-	35	21	1229,5	-	-	23	11
PROPIÔNICO	31	1739,3	2365	356,7	1,2	15	22	798,5	-	-	37	8
ISOBUT	-	35	61,5	-	-	9	53	-	-	-	4,5	21
BUT	700	-	-	-	-	45	16	-	-	-	2	-
ISOVAL	2,12	35,5	22	8	-	23	-	-	-	-	-	424
VALÉRICO	-	5	2,4	-	-	-	12	-	-	-	-	-
CAPRÓICO	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

31/03/03 201	14/04/03 215	28/04/03 229	20/05/03 252	30/05/03 262
6	23	6	720	52
5,6	55	6	-	-
9,5	45	9,5	1858	-
16	675	21	735	-
7,3	12,5	36	-	24
-	-	-	-	-
10	366	-	-	43
2,8	3549	2	-	-
-	-	-	-	-

Tabela I9. Variação temporal nas concentrações de pentaclorofenol (mg/L) nos reatores Caneus. As colunas em amarelo referem-se à realimentações

	13/09/02	24/09/02	05/10/02	04/11/02	12/12/02	09/01/03	24/01/03	27/01/03	06/02/03	27/02/03	12/03/03	31/03/03
REATORES	1	11	22	52	91	119	134	137	146	167	182	201
CANEUS C PCP1	22,6	22,2	20,3	23,1	19,0	19,4	18,8					
CANEUS C PCP2	19,2	22,6	19,7	20,6	19,1	20,6	22,3					
CANEUS PCP1	8,8	5,1	6,0	6,4	6,5	4,7	5,0	6,4	4,6	3,3	2,9	2,2
CANEUS PCP2	8,3	5,5	6,4	6,6	6,6	5,7	6,7	7,3	6,4	2,5	2,4	3,1
CANEUS C2 PCP												

14/04/03	28/04/03	20/05/03	30/05/03	18/06/03	23/06/03	16/07/03	01/08/03	14/08/03	17/08/03	02/09/03	19/09/03	15/10/03
215	229	252	262	281	286	309	324	337	340	355	372	399
	23,6											
	24,2											
2,8		7,3	6,9	6,5	3,6	5,4	5,4	3,6	4,2	4,2	5,2	4,8
2,8		9,8	4,9	4,9	6,4	7,3	8,6	8,5	6,8	8,7	7,4	7,2
		9,2	7,7	6,8	7,5	7,5	9,8	7,5	5,6	7,9	8,0	3,8

25/10/03	10/11/03	26/11/03	08/12/03	12/12/03	30/12/03	15/01/04
409	425	441	453	455	475	491
4,7	5,5	5,3	4,1	6,3	6,8	10,0
6,1	8,2	6	6,7	7,9	6,4	10,4
4,0	4,7	4,1	4,5	7,1	6,3	8,5

Legenda: Caneus C PCP – são os reatores controle negativo; Caneus C2 PCP – são os reatores controle que receberam PCP na 7ª realimentação

Tabela I10. Variação temporal nas concentrações de pentaclorofenol (mg/L) nos reatores Cosipa. As colunas em amarelo referem-se à realimentações

REATORES	13/09/02	24/09/02	05/10/02	04/11/02	12/12/02	09/01/03	24/01/03	27/01/03	06/02/03	27/02/03	12/03/03
	1	11	22	52	91	119	134	137	146	167	182
COSIPA C PCP1	37,7	36,4	44,1	44,4	45,5	40,9	39,5				
COSIPA C PCP2	36,3	38,0	42,6	41,1	41,3	41,0	44,6				
COSIPA PCP1	25,9	11,6	14,6	17,7	17,4	14,3	18,4	15,4	10,8	9,9	8,2
COSIPA PCP2	23,5	19,0	16,2	17,3	16,9	18,0	18,1	17,3	9,4	10,3	12,8
Cosipa C2PCP											

31/03/03	14/04/03	28/04/03	20/05/03	30/05/03	18/06/03	23/06/03	16/07/03	01/08/03	14/08/03	17/08/03	02/09/03	19/09/03
201	215	229	252	262	281	286	309	324	337	340	355	372
		46,5										
8,5	8,0		29,3	22,0	17,6	18,7	20,7	23,1	-	22,0	23,4	20,5
10,5	11,2		27,4	22,5	21,3	17,6	17,2	19,7	16,2	16,3	18,2	17,5
			40,4	24,6	22,8	20,8	22,0	23,6	22,3	18,4	24,1	25,0

15/10/03	25/10/03	10/11/03	26/11/03	08/12/03	12/12/03	30/12/03	15/01/04	26/01/03	29/01/03
399	409	425	441	453	455	475	491	502	505
16,5	16,0	19,3	16	13,5	18,2	13,9	28,2	30,0	34,2
	14,0	15,4	18,4	12,8	16,4	14,8	27,3	29,0	33,0
23,7	19,4	22	22,3	20,3	22,4	17,3	28,3	28,1	28,1

Legenda: Caneus C PCP – são os reatores controle negativo; Caneus C2 PCP – são os reatores controle que receberam PCP na 7ª realimentação

Tabela J1. Quantificação da massa de PCP adsorvida na biopartícula (mgPCP/gbiopartícula) do reator para cada concentração de PCP aplicada.

a) 5mg/L de PCP

L/D	4	8	12	16
FR	8,88	5,46	5,98	1,15
PCP (mg/L)	7,69	5,73	6,31	0,98
biopartícula (g)	0,0224	0,0200	0,0158	0,0248
mgPCP/gbiopartícula	3,44	2,87	3,99	0,40

b) 10 mg/L PCP

L/D	4	8	12	16
FR	31,1	8,30	0,50	
PPCP (mg/L)	38,50	7,00	0,26	
biopartícula (g)	0,0297	0,0212	0,0264	0,0272
mgPCP/gbiopartícula	12,96	3,30	0,10	

c) 15mg/L PCP

L/D	4	8	12	16
FR	33,8	18,73	3,37	6,04
PCP (mg/L)	42,23	21,41	3,43	6,37
biopartícula (g)	0,0250	0,0200	0,0193	0,0245
mgPCP/gbiopartícula	16,89	10,71	1,78	2,60

d) 21 mg/L PCP

L/D	4	8	12	16
FR	44,5	18,14	7,89	1,37
PCP (mg/L)	57,01	20,60	6,44	1,22
biopartícula (g)	0,0320	0,0178	0,0194	0,0277
mgPCP/gbiopartícula	17,82	11,57	3,32	0,44

Tabela J2. Massa de Sólidos Totais (ST) e Sólidos Totais Voláteis (STV) retidos na espuma no final de operação do reator

L/D	Amostra	Peso da espuma (g)	ST (g)	STV (g)	gST/gespuma	gSTV/gespuma
4	4.1	0,046	0,0841	0,0312	1,8	0,7
8	8.1	0,040	0,0083	0,0028	0,2	0,1
	8.2	0,050	0,0150	0,0033	0,3	0,1
	média				0,25	
12	12.1	0,035	0,0162	0,0069	0,5	0,2
	12.2	0,035	0,0160	0,0084	0,5	0,2
	média				0,5	
16	16.1	0,030	0,0141	0,0027	0,5	0,1
	16.2	0,030	0,0134	0,0029	0,4	0,1
	média				0,45	