**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

***APLICAÇÃO DE VERMICOMPOSTAGEM PARA A
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS***

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção de título de doutor em
Ciências (Química Analítica)

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Olímpia de Oliveira Rezende

São Carlos - SP

2008

Coração Civil

Milton Nascimento e Fernando Brant

*Quero a utopia, quero tudo e mais
Quero a felicidade nos olhos de um pai
Quero a alegria muita gente feliz
Quero que a justiça reine em meu país
Quero a liberdade, quero o vinho e o pão
Quero ser amizado, quero amor, prazer
Quero nessa cidade sempre ensolarada
Os meninos e o povo no poder, eu quero ver
São José da Costa Rica, coração civil
Me inspire no meu sonho de amor Brasil
Se o poeta é o que sonha o que vai ser real
Bom sonhar coisas boas que o homem faz
E esperar pelos frutos no quintal
Sem polícia, nem a milícia, nem feitiço, cadê poder ?
Viva a preguiça viva a malícia que só a gente é que sabe ter
Assim dizendo a minha utopia eu vou levando a vida
Eu viver bem melhor
Doído pra ver o meu sonho teimoso, um dia se realizar
E Eu viver bem melhor*

*Dedico em especial,
ao meu marido Marcelo Henrique,
o qual me ensinou mais
do que eu pude ensiná-lo.
Obrigada pelo seu amor.
Te amo.*

*Ao meu Deus,
por ter me dado saúde e força
principalmente nos momentos
de idas e vindas à Minas Gerais.*

*Aqueles que são responsáveis
pelo meu caráter,
meus pais, Joanna e Sebastião.*

*Às minhas irmãs,
Jacqueline, Janaína, Julciléia,
Júnia, Josianne e Jardelli.
Tenho orgulho de vocês.
Que bom que vocês existem!!!!*

*A minha querida afilhada e sobrinha
Larissa, seu sorriso me encanta
e me deixa cheia de alegria.*

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. **Maria Olímpia de Oliveira Rezende** pela confiança e orientação, e compreensão nos momentos em que mais precisei.

Ao **Paulo**, que você tenha aprendido algo comigo, como eu aprendi com você.

Aos antigos colegas do laboratório de Química Ambiental, **Solange, Ademir, Claudemir, Allan, Frank, Sônia, Marcelo, Rossine, Érica, Lurdinha e Leonardo**, que de uma forma ou outra contribuíram para minha formação. Que saudades que tenho das conversas sobre química durante os cafezinhos no laboratório!!!!

Não devo esquecer também dos colegas **Elias, Almir, Paula, Raquel, Elke**. E dos atuais colegas de laboratório **Ezequiel, Maurício, Joel, Bruno, Fabiane, Cleber, Roberta, Regis, Livia, Flávia**.

A minha querida **família**, alicerce de toda a minha formação pessoal.

A minha nova família "**Braga e Luz**", as quais me receberam de braços abertos.

As minhas eternas amigas da **República PA**.

Aos amigos de grande convívio, **Marco Braga, Sheila, Brian e Bárbara**.

Aos meus alunos e colegas de trabalho da Faculdade de Engenharia da Universidade do Estado de Minas Gerais (**UEMG**).

Aos amigos da turma de **Química 97 da UFV**, que nossa amizade prevaleça!

Aquelas que dividiram o teto, as alegrias e tristezas, **Marisa, Roberta e Lucimar, Shirley, Lia, Idaliria**, principalmente pela amizade.

Às secretarias da seção de Pós-Graduação, **Silvia e Andréia** e às funcionárias da Biblioteca pela constante disposição em ajudar-me.

Ao **IQSC** pelo apoio institucional.

Os **funcionários** do IQSC.

Aos Funcionários do laboratório de Estradas, **Departamento de Transporte**, em especial ao Gigante.

A **Capes** pelo apoio financeiro.

À **FAPESP**, pelo apoio ao Projeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram na realização desta tese, meu muito obrigado.

Em especial, à minha querida **Divininha**, que me mostrou além do seu grande profissionalismo e de sua dedicação, a fundamental importância entre duas pessoas: a amizade, principalmente nos momentos mais difíceis.

*Não sou nada diante
deste vasto universo,
mas uma partícula
que o faz por completo.*

Jussara Cotta

RESUMO

Um dos principais problemas ambientais que encaramos hoje é a contaminação do solo por vazamento de tanques de armazenagem de combustíveis. Os combustíveis armazenados se compõem de vários hidrocarbonetos de petróleo, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Eles são selecionados pela US EPA e pelo NIOSH como prioritários, devido à carcinogenicidade, mutagenicidade e sua persistência no ambiente. Este trabalho propõe meios de recuperação de solos contaminados utilizando a vermicompostagem. Investigou-se o papel da matéria orgânica durante o processo para melhorar a atividade de remoção no sistema solo, bem como o papel da minhoca. Em diferentes caixas foi adicionado solo dopado a 2% de diesel (v/v) e quantidades estabelecidas de esterco bovino. A inoculação foi realizada com minhoca *Eisenia foetida*. Foram realizadas 7 coletas durante 3 meses e determinadas as concentrações dos HPAs por cromatografia líquida de alta eficiência, além de análises que indicam a humificação e mineralização. Verificou-se, através da determinação da concentração dos contaminantes durante o processo, que houve a remoção desses contaminantes e que a técnica de vermicompostagem pode ser aplicada para remediar solos contaminados por HPAs. As vantagens da vermicompostagem são: pode ser realizada no próprio local contaminado, é um processo natural, deixa o solo mais rico em nutrientes, além de ser um processo economicamente viável. Durante o processo, percebem-se diferenças nas características físico-químicas do solo devido ao processo de mineralização e um aumento do teor de ácido húmico. Também foi feito o estudo da sorção dos compostos naftaleno, antraceno e benzo(a)pireno na matriz solo e no produto final da vermicompostagem, o vermicomposto, a fim de verificar a capacidade que estes compostos têm de sorver ou estarem disponíveis para o processo de degradação. Verifica-se que com o aumento do número de anéis aromáticos há uma maior sorção com as matrizes estudadas.

ABSTRACT

One of the main environmental problems that we face today is the soil contamination due to storage fuel tanks leakages. Fuels are comprised of a variety of hydrocarbons, among them are the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Those are classified by US-EPA and NIOSH as priority contaminants, due to their carcinogenic and mutagenic characteristics and their persistence in the environment. This work proposes ways of recovering contaminated soil with such hydrocarbons using vermicomposting. It was investigated the role of organic matter during the process to improve the PAHs degradation in the soil system, as well as the influence of the earthworms. In different boxes it was added soil doped with 2% of diesel and established amounts of manure cast. The inoculation was carried out with *Eisenia foetida* earthworm. Seven samplings were performed during three months and the PAHs determined by HPLC, as well as analyses that indicated the humification. By following the contaminants concentration during the process, it was observed that vermicomposting can be applied to clean up contaminated soils by degrading the contaminants, proving the vermicomposting is an useful tool for soil remediation. The advantages of the vermicomposting are: it can be carried out in situ; it is a natural process that leaves the soil enriched with nutrients; and it is economically viable. During the process, differences in the physico-chemical characteristics of the soil were observed due to the mineralization process and an increase in the humic acid content. The sorption of naphthalene, anthracene and benzo(a)pyrene in soil and in vermicompost was also studied, in order to verify the ability and availability of those compounds for the degradation process. The increase of the number of aromatic rings takes to a greater sorption in the environmental matrices soil and vermicompost.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema mecanístico para a formação de HPAs por meio de pirólise (LOPES e ANDRADE, 1996).	24
Figura 2 - Região K, L e baía do benzo[a]antraceno (BRAGA et al., 1999).	28
Figura 3 – Estrutura dos HPAs estudados (NIOSH, 1989).	31
Figura 4 – Cromatografo líquido utilizado.	34
Figura 5 - Espectro UV-Vis do naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno.	49
Figura 6 - Espectro de fluorescência do naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno.	50
Figura 7 - Espectro UV-Vis do fenantreno, antraceno, fluorenteno e pireno.	52
Figura 8 - Espectro de fluorescência do fenantreno, antraceno, fluorenteno e pireno.	52
Figura 9 - Espectro UV-Vis do b[a]antraceno, criseno, b[e]pireno e b[e]acefenantrileno.	52
Figura 10 - Espectro de fluorescência do b[a]antraceno, criseno, b[e]pireno e b[e]acefenantrileno.	53
Figura 11 - Espectro UV-Vis do b[k]fluoranteno, b[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, b(g,h,i)perileno.	53
Figura 12 - Espectro de fluorescência do b[k]fluoranteno, b[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, b(g,h,i)perileno.	53
Figura 13 - Espectro UV-Vis do Indeno(1,2,3,cd)pireno.	54
Figura 14 - Espectro fluorescência do Indeno(1,2,3,cd)pireno.	54
Figura 15 - Cromatograma obtido pelo detector de UV-Vis para a solução padrão (para identificação dos HPAs ver Tabela 2).	56
Figura 16 – Cromatograma obtido pelo detector fluorescência para a solução padrão (para identificação dos HPAs ver Tabela 2).	56
Figura 17 - Curvas analíticas dos HPAs	59
Figura 18 – Seleção do solvente para extração dos 17 HPAs. O eixo vertical é a razão dos sinais para os HPAs extraídos do solo pelos outros solventes comparativamente ao obtido com a acetona.	63
Figura 19 – Atividades das áreas contaminadas em São Paulo (1.336 casos), 2004 (FURTADO, 2005).	71
Figura 20 – Principais agentes contaminantes em São Paulo (FURTADO, 2005).	71
Figura 21 – Estágios do processo de remediação em São Paulo, 2004 (FURTADO, 2005).	71
Figura 22 – Ciclo de reprodução da <i>Eisenia foetida</i>	77

Figura 23 - Minhoca <i>Eisenia foetida</i>	81
Figura 24 - Montagem das caixas de compostagem.	83
Figura 25 - Caixas de compensado utilizadas no tratamento.	83
Figura 26 – Concentrações (mg kg^{-1}) dos HPAs nas amostras durante o processo da vermicompostagem.	87
Figura 27 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) da amostra do experimento E no 1º dia. O extrato foi diluído 1:9 v/v antes da corrida cromatográfica.	94
Figura 28 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) da amostra do experimento E no 1º dia. O extrato foi diluído 1:9 v/v antes da corrida cromatográfica.	95
Figura 29 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) da amostra do experimento E no 90º dia.	95
Figura 30 - Fotografias tiradas na montagem dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar.	96
Figura 31 - Fotografias tiradas após 3 meses dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar.	98
Figura 32 – Experimento após 3 meses do processo de vermicompostagem utilizando esterco bovino sem pré-compostar	99
Figura 33 – Biomassa das minhocas no início do processo e ao final de 3 meses, utilizando esterco bovino (a) sem pré-compostar e (b) pré-compostado.	101
Figura 34 – Tamanho apresentado pelas minhocas após 3 meses do processo.	101
Figura 35 – Maior tamanho apresentado pelas minhocas após o processo de vermicompostagem.	102
Figura 36 – Minhocas em cada experimento (B, C, D, E e F) após 3 meses utilizando esterco bovino sem pré-compostar.	102
Figura 37 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento B.	103
Figura 38 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento C.	104
Figura 39 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento D.	104
Figura 40 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato extraído das minhocas do experimento E.	104
Figura 41 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento F.	104
Figura 42 - Modelo de ácido húmico proposto por STEVENSON, em 1982 (adaptado de STEVENSON, 1985).	121
Figura 43 – Modelo de ácido húmico proposto por SCHULTEN e SCHNITZER (1993).	121
Figura 44 – Estrutura tridimensional proposta por SEIN Jr. et al.	122
Figura 45 - Curva de distribuição granulométrica do solo.	140
Figura 46 – Teor de matéria orgânica das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-	141

compostado.

Figura 47 – CTC das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	142
Figura 48 – pH das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	142
Figura 49 – Teor de umidade das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	144
Figura 50 – Curvas analíticas utilizadas para a determinação de carbono orgânico total - (A) em MG L^{-1} e (B) em mg.	145
Figura 51 – Carbono orgânico das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar. *Coletas dos experimentos realizadas em triplicata.	145
Figura 52 - Teor de ácidos húmicos nas amostras dos experimentos B, C, D, E e F do 1º e 90º dia de vermicompostagem utilizando esterco bovino sem pré-compostar (A) e pré-compostado (B).	146
Figura 53 – Razão C/N do ácido húmico extraído dos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	150
Figura 54 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de Ba(OH)_2) com $\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 25% de esterco bovino bovino e 25% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	151
Figura 55 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de Ba(OH)_2) com $\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 50% de esterco bovino bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	151
Figura 56 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de Ba(OH)_2) com $\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 60% de esterco bovino bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	152
Figura 57 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de Ba(OH)_2) com $\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 75% de esterco bovino bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	152
Figura 58 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de Ba(OH)_2) com $\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referente aos experimentos de 100% de esterco bovino bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	152
Figura 59 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca(CH}_3\text{COO)}_2$) com $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 25% de esterco bovino bovino e 25% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	153
Figura 60 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca(CH}_3\text{COO)}_2$) com $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 50% de esterco bovino bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	153

Figura 61 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	154
Figura 62 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 75% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	154
Figura 63 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referente aos experimentos de 100% de esterco bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	154
Figura 64 - Espectros de absorbância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 25% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	156
Figura 65 - Espectros de absorbância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 50% de esterco bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	156
Figura 66 - Espectros de absorbância no UV/visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	157
Figura 67 - Espectros de absorbância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 75% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	157
Figura 68 - Espectros de absorbância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 100% de esterco bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	157
Figura 69 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 25% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	158
Figura 70 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 50% de esterco bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	159
Figura 71 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	159
Figura 72 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 75% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	159
Figura 73 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 100% de esterco bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.	160
Figura 74 – Isotermas de sorção (VIEIRA, 1996)	173
Figura 75 – Classificação das isotermas de sorção	176
Figura 76 – Isoterma de Freundlich da sorção do antraceno (A) e naftaleno (B) em vermicomposto (concentração de naftaleno sorvido por g de vermicomposto versus	181

concentração em equilíbrio).

Figura 77 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do naftaleno em vermicomposto (log da concentração de naftaleno sorvido por g de vermicomposto versus log da concentração em equilíbrio). 181

Figura 78 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do naftaleno em solo (log da concentração de naftaleno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio). 182

Figura 79 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do naftaleno em solo calcinado (log da concentração de naftaleno orvido por g de solo calcinado versus log da concentração em equilíbrio). 182

Figura 80 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do antraceno em vermicomposto (log da concentração de antraceno sorvido por g de vermicomposto versus log da concentração em equilíbrio). 182

Figura 81 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do antraceno em solo (log da concentração de antraceno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio). 183

Figura 82 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do antraceno em solo calcinado (log da concentração de antraceno sorvido por g de solo calcinado versus log da concentração em equilíbrio). 183

Figura 83 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do benzo[a]pireno em vermicomposto (log da concentração de benzo[a]pireno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio). 183

Figura 84 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do benzo[a]pireno em solo (log da concentração de benzo[a]pireno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio). 184

Figura 85 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do benzo[a]pireno em solo calcinado (log da concentração de benzo[a]pireno sorvido por g de solo calcinado versus log da concentração em equilíbrio). 184

Figura 86– Comportamento do contaminante no solo (D`AGOSTINHO e FLUES, 2006). 186

Figura 87– Percentual de remoção do HPA durante o biorremediação versus massa molar do HPA. Onde: (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo. 197

Figura 88– Percentual de remoção do HPA durante o biorremediação versus Kow. Onde: (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo. 197

Figura 89 – Percentual de remoção do HPA durante o biorremediação versus solubilidade em água. Onde: (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo. 198

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas dos HPAs e seus sinônimos (LUNSTEDT, 2003).	26
Tabela 2 – Alguns dos parâmetros otimizados na tentativa de separação dos HPAs.	47
Tabela 3 - Comprimentos de onda de excitação e emissão (nm) utilizadas por algumas literaturas e aqueles obtidos neste trabalho.	48
Tabela 4 – Tempo de retenção (tr) e validação do método em termos de linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).	58
Tabela 5 - Recuperação (R) e desvio padrão relativo (DPR) para extração por ultra-som de solo com metanol, acetonitrila e acetona como solventes.	62
Tabela 6 – Percentual de remoção dos HPAs (%) durante o processo de biorremediação em cada experimento.	91
Tabela 7 - Conformação de substâncias húmicas em função do pH e da concentração iônica.	119
Tabela 8 - Caracterização física e química do solo utilizado.	139
Tabela 9 - Teor de cinzas (%) das amostras de ácidos húmicos.	147
Tabela 10 - Teor (em massa) de C, H, N, S e O, e razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C das amostras de ácidos húmicos, utilizando esterco bovino sem pré-compostar.	148
Tabela 11 - Teor (em massa) de C, H, N, S e O, e razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C das amostras de ácidos húmicos, utilizando esterco bovino pré-compostado.	149
Tabela 12 - Acidez total, carboxílica e fenólica das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar (valores em mmol _c g ⁻¹).	155
Tabela 13 - Acidez total, carboxílica e fenólica das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos utilizando esterco bovino pré-compostado (valores em mmol _c g ⁻¹).	155
Tabela 14 - Valores de E ₄ /E ₆ das amostras de ácidos húmicos.	158
Tabela 15 - Características que identificam o tipo de sorção (química ou física) (OLIVEIRA, 2003).	172
Tabela 16 - Dados de sorção dos HPAs estudados segundo o modelo de Freundlich.	186
Tabela 17 – Coeficiente de distribuição (K _d) em L kg ⁻¹ numa dada concentração e coeficiente de distribuição em relação ao teor de carbono orgânico (K _{oc}) L kg ⁻¹ do vermicomposto.	188

Tabela 18 – Coeficiente de distribuição (K_d) em $L\ kg^{-1}$ numa dada concentração e coeficiente de distribuição em relação ao teor de carbono orgânico (K_{oc}) $L\ kg^{-1}$ do solo.	188
Tabela 19 - Comparação dos valores de coeficiente de distribuição (K_d) do naftaleno, do antraceno e do benzo[a]pireno com base nos dados de K_{oc} segundo a EPA (2008) com os dados obtidos experimentalmente das amostras de solo e vermicomposto.	189

LISTA DE ABREVIATURAS

HPAs: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CTC: Capacidade de Troca Catiônica
EPA: Environmental Protection Agency
LOC: Limite de detecção
LOQ: Limite de quantificação
TOC: Carbono Orgânico Total, do inglês *Total Organic Carbon*
C18 : n-octadecil
UV: Ultravioleta
UV-Vis: Ultravioleta visível
UV-Vis-NIR: Ultravioleta visível no infravermelho próximo
IV: Infravermelho
CG: Cromatografia Gasosa
CL: Cromatografia Líquida
DPR: Desvio Padrão Relativo
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CG-EM: Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas
 K_d : Coeficiente de distribuição
 K_{oc} : Coeficiente de distribuição do contaminante entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo

SUMÁRIO

<i>CAPITULO I - Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e a otimização do método para suas determinações nas amostras</i>	21
1.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	22
1.1.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	22
1.1.1.1. Aspectos Históricos	22
1.1.1.2. Fontes de emissão de HPAs	23
1.1.1.3. Formação de HPAs	24
1.1.1.4. Propriedades físicas e químicas	25
1.1.1.5. Atividades biológicas	26
1.1.1.6. HPAs e o ambiente	29
1.1.2. A Cromatografia	12
1.1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	33
1.1.2.2. Detectores	35
1.1.2.2.1. Detector de fluorescência	36
1.1.3. Metodologia analítica	37
1.1.3.1. O otimização do método para a determinação dos HPAs nas amostras	37
1.2. OBJETIVO	41
1.3. METODOLOGIA	41
1.3.1. Limpeza do material a ser utilizado	41
1.3.2. Reagentes e soluções-padrão de referência	41
1.3.3. O solo	42
1.3.4. Determinação do intervalo de linearidade dos compostos	42
1.3.5. Avaliação da sensibilidade: limite de detecção e quantificação	43
1.3.6. Tratamento estatístico dos dados ou avaliação do método	43
1.3.7. Branco do método	44
1.3.8. Extração da amostra	45
1.3.9. Instrumentação e separação cromatográfica	45
1.3.10. Quantificação das amostras	46
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
1.4.1. Otimização das condições cromatográficas	46

1.4.2. Separação cromatográfica	55
1.4.3. Linearidade, sensibilidade e precisão	57
1.4.4. Seleção do solvente de extração	61
1.5. CONCLUSÕES	64
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPITULO II - A biorremediação utilizando a vermicompostagem	69
2.1. FUNDAMENTOS TEORICOS	70
2.1.1. Ocorrência dos HPAs no ambiente	70
2.1.2. Processo de remediação	72
2.1.3. A biorremediação	72
2.1.4. A vermicompostagem e sua utilização como forma de remediação	73
2.1.4.1. As minhocas: Em especial <i>Eisenia foetida</i>	74
2.2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	78
2.3. OBJETIVO	80
2.4. METODOLOGIA	80
2.4.1. As minhocas utilizadas	80
2.4.2. O solo	81
2.4.2.1. Adição de diesel ao solo	81
2.4.3. A vermicompostagem	82
2.4.4. A coleta	84
2.4.5. A extração e a determinação dos HPAs	85
2.4.6. A extração e a determinação qualitativa dos HPAs nas minhocas após o 90º dia do processo.	85
2.4.7. A biomassa das minhocas	86
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
2.5.1. A remoção dos HPAs durante o processo de vermicompostagem	86
2.5.2. O aspecto do solo e das minhocas após o processo	95
2.5.3. Compostos derivados de petróleo nas minhocas	103
2.6. CONCLUSÕES	105
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
CAPITULO III - Caracterização físico-química e estudo da humificação durante a biorremediação	110
3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	111
3.1.1. As substâncias húmicas	116
3.1.1.1. Fracionamento das substâncias húmicas	118

3.1.1.2. Estruturas químicas propostas para os ácidos húmicos	120
3.2. OBJETIVOS	123
3.3. METODOLOGIA	123
3.3.1. Análises granulométricas do solo	123
3.3.2. Características físico-químicas	124
3.3.2.1. Determinação do pH	124
3.3.2.2. Teor de matéria orgânica	125
3.3.2.3. Determinação da umidade do solo a 100-110 ⁰ C	125
3.3.2.4. Determinação da capacidade de troca catiônica (CTC)	126
3.3.2.4.1. Determinação dos cátions metálicos totais trocáveis	126
3.3.2.4.2. Acidez trocável	127
3.3.2.5. Determinação do carbono orgânico total	128
3.3.3. Os Ácidos húmicos	129
3.3.3.1. A extração	129
3.3.3.2. Teor de Cinzas	131
3.3.3.3. Análise Elementar (CHNS)	131
3.3.3.4. Acidez Total, Carboxílica e Fenólica	133
3.3.3.4.2. Acidez total	134
3.3.3.4.3. Acidez carboxílica	134
3.3.3.5. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta/Visível	135
3.3.3.6. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)	136
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
3.4.1. Características do solo estudado	139
3.4.2. Características físicas e químicas das amostras durante o processo	141
3.4.3. Ácidos húmicos	146
3.4.3.1. Extração dos ácidos húmicos	146
3.4.3.2. Teor de cinzas	147
3.4.3.3. Razão C/N dos ácidos húmicos	148
3.4.3.4. Acidez Total, Carboxílica e Fenólica	151
3.4.3.5. Espectros de absorbância na região do UV/visível	155
3.4.3.6. Espectros no infravermelho	158
3.5. CONCLUSÕES	161
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
<i>CAPITULO IV- O estudo da sorção dos compostos naftaleno, antraceno e b[a]pireno no solo e vermicomposto</i>	167

4.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	168
4.1.1. Conceito Teórico de sorção	169
4.1.2. Isoterma de sorção	174
4.1.2.1. As classes das isotermas de sorção	175
4.1.2.1.1. Isotermas do tipo S	176
4.1.2.1.2. Isotermas do tipo L	176
4.1.2.1.3. Isotermas do tipo H	176
4.1.2.1.4. Isotermas do tipo C	177
4.2. OBJETIVOS	177
4.3. METODOLOGIA	177
4.3.1. Reagentes e solventes utilizados no experimento de sorção	177
4.3.2. Coleta e preparo das amostras	177
4.3.3. Sorção dos HPAs em vermicomposto, solo e solo calcinado	178
4.3.4. Coeficiente de distribuição (K_d) e coeficiente de distribuição do contaminante na fração orgânica do solo (K_{oc})	179
4.4. RESULTADO E DISCUSSÃO	180
4.4.1. Determinação de coeficiente de distribuição (K_d)	187
4.5. CONCLUSÕES	191
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
5. CONCLUSÕES FINAIS	195
5. Trabalhos Futuros	199

CAPITULO I

***Os hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos e a otimização
do método para suas
determinações nas amostras***

1.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

1.1.1.1. Aspectos Históricos

Pode-se considerar como o início da química dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) o isolamento do benzo[a]pireno a partir do carvão em 1931 e, subsequente, a sua síntese no mesmo ano. A sua identificação como uma nova substância química, em 1933, permitiu demonstrar que o benzo[a]pireno é um forte agente cancerígeno em animais (LOPES e ANDRADE, 1996).

As primeiras provas dos riscos ocupacionais e ambientais dos HPAs foram obtidas em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem são cancerígenos em animais e, em 1942, também pela atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental. Posteriormente, a atividade biológica foi observada em extratos de material particulado ambiental coletado do *smog* fotoquímico de Los Angeles. Em 1949, o benzo[a]pireno foi identificado em fuligem doméstica e, em 1952, em material particulado ambiental. Em 1970 o benzo[a]pireno e outros HPAs foram caracterizados como agente cancerígenos de distribuição mundial, em ambientes respiráveis, como constituintes de aerossóis urbanos (LOPES e ANDRADE, 1996).

Nos anos 70 é reconhecido da carcinogenicidade atribuído ao benzo[a]pireno e demonstrado que a atividade cancerígena dos extratos de partículas atmosféricas não é somente devida aos HPAs mas, também, à presença de outras substâncias orgânicas ainda desconhecidas (LOPES e ANDRADE, 1996).

1.1.1.2. Fontes de emissão de HPAs

Os HPAs são produzidos pela combustão incompleta de combustíveis fósseis, bem como por processos diagenéticos durante a formação dos combustíveis fósseis, em pequenas quantidades por incêndios de florestas, possivelmente pela síntese microbiológica, pelos motores de combustão à gasolina e especialmente pelos de combustão a diesel, o alcatrão da fumaça do cigarro, a superfície dos alimentos chamuscados ou queimados, fumaça da queima de madeira ou carvão, e outros processos de combustão parcial, nos quais o carbono ou combustível não são convertidos em CO ou CO₂ (CODINA et al., 1994; BERSET et al., 1999; BAIRD, 2002).

Os HPAs são emitidos por fontes naturais e antropogênicas. A contribuição de fontes naturais de HPAs é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queimada espontânea de florestas e às emissões vulcânicas. No entanto, as fontes antropogênicas são as maiores responsáveis pela liberação dos HPAs ao meio ambiente (LOPES e ANDRADE, 1996).

Os HPAs são também oriundos de fontes tecnológicas que podem ser móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis, destaca-se o motor de combustão interna como o principal emissor de HPA para o ambiente, estando presente em diversos veículos de transporte de carga e passageiros. As fontes estacionárias são divididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor e aquelas ligadas à atividade industrial e incineração (principalmente os rejeitos químicos) e podem emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta (LOPES e ANDRADE, 1996).

As fontes veiculares de emissão têm uma grande importância devido à complexidade e quantidade, cada vez maior, de material que é lançado na

atmosfera. O material particulado emitido por veículos a diesel, por exemplo, é constituído principalmente de carbono elementar que atua como superfície de condensação de HPAs e outros compostos orgânicos (LOPES e ANDRADE, 1996).

As maiores fontes de emissão dos HPAs são em geral os geradores de calor e energia, incineradores, produção de coque, produção de carvão vegetal e motores de veículos.

1.1.1.3. Formação de HPAs

Os HPAs formam-se pela combustão incompleta de substâncias orgânicas a altas temperaturas, através de processos como a pirólise e pirossíntese e, deste modo, são essencialmente emitidos por todo tipo de combustão. Na pirólise dá-se a quebra parcial de substâncias orgânicas em moléculas menores, as quais, por sua vez, recombina-se originando os hidrocarbonetos policíclicos que são relativamente estáveis (JUHASZ e NAIDU, 2000). A formação pirolítica de HPAs é bastante complexa e variável, dependendo de fatores como pressão e temperatura. O esquema mecanístico aceito para esta reação envolve a polimerização via radicais livres, em várias etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados (Figura 1).

Figura 1 – Esquema mecanístico para a formação de HPAs por meio de pirólise (LOPES e ANDRADE, 1996).

1.1.1.4. Propriedades físicas e químicas

Os principais processos e propriedades físicas que afetam o destino dos HPAs durante o processo atmosférico de sua fonte para o receptor são a pressão de vapor, temperatura, deposição úmida e seca e aglomeração de partículas. A Tabela 1 apresenta as principais características dos HPAs estudados.

Os HPAs são compostos que possuem dois ou mais anéis benzênicos condensados em suas estruturas, e contêm somente átomos de carbono e hidrogênio. Geralmente, os HPAs são compostos lipofílicos que mostram alta afinidade pela matéria orgânica. Contudo, HPAs, individualmente, diferem substancialmente em suas propriedades físico-químicas. Como mostra a Tabela 1, propriedades como a solubilidade em água e pressão de vapor variam de cinco a doze ordens de magnitude quando se têm de dois a seis anéis de benzeno na molécula de HPAs, respectivamente. Eles existem nos estados líquido e sólido e apresentam ponto de ebulição maior do que 218°C, sob pressão atmosférica normal. Os HPAs de baixa massa molar são muito mais solúveis em água e voláteis que os HPAs de alta massa molar, os quais apresentam maior hidrofobicidade do que os compostos com baixa massa molar. A diferença na hidrofobicidade é também refletida pelo coeficiente de partição octanol:água ($\log K_{ow}$) mostrado na Tabela 1. O coeficiente de partição água:octanol varia entre 3,37 para o naftaleno (composto com 2 anéis) e 6,75 para o dibenzo[a,h]antraceno (LUNSTEDT, 2003).

As transformações químicas implicam em modificações das propriedades físicas dos HPAs. Geralmente as reações que envolvem os HPAs podem ser classificadas como de substituição (um átomo de hidrogênio é trocado por outro elemento ou grupo) ou adição (uma ligação dupla é desfeita). O processo de adição seguido de eliminação resulta em reação de substituição. Os produtos destas

reações podem, subseqüentemente, sofrer novas transformações, inclusive a abertura de anéis, e dar origem a substâncias mais complexas (LOPES e ANDRADE, 1996).

O tipo de reação que um HPA pode experimentar depende de sua própria estrutura e das espécies com quem interagem. As posições em que ocorrem as reações são determinadas pela estabilidade das espécies intermediárias. São mais reativas aquelas adjacentes à fusão dos anéis por serem energeticamente favorecidas (LOPES e ANDRADE, 1996).

Tabela 1 - Características físicas dos HPAs e seus sinônimos (LUNSTEDT, 2003)

HPA	Nº de anéis	FM	MM (gmol ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)	SA* (mgL ⁻¹)	PV* (Pa)	Log K _{ow}	Sinônimos
<i>Naftaleno</i>	2	C ₁₀ H ₈	128,17	80,2	218	31	1,0x10 ⁻²	3,37	Nafteno
<i>Acenaftileno</i>	3	C ₁₂ H ₈	152,20	92,5	280	16	9,0x10 ⁻¹	4,00	Acenaftaleno
<i>Acenafteno</i>	3	C ₁₂ H ₁₀	154,21	93,4	279	3,8	3,0x10 ⁻¹	3,92	
<i>Fluoreno</i>	3	C ₁₃ H ₁₀	166,22	115	295	1,9	9,0x10 ⁻²	4,18	
<i>Fenantreno</i>	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	99,2	340	1,1	2,0x10 ⁻²	4,57	
<i>Antraceno</i>	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	215	340	0,045	1,0x10 ⁻³	4,54	
<i>Pireno</i>	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	151	404	0,13	6,0x10 ⁻⁴	5,18	Benzo[d,e,f]fenantreno
<i>Fluoranteno</i>	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	108	384	0,26	1,2x10 ⁻³	5,22	Benzo[j,k]fluoreno
<i>Benzo[a]antraceno</i>	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	167	435	0,011	2,8x10 ⁻⁵	5,91	1,2-benzantraceno; benzo[b]fenantreno; 2,3-benzofenantreno; tetrafeno
<i>Criseno</i>	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	258	448	0,006	5,7x10 ⁻⁷	5,91	1,2-benzofenantreno; benzo[a]fenantreno
<i>Benzo[e]acefenantrileno</i>	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	168	-	0,0015	-	5,80	Benzo[b]fluoranteno; 3,4-benzofluoranteno; 2,3-benzofluoranteno
<i>Benzo[k]fluoranteno</i>	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	217	480	0,0008	5,2x10 ⁻⁸	6,00	11,12-benzofluoranteno
<i>Benzo[a]pireno</i>	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	177	495	0,0038	7,0x10 ⁻⁷	5,91	3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno
<i>Benzo[e]pireno</i>		C ₂₀ H ₁₂	252,32	178	311				1,2-benzopireno; 4,5-benzopireno
<i>Dibenzof[a,h]antraceno</i>	6	C ₂₂ H ₁₄	278,35	270	524	0,0006	3,7x10 ⁻¹⁰	6,75	1,2,5,6-dibenzantraceno
<i>Indeno[1,2,3-cd]pireno</i>	6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	164	-	0,00019	-	6,50	2,3-fenilenopireno
<i>Benzo[g,h,i]perileno</i>	6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	278	-	0,00026	1,4x10 ⁻⁸	6,50	1,12-benzoperileno

*SA - solubilidade em água, PV - pressão de vapor, FM - fórmula molecular, PF - ponto de fusão, PE - ponto de ebulição, K_{ow} - coeficiente de partição octanol:água, MM - massa molar.

1.1.1.5. Atividades biológicas

Uma grande variedade de substâncias químicas presentes no ambiente são benignas ou ativamente benéficas. Contudo, tem aumentado muito o relato de poluentes ambientais que apresentam atividade mutagênica e cancerígena. A caracterização da atividade biológica e a quantificação destes compostos no ambiente não é o suficiente para determinar o risco individual. Geralmente, após

absorção pelo organismo, estas substâncias são convertidas em metabólitos ativos. Uma rigorosa avaliação de riscos requer a determinação dos efeitos resultantes da exposição, conhecimento da relação dose-resposta e compreensão do mecanismo de mutagênese para cada substância química considerada. Isto finalmente depende de metodologias analíticas adequadas para a quantificação de metabólitos ativos oriundos de poluentes ambientais (LOPES e ANDRADE, 1996).

O processo de mutagênese está intimamente relacionado com a carcinogênese. Quando uma substância química interage com o material genético podem aparecer as mutações, ou seja, alterações no material genético. A carcinogênese é mais complexa e envolve duas etapas principais: a iniciação e a promoção. A iniciação caracteriza-se pela ocorrência de uma mutação e a promoção pelo crescimento celular intenso e desordenado das células iniciadas ou mutantes originando focos de proliferação dos quais alguns se desenvolvem em tumores (ANDRADE, 2000).

A atividade carcinogênica de um composto particular é dependente de vários fatores estruturais da molécula como forma, tamanho, fatores estéricos e potencial de ionização.

Os HPAs estão entre aqueles poluentes ambientais que apresentam atividade cancerígena e mutagênicas, tendo sido comprovado que provocam tumoração em animais e mutações em bactéria.

Investigações sobre a atividade cancerígena relativa de HPAs indicam que os epóxidos formados em *região de baía*, em moléculas angulares, são mais reativos que os epóxidos possíveis na mesma molécula ou epóxidos formados em moléculas lineares (Figura 2). Esta região é conhecida por propiciar vários tipos de reações e a reatividade pode ser resultante da estabilidade do carbocátion formado como

intermediário; o mesmo não ocorre com os HPAs lineares (LOPES e ANDRADE, 1996).

A ação carcinogênica dos HPAs tem sido principalmente observada em compostos tri-, tetra-, penta- e hexa-cíclicos e parece estar relacionada com a existência da *região ativa K* e da *região inativa L*. A *região K* possui alta densidade eletrônica e a reatividade carcinogênica pode ser formada via epoxidação na *região K*, enquanto que a reação na *região L* conduz a um produto que é facilmente detoxificado (SUNDBERG et al., 1998; QIANHUAN, 1998.)

Similaridades estruturais entre metabólitos ativos (dióis e epóxidos) de diferentes HPAs conduziram à proposta da teoria da *região de baía*, na qual a posição do anel epóxido reativo dentro da molécula é altamente relacionada à sua atividade biológica. A atividade é alta se o anel epóxido faz parte da região da baía. As regiões K e L, juntamente com a região de baía, estão representadas na estrutura do benzo[a]antraceno na Figura 2 (BRAGA et al., 1999; BARONE et al., 1996).

Figura 2 - Região K, L e baía do benzo[a]antraceno (BRAGA et al., 1999).

Dados sobre o potencial carcinogênico e mutagênico dos HPAs são vastos na literatura (BJØRSETH e BECHER, 1986; LEE et al., 1981; COOKE e DENNIS,

1986). Sabe-se que de 70 a 90% dos cânceres humanos são causados por fatores ambientais (LEE et al., 1981).

Uma ampla faixa de efeitos ecotoxicológicos agudos e crônicos dos HPAs em diversos componentes da biota, incluindo microorganismos, plantas terrestres, biota aquática, anfíbios, répteis e animais terrestres têm sido relatados (LUNSTEDT, 2003), incluindo sobrevivência, reprodução, crescimento e metabolismo, além dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos. Porém, os focos principais da pesquisa toxicológica dos HPAs são a genotoxicidade e carcinogenicidade, comprovando que alguns HPAs alteram o DNA e causam mutação, o que, em alguns casos, pode resultar em câncer (LUNSTEDT, 2003).

1.1.1.6. HPAs e o ambiente

Os HPAs representam um importante grupo de micropoluentes orgânicos (xenobióticos) devido à alta capacidade de distribuição no ambiente (atmosfera, água e solo) (PEREIRA NETTO et al., 2000), sendo encontrados em matrizes ambientais como uma mistura extremamente complexa contendo numerosos isômeros em uma faixa extensa de concentração (GORSHKOV et al., 2003; VERWEIJ et al., 2004). HPAs são considerados indicadores de contaminação por combustíveis, por não se degradarem no ambiente. Comparando-se os HPAs com menos de 4 anéis com os que contêm 4 ou mais, estes últimos são menos voláteis e menos solúveis em água. Os HPAs permanecem no ambiente por um longo tempo. Por essa razão, é importante monitorar os HPAs tendo 4 ou mais anéis em amostras ambientais contaminadas por combustíveis (UTSUMI et al., 1998). Nestes estudos fica claro que a persistência de HPAs no ambiente solo está possivelmente relacionada com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA. Este fato fica

aparente porque os compostos com alta massa molar são menos susceptíveis à degradação, lixiviação e volatilização (WIIDFL et al., 1992).

Devido às suas propriedades físico-químicas, especialmente os HPAs de alta massa molar são dificilmente degradáveis e tendem a se acumular em diferentes compartimentos ambientais (PEREIRA NETTO et al., 2000; VERWEIJ et al., 2004; BERSET et al., 1999; TOMANIOVÁ et al., 1998; KOH et al., 2004; RHODES et al., 2005; QUANTIN et al., 2005).

Embora existam centenas de HPAs no ambiente, somente 17 HPAs são selecionados pela US Environmental Protection Agency (US EPA) e o National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) como poluentes prioritários, a saber: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]pireno, benzo[b]fluoranteno ou b(e) acefenantrileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno, sendo monitorados rotineiramente para fins reguladores. A EPA (EPA, 600/4-89/017,1988) considera como poluente prioritário para investigação ambiental os compostos da Figura 3, com exceção ao benzo[e]pireno, enquanto que o NIOSH (Method 5506,1998) considera como prioritário todos os compostos apresentados. Ambas as agências citadas são do governo norte-americano, pois no Brasil não há legislação ambiental e/ou ocupacional a respeito dos HPAs em solo.

Figura 3 – Estrutura dos HPAs estudados (NIOSH, 1989).

Devido à sua alta carcinogenicidade, mutagenicidade e persistência no ambiente (OBUCHI et al., 1984; ANYAKORA et al., 2005), a EPA tem incluído os 16 HPAs em sua lista de poluentes prioritários e tem desenvolvido métodos para seu monitoramento no ambiente. Em 1986, a EPA propôs uma regulamentação para diminuir os riscos de poluição, incluindo limites de concentração para poluentes orgânicos como o benzo[a]pireno, por exemplo. Na Europa apresenta-se uma lista de seis HPAs - fluoranteno, benzo[a]pireno, Benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno - para monitoramento em águas superficiais usadas para fins de potabilidade.

Os HPAs são adsorvidos nas partículas sólidas do solo, pois a maioria deles apresentam baixa solubilidade em água e alta hidrofobicidade (MIÈGE et al., 1998). No solo, muitos HPAs são fortemente adsorvidos na matéria orgânica, o que os torna relativamente indisponíveis para o processo de degradação. Os HPAs podem,

então, permanecer no solo por muito tempo, possuindo um longo tempo de residência, apesar dos HPAs de baixa massa molar serem praticamente perdidos por processos de degradação, volatilização e lixiviação.

A natureza semi-volátil dos HPAs de baixa massa molar indica que eles existem na atmosfera particularmente como vapor e são, por essa razão, altamente suscetíveis ao processo de degradação atmosférica. Similarmente, em ambiente aquoso, os HPAs de baixa massa molar são mais facilmente dissolvidos, tornando-se disponíveis para vários processos de degradação. Os HPAs de alta massa molar, por outro lado, são primeiramente associados às partículas na atmosfera e água, sendo por essa razão mais recalcitrantes à degradação. Além disso, os HPAs adsorvidos sobre as partículas podem ser transportados a longas distâncias na atmosfera (LUNSTEDT, 2003).

1.1.2. A Cromatografia

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem ao cientista separar componentes muito semelhantes de misturas complexas. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus. Os componentes que são mais fortemente retirados na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas diferenças na mobilidade, os

componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (SKOOG et. al, 2002).

Uma classificação mais básica dos métodos cromatográficos apóia-se nos tipos de fase móvel e estacionária e nos tipos de equilíbrio envolvidos na transferência de solutos entre as fases. Levando em conta a fase móvel pode-se, como exemplo, classificá-la em cromatografia líquida quando a fase móvel é um líquido, e gasosa quando a fase móvel é um gás.

1.1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária. Entretanto, somente no final dos anos 60 foi desenvolvida a tecnologia para a produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10 μm . Esta tecnologia exigiu equipamentos sofisticados operando a altas pressões, que contrastavam acentuadamente com as colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade. O nome Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é empregada para distinguir esses procedimentos mais novos dos métodos básicos, ainda usados para finalidades preparativas. A CLAE é a mais usada de todas as técnicas de separação. As razões para a popularidade do método é a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos das ciências e para o público (SKOOG et. al, 2002).

Para se obter vazões do eluente com fases estacionárias com tamanho de partículas de 2 a 10 μm , comuns na cromatografia líquida moderna, são requeridas pressões de bombeamento de até milhares de libras por polegadas quadradas (psi). Como consequência dessas altas pressões, o equipamento necessário para CLAE tende a ser mais sofisticado e caro do que os encontrados para outros tipos de cromatografia (SKOOG et. al, 2002). A Figura 4 mostra o cromatografo Líquido de Alta Eficiência utilizado no trabalho.

Figura 4 – Cromatografo líquido utilizado

Os trabalhos iniciais em cromatografia líquida estavam baseados em fases estacionárias altamente polares, como água ou trietilenoglicol, suportados em partículas de sílica ou alumina. Um solvente relativamente apolar, como o hexano, serve então como fase móvel. Por razões históricas, atualmente denomina-se esse tipo de cromatografia como cromatografia de fase normal. Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é apolar, geralmente um hidrocarboneto, e a fase móvel é relativamente polar (como água, metanol e acetonitrila). Em cromatografia de fase normal, o componente menos polar é eluído primeiro por ser o mais solúvel na fase móvel. O aumento de polaridade da fase móvel tem efeito de diminuir o tempo de

eluição. Ao contrário, no método de fase reversa, o componente mais polar aparece primeiro e o aumento da polaridade da fase móvel aumenta o tempo de eluição (SKOOG et. al, 2002).

Os empacotamentos para fase ligada são classificadas sendo de fase reversa quando a cobertura ligada tem caráter apolar, e como de fase normal quando o recobrimento contém grupos funcionais polares. Talvez três quartos de toda a CLAE esteja atualmente sendo feita em colunas com empacotamento de fase reversa. Mais comumente, o grupo R do siloxano nesses recobrimentos é a cadeia C8 (*n-octil*) ou a cadeia C18 (*n-octadecil*).

Com essas preparações, os grupos de hidrocarbonetos de cadeia longa são alinhados paralelamente um ao outro e perpendicularmente à superfície da partícula, gerando uma estrutura reticular. Atualmente, não está inteiramente claro o mecanismo pelo qual essas superfícies retêm moléculas do soluto. Os suportes para a maioria dos empacotamentos de fase ligada para cromatografia são preparados com sílica rígida ou com composições à base de sílica (SKOOG et. al, 2002).

1.1.2.2. Detectores

Os detectores de Cromatografia líquida são de dois tipos básicos. Os detectores de propriedades universais ou globais respondem às propriedades da fase móvel como um todo, como índice de refração. Ao contrário, detectores de propriedade do soluto respondem a algumas propriedades do soluto, como absorbância no UV e fluorescência, que não pertencem à fase móvel (SKOOG et. al, 2002).

1.1.2.2.1. Detector de fluorescência

Em condições normais a maior parte das moléculas se encontra no nível energético mais baixo do estado eletrônico (estado fundamental). A absorção de um *quantum* de luz promove a passagem dos elétrons a níveis superiores de energia (estado excitado). Durante o retorno ao estado fundamental, uma parte da energia absorvida é reemitida, sendo este fenômeno conhecido como luminescência. Se a energia é reemitida à partir do primeiro estado singlete excitado, o fenômeno corresponde à fluorescência. A fluorescência corresponde em princípio, ao processo inverso do fenômeno da absorção, uma vez que se produz sempre pela emissão de energia a partir do nível mais baixo do primeiro estado singlete excitado.

A fluorescência de um composto depende de sua estrutura molecular e está quase sempre associada ao sistema eletrônico π . Os elétrons envolvidos numa ligação σ estão, geralmente, fortemente ligados à molécula sendo necessário fornecer mais energia para levar estes elétrons a ocupar um orbital molecular vazio. Assim os espectros eletrônicos produzidos por transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se situam nas zonas de comprimento de ondas mais curtos do espectro eletromagnético. Os elétrons π , ao contrário, estão mais livres que os elétrons σ . O espectro de emissão correspondente se situa na região de comprimentos de onda mais longos.

Os detectores de fluorescência para CLAE têm projetos similares aos fluorímetros e espectrofluorímetros. Na maioria deles, a fluorescência é observada por um detector fotoelétrico posicionado perpendicularmente ao feixe de excitação. Os detectores mais simples empregam uma fonte de excitação de mercúrio e um ou mais filtros para isolar uma banda de emissão de radiação. Os equipamentos mais sofisticados possuem uma fonte de xenônio e empregam um monocromador de rede para isolar a radiação fluorescente (SKOOG et. al, 2002).

1.1.3. Metodologia analítica

1.1.3.1. O otimização do método para a determinação dos HPAs nas amostras

Os melhores métodos disponíveis para monitorar HPAs são a cromatografia líquida (CL) com detecção por fluorescência e ultravioleta e a cromatografia gasosa (CG) acoplada ao espectrômetro de massas. As etapas de separação e detecção para amostras sólidas são descritas no método 8310 da EPA, usando CL com detecção no ultravioleta (UV) e fluorescência e método 8100, usando CG acoplada a espectrômetro de massas. Os vários métodos já validados não deixam dúvidas quanto à vantagem da CL no fracionamento de misturas complexas de HPAs e no “clean-up” de amostras. Por exemplo, os procedimentos analíticos recomendados pela EPA-US são documentados nos métodos 550.1 (água potável), 610 (água residual), 8310 (resíduo sólido) e TO-13 (ar). Todos esses métodos são baseados na CL com detector UV e fluorescência. A CLAE é preferível à cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), pois mesmo que apresente uma eficiência mais baixa na resolução de HPAs com baixa massa molar, as colunas de fase reversa podem realmente separar um número de isômeros HPAs que são difíceis de separar por CGAR (MORET e CONTE, 2000).

No método 8310 da EPA, 1986 (EPA, 2007) recomenda-se a determinação dos HPAs em resíduos sólidos utilizando CLAE e, neste caso, os detectores indicados são UV (254 nm) e fluorescência (excitação: 280 nm e emissão: 389 nm) e coluna de fase reversa HC-ODS Sil-X, de 250 x 2.6 mm com diâmetro de partícula de 5 µm (Perkin Elmer nº. 089-0716). Eluição isocrática por 5 min usando acetonitrila/água (4:6 v/v) e, então, um gradiente de eluição linear a 100% acetonitrila até 25 min, com vazão de 0,5 mL min⁻¹. Nestas condições, o limite de

detecção do método quando utilizado CLAE/fluorescência se mostrou melhor que o sistema CLAE/UV. No sistema CLAE/UV o limite de detecção variou de 0,21 a 2,3 µg/L enquanto que no CLAE/fluorescência situou-se entre 0,013 a 0,66 µg/L.

O método 5506 NIOSH (1998) também trata da determinação dos HPAs por CLAE/UV e fluorescência em série. Neste método recomenda-se o comprimento de onda de 254 nm no UV e os comprimentos de onda de 340 e 425 nm, respectivamente, para excitação e emissão no detector de fluorescência. A coluna de fase reversa recomendada é uma C-18 de 250 x 4,6 mm com diâmetro de partícula de 5 µm. Um gradiente de eluição linear de 60% acetonitrila/40% água para 100% acetonitrila acima de 20 min, seguido a 100% por 20 min e um gradiente linear com as condições iniciais por 5 min, mantendo a temperatura ambiente com uma vazão de 1 mL min⁻¹. Os compostos naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno e criseno são detectados por UV e os demais por fluorescência. Neste método, os limites de detecção e quantificação se mostraram bastante baixos, variando significativamente de um composto para outro (o intervalo de valores para o limite de detecção mostra-se entre 0,0010-0,090 µg para antraceno e benzo[a]antraceno e 0,20-5,0 µg para acenafteno). A extração é realizada com 5 mL de acetonitrila de 30 a 60 minutos em um banho de ultra-som.

Miège et al. (1998) estudaram a determinação de poliaromáticos em lodo de esgoto por CLAE/fluorescência. Uma coluna Bakerbond PAH-16 Plus (J.T. Baker-Mallinckrodt) de 250x3 mm foi usada. A acetonitrila e água foram usadas como solvente de eluição com uma vazão de 0,5 mL min⁻¹. O programa de gradiente de eluição foi de 0-5 min: acetonitrila-(40:60)água; então um gradiente eluição linear de 40% acetonitrila até 5 min a 100% acetonitrila até 30 min, abaixando por eluição isocromática com 100% acetonitrila por 5 min. A temperatura da coluna foi mantida a

45°C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram mudados durante a separação cromatográfica na ordem para obter melhor sensibilidade. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de: 280/340 nm a 0 min, 295/380 nm a 18,2 min, 280/430 nm a 19,3 min, 285/460 nm a 26 min até 35 min. O limite de detecção obtido por injeção direta da mistura padrão dos 16 HPAs estão entre 2 a 100 vezes mais altos usando detector de fluorescência comparado com o detectado por UV, exceto para antraceno e criseno, que possuem limites de detecção similares por UV e por fluorescência.

Para cada método, uma etapa de extração e concentração é requerida e o principal problema para análise de traços de poluentes orgânicos vem da complexidade das várias matrizes, que depende de sua origem (MIÈGE et al., 1998).

Os HPAs individualmente estão presentes no solo em níveis de ng/g ou abaixo, e poucas matrizes podem ser analisadas diretamente. A eliminação dos interferentes, extração, pré-concentração e “clean-up” das amostras são etapas indispensáveis para a determinação dos HPAs. A extração do analito em amostras sólidas continua sendo um passo crítico na análise de contaminantes. Deve-se avaliar o método de extração sempre levando em conta os seguintes aspectos: seletividade para os componentes de interesse, recuperação do analito, volume do solvente orgânico necessário, toxicidade do solvente, tempo de extração e número de passos de “clean-up” requeridos após a extração (FEDOTOV et al., 2004; HAWTHORNE et al., 2000). Cada técnica tem seu próprio mérito e a escolha da extração depende, ainda, de outros fatores como o custo de capital, o custo e a simplicidade de operação e a disponibilidade de um método-padrão ou validado. Existe uma série de técnicas de extração por solventes comumente usadas para a extração de hidrocarbonetos em solo e sedimento (HAWTHORNE et al., 2000;

SONG et al., 2004; SAIM et al., 1997; REIMER e SUAREZ, 1995). Há procedimentos de extração que incluem Soxhlet, ultra-som, agitação mecânica, refluxo com KOH e destilação a vapor, e técnicas que incluem extração por fluído supercrítico, extração líquida pressurizada, entre outras (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2000). A extração em Soxhlet é o método recomendado pela US Environmental Protection Agency (EPA) para a extração de compostos orgânicos semi-voláteis e não-voláteis de matrizes sólidas. Esta extração, cuja eficiência é alta, tem sido por muitos anos o método-padrão para preparar um extrato de solvente das matrizes sólidas contendo HPAs. Contudo, o procedimento é tedioso, pois o tempo de extração é longo, com aproximadamente 16 horas ou mais, requer uma grande quantidade de solvente e pode, ainda, degradar compostos termicamente lábeis (BANJO e NELSON, 2005). Mais recentemente, outras técnicas de extração em amostras ambientais sólidas têm sido desenvolvidas para tentar reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente, como, por exemplo, por ultra-som. Em comparação à extração por Soxhlet, a extração por ultra-som ocorre em curto espaço de tempo (cerca de 15 minutos) e oferece boa recuperação dos analitos, por meio de um equipamento simples e de fácil operação (SUN et al., 1998). A otimização dos parâmetros de extração por ultra-som, incluindo tipo de solvente ou composição do solvente, tempo de extração, carga da amostra e teor de água, é necessária para a obtenção de uma maior eficiência e reprodutibilidade de extração (BERSET et al., 1999). Além disso, para melhorar a recuperação obtida, usa-se um solvente polar, como a acetona ou metanol, minimizando-se, assim, a necessidade da secagem das amostras antes da extração. A secagem de amostras contendo analitos voláteis ou semi-voláteis é um fator de erro, devido à perda desses analitos. Até cerca de 16% de perdas de hidrocarbonetos têm sido observadas, em consequência da secagem das amostras

em forno a 45°C. O uso de alta temperatura na extração em Soxhlet também resulta em perdas de hidrocarbonetos atribuídas à volatilização e/ou oxidação de espécies altamente voláteis e termodinamicamente lábeis. Vários estudos têm sido relatados (BANJOO e NELSON, 2005; SUN et al. 1998) mostrando a eficiência de extração por ultra-som de analitos orgânicos em sedimento e solo utilizando diferentes solventes.

1.2. OBJETIVO

O objetivo desta parte do trabalho foi adaptar um método para análise de HPAs em solo, em nível de mg kg^{-1} (matéria seca), com limites de detecção de HPAs em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} para cada composto. Foram avaliados a recuperação, o limite de detecção e a aplicação do método.

1.3. METODOLOGIA

1.3.1. Limpeza do material a ser utilizado

Toda vidraria utilizada foi imersa em solução de detergente Extran alcalino (Merck) por 24 horas e enxaguada sucessivamente, 6 vezes em água corrente, 3 vezes em água destilada, 1 vez com água isenta de orgânicos e 1 vez com acetona. A secagem foi feita em estufa (exceto material volumétrico). No momento da utilização foram feitas 2 lavagens com acetona.

1.3.2. Reagentes e soluções-padrão de referência

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. O sal de sulfato de sódio foi obtido da Mallinckrodt Chemicals. Os solventes acetona, acetonitrila e metanol foram obtidos da Mallinckrodt Chemicals; os padrões sólidos

dos correspondentes HPAs da Supelco. As soluções-padrão dos HPAs foram preparadas separadamente em uma concentração de 100 mg L^{-1} em acetonitrila. A solução-estoque padrão ou padrão mista foi preparada pela dissolução de quantidades apropriadas dos HPAs em acetonitrila, dependendo da resposta de cada HPA pelo detector de fluorescência e o acenaftileno pelo UV, com as seguintes concentrações: naftaleno ($0,492 \text{ mg L}^{-1}$), acenaftileno ($0,984 \text{ mg L}^{-1}$), acenafteno ($0,032 \text{ mg L}^{-1}$), fluoreno ($0,162 \text{ mg L}^{-1}$), fenantreno ($0,540 \text{ mg L}^{-1}$), antraceno ($0,032 \text{ mg L}^{-1}$), fluoranteno ($3,142 \text{ mg L}^{-1}$), pireno ($0,212 \text{ mg L}^{-1}$), benzo[a]antraceno ($0,236 \text{ mg L}^{-1}$), criseno ($0,540 \text{ mg L}^{-1}$), benzo[e]pireno ($0,687 \text{ mg L}^{-1}$), benzo[e]acefenantrileno ou benzo[k]fluoranteno ($0,491 \text{ mg L}^{-1}$), benzo[k]fluoranteno ($0,039 \text{ mg L}^{-1}$), benzo[a]pireno ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$), dibenzo[a,h]antraceno ($1,944 \text{ mg L}^{-1}$), benzo[g,h,i]perileno ($1,296 \text{ mg L}^{-1}$), indeno[1,2,3-cd]pireno ($1,296 \text{ mg L}^{-1}$), e estocadas sob refrigeração a 4°C . As soluções-padrão de trabalho foram preparadas por diluição da solução-estoque a um volume final de $5,0 \text{ mL}$ com acetonitrila. A identificação dos HPAs estudados foi feita em relação aos tempos de retenção dos picos e a quantificação pelas áreas dos mesmos.

1.3.3. O solo

O solo utilizado durante o trabalho foi coletado na fazenda Santa Isabel, na Rodovia SP215, km 140, município de São Carlos, estado de São Paulo, caracterizando um solo não cultivado e sem histórico de contaminação. Para efeito didático as características do solo estão apresentadas no capítulo III, página 139.

1.3.4. Determinação do intervalo de linearidade dos compostos

A linearidade refere-se à faixa de concentração na qual o composto de interesse mantém a relação concentração/área do pico constante. A partir da determinação da linearidade foram construídas as curvas analíticas para os HPAs estudados no intervalo de concentração determinado, utilizando solução-padrão com concentração conhecida.

1.3.5. Avaliação da sensibilidade: limite de detecção e quantificação

A definição para limite de detecção adotada em 1975 estabelece que: “limite de detecção” expressa a concentração derivada da menor medida que pode ser detectada com razoável certeza para dado método analítico, ou seja, o limite de detecção é a mais baixa concentração de um determinado analito que se pode detectar por determinado procedimento analítico (LONG, 1983). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados com base na definição IUPAC (KRULL e SWARTZ, 1998; LONG, 1983) segundo as Equações 1 e 2, pelas curvas analíticas de cada composto, sendo:

$$\text{LOD} = 3.(\sigma/A) \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10.(\sigma/A) \quad (2)$$

Onde:

σ = desvio-padrão dos valores de y no ponto de intercepto com a regressão linear;

A = coeficiente angular da curva analítica.

1.3.6. Tratamento estatístico dos dados ou avaliação do método

Para a avaliação do método foram utilizadas amostras do solo como matriz, adicionando-se soluções-padrão de concentração conhecida dos HPAs. Essas matrizes foram, então, submetidas ao mesmo procedimento analítico para as amostras reais, sendo avaliados deste modo a porcentagem de recuperação do método. Foram determinados ainda o desvio padrão (S) e desvio-padrão relativo (DPR), através das Equações 3 e 4:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

$$DPR = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

DPR = desvio-padrão relativo

S = desvio-padrão;

X = valor de recuperação;

$\bar{X}$ = média dos valores de recuperação;

n = número de determinação feitas.

A recuperação do método de extração foi determinada comparando-se a concentração no solo dopado com solução-padrão, submetida aos procedimentos de extração e comparada com o cromatograma do padrão na respectiva concentração.

Foram utilizados diferentes solventes de extração, como acetona, metanol e acetonitrila, com vistas à avaliação do melhor extrator para os compostos de interesse e recuperação do método.

1.3.7. Branco do método

Para a avaliação do branco foi seguido o mesmo procedimento aplicado às amostras, ou seja, uma análise completa utilizando-se apenas o solo calcinado como matriz na extração, com o objetivo de identificar possíveis interferentes dos solventes ou do solo que podem co-eluir com os compostos de interesses, prejudicando a identificação e quantificação das mesmas.

1.3.8. Extração da amostra

Para o método de extração de HPAs foi utilizada a técnica de ultra-som. As extrações foram realizadas em triplicata e de cada extrato foram feitas cinco injeções cromatográficas. Amostras de 5 g de solo *in natura* e 5 g de sulfato de sódio foram colocadas em recipiente fechado de 200 mL com 25 mL do solvente. A amostra foi sonicada em banho de ultra-som (modelo 2510, marca Branson) por 15 min. A solução extraída foi centrifugada, separada e esse extrato foi filtrado em um vial (em filtro de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, da Hewlett Packard) e armazenada em refrigerador a 4°C para posterior injeção (em triplicata) de 10 µL no CLAE.

1.3.9. Instrumentação e separação cromatográfica

A determinação dos HPAs foi feita por CLAE, utilizando-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, com detector UV-Vis, modelo SPD-10A VP, e fluorescência, modelo RF-10A, utilizando uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm SS, Wakosil II 5C18AR 5 µm, SGE). A acetonitrila e a água deionizada foram usadas como eluentes na vazão de 1,8 mL min⁻¹. O gradiente de eluição foi de 0-9,6 min: acetonitrila-(25-75%) água, 9,6-20 min: 100 % acetonitrila. A temperatura da coluna foi mantida a 25°C. O

comprimento de onda de excitação/emissão no fluorescência foi fixado em: 280/320 nm a 0,01 min; 240/398 nm a 9,6 min, 300/466 nm a 18,10 min , 240/398 nm a 19,8 min até 20 min. Quando a determinação foi feita por UV-Vis, o comprimento de onda foi fixado em 254 nm.

Todos os parâmetros para a extração e as condições cromatográficas foram otimizadas para obtenção da melhor e mais eficiente separação dos compostos estudados.

1.3.10. Quantificação das amostras

A quantificação das amostras foi realizada por padronização externa, por meio de um gráfico de calibração compatível com o das amostras e no qual o composto apresentou linearidade. Para a determinação da quantidade dos HPAs existentes na amostra utilizou-se a Equação 5:

$$R = \frac{C \times V_f \times 100}{m \times R\%} \quad (5)$$

Onde:

R = Resíduo dos compostos (mg kg^{-1});

C = Concentração encontrada por interpolação na curva analítica (mg L^{-1});

V_f = Volume final da diluição (L);

m = Massa da amostra (kg);

$R\%$ = Recuperação do método.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. Otimização das condições cromatográficas

Um dos parâmetros otimizados foi a concentração de cada analito na solução padrão mista, já que o detector de fluorescência tem sensibilidade diferenciada para cada HPA.

A otimização da resolução dos picos cromatográficos no sistema CLAE/fluorescência foi estudada. Para esta etapa utilizou-se a solução-padrão mista contendo os 17 HPAs, no qual concentrações foram escolhidas por representarem picos com boa detecção no detector fluorescência. Nesta etapa trabalhou-se com os comprimentos de onda para excitação e emissão, respectivamente.

Seguindo indicações de métodos oficiais da literatura (NIOSH, 1998), que preconizavam a utilização de coluna C-18, utilizou-se a coluna C-18 (250 x 4,6 mm SS, Wakosil II 5C18AR 5 µm, SGE) específica para a separação dos HPAs. Com essa coluna foram testados vários parâmetros, como vazão, gradientes de eluição (acetonitrila/água) e temperatura (Tabela 2).

Tabela 2 – Alguns dos parâmetros otimizados na tentativa de separação dos HPAs.

Testes	vazão (mL/min)	Gradiente	Temperatura (°C)
1	2	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	24,7
2	2	0 - 13 min – acetonitrila:água (40:60%) / 13 - 30 min – acetonitrila (100%)	24,2
3	2,2	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	24,2
4	2	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	23,9
5	1,6	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	24,5
6	1,6	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	25
7	1,4	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 35 min – acetonitrila (100%)	26
9	1,8	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	26,5
10	1,8	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	23,6
11	1,8	0 - 5 min – acetonitrila:água (40:60%) / 5 - 30 min – acetonitrila (100%)	26
12	1,8	0 - 7,5 min – acetonitrila:água (40:60%) / 7,5 - 30 min – acetonitrila (100%)	26
13	1,8	0 - 7,5 min – acetonitrila:água (40:60%) / 7,5 - 30 min – acetonitrila (100%)	25
14	1,8	0 - 7,5 min – acetonitrila:água (40:60%) / 7,5 - 30 min – acetonitrila (100%)	24
15	1,8	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 30 min – acetonitrila (100%)	25
16	1,8	0 - 11 min – acetonitrila:água (40:60%) / 11 - 35 min – acetonitrila (100%)	24
17	1,8	0 - 11 min – acetonitrila:água (25:75%) / 11 - 20 min – acetonitrila (100%)	23
18	1,8	0 - 11 min – acetonitrila:água (30:70%) / 11 - 20 min – acetonitrila (100%)	23
19	1,8	0 - 7,8 min – acetonitrila:água (30:70%) / 7,8 - 20 min – acetonitrila (100%)	23
20	1,8	0 - 7,8 min – acetonitrila:água (25:75%) / 7,8 - 20 min – acetonitrila (100%)	23
21	1,5	0 - 9,8 min – acetonitrila:água (25:75%) / 9,8 - 25 min – acetonitrila (100%)	23
22	1,2	0 - 9,8 min – acetonitrila:água (25:75%) / 9,8 - 30 min – acetonitrila (100%)	23
23	1,8	0 - 8,4 min – acetonitrila:água (25:75%) / 8,4 - 20 min – acetonitrila (100%)	23
24	1,8	0 - 9,8 min – acetonitrila:água (25:75%) / 9,8 - 20 min – acetonitrila (100%)	23
25	1,8	0 - 9,6 min – acetonitrila:água (25:75%) / 9,6 - 20 min – acetonitrila (100%)	25

Uma vez otimizadas as condições para obtenção da melhor resolução cromatográfica, iniciou-se o estudo em relação à sensibilidade aos detectores UV e fluorescência em relação aos 17 HPAs de interesse.

Como é sabido que os comprimentos de onda de excitação e emissão são diferentes para cada HPA, utilizaram-se diversas programações de comprimento de onda baseados na literatura (EPA, 1988; NIOSH, 1998; BERSET et al., 1999; ANDRADE, 2000). Na Tabela 3 podem ser vistos os comprimentos de onda estudados e o maior comprimento de onda obtidos após uma varredura entre 200 e 600 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Cary 5G, Varian), seguida de uma varredura entre 250 e 550 nm em um espectrofotômetro de fluorescência (F-4500, Hitachi) para os HPAs durante este trabalho.

Tabela 3 - Comprimentos de onda de excitação e emissão (nm) utilizadas por algumas literaturas e aqueles obtidos neste trabalho.

HPA [#]	Literatura ^a		Literatura ^b		Literatura ^c		Estudado*	
	λ_{ex}	λ_{ex}	λ_{ex}	λ_{ex}	λ_{ex}	λ_{em}	λ_{ex}	λ_{em}
Naftaleno	220	330	224	330	224	320	220	325 a 340
Acenaftileno	Não detectado por fluorescência							
Acenafteno	225	315	234	320	224	320	225	322 e 340
Fluoreno	225	315	224	320	224	320	204	305
Fenantreno	244	370	252	370	240	398	250	347 e 365
Antraceno	244	370	252	402	240	398	252	378 e 402
Fluoranteno	237	460	252	402	240	398	235	460
Pireno	237	385	238	398	240	398	239	370
Benzo[a]antraceno	277	376	238	398	240	398	287	388
Criseno	277	376	238	398	240	398	266	365 e 384
Benzo[e]pireno					240	398	288	390 e 402
Benzo[e]acefenantrileno	255	420	268	398	240	398	255	430 a 455
Benzo[k]fluoranteno	255	420	268	398	240	398	306	410
Benzo[a]pireno	255	420	268	398	240	398	265 e 296	410
Dibenzo[a,h]antraceno	300	415	234	420	240	398	297	398
Benzo[g,h,i]perileno	300	415	234	420	240	398	300	410
Indeno[1,2,3-cd]pireno	250	495	300	466	300	466	249	500

^a BERSET et al., 1999; ^b Varian Chromatography Systems, 2008; ^c ANDRADE, 2000; *Maior comprimentos de onda obtidos após uma varredura entre 200 e 600 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Cary 5G, Varian), seguida de uma varredura entre 250 e 550 nm em um espectrofotômetro de fluorescência (F-4500, Hitachi) para os HPAs durante este trabalho.

O método 8310 da Environmental Protection Agency (EPA, 2007) propõe determinar os compostos naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno pelo detector UV-Vis e os demais por fluorescência. Mas pôde-se observar, após uma varredura entre 200 e 600 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Cary 5G, Varian), seguida de uma varredura entre 250 e 550 nm em um comprimento de onda de excitação estabelecido em um espectrofotômetro de fluorescência (F-4500, Hitachi) para todos os compostos, que o naftaleno, o acenafteno e o fluoreno têm uma boa detecção por fluorescência. Nas Figuras 5 e 6 apresentam-se os espectros no UV-Vis e de fluorescência do naftaleno, acenaftileno, fluoreno e acenaftileno.

Figura 5 - Espectro UV-Vis do naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno.

Figura 6 - Espectro de fluorescência do naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$).

Segundo as Figuras 5 e 6, o melhor comprimento de onda de excitação para os HPAs naftaleno, acenafteno e fluoreno seria próximo a 224 nm. O estudo desses compostos seria prejudicado em uma faixa de comprimento de onda de excitação/emissão em que respondem ($\lambda_{\text{ex}} = 224 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$), pois há um aumento significativo na linha de base do cromatograma, o que impede a correta integração dos picos. Devido a isso, utilizou-se $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ para o naftaleno, acenafteno e fluoreno.

Já com o acenaftileno, após várias tentativas com comprimentos de onda de emissão entre 320 a 350 nm de excitação/emissão no detector de fluorescência, não se obteve resposta. Apesar de se registrar um sinal do acenaftileno da mesma ordem de grandeza dos demais compostos, deve-se ressaltar que as demais soluções encontram-se 20 vezes mais diluídas que a solução de acenaftileno utilizadas na leitura.

Sabe-se que cada HPA apresenta uma melhor detecção em um comprimento de onda específico, mas não foi possível utilizar o comprimento de onda ótimo para cada composto devido ao grande número de compostos e a proximidade de alguns

deles na ordem de eluição, ou seja, tempo de retenção muito próximo. Mas neste caso, estipulou-se um comprimento de onda de emissão e excitação próximo ao ideal para todos.

Foi então verificado o melhor comprimento de onda que se deveria utilizar para cada HPA no detector de fluorescência a fim de se obter a melhor sensibilidade para todos os analitos. As melhores condições observadas, nas quais foram obtidas as curvas analíticas e toda metodologia analítica, foram baseadas nos dados de VARIAN CHROMATOGRAPHY SYSTEMS (2008) e Andrade (2000).

Para o Indeno(1,2,3,cd)pireno alcançou-se uma boa detecção no comprimento de onda de excitação em 300 nm e emissão em 466 nm e os demais HPAs no comprimento de onda de excitação em 240 nm e emissão em 398 nm. Espectros UV-Vis e de fluorescência do fenantreno, antraceno, fluorenteno, pireno, b[a]antraceno, criseno, b[e]pireno, b[e]acefenantrileno, b[k]fluoranteno, b[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, b(g,h,i)perileno e Indeno(1,2,3,cd)pireno são mostrados nas Figuras de 7 a 14.

Por esta razão, o comprimento de onda de excitação/emissão no fluorescência foi fixado em: 280/330 nm a 0,01 min; 240/398 nm a 9,6 min, 300/466 nm a 18,10 min e 240/398 nm a 19,8 min até 20 min.

Figura 7 - Espectro UV-Vis do fenantreno, antraceno, fluorenteno e pireno.

Figura 8 - Espectro de fluorescência do fenantreno, antraceno, fluorenteno e pireno ($\lambda_{ex} = 240$ nm).

Figura 9 - Espectro UV-Vis do b[a]antraceno, criseno, b[e]pireno e b[e]acefenantrileno.

Figura 10 - Espectro de fluorescência do b[a]antraceno, criseno, b[e]pireno e b[e]acefenantrileno ($\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$).

Figura 11 - Espectro UV-Vis do b[k]fluoranteno, b[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, b[g,h,i]perileno.

Figura 12 - Espectro de fluorescência do b[k]fluoranteno, b[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, b[g,h,i]perileno ($\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$).

Figura 13 - Espectro UV-Vis do Indeno[1,2,3,cd]pireno.

Figura 14 - Espectro fluorescência do Indeno(1,2,3,cd)pireno ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$).

Trabalhou-se com os detectores de UV-Vis e de fluorescência em linha (online), criando-se o método com intenção de quantificar o composto acenaftileno utilizando o detector UV-Vis e para os compostos naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]pireno, benzo[k]fluoranteno ou benzo[e]acefenantrileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, indeno[1,2,3-cd]pireno utilizando-se o detector de fluorescência, pois estes apresentam maior sensibilidade nesse detector.

Pelos valores obtidos, verificou-se que o limite de detecção do naftaleno e acenafteno + fluoreno é 56 e 5 vezes menor no detector de fluorescência em relação

ao UV-Vis, respectivamente. Nota-se, assim, que há uma maior sensibilidade destes compostos no detector de fluorescência. Por isso, resolveu-se determinar o naftaleno e acenafteno + fluoreno pelo detector de fluorescência, modificando ligeiramente o método 8310 proposto pela EPA.

1.4.2. Separação cromatográfica

Cromatogramas com detecção por UV-Vis (Figura 15) e por fluorescência (Figura 16) nas melhores condições cromatográficas foram obtidos pela injeção direta da mistura-padrão dos 17 HPAs. A separação dos 17 HPAs foi alcançada em 20 min. Somente o acenaftileno, por não fluorescer, não foi detectado no detector de fluorescência. Em nenhuma das condições de eluição foi possível separar os pares acenafteno/fluoreno.

Figura 15 - Cromatograma obtido pelo detector de UV-Vis para a solução-padrão (para identificação dos HPAs ver Tabela 2).

Figura 16 – Cromatograma obtido pelo detector fluorescência para a solução-padrão (para identificação dos HPAs ver Tabela 2).

1.4.3. Linearidade, sensibilidade e precisão

A CLAE com detectores de fluorescência e UV fornece uma resposta linear para quantidades injetadas na faixa pré-estabelecida para cada composto estudado. Na Figura 17 apresentam-se as curvas de linearidade dos HPAs. A área do pico foi usada para avaliar a linearidade, sensibilidade e precisão do método. As curvas analíticas obtidas, através de suas respectivas equações das retas, permitiram o cálculo dos coeficientes de determinação, desvio-padrão, limite de detecção e limite de quantificação do equipamento. A Tabela 4 apresenta o intervalo no qual se estudou a linearidade do sistema para os 17 HPAs, além dos respectivos resultados que mostram a sensibilidade e precisão do método. Os HPAs apresentaram boa linearidade, com valores de coeficiente de determinação na faixa de 0,99965-0,99999. Os limites de detecção (Tabela 4) obtidos por injeção direta da mistura-padrão dos 17 HPAs foram calculados com base na definição da IUPAC, pelas curvas analíticas de cada composto, e ficaram entre 3 e 74 vezes menores usando-se detecção por fluorescência com relação aos valores comparados com detecção UV. Com as condições experimentais aqui relatadas, o limite de detecção no detector de fluorescência está na faixa de $7,1 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$, injetado para o antraceno, a $1,9 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ para o fluoranteno e os limites de detecção com UV (254 nm) na faixa de $4,5 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ para o benzo[e]pireno a $9,9 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ para o acenaftileno.

Tabela 4 – Tempo de retenção (tr) e validação do método em termos de linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

Compostos	tr (UV-Vis)	tr (fluoresc.)	Faixa de concentração (mgL ⁻¹)	Curva de calibração	Coeficiente de determinação	LOD(mg L ⁻¹)		LOQ(mgkg ⁻¹)	
						fluoresc.	UV-Vis	Fluoresc.	UV-Vis
1) Naftaleno	7,580	7,685	0,0031-0,4921	$Y = 1,11 \times 10^7 X + 1,10 \times 10^4$	0,99996	$7,1 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-2}$
2) Acenaftileno	8,205		0,0062-0,9843	$Y = 9,33 \times 10^3 X + 19,99$	0,99999	-	$9,9 \times 10^{-3}$	-	$3,3 \times 10^{-2}$
3) Acenafteno			0,0002-0,0325				$7,3 \times 10^{-4}$		
4) Fluoreno	9,287	9,398	0,0010-0,1624	$Y = 4,27 \times 10^7 X + 2,49 \times 10^3$	0,9998	$1,4 \times 10^{-4}$		$4,6 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-3}$
5) Fenantreno	9,956	10,062	0,0034-0,5400	$Y = 8,34 \times 10^6 X + 5,96 \times 10^3$	0,99965	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$
6) Antraceno	10,633	10,738	0,0002-0,0324	$Y = 1,65 \times 10^8 X + 2,65 \times 10^3$	0,99987	$7,0 \times 10^{-6}$	$5,2 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-3}$
7) Fluoranteno	11,127	11,233	0,0196-3,1419	$Y = 1,44 \times 10^6 X + 3,13 \times 10^3$	0,99993	$1,9 \times 10^{-3}$	$8,5 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-2}$
8) Pireno	11,637	11,744	0,0013-0,2121	$Y = 1,99 \times 10^7 X + 1,94 \times 10^4$	0,99988	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-3}$
9) Benzo[a]antraceno	12,894	13,001	0,0015-0,2356	$Y = 2,03 \times 10^7 X + 4,13 \times 10^3$	0,99995	$8,3 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-3}$
10) Criseno	13,304	13,410	0,0034-0,5400	$Y = 9,08 \times 10^6 X + 6,01 \times 10^3$	0,99998	$7,4 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-3}$
11) Benzo[e]pireno	14,053	14,160	0,0043-0,6873	$Y = 8,26 \times 10^6 X + 4,96 \times 10^3$	0,99996	$1,3 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-3}$
12) Benzo[e]acefenantrileno	14,264	14,370	0,0031-0,4909	$Y = 1,11 \times 10^7 X + 5,53 \times 10^3$	0,99997	$5,1 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-3}$
13) Benzo[k]fluoranteno	15,086	15,191	0,0002-0,0393	$Y = 1,44 \times 10^8 X + 1,22 \times 10^4$	0,99996	$3,9 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-3}$
14) Benzo[a]pireno	15,857	15,961	0,0008-0,1296	$Y = 4,54 \times 10^7 X + 5,14 \times 10^3$	0,99996	$1,1 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-3}$
15) Dibenzo[a,h]antraceno	16,822	16,928	0,0122-1,9440	$Y = 3,38 \times 10^6 X + 3,72 \times 10^3$	0,99992	$9,5 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$
16) Benzo[g,h,i]perileno	17,871	17,975	0,0081-1,2960	$Y = 6,19 \times 10^6 X + 2,99 \times 10^3$	0,99996	$3,5 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$
17) Indeno[1,2,3-cd]pireno	18,802	18,907	0,0081-1,2960	$Y = 6,20 \times 10^6 X + 2,09 \times 10^3$	0,99998	$1,8 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-2}$

Figura 17 - Curvas analíticas dos HPAs.

Figura 17 – Continua.

Figura 17 – Conclusão.

1.4.4. Seleção do solvente de extração

Como individualmente os HPAs podem estar presentes no solo em níveis de ng g^{-1} ou menores, poucas matrizes podem ser determinadas diretamente sem interferentes sérios. Então, uma extração eficiente, pré-concentração e “clean-up” das amostras são operações imprescindíveis para a determinação de HPAs.

Sun et al. (1998) utilizaram acetona, cicloexano, hexano, diclorometano, tolueno ou mistura destes solventes para a extração de HPAs e observaram grandes diferenças no percentual de recuperação. Song et al. (2002) relataram valores de recuperações adequados na extração de HPAs em solo com 98% de areia usando um método ultra-som. Na maioria dos trabalhos publicados, os HPAs mais voláteis, com 2 ou 3 anéis aromáticos, tais como naftaleno e acenaftileno, alcançaram valores

de recuperação não-reprodutíveis, porque o solvente usado para a extração e a eluição, na extração por Soxhlet, por exemplo, foi evaporado quase à secura usando um rota evaporador e fluxo de nitrogênio. A fim de evitar perdas dos HPAs mais voláteis e aumentar a eficiência de extração, uma seleção apropriada dos solventes foi empregada para otimizar o procedimento de extração dos 17 HPAs, sem que houvesse a etapa de evaporação do solvente. Neste trabalho, três diferentes solventes (acetona, metanol e acetonitrila) foram testados. Os resultados para as recuperações, usando o procedimento de extração em ultra-som, são mostrados na Tabela 5. A precisão do método, representada como desvio-padrão relativo (DPR) para determinação de replicatas, foram menores que 10,0%, exceto para acenaftileno, que foi de 11,1% e benzo[a]pireno de 13,9%, ambos utilizando acetonitrila como solvente de extração. Foram observadas grandes diferenças no percentual de recuperação quando esses diferentes solventes foram utilizados para a extração de HPAs no solo.

Tabela 5 - Recuperação (R) e desvio padrão relativo (DPR) para extração por ultra-som de solo com metanol, acetonitrila e acetona como solventes (valores obtidos por triplicata).

HPAs	<i>metanol</i>		<i>acetonitrila</i>		<i>acetona</i>	
	R(%)	DPR (%)	R(%)	DPR (%)	R(%)	DPR (%)
1) Naftaleno	62,2	4,5	50,1	4,4	82,2	2,5
2) Acenaftileno	65,2	2,9	97,8	11,1	59,1	3,6
3) Acenafteno + 4) Fluoreno	57,7	9,8	58,8	9,3	75,1	1,0
5) Fenantreno	70,0	3,5	64,0	6,4	91,2	4,6
6) Antraceno	58,5	2,3	67,1	7,9	74,0	2,7
7) Fluoranteno	72,4	1,5	71,4	6,5	80,0	2,2
8) Pireno	73,4	4,5	65,9	5,8	88,9	3,3
9) Benzo[a]antraceno	74,8	2,3	73,1	9,6	83,4	4,2
10) Criseno	78,2	2,3	73,4	9,8	88,7	4,6
11) Benzo[e]pireno	74,8	2,0	69,6	9,2	82,8	2,5
12) Benzo[e]acefenantrileno	63,5	1,3	73,3	9,9	78,9	1,9
13) Benzo[k]fluoranteno	76,6	1,4	72,3	8,4	78,9	0,8
14) Benzo[a]pireno	20,5	9,1	46,3	13,9	46,0	6,2
15) Dibenzo[a,h]antraceno	70,0	3,0	70,3	6,9	76,2	1,4
16) Benzo[g,h,i]perileno	67,1	4,7	69,1	6,0	73,4	4,6
17) Indeno[1,2,3-cd]pireno	66,6	5,4	49,4	10,3	73,0	7,8

Como mostrado na Figura 18, a eficiência da extração para os 17 HPAs no solo com acetona, foi definida como 1, sendo as demais representadas por uma razão dos sinais obtidos pelos outros solventes, em comparação com os sinais obtidos pela acetona. Na Figura 18 observa-se que as mais elevadas eficiências de extração para a maioria dos 17 HPAs, em relação aos três solventes utilizados, foram obtidas usando acetona, exceto para o acenaftileno.

Figura 18 – Seleção do solvente para extração dos 17 HPAs. O eixo vertical é a razão dos sinais para os HPAs extraídos do solo pelos outros solventes comparativamente ao obtido com a acetona.

A ordem de eficiência de extração para a maioria dos 17 HPAs do solo pelos solventes foi acetona>metanol>acetonitrila. Como a mistura acetonitrila-água foi o solvente usado como fase móvel e levando-se em conta que o solvente que é miscível com a fase móvel é o melhor para a solução de injeção final, selecionou-se a acetona como o solvente de extração. A etapa de evaporação do solvente quase à secura pôde ser omitida, pois a sensibilidade foi bastante alta para a determinação dos HPAs pelo método proposto. Além disso, com acetona alcançou-se a mais

elevada eficiência de extração para a maioria dos 17 HPAs do solo em relação a todos os solventes testados.

Na avaliação do branco, ou seja, uma análise completa utilizando-se apenas o solo calcinado como matriz na extração, não foi identificado nenhum interferente do solvente ou do solo que poderiam co-eluir com os compostos de interesse.

1.5. CONCLUSÕES

Os 17 HPAs podem ser bem separados e determinados por CLAE com detector UV-Vis e fluorescência usando uma coluna C-18 e misturas acetonitrilina-água como fase móvel. O tempo da corrida cromatográfica é de 20 minutos. A extração por ultra-som foi escolhida em relação à extração por Soxhlet, porque apresentou alta eficiência de extração, baixo custo operacional e fácil operação, além de minimizar o uso de solvente e não levar a perda por evaporação. A acetona foi o melhor solvente entre os três avaliados para a extração dos 17 HPAs em solo, seguida do metanol e da acetonitrila.

Finalmente, pode ser mencionado que a metodologia proposta pode ser aplicada para o controle dos 17 HPAs em amostras de solo com características próximas ao solo estudado.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Sandro José de. **Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em urina**. 2000.104f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2000.
- ANYAKORA, C.; OGBECHE, A.; PALMER, P.; COKER, H. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 323–330, 2005.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2002. 622p.
- BANJOO, D. R.; NELSON, P. K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 9-18, 2005.
- BARONE, P. M. V. B.; CAMILO JUNIOR., A.; GALVÃO, D. S. Theoretical approach to identify carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 6, p. 1186-1189, 1996.
- BERSET, J. D.; EJEM, M.; HOLZER, R.; LISCHER, P. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 383, p. 263-275, 1999.
- BJØRSETH, A.; BECHER, G. **PAH in work atmospheres: occurrence and determination**. Boca Ranton : CRC, 1986. 176p.
- BRAGA, R.S.; BARONE, P.M.V.B.; GALVÃO, D.S. Identifying carcinogenic activity of methylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 464, p. 257–266, 1999.
- CODINA, G.; VAQUERO, M.T.; COMELLAS, L.; BROTO-PUIG, F. Comparison of various extraction and clean-up methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. **Journal of Chromatography A**, v. 673, p. 21-29, 1994.
- COOKE, M.; DENNIS, A.J. **Polynuclear aromatic hydrocarbons: chemistry, characterization and carcinogenesis**. Richland: Battelle Press, 1986. 1088p.
- ENVIRONMENTAL POLLUTION AGENCY (EPA). **Polynuclear aromatic hydrocarbons: method 8310**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/sw.846/pdfs/8310.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2008.
- FEDOTOV, P. S.; BAUER, C.; POPP, P.; WENNRICH, R. Dynamic extraction in rotating coiled columns, a new approach to direct recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 305–309, 2004.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ. V.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Micelle formation for improvement of continuous subcritical water extraction of polycyclic aromatic

hydrocarbons in soil prior to high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 357–367, 2000.

GORSHKOV, G.; MARINAITE, I. I.; BARAM, G. I.; SOKOV, I. A. Application of high-performance liquid chromatography on short narrow-bore columns to the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 768–774, 2003.

HAWTHORNE, S., B.; GRABANSKI, C. B.; MARTIN, E., MILLER, D. J. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 421–433, 2000.

JUHASZ, A.L.; NAIRU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 45, p. 57–88, 2000.

KOH, C.-H.; KHIM, J.S.; KANNAN, K.; VILLENEUVE, D.L.; SENTHILKUMAR, K.; GIESY, J.P. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-TCDD equivalents (TEQs) in sediment from the Hyeongsan River, Korea. **Environmental Pollution**, v. 132, p. 489–501, 2004.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Determining limits of detection and quantification. **LC-CG Magazine**, v. 16, n. 10, p. 922–924, 1998.

LEE, M.L.; NOVOTNY, M.V.; BARTLE, K.D. **Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds**. New York: Academic Press, 1981. 462p.

LONG, L. G.; WINWFORDDER, J. D. Limit of detection: a closer at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712–724, 1983.

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

LUNSTEDT, Staffan. **Analysis de PAHs and transformation products in contaminated soil and remedial processes**. 2003. 56f. Tese (Doutorado) - Faculty of Science and Technology, Department of Chemistry, Umeå University, Sweden, 2003. Disponível em: < <http://www.diva-portal.org/umu/theses/abstract.xsql?dbid=57>>. Acesso em: 19 ago. 2008.

MIÈGE, C.; DUGAY, J.; HENNION, M. C. Optimization and validation and supercritical fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge's by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. **Journal of Chromatograph A**, v. 823, p. 219–230, 1998.

MORET, S.; CONTE, L. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 245–253, 2000.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH). **NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM) - Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC**: Method 5506. Disponível em: <[Http://www.cdc.gov/niosh/nman/pdfs/5506.pdf](http://www.cdc.gov/niosh/nman/pdfs/5506.pdf)>. Acesso em: 18 ago. 2008.

OBUCHI, A.; AOYAMA, H.; OHI, A.; OHUCHI, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particulate matter and diesel fuel oil. **Journal of Chromatography**, v. 312, p. 241-259, 1984.

PEREIRA NETTO, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

QUANTIN, C.; JONER, E.J.; PORTAL, J.M.; BERTHELIN, J. PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. **Environmental Pollution**, v. 134, p. 315–322, 2005.

QIANHUAN, D. Di-region theory, new discovery on mechanism of carcinogenesis. **Molecular Engineering**, v. 8, p. 61–89, 1998.

REIMER, G.; SUAREZ, A. Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the analysis of native polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 699, p. 253-263, 1995.

RHODES, S.; FARWELL, A.; HEWITT, L. M.; MACKINNON, M.; DIXON, D. G. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 247–258, 2005.

SAIM, N.; DEAN, J. R.; ABDULLAH, M. D. P.; ZAKARIA, Z. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 791, p. 361–366, 1997.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; TIMOTHY, A. N. **Princípios da análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 835p.

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

SUN, F.; LITTLEJOHN, D.; GIBSON, M. D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 364, p. 1-11, 1998.

SUNDBERG, K.; SEIDEL, A.; MANNERNVIK B.; JERNSTROËM B. Detoxication of carcinogenic fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by

glutathione transferase P1-1 variants and glutathione. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 438, p. 206 – 210, 1998.

TOMANIOVÁ, M.; HAJŠLOVÁ, J.; PAVELKA JUNIOR, J.; KOCOUREK, V.; HOLADOVÁ K.; KLÍMOVA, I. Microwave-assisted solvent extraction — a new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants. **Journal of Chromatography A**, v. 827, p. 21–29, 1998.

UTSUMI, A.; NAKASHIMA, A.; ANDO, K.; KIZU, R.; HAYAKAMA K. Flow injection analysis of C-fuel oil-contaminated samples based on the fluorescence detection for polycyclic aromatic hydrocarbons. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 845-847, 1998.

VARIAN CHROMATOGRAPHY SYSTEMS. HPLC detector options for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons. Maureen Joseph e Varian Chromatography Systems, Number 7. Disponível em:
<<https://www.varianinc.com/media/sci/apps/lc07.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2008.

VERWEIJ, F.; BOOIJ, K.; SATUMALAY, K.; MOLEN, N. van der; OOST, R. van der. Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp. **Chemosphere**, v. 54, p. 1675–1689, 2004.

WIIDFL, S. R.; BERROW, M. L.; MCGRATH, S. P.; JONES, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. **Environmental Pollution**, v. 76, p. 25-32, 1992.

CAPITULO II

A biorremediação utilizando a vermicompostagem

2.1. FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1.1. Ocorrência dos HPAs no ambiente

Os combustíveis armazenados consistem de vários hidrocarbonetos de petróleo com potencial efeito tóxico para o homem (NAMKOONG et al., 2002). A preocupação relacionada ao potencial de contaminação por derramamentos de combustível vem crescendo, seja em São Paulo ou em diversas outras cidades do país, como Curitiba, que já possui legislação sobre o tema, e Joinville (SC). No Brasil, este problema tende a se acentuar porque a vida útil de grande parte dos tanques de armazenamento dos postos de combustíveis está próxima do seu fim, podendo aumentar a ocorrência de vazamentos. Já as indústrias de petróleo lidam diariamente com problemas decorrentes de vazamentos, derrames e acidentes durante a exploração, refino, transporte e operações de armazenamento do petróleo e seus derivados (FURTADO, 2005; CETESB, 2003). As Figuras 19 a 21 levantam alguns dados relacionados às atividades das áreas contaminadas, principais agentes contaminantes e estágios do processo de remediação no estado de São Paulo, segundo a CETESB (FURTADO, 2005).

Figura 19 – Atividades das áreas contaminadas em São Paulo (1.336 casos), 2004 (FURTADO, 2005).

Figura 20 – Principais agentes contaminantes em São Paulo x ocorrência (FURTADO, 2005).

Figura 21 – Estágios dos processos de remediação de áreas contaminadas no estado de São Paulo, 2004 (FURTADO, 2005).

2.1.2. Processo de remediação

Uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos tem sido utilizada na remoção de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente. Processos como extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, bioventilação, extração com solventes, incineração, torres de aeração, adsorção em carvão ativado, biorreatores, biorremediação no local, entre outros, têm sido usados para remover contaminantes orgânicos de sistemas de solo subsuperficial e águas subterrâneas. Esses processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas (contaminantes), tratar águas subterrâneas e/ou descontaminar solos. No entanto, longos períodos de tempo e altos custos estão normalmente associados com a grande maioria dos processos utilizados para remediação de áreas contaminadas. Por outro lado, a biorremediação no local, processo economicamente mais viável, é muitas vezes limitada por dificuldades no transporte de nutrientes ou receptores de elétrons e no controle das condições para aclimação e degradação dos contaminantes nos sistemas sub-superficiais. Mas ela continua sendo a forma mais usada e pesquisada para a descontaminação de aquíferos contendo compostos tóxicos (SAINT-DENIS et al., 1999; SATERBAK et al., 1999; SATERBAK et al., 2000).

2.1.3. A biorremediação

A biorremediação pode ser um processo efetivo e barato para remediar solos contaminados com compostos orgânicos tóxicos e é promovida por uma população de microorganismos capaz de degradá-los. O solo, neste caso, deve ser mantido em condições apropriadas para promover a biodegradação.

A degradação de contaminantes químicos no solo é afetada por fatores ambientais, tais como, grau de mistura, pH, temperatura, nível de O₂ e a biodisponibilidade dos contaminantes ou metabólitos tais como os nutrientes requeridos pelos organismos e a aclimação da população. Alguns destes fatores podem ser manipulados durante um processo de biorremediação para aumentar a taxa de biodegradação (PHILLIPS et al., 2000). A remoção dos contaminantes durante a biorremediação pode ser monitorada por aproximação da concentração dos contaminantes. Uma combinação de análises químicas, para apontar o nível de contaminação, e teste de toxicidade também é recomendada para monitorar o processo de biorremediação (PHILLIPS et al., 2000).

A compostagem e a vermicompostagem são técnicas ideais para se obter mais rapidamente, e em melhores condições, a desejada estabilização da matéria orgânica. Na natureza, essa estabilização ou humificação se dá em prazo indeterminado, ocorrendo de acordo com as condições em que a matéria orgânica se encontra (KIEHL, 1985).

2.1.4. A vermicompostagem e sua utilização como forma de remediação

A bio-oxidação e estabilização da matéria orgânica, resultante da ação combinada de minhocas e da microflora que vive em seu trato digestivo, é definida como vermicompostagem ou vermiestabilização (EDWARDS e FLETCHER, 1988; AQUINO et al., 1992). Enquanto a compostagem de resíduos orgânicos é uma prática antiga, a vermicompostagem foi desenvolvida nas décadas 40 e 50 a partir de pesquisas realizadas por programas de manejo de minhocas na estação experimental em Rothamstead (Inglaterra). Só a partir de 1970 é que se intensificaram os estudos sobre o potencial das minhocas para conversão de

resíduos orgânicos em uma forma mais estabilizada da matéria orgânica (AQUINO et al., 1992; EDWARDS, 1995). Embora os microorganismos sejam responsáveis pela degradação bioquímica da matéria orgânica, minhocas influenciam fisicamente e bioquimicamente o processo (NADDAFI et al., 2004). O vermicomposto é o produto final (estabilizado) da vermicompostagem (KIEHL, 1985).

A vermicompostagem tem a vantagem de ter um baixo custo de capital e de operação, simplicidade de operação e eficiência relativamente alta. No Brasil a vermicompostagem é uma atividade recente e relativamente desconhecida pela agroindústria. Teve início no final de 1983 com matrizes (minhocas) trazidas da Itália pelo Comendador Lino Morganti para a sua propriedade em Itu (SP). Em 1987 a CETESB de São Paulo, agência responsável pelo monitoramento ambiental, publicou o artigo: "The use of worms in the production of organic compost". Esse trabalho discute a biologia da minhoca, sua importância agrônômica, a vermicompostagem e predadores da minhoca (CETESB, 1987).

A estabilização da matéria orgânica é alcançada pelo metabolismo de algumas espécies de minhocas ao se alimentarem desse material. As minhocas ingerem rapidamente a matéria orgânica, transformando-a em composto de melhor qualidade do que os produzidos pelo método tradicional de compostagem, sendo rico em elementos essenciais para as plantas, como nitrogênio, fósforo, magnésio, enxofre e potássio, contendo também bactérias fixadoras de nitrogênio (KIEHL, 1985).

2.1.4.1. As minhocas: Em especial *Eisenia foetida*

As minhocas são animais invertebrados, hermafroditas (possuem os dois sexos, embora não se auto-fecundem e necessitam de outra minhoca para se

reproduzirem) e têm respiração cutânea. As minhocas se reproduzem durante a noite (2 a 3 h), originando cada minhoca adulta 1500 indivíduos em 6 meses. A boca fica na extremidade próxima do clitelo. São capazes de regenerar a cauda, mas não a cabeça, ou seja, se uma minhoca for dividida, apenas a parte que contém a cabeça regenera uma nova cauda. Elas não têm olhos, mas os seus fotorreceptores são sensíveis à luminosidade (luz do Sol). Vivem em média um ano, mas em condições favoráveis chegam a até 5 anos. Quando adultas pesam em média 1 g, podendo chegar a um tamanho máximo (12 a 20 cm) aos 7 meses, dependendo da espécie.

As minhocas são saprófitas, isto é, alimentam-se de matéria orgânica morta, especialmente vegetal, que normalmente transportam para dentro das suas galerias. Durante a digestão das minhocas, a matéria orgânica ao passar pela faringe, é umedecida pelas secreções salivares e neutralizada pelas secreções das glândulas calcíferas do esôfago. Na moela os alimentos são esmagados para posterior digestão no intestino; a areia e os minerais atuam como um moinho de pedra na moela, transformando o alimento em uma massa homogênea. O processo de digestão no tubo digestivo ocorre devido à reação das enzimas com os carboidratos, proteínas, gorduras e até mesmo com a celulose. É no intestino que ocorre a adsorção dos principais nutrientes necessários à alimentação das minhocas. No final do processo digestivo, os restos orgânicos que não foram digeridos e assimilados são expelidos, junto com as partículas de terra, na forma de vermicomposto (OLIVEIRA, 2001; EDWARDS, 1995).

As minhocas são classificadas como oligoquetos terrestres e as que apresentam interesse para a decomposição da matéria orgânica podem ser agrupadas de acordo com sua coloração: vermelha e cinzenta. Do grupo

pigmentado de vermelho destaca-se a minhoca vermelha *Lumbricus rubellus* e do grupo cinzento a minhoca de esterco ou fétida *Eisenia foetida*.

A escolha da minhoca é um aspecto importante na evolução da tecnologia de vermicompostagem. Dentre mais de 3.000 espécies conhecidas no mundo todo (SHARMA et al., 2005), a *Eisenia foetida* é a mais utilizada pelo fato de sua ampla distribuição, pela larga faixa de tolerância à variação de temperatura e por viver em resíduos orgânicos com diferentes graus de umidade, além de ser bastante resistente ao manuseio. São amplamente utilizadas na vermicompostagem, porque além de se alimentarem de resíduos orgânicos, têm elevada capacidade reprodutiva e apresentam crescimento rápido (AQUINO e NOGUEIRA, 2001; PEREIRA et al., 2005).

A espécie *foetida* - Savigny, 1826 - pertence ao reino **Animalia**, filo **Annelida**, Classe **Clitellata**, Ordem **Haplotaxida**, Família **Lumbricidae** e ao gênero **Eisenia**, e se adapta muito bem às condições ambientais dos climas temperados. Esta espécie apresenta duas sub-espécies: a ***Eisenia foetida andrei*** ou a minhoca do terriço, de cor vermelha e comprimento no estado adulto entre 50 e 90 mm, e a ***Eisenia foetida foetida*** ou minhoca zebrada do estrume, de comprimento superior à anterior, caracterizada por apresentar em cada anel uma banda vermelha alternada com uma zona pigmentada e ainda a característica que lhe dá o nome; liberta, quando ameaçada, um líquido de cheiro fétido. A ***Eisenia foetida foetida***, conhecida comumente como vermelha-da-califórnia ou minhoca-européia-de-esterco, ou “manure worm, compost worm ou red worms” em inglês, apresenta um corpo cilíndrico medindo de 35 a 130 mm de comprimento e de 3 a 5 mm de diâmetro. Pode apresentar as seguintes colorações: roxo, vermelho, vermelho escuro e marrom-avermelhado. Há indivíduos cujo corpo é de uma única cor, e indivíduos

cujas cores são intercaladas entre o marrom-avermelhado na região dorsal e um tom de amarelo nas áreas apigmentadas entre os segmentos. A coloração vermelha é restrita apenas à região dorsal. Alimenta-se de frutas e vegetais em decomposição, consumindo pouco solo. É principalmente utilizada para compostagem de restos de vegetais e frutas e esterco animal. Vive no máximo de 4 - 5 anos, sendo que normalmente atinge no máximo 2 anos de vida. Quando é ameaçada, a minhoca secreta pelos poros na superfície superior do corpo uma substância fétida amarela que age em defesa do animal, afastando possíveis predadores (AQUINO e NOGUEIRA, 2001; DOMINGUEZ, 2005). A Figura 22 mostra o ciclo de reprodução da *Eisenia foetida*.

Figura 22 – Ciclo de reprodução da *Eisenia foetida*.

As minhocas são consideradas uma importante fonte de estudos ecotoxicológicos devido sua habilidade em acumular e excretar metais e compostos orgânicos tóxicos (SAINT-DENIS et al., 1999). São utilizadas como bioindicadores de solos contaminados com pesticidas organoclorados (MORRISON et al., 2000), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (TANG et al., 2002; BUNDY et al., 2002) e metais tóxicos (PEREIRA et al., 2003). A *Eisenia foetida* é apontada como a espécie indicadora para testes de toxicidade de poluentes industriais pela Environmental

Protection Agency (EPA, 1996). A sua habilidade em promover a concentração de metais como Cd, Cu, Pb, Zn e Ca nos seus tecidos também foi avaliada por Morgan e Morgan (1999) e Shahmansouri et al. (2005). Os autores relatam que diferentes espécies de minhocas apresentam sensibilidades diferentes com relação ao efeito tóxico dos metais. Baseado em sua importância ecológica e resistência à toxicidade, as minhocas podem ser consideradas como uma importante fonte de informação para a avaliação de risco de contaminação ambiental (LUKKARI et al., 2004; GUPTA et al., 2005).

2.2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Um dos principais problemas atuais é a contaminação do solo por vazamentos de tanque de armazenagem no subsolo e seus efeitos adversos. No Brasil, segundo o Anuário Estatístico da Agência Nacional do Petróleo (ANP) em 2004 havia mais de 31000 postos revendedores em funcionamento no Brasil. Há, portanto, um crescente interesse sobre o impacto que esses postos podem causar ao meio ambiente. A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo de São Paulo – CETESB – impôs a determinação de HPAs junto aos postos de gasolina do estado de São Paulo, onde existem cerca de 5.000 postos. Esse número, aliado à importância que tais contaminantes têm em termos ambientais e de saúde ocupacional, justifica a busca de metodologias analíticas reprodutíveis para sua determinação, com adequados limites de detecção e de quantificação e que ofereçam respostas rápidas. Ressalte-se que a obrigatoriedade de tais determinações começa a ser estendida a diversas regiões do país. A obrigatoriedade do licenciamento, determinada pela Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 273, deve-se ao fato de grande

parte dos estabelecimentos estarem localizados em áreas densamente povoadas, cujas populações correm risco em casos de vazamentos de tanques, que podem provocar a contaminação do solo e das águas subterrâneas, além da possibilidade de incêndios e explosões (CETESB, 2003).

A biorremediação vem recentemente ganhando aceitação, principalmente em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo, como o que acontece em postos de gasolina. É um método de tratamento de baixo custo para a descontaminação de solos contaminados por HPAs e outros hidrocarbonetos. A biorremediação, isto é, a utilização de microrganismos ou minhocas para degradar poluentes ambientais, apresenta-se como uma alternativa para remover xenobióticos do ambiente, especialmente os compostos orgânicos tóxicos. Ela só pode ser utilizada em locais onde os contaminantes estejam biodisponíveis. Compostos que sejam insolúveis ou ligados à matéria orgânica ou argila são, freqüentemente, menos acessíveis ao ataque dos microrganismos (MELO et. al., 1997).

Embora a compostagem tenha sido realizada por décadas para degradação de resíduos em lixões municipais, entre outros, ela ainda é uma tecnologia mais utilizada ex-situ, por exemplo, em laboratório, em estudo para descontaminação de solos com poluentes orgânicos. Estudos (KÄSTNER et al., 1996; WISCHIMANN e STEINHART, 1997; JØRGENSEN et al., 2000; SEMPLE et al., 2001; NAMKOONG et al., 2002; VAN GESTEL, 2003; ROMANTSCHUK et al., 2000) mostram que a compostagem pode ser utilizada com eficácia na remoção de HPAs em solos e relatam seu uso como estratégia de biorremediação de solos contaminados .

A recuperação de áreas contaminadas deve ser prioridade tanto para as empresas potencialmente poluidoras como para os órgãos de controle ambiental (MOLSON et al., 2002). As estratégias de compostagem para a descontaminação de

solos com poluentes orgânicos em geral foram recentemente revisadas por SEMPLE et al. (2001), entre outros. Entretanto, estudos que envolvam a utilização da vermicompostagem estão em um estágio inicial, sendo a técnica demonstrada por poucas pesquisas, como a de Tharakan et al. (2004), que estudaram a biorremediação de congêneres de bifenilas policloradas e a de Hickman et al. (2005) que avaliaram a aplicação da vermicompostagem para a biorremediação de solos contaminados. Neste trabalho são propostos meios de recuperação de solos contaminados utilizando a vermicompostagem.

2.3. OBJETIVO

Verificar a eficiência da biorremediação de solo contaminado por HPAs usando a vermicompostagem com resíduos de esterco bovino como fonte de matéria orgânica e investigar o papel da matéria orgânica sólida durante o processo da vermicompostagem, e o das minhocas, para melhorar a atividade de remoção desses compostos no sistema solo.

2.4. METODOLOGIA

2.4.1. As minhocas utilizadas

As minhocas utilizadas foram cultivadas na mesma fazenda onde foi feito o trabalho experimental. As minhocas usadas no experimento apresentavam um massa média de 0,2 g e foram adquiridas da empresa Minhobox situada em Juiz de Fora – MG e identificadas pelo fornecedor.

Nos experimentos foi utilizada a minhoca *Eisenia foetida* (Figura 23), também conhecida como minhoca vermelha da Califórnia ou minhoca de esterco. A escolha da espécie foi feita em função de sua habilidade em converter resíduos orgânicos

pouco decompostos em material estabilizado, bem como pela preferência por ambientes com elevado conteúdo de matéria orgânica, extraordinária capacidade reprodutiva e rápido crescimento.

Figura 23 - Minhoca *Eisenia foetida*

2.4.2. O solo

O solo utilizado no estudo foi coletado na fazenda Santa Isabel, município de São Carlos, estado de São Paulo, na Rodovia SP215, km 140. Para efeito didático as características físicas e químicas do solo estudado serão apresentadas no capítulo III.

2.4.2.1. Adição de diesel ao solo

Como este estudo requer um conhecimento prévio do teor de diesel no experimento, fez-se necessário dopar o solo com uma quantidade estabelecida de diesel. No entanto, dependendo da concentração, o diesel pode ser tóxico para as minhocas. Foram levantados dados teóricos a respeito da toxicidade aguda, ou seja, a concentração letal (CL50) de diesel e HPAs em solo usando minhocas da espécie

Eisenia foetida (DORN et. al, 1998), chegou-se a concentração de 2% (v/v) de diesel, a qual não seria letal para as minhocas.

Ao solo foi adicionada apropriada quantidade de diesel, ou seja, 0,12L de diesel a 6L de solo. O solo foi colocado em um recipiente de polietileno, adicionando-se o diesel em diferentes seções do solo com o requerido volume calculado de diesel. O solo foi então misturado de forma a alcançar a homogeneidade da mistura.

2.4.3. A vermicompostagem

Foram utilizados no tratamento caixas de compensado naval, denominadas leiras de vermicompostagem, de dimensão de 0,70 x 0,70 x 0,70 m. Em diferentes caixas foram adicionadas determinadas quantidades de solo dopado com 2% v/v, ou seja, 1,74% volume de diesel por massa de solo, e quantidades estabelecidas de esterco bovino sem pré-compostar, como matéria orgânica, conforme mostrado nas Figuras 24 e 25. Este material foi misturado de forma a alcançar a homogeneidade da mistura solo/esterco. Dois outros experimentos foram realizados como controle: um experimento somente com esterco bovino sem a presença do solo contaminado para avaliar a taxa de decomposição da matéria orgânica pelas minhocas e outro envolvendo somente o solo contaminado (sem mistura de correção orgânica e sem minhocas) para investigar a remoção dos HPAs por outros fatores, como a luz ultravioleta (fotodegradação), durante o processo. Foram feitos no total 6 experimentos, onde (A) corresponde ao experimento contendo 0% de esterco bovino e 100% solo (sem minhoca); (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de

esterco bovino e 25% solo e (F) 100% de esterco bovino e 0% solo, respectivamente.

Figura 24 - Montagem das caixas de compostagem.

Figura 25 - Caixas de compensado utilizadas no tratamento.

Segundo Landgraf (1999) necessita-se de 1000 minhocas para 1m². Foram adicionadas 400 minhocas em cada caixa, exceto àquela que continha 100% de solo dopado (A), que serviu como controle. As caixas foram cobertas com palha para favorecer as condições propícias ao meio, como por exemplo, dificultar a entrada de

luz, pois as minhocas são fotossensíveis e os compostos poderiam degradar-se através da luz ultravioleta.

Na utilização da compostagem, assim como da vermicompostagem para a descontaminação de solo contaminado, os resíduos orgânicos incluindo esterco, resíduo de processamento de alimento, lodo de esgoto, resíduos orgânicos industriais, entre outros, são freqüentemente adicionados para suplementarem a quantidade de nutrientes e realizar a degradação orgânica no solo. A adição de resíduo orgânico pode facilitar a remoção de contaminantes orgânicos, porque eles têm um importante papel na suplementação de nutrientes e de fonte de carbono no solo contaminado. Os resíduos orgânicos podem conter uma abundante quantidade de matéria orgânica e nitrogênio, elevando assim o potencial de biorremediação (NAMKOONG et al., 2002). A razão entre solo contaminado e resíduo orgânico deve ser determinada porque uma razão inapropriada pode retardar ou inibir a atividade microbiana. Diante desse fato, utilizaram-se diferentes porcentagens de esterco bovino, segundo a Figura 24.

2.4.4. A coleta

Foram realizadas 7 coletas (1º, 10º, 25º, 43º, 58º, 73º e 90º dia, em que o 1º dia corresponde ao tempo 0 h) em cada experimento durante os 3 meses decorridos do processo de vermicompostagem. Em cada experimento foram realizadas três amostragens, coletando-se as amostras a aproximadamente 15 cm de profundidade. As amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C para posteriormente serem extraídas.

2.4.5. A extração e a determinação dos HPAs

Cinco gramas das amostras e 5 g de sulfato de sódio anidro foram colocados em recipiente fechado de 200 mL com 25 mL de acetona. A amostra foi sonicada em banho de ultra-som (modelo 2510, marca Bransom) por 15 min. A solução extraída foi centrifugada e filtrada em um vial (em filtro Minisart RC15 de 15 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade da marca Sartorius) e armazenada em refrigerador a 4°C para posterior determinação.

As determinações dos 17 HPAs foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, com detector UV-Vis, modelo SPD-10A VP, e fluorescência, modelo RF-10A, utilizando uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm SS, Wakosil II 5C18AR 5 µm, SGE), segundo as condições cromatográficas descritas no capítulo I. A cada determinação foi feita uma corrida com padrão contendo os 17 HPAs a fim de corrigir o tempo de retenção referente a cada composto e o comprimento de onda de excitação e emissão durante a corrida cromatográfica.

Buscou-se certificar, através das determinações das concentrações dos 17 HPAs durante o decorrer do experimento, se a técnica de vermicompostagem pode ser aplicada para limpar solos contaminados por compostos derivados de petróleo ao adicionar-se matriz orgânica a esse solo.

2.4.6. A extração e a determinação qualitativa dos HPAs nas minhocas após o 90º dia do processo.

Cinco gramas da minhoca e 5 g de sulfato de sódio anidro foram colocados em recipiente fechado de 200 mL com 25 mL de acetona. A amostra foi sonicada em banho de ultra-som (modelo 2510, marca Bransom) por 15 min. A solução extraída

foi centrifugada e filtrada em um vial (em filtro Minisart RC15 de 15 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade da marca Sartorius) e armazenada em refrigerador a 4 °C para posterior determinação.

Seguiu-se a mesma metodologia (itens 1.3.8. e 1.3.9., página 45) adotada anteriormente para a extração e determinação dos HPAs nas minhocas em cada experimento.

2.4.7. A biomassa das minhocas

As minhocas foram pesadas no início dos experimentos e após o 90º dia. Elas foram lavadas, secas em papel de filtro e pesadas em balança analítica. Foram pesados 20 indivíduos em cada experimento, que correspondem em média a 5% dos indivíduos inicialmente adicionados a cada experimento.

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1. A remoção dos HPAs durante o processo de vermicompostagem

A Figura 26 mostra a cinética de remoção dos HPAs no 1º, 10º, 25º, 43º, 58º, 73º e 90º dia, onde o 1º dia corresponde ao tempo 0 h dos experimentos de solo dopado a 2% (v/v) de diesel com porcentagens de 0, 25, 50, 60 e 75% de esterco bovino sem pré-compostar.

Não foram detectados os compostos benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno em nenhum dos experimentos.

Figura 26 – Concentrações (mg kg^{-1}) dos HPAs nas amostras durante o processo da vermicompostagem. Coleta realizada em triplicata. Determinação por CLAE com detector de fluorescência ou com detector UV-Vis.* detector UV-Vis.

(A) 0% de esterco bovino e 100% solo a 2% diesel; (B) 25% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo a 2% diesel; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo a 2% diesel.

Figura 26 – Continuação.

Figura 26 – Conclusão.

Observa-se, pelos resultados obtidos, que os compostos foram removidos durante a vermicompostagem, enquanto a concentração dos compostos na caixa contendo o solo dopado (utilizado como controle - A) permaneceu quase sempre inalterada.

Pelo gráfico de cinética do naftaleno (Figura 26) observa-se que houve uma diminuição na concentração deste HPA no experimento A (controle) até o 25º dia. Este composto de baixa massa molar e de baixo ponto de ebulição e com maior polaridade que os demais HPAs tende a facilmente evaporar para o ambiente e a dissolver-se melhor em água. Por essa razão, é altamente suscetível ao processo de degradação, seja ele fotoquímico ou biológico. Observou-se, menos acentuadamente, esse mesmo comportamento para o acenaftileno e acenafteno + fluoreno.

Pela Figura 26, utilizando-se a CLAE para a determinação da concentração de benzo[a]pireno, constatou-se um aumento da concentração desse composto. Porém, uma confirmação mais precisa deverá ser realizada futuramente por espectrômetro de massas (CG-EM).

Ainda pela Figura 26, pode-se notar que os HPAs que são mais polares e que apresentam menor massa molar degradaram com maior facilidade em relação àqueles compostos com maior massa molar. Neste estudo fica claro que a persistência de HPAs no ambiente solo está relacionada com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA. Pela Tabela 6, nota-se que os compostos que contêm até 4 anéis benzênicos (naftaleno, acenaftileno, acenafteno+fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, b[a]antraceno, criseno) apresentaram maior tendência à degradação, ou seja, maior remoção desses compostos durante o processo de biorremediação. Já os compostos que contêm mais de 4 anéis

benzênicos, b[e]pireno, b[e]acefenantrileno, b[k]fluoranteno, b[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, apresentaram menor remoção. Esses compostos são mais apolares e menos voláteis, portanto são menos susceptíveis à degradação, lixiviação e volatilização, tendendo a adsorverem nas partículas do solo com maior facilidade e a permanecem no ambiente por um longo tempo. Por essa razão são utilizados para efeito de monitoramento ambiental em áreas contaminadas por combustíveis. (WIIDFL et al., 1992; UTSUMI et al., 1998).

Tabela 6 – Percentual de remoção dos HPAs (%) durante o processo de biorremediação em cada experimento (valores obtidos em triplicata).

HPA	A	B	C	D	E
Naftaleno	53,3	95,4	91,8	90,6	86,8
Acenaftileno	36,8	88,6	72,1	79,0	91,5
Acenafteno + Fluoreno	0,0	97,9	94,2	93,0	86,4
Fenantreno	0,0	94,0	89,8	71,3	47,3
Antraceno	14,3	99,1	97,8	98,8	98,0
Fluoranteno	18,6	97,8	98,3	97,0	93,8
Pireno	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Benzo[a]antraceno	0,0	71,6	83,5	86,1	86,3
Criseno	0,0	83,1	82,2	84,3	83,3
Benzo[e]pireno	8,1	61,2	27,2	66,9	60,9
Benzo[e]acefenantrileno	0	33,4	18,6	ND	ND
Benzo[k]fluoranteno	55,2	49,4	55,9	64,7	64,6
Benzo[a]pireno	0	0	0	0	0
Dibenzo[a,h]antraceno	0	51,9	73,6	70,2	50,6
Benzo[g,h,i]perileno	ND	ND	ND	ND	ND
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	ND	ND	ND	ND

Monitorou-se a biorremediação através da determinação da concentração dos contaminantes, mas deve-se ressaltar que nem sempre a redução dos mesmos é um indicativo do decréscimo da toxicidade do solo. A degradação incompleta e a formação de metabólitos intermediários tóxicos podem resultar no aumento da toxicidade do solo durante a biorremediação. A degradação pode ocorrer por processos químicos, físicos e biológicos, levando à formação de compostos de diferente toxicidade. Deve-se pensar em se estudar futuramente os possíveis produtos da degradação dos HPAs e sua toxicidade no ambiente, além de fazer um

controle de sua concentração através de um espectrômetro de massas durante o processo da vermicompostagem.

Recentemente, a remoção de hidrocarbonetos do solo tem sido investigada utilizando glicose, serradura, esterco, biossólido e composto com bioestimulantes (NAMKOONG et al., 2002). Os bioestimulantes são fontes de nutrientes para minhocas na vermicompostagem e contém microorganismos que podem acelerar a remoção de hidrocarbonetos (NAMKOONG et al., 2002). A liberação de nutrientes é lenta, reduzindo, assim, possíveis prejuízos e a contaminação do meio ambiente (CONTRERAS-RAMOS et al., 2008).

Alguns estudos, no entanto, têm relatado o uso de biossólido ou vermicomposto e/ou de minhocas para remediar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em solos contaminados. Contreras-Ramos et al. (2008) estudaram a remoção de três HPAs, fenantreno, antraceno e benzo[a]pireno em solo esterilizado e não esterilizado com ou sem biossólido ou vermicomposto, e com ou sem minhocas, da espécie *Ensenia foetida*, durante uma incubação aeróbia a 22,2°C durante 70 dias. A remoção de fenantreno foi mais rápida no solo adicionando-se minhocas, que em solos sem minhocas após 7 dias. Os experimentos demonstraram que o desaparecimento de fenantreno, antraceno e b[a]pireno nos solos é acelerado pela presença de minhocas. A remoção dos HPAs aumentou no solo não-esterilizado com adição de minhocas. Houve uma degradação de 91% de antraceno, 16% de b[a]pireno e 99% fenantreno dissipado comparado a 42%, 3% e 95% em solo não-esterilizado sem minhocas, mostrando, assim, que o efeito da adição de minhocas foi altamente significativo em matéria de perda de HPAs no solo, e que a atividade das minhocas aumenta a remoção de HPAs, estimulando a quantidade e a atividade da biomassa microbiana do solo e melhora a sua aclimatação e adaptação

microbiana. As minhocas excretam em seus dejetos nutrientes como N e P, e microorganismos, que passam a acelerar a remoção de HPAs. Além disso, as minhocas melhoraram a remoção de contaminantes dos solos e pela aeração fornecem nutrientes para os microorganismos do solo.

No estudo de Contreras-Ramos et al. (2008) também foi relatado o efeito da flora intestinal microbiana das minhocas e de sua atividade na remoção de HPAs no solo esterilizado com minhocas. A remoção de fenantreno foi em média 89%, em solo esterilizado com minhocas nos primeiros 7 dias e maior que 75% em solo não-esterilizado sem minhocas. A remoção de antraceno foi 63% em solo esterilizado com minhocas comparado a 42% em solo não-esterilizado sem minhocas, enquanto que a remoção de b[a]pireno foi de 58% comparado a 3% após 70 dias. Houve uma maior remoção desses HPAs no solo esterilizado com minhocas do que no solo não-esterilizado sem minhocas, mostrando que as minhocas têm maior capacidade de remoção que os microorganismos que vivem neste solo. Estes resultados sugerem que as minhocas e/ou os microrganismos que vivem em seu trato intestinal podem desempenhar um papel importante na remoção de HPAs. Os microrganismos presentes na flora intestinal das minhocas contribuíram para a remoção dos HPAs, e 100% de fenatreno, 63% de antraceno e 58% de b[a]pireno foram removidos do solo esterilizado na presença de *Ensenia foetida*. Verificaram também que a adição de bio sólido e vermicomposto em menor grau acelera a remoção de HPAs do solo.

A Figura 27 apresenta o cromatograma referente à amostra do experimento A (0% de esterco bovino) no 1º dia de processo.

Figura 27 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) da amostra do experimento A no 1º dia. O extrato foi diluído 1:9 v/v antes da corrida cromatográfica. Identificação: naftaleno (tr:10,871), acenafteno e fluoreno (tr:11,981), fenantreno (tr: 12,366), antraceno (tr: 12,806), fluoranteno (tr: 13,092), pireno (tr:13,711), b[a]antraceno (tr: 14,406), criseno (tr: 14,829), benzo[e]pireno (tr: 15,469), b[e]acefenantrileno (tr: 15,717), b[k]fluoranteno (tr: 16,629), benzo[a]pireno (tr: 17,536)

As Figuras 28 e 29 apresentam os cromatogramas referentes às amostras do experimento E (75% de esterco bovino e 25% solo a 2% diesel) no 1º e 90º dia de processo. O extrato referente à amostra E do 1º dia foi diluído 1:9 v/v antes da injeção. Percebe-se uma significativa redução na intensidade e resolução dos picos após os 90 dias de vermicompostagem. Esta característica indica que houve uma remoção de compostos derivados de petróleo durante o processo de biorremediação.

Percebe-se nos cromatogramas um aumento na linha de base após 10 minutos de corrida, indicando ser um cromatograma típico de amostras derivadas de petróleo (hidrocarbonetos de petróleo).

Figura 28 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) da amostra do experimento E no 1º dia. O extrato foi diluído 1:9 v/v antes da corrida cromatográfica. Identificação: naftaleno (tr:9,831), acenafteno e fluoreno (tr:10,993), fenantreno (tr: 11,371), antraceno (tr: 11,801), fluoranteno (tr: 12,269), pireno (tr:12,456), benzo[a]antraceno (tr: 13,383), criseno (tr: 13,792), benzo[e]pireno (tr: 14,518), benzo[e]acefenantrileno (tr: 14,874), benzo[k]fluoranteno (tr: 15,247), benzo[a]pireno (tr: 16,173), dibenzo[a,h]antraceno (tr: 17,166).

Figura 29 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) da amostra do experimento E no 90º dia. Identificação: naftaleno (tr:9,825), acenafteno e fluoreno (tr:11,007), fenantreno (tr: 11,371), antraceno (tr: 11,818), fluoranteno (tr: 12,122), pireno (tr:12,446), benzo[a]antraceno (tr: 13,415), criseno (tr: 13,823), benzo[e]pireno (tr: 14,455), benzo[e]acefenantrileno (tr: 14,619), benzo[k]fluoranteno (tr: 15,311), benzo[a]pireno (tr: 16,250), dibenzo[a,h]antraceno (tr: 17,215).

2.5.2. O aspecto do solo e das minhocas após o processo.

A Figura 30 mostra fotografias tiradas na montagem dos experimentos.

Figura 30 - Fotografias tiradas na montagem dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar. (B) 25% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo a 2% diesel; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo a 2% diesel.

A Figura 31 mostra fotografias tiradas após 3 meses do início dos experimentos. Observa-se uma estrutura diferente do solo, com a cor típica de um solo mais humificado.

As minhocas deixam o solo com aspecto homogêneo, mantendo a sua fertilidade e estrutura e melhorando a capacidade de infiltração da água e aeração (CONTRERAS-RAMOS et al., 2008). Funcionam como engenheiras do solo, alterando o substrato através do qual elas se movimentam, melhorando o ecossistema dos solos. As minhocas fazem galerias através do solo, assim, acumulam muitos poluentes orgânicos lipofílicos do meio circundante, então elas podem ser usadas para remover os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) a partir do solo (CONTRERAS-RAMOS et al., 2008).

A atividade das minhocas contribui para a biodegradação de contaminantes orgânicos. Alguns trabalhos indicam que outros anelídeos podem metabolizar o benzo[a]pireno, porque eles possuem enzimas citocromo-P450 capazes de degradar este composto (CONTRERAS-RAMOS et al., 2008). A mesma atividade enzimática foi encontrada em minhocas terrestres, como a *Eisenia foetida*. Microrganismos autóctones degradam hidrocarbonetos (JOHNSON et al., 2005), mas as minhocas ao serem adicionadas ao solo melhoram a aeração, estimulam a atividade microbiana e aumentam a biodegradação. Enquanto há uma grande diversidade de organismos capazes de degradar HPAs de baixa massa molar, são relativamente poucos os gêneros que têm sido capazes de degradarem HPAs de alta massa molar, tal como o b[a]pireno (JUHASZ e NAIDU, 2000).

Figura 31 - Fotografias tiradas após 3 meses dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar. (D) 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel.

Observa-se (Figura 32-A) após os 3 meses do processo de vermicompostagem, ao retirar-se o material das caixas, que havia espaços onde o material encontrava-se em um maior estado de decomposição (circulado em vermelho), e outros com menor estado de decomposição (circulado em branco). Além disso, verificou-se a formação de clitelo nas minhocas e produção de casulos nas caixas dos experimentos C, D, E, F, indicando a reprodução das minhocas (Figura 32-B).

Figura 32 – Experimento após 3 meses do processo de vermicompostagem utilizando esterco bovino sem pré-compostar

Outros fatores que devem ser levados em consideração para os processos de vermicompostagem são a qualidade e a quantidade de material em relação ao número de minhocas (EDWARDS e FLETCHER, 1988; REINECKE e VILJOEN, 1990). Diante disso, para efeito de enriquecimento deste trabalho realizou-se uma nova batelada de experimentos utilizando esterco bovino pré-compostado por 15 dias como matéria orgânica.

A Figura 33 mostra a biomassa das minhocas (g) no início e após 3 meses do processo da vermicompostagem, utilizando-se esterco bovino sem pré-compostar e pré-compostado. De acordo com Gunadi et al. (2002) muitos estudos têm usado

matéria-prima fresca, mas o grau de estabilização ou a pré-compostagem da matéria-prima determina a velocidade e a qualidade do vermicomposto. A pré-compostagem é um passo importante para reduzir a mortalidade das minhocas devido à presença de elementos tóxicos, como amônia e ácidos em esterco verde e ao aumento de temperatura durante os estágios iniciais de vermicompostagem. GUNADI et al. (2003) encontraram uma mortalidade de 13% dos indivíduos para resíduos pré-compostados e 20% para o resíduo sem nenhuma estabilização prévia. Com relação ao crescimento da biomassa, em ambos os experimentos o valor médio observado foi de 7,9 mg dia⁻¹. Os autores também observaram valores da C/N variáveis entre 29,0-51,5 e 14,8-17,9 durante os seis meses de experimento. O mesmo comportamento foi observado neste trabalho. Os experimentos utilizando resíduo sem nenhuma estabilização prévia promoveram maior mortalidade dos indivíduos, no entanto, Gunadi et al. (2003) afirma que a biomassa dos organismos manteve-se inalterada. No presente estudo os indivíduos dos experimentos com esterco bovino pré-compostado apresentaram menor biomassa em relação às aquelas com esterco bovino sem pré-compostar.

A Figura 34 mostra os tamanhos apresentados pelas minhocas nas caixas de 25, 50, 60, 75 e 100% de esterco bovino pré-compostado após o processo. As minhocas da caixa de 25% e 100% apresentaram os menores e os maiores tamanhos, respectivamente.

Figura 33 – Biomassa das minhocas no início do processo e ao final de 3 meses, utilizando esterco bovino (a) sem pré-compostar e (b) pré-compostado. Média de 20 indivíduos.

Figura 34 – Tamanho apresentado pelas minhocas após 3 meses do processo, utilizando esterco bovino pré-compostado.

O comprimento das minhocas (Figura 35) após o processo de vermicompostagem variou de 5 a 11 cm. No início do processo elas apresentavam um tamanho de 3 a 4 cm.

Figura 35 – Maior tamanho apresentado pelas minhocas após o processo de vermicompostagem.

A Figura 36 mostra o aspecto das minhocas em cada experimento utilizando esterco bovino pré-compostado ao fim do 90º dia do processo. Pode-se afirmar que a quantidade da matéria orgânica influenciaram no tamanho da minhoca.

Figura 36 – Minhocas em cada experimento (B, C, D, E e F) após 3 meses utilizando esterco bovino sem pré-compostar.

2.5.3. Compostos derivados de petróleo nas minhocas

Os cromatogramas (Figuras de 37 a 41) fornecem informações qualitativas sobre a existência de hidrocarbonetos nas minhocas. Percebe-se que os cromatogramas dos experimentos B, C, D e E apresentaram um aumento na linha de base após 10 minutos de corrida, típico de amostras derivadas de petróleo (hidrocarbonetos de petróleo). Já o cromatograma do experimento F, mantido como branco, não apresenta esta característica. Isto indica que as minhocas, além de degradarem os compostos orgânicos, tendem a incorporá-los em seu organismo.

As minhocas acumulam muitos poluentes orgânicos lipofílicos do solo a partir do ambiente circundante, não só através da absorção pela superfície do corpo na forma de fração dissolvida na água intersticial, mas também pela absorção intestinal durante a passagem do solo através do tubo digestivo (CONTRERAS-RAMOS et al., 2006 e CONTRERAS-RAMOS et al., 2008).

Figura 37 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento B.

Figura 38 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento C.

Figura 39 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento D.

Figura 40– Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato extraído das minhocas do experimento E.

Figura 41 – Cromatograma (CLAE-fluorescência) do extrato das minhocas do experimento F.

2.6. CONCLUSÕES

Verificou-se através da determinação da concentração dos contaminantes, que houve uma remoção dos HPAs durante o processo de biorremediação. A biorremediação utilizando-se a ação conjunta de minhocas e de microorganismos apresenta vantagens, como a de realizar o processo no próprio local contaminado, por ser natural e por deixar o solo mais rico em nutrientes, entre outros, além de ser economicamente mais viável. Esse tipo de remediação pode ser utilizado em locais impactados por derramamento de compostos derivados de petróleo, como, por exemplo, postos de gasolina com vazamento de combustíveis, além de ser utilizado para degradar esses compostos em resíduos sólidos de laboratórios de análises ambientais, onde se recebe um vasto número de amostras de solo para serem analisadas.

A utilização de minhocas em um sítio contaminado é uma forma ambientalmente amigável para eliminar hidrocarbonetos do solo. No entanto, pode ter uma limitação quanto à grande quantidade de minhocas necessária para eliminar os HPAs de solo e para a necessidade de fornecer-lhe substrato suficiente, mantendo simultaneamente o teor de água do solo suficientemente alto para o seu normal funcionamento. Assim, sugere-se que o solo seja caracterizado e que se acrescente matéria orgânica (esterco bovino, por exemplo) para suprir os nutrientes necessários à manutenção das minhocas.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; SILVA, V. F. **Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa Biológica do Solo, 1992. 13 p. (Comunicado Técnico, 8)
- AQUINO, M. A.; NOGUEIRA, E. M. **Fatores limitantes da vermicompostagem de esterco suíno e de aves e influência da densidade populacional das minhocas na sua reprodução**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001. 10p.
- BUNDY, J.G.; LENZ E.M.; OSBORN D.; WEEKS J.M.; LINDON J. C.; NICHOLSON J. K. Metabolism of 4-fluoroaniline and 4-fluorobiphenyl in the earthworm *Eisenia veneta* characterized by high-resolution NMR spectroscopy with directly coupled HPLC-NMR and HPLC-MS. **Xenobiotica**, v. 32, n. 6, p. 479-490, 2002.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **The use of worms in the production of organic compost**. São Paulo: CETESB, 1987. 8p. (Norma P4230)
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Padrões de Qualidade de Solos e Águas Subterrâneas**. São Paulo: CETESB, 2003. 8p. (Relatório Técnico)
- CONTRERAS-RAMOS, S.M.; ALVAREZ-BERNAL, D.; DENDOOVEN, L. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 396–401, 2006.
- CONTRERAS-RAMOS, S.M.; ALVAREZ-BERNAL, D.; DENDOOVEN, L. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1954–1959, 2008.
- DORN, P.B.; VIPOND, T. E.; SALANITRO, J.P.; WISNIEWSKI, H.L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. **Chemosphere**, v. 37, n. 5, p. 845-860, 1998.
- DOMINGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché(1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? **Pedobiologia**, v. 49, p. 81-87, 2005.
- EDWARDS, C.A.; FLETCHER, K.E. Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter break-down. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 24, p. 235-240, 1988.
- EDWARDS, C. A. Historical overview of vermicomposting. **BioCycle**, v. 36, p. 56-58, 1995.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.6200 - Earthworm subchronic toxicity test. Cincinnati: Environmental Protection Agency, 1996. 11p.

FURTADO, M. Remediação de solos. **Química e Derivados**, p. 26-45, 2005.

GUNADI, B.; BLOUNT, C.; EDWARDS, C. A. The growth and fecundity of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle solids pre-composted for different periods. **Pedobiologia**, v. 46, p. 15-23, 2002.

GUNADI, B.; EDWARDS, C.A. The effects of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) (Lumbricidae). **Pedobiologia**, v. 47, p. 321-329, 2003.

GUPTA, S. K.; TEWARI, A.; SRIVASTAVA, R.; MURTHY, R. C.; CHANDRA, S. Potential of *Eisenia foetida* for sustainable and efficient vermicomposting of fly ash. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 163, p. 293-302, 2005.

HICKMAN, Z.A.; REID, B.J.; MUGGLETON, S.; STANLEY, P. Application of vermicomposting for the bioremediation of contaminated soils. In: INTERNATIONAL IN SITU AND ON SITU BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, 8., 2005, Baltimore. **Anais ...**, Maryland: Battelle, 2005. p.12.

JØRGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 245-254, 2000.

JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 71–84, 2005.

JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 45, p. 57-88, 2000.

KÄSTNER, M.; MAHRO, B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 668-675, 1996.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1985. 492p.

LANDGRAF, M.D.; ALVES, M.R.; SILVA, S.C.; REZENDE, M.O.O. Caracterização de ácidos húmicos de vermicomposto de esterco bovino compostado durante 3 e 6 meses. **Química Nova**, v. 22, p. 483-486, 1999.

LUKKARI, T.; TAAVISAINEN, M.; VAISANEN, A.; HAIMI, J. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 340-348, 2004.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. São Carlos: Emprapa-CNPMA, 1997. 440p.

MOLSON, J.W.; FRIND, E.O. ;VAN STEMPOVOORT, D.R.; LESAGE S. Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in groundwater: 2. Numerical

model development and application. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 54, p. 277-305, 2002.

MORGAN J. E.; MORGAN A. J. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworms species. **Applied Soil Ecology**, v. 13, p. 9-20, 1999.

MORRISON, D.E.; ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and dieldrin in soil. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 709-713, 2000.

NADDAFI, K.; ZAMANZADEH, M.; AZIMI, A.A.; OMRANI, G. A.; MESDAGHINIA, A.R.; MOBEDI, E. Effect of temperature, dry solids and C/N ratio on vermicomposting of wates activated sludge. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 7, n. 7, p. 1217-1220, 2004.

NAMKOONG, W.; HWANG, E. Y.; PARK, J.S.; CHOI, J.Y. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. **Environmental Pollution**, v. 119, p. 23-31, 2002.

OLIVEIRA, C. **Compostagem e vermicompostagem apostila elaborada para o curso de Zootecnia da UNESP/FCA**. Botucatu: UNESP, 2001. 9p.

PEREIRA, M.G.; MARCO A. Z.; ARRUDA, M. Z.A. Vermicompost as a Natural Adsorbent Material: Characterization and potentialities for cadmium adsorption. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 14, p. 39-47, 2003.

PEREIRA E. W. L.; AZEVEDO, C. M. S. B.; LIBERALINO FILHO, J.; NUNES, G. H. S.; TORQUATO, J. E.; SIMÕES, B. R. Produção de vermicomposto em diferentes proporções de esterco bovino e palha de carnaúba. **Caatinga**, v. 18, n. 2, p.112-116, 2005. Disponível em: <http://www.ufersa.edu.br/caatinga/artigos/caav18n28.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2008.

PHILLIPS, T. M.; LIU, D.; SEECH, A. G.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 132–139, 2000.

REINECKE, A. J.; VILJOEN, S. A. The influence of feeding patterns on growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Biology and Fertility of Soils**, v. 10, p. 184–187, 1990.

ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSON-VIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K.; HAAHTEL, K. Means to improve the effect of in situ biorremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 179-185, 2000.

SAINT-DENIS, M.; NARBONNE, J. F.; ARNAUD, C.; THYBAUD, E.; RIBERA, D. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1837–1846, 1999.

SATERBAK, A.; TOY, R. J.; WONG, D. C. L.; MCMAIN, B. J.; WILLIAMS, M. P.; DORN, P. B.; BRZUZY, L. P.; CHAI, E.Y.; SALANITRO, J. P. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon- contaminated soils and application to ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 1591–1607, 1999.

SATERBAK, A.; TOY, R. J.; MCMAIN, B. J.; WILLIAMS, M. P.; DORN, P. B. Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 2643–2652, 2000.

SEMPLE, K.T.; REID, B.J.; FERMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 269-283, 2001.

SHAHMANSOURI, M. R.; POURMOGHADAS, H.; PARVARESH, A.R.; ALIDADI, H. Heavy metals bioaccumulation by iranian and australian earthworms (*Eisenia fetida*) in the sewage sludge vermicomposting. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 2, p. 28-32, 2005.

SHARMA, S.; PRADHAN, K.; SATYA, S.; VASUDEVAN, P. Potentiality of earthworms for waste management and in other uses – a review. **The Journal of American Science**, v. 1, p. 4-16, 2005.

TANG, J.; LISTE, H.H.; ALEXANDER, M. Chemical assays of availability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Chemosphere**, v. 48, p. 35-42, 2002.

THARAKAN, J.; ADDAGADA, A.; TOMLINSON, D.; SHAFAGATI, A. Vermicomposting for the bioremediation of PCB congeners in SUPERUND site media. In: BREBBIA, C.A.; KUNGOLOS, S.; POPOV, V.; ITOH, H. (Eds.). **Waste Management and the Environment II**. Southampton : Wit Press, 2004. pp. 117-124

UTSUMI, A.; NAKASHIMA, A.; ANDO, K.; KIZU, R.; HAYAKAMA K. Flow injection analysis of C-fuel oil-contaminated samples based on the fluorescence detection for polycyclic aromatic hydrocarbons. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 845-847, 1998.

VAN GESTEL, K.; MERGAERT, J.; SWINGS, J.; COOSEMANS, J.; RYCKEBOER, J. Biorremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. **Environmental Pollution**, v. 125, p. 361-368, 2003.

WIIDFL, S. R.; BERROW, M. L.; MCGRATH, S. P.; JONES, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. **Environmental Pollution**, v. 76, p. 25-32, 1992.

WISCHIMANN, H.; STEINHART, H. The formation of PAH oxidation products in soil and soil/compost mixtures. **Chemosphere**, v. 35, n. 8, p. 1681-1698, 1997.

CAPITULO III

Caracterização físico-química e estudo da humificação durante a biorremediação

3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Na matéria orgânica encontram-se dois tipos de substâncias: a denominada matéria orgânica ativa, que ainda não se decompôs e a matéria orgânica inativa ou humificada ou estabilizada, também denominada de húmus, não mais sujeita a decomposições intensas. Portanto, o húmus pode ser dividido em duas frações: húmica e não-húmica.

Durante o processo de decomposição, ou seja, de mineralização da matéria orgânica pelo processo da compostagem ou vermicompostagem, haverá liberação de elementos químicos, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, os quais deixam a forma orgânica, dita imobilizada, para passarem à forma assimilável de nutrientes para as plantas. Alguns componentes da matéria orgânica são utilizados pelos microorganismos e minhocas para formação de seus tecidos, outros são volatilizados e outros são transformados biologicamente em substância escura, uniforme, com consistência amanteigada e aspecto de massa amorfa, rica de partículas coloidais, proporcionando a esse novo material formado propriedades físicas, químicas e físico-químicas inteiramente diferentes da matéria-prima original. A essa substância dá-se a denominação de húmus. O húmus apresenta coloração variando de cinza escuro à preta intensa. É praticamente insolúvel em água, embora boa parte possa entrar em suspensão coloidal, e é solúvel em álcalis (KIEHL, 1985).

A produção de vermicomposto é acelerada devido à digestão da celulose e à semi-decomposição provocada pelas minhocas que trabalham simbioticamente com

os microorganismos. Isto fortalece sua habilidade na redução da matéria orgânica crua em material humificado (KIEHL, 1985, LONGO, 1987).

Diferentes espécies de minhocas secretam diferentes enzimas baseadas em suas fontes de alimentação preferidas. A *Eisenia foetida* secreta duas proteases e uma amilase para ajudar na sua digestão. Essas enzimas ajudam a acelerar a humificação da matéria orgânica ingerida, auxiliando no aumento da flora microbiana, que em atividade aumenta a degradação da matéria orgânica (SHARMA et al., 2005). Também seus sucos gástricos atacam grânulos de rochas e minerais engolidos, alterando-lhes a estrutura. Os carbonatos por elas expelidos servem como corretivo dos solos ácidos e os demais elementos do húmus constituem excelentes nutrientes vegetais (CANTI e PEARCE, 2003).

A qualidade e a quantidade dos alimentos disponibilizados nos resíduos influenciam no tamanho e na velocidade de crescimento da minhoca e na produção de coprólitos (SHARMA et al., 2005). Os coprólitos neutralizam os solos originais, quer eles sejam ácidos ou alcalinos. São pobres em argilas, ricos em matéria orgânica, nitratos, fósforo, potássio, cálcio e magnésio e apresentam elevada capacidade de troca catiônica, saturação em base e umidade (KIEHL, 1985, SHIPITALO e PROTZ, 1989).

O tempo necessário para compostar resíduos orgânicos depende da natureza física e química da matéria-prima como a relação C/N, teor de nitrogênio da matéria-prima, dimensão das partículas, entre outros, e das condições do meio, tais como umidade, temperatura e pH. Outros fatores de menor importância completam a relação dos agentes que influenciam na decomposição. Para que o processo de decomposição seja bem sucedido, a matéria-prima deve ter um balanço da relação C/N favorável ao metabolismo dos organismos que vão efetuar sua biodigestão,

deve-se facilitar a digestão dessa matéria-prima dispondo-a em local adequado, controlando a umidade, a temperatura e os demais fatores, conforme o caso requerer. Antes de se discorrer sobre o tempo de compostagem e vermicompostagem é necessário esclarecer qual o produto final que se pretende obter e qual o conceito que se tem sobre as qualidades desse material.

O teor de nitrogênio dos resíduos a serem decompostos deve ser teoricamente 1,7% (KIEHL, 1985). Quando o conteúdo de nitrogênio for inferior a esse valor, o tempo de decomposição será maior. Os materiais pobres em nitrogênio decompõem-se mais lentamente, liberando a princípio pouco nitrogênio e ao final geram maior porção de húmus que o material rico em nitrogênio. Por outro lado, experimentos têm demonstrado que a decomposição de resíduos vegetais ricos em nitrogênio é rápida, liberando-se uma grande quantidade de amônia, enquanto que, comparativamente, pequena porção de húmus é formada (KIEHL, 1985).

Portanto, segundo Imbar et al. (1999), a decomposição de resíduos com concentração de nitrogênio inferior a 2% ou com uma relação C/N maior que 25 possibilita a imobilização de nitrogênio mineral, enquanto materiais com concentração superiores a esses valores liberam o nitrogênio mineral. A concentração de nitrogênio e relação atômica C/N são os principais fatores que determinam a habilidade na liberação do nitrogênio dos resíduos. Relações muito baixas causam perdas praticamente inevitáveis de nitrogênio na forma de amônia, enquanto que os valores mais altos tornam o processo mais prolongado.

A razão C/N é de fundamental importância no processo de vermicompostagem para produção de energia e metabolização do protoplasma, proteínas e aminoácidos das células (KIEHL, 1985 e WALLACE, 1994). A utilização da matéria orgânica fresca não é aconselhável, devido aos valores mais altos da

relação C/N e excesso de componentes orgânicos tóxicos. As minhocas desenvolvem-se bem com uma alimentação relativamente rica em nitrogênio protéico; devido a este fato elas preferem os resíduos de origem animal aos de vegetal. Porém, resíduos com teores elevados de proteína devem ser evitados por serem altamente fermentáveis no intestino da minhoca, provocando sua morte. A matéria orgânica fibrosa, rica em carbono, apresenta uma relação C/N de 70/1 a 90/1, o que dificulta sua decomposição pelas bactérias. Desta forma é necessária a inclusão do esterco, que é rico em nitrogênio e tem a função de baixar a relação C/N em níveis ideais para o desenvolvimento das bactérias (THOMSEN, 2000).

O favorecimento da respiração microbiana e do desenvolvimento da população de bactérias devido ao excremento das minhocas está diretamente associado à transformação microbiana do nitrogênio, indicando uma elevada atividade de nitrificação e desnitrificação (PARKIN e BERRY, 1999). A atividade microbiana em processos aeróbios utiliza de 15 a 30 partes de carbono para cada parte de nitrogênio, mantendo uma razão C/N aproximadamente entre 15/1 e 30/1. Semelhantemente, a relação C/N ideal para facilitar a decomposição do resíduo pelas minhocas e microorganismos é de 30 partes de carbono para 1 de nitrogênio. De acordo com estudos realizados por Aquino et al. (1994), Elvira et al. (1996) (a) e Elvira et al. (1996 b), esses valores devem ser controlados através da pré-compostagem ou pelas misturas de material a ser utilizado na vermicompostagem.

Os resíduos contêm diferentes quantidades de nutrientes em sua composição, a qual influencia na velocidade e no grau de decomposição desses resíduos. Os resíduos não são igualmente atacados nem se decompõem inteiramente de uma só vez. Seus vários constituintes são decompostos em diferentes estágios, com diferentes intensidades. A velocidade e o grau de

decomposição dos resíduos vegetais e animais podem ser medidos de várias maneiras: pela quantidade de gás carbônico desprendido, pelo consumo de certos componentes como os açúcares, os amidos e as celuloses, e pela transformação de nitrogênio orgânico em amônio, nitrito e nitrato. As análises químicas em laboratório ou os testes rápidos de campo permitem que se acompanhe o grau de transformação que esses materiais vão sofrendo durante o processo de decomposição. A diminuição do conteúdo de matéria orgânica e, conseqüentemente, o aumento do teor de cinzas que ocorre no processo, devido à simultânea humificação e mineralização dos restos orgânicos, é outra maneira de se acompanhar a decomposição. A fertilidade é geralmente avaliada através da análise dos macros e micros nutrientes, C/N e sua capacidade de troca catônica (CTC) (KIEHL, 1985). As cargas negativas, responsáveis pelo aumento da CTC, estão presentes nos grupos funcionais carboxílicos (-COOH), fenólicos (-OH), alcoólicos (-OH) e metoxílicos (-OCH₃) dos ácidos orgânicos presentes no húmus e dependem do pH do meio (ABREU Jr. et al., 2001).

O emprego de esterco animais como de bovinos, equinos, caprinos, suínos e ovinos para a vermicompostagem é uma prática comum mundialmente, pois é um método economicamente interessante de aproveitamento de resíduos gerado no próprio campo (HARRIS et al., 1990; LOH et al., 2005). A produção de minhocas é semelhante, independentemente da origem do esterco empregado (RODRIGUES et al., 2003). No entanto, o esterco bovino, devido à facilidade de ser obtido, vem se constituindo na principal fonte de matéria-prima para essa atividade (TEIXEIRA, 1996).

A composição e as propriedades físico-químicas dos dejetos aceleram em até 60% o desenvolvimento de bactérias, protozoários e outros microrganismos,

inclusive a bactéria que fixa o nitrogênio. Esses mesmos microrganismos multiplicados no processo tornam mais rápida a fermentação de restos vegetais e animais, que podem ser aproveitados pelas plantas. O esterco bovino que passou pelo processo de vermicompostagem tem seu conteúdo de matéria orgânica humificada (ácidos fúlvicos, húmicos e humina) acrescido em até 30% (AQUINO et al., 1994).

3.1.1. As substâncias húmicas

Os solos são constituídos de uma porção inorgânica e outra orgânica. A matéria orgânica existente nos solos, turfas, sedimentos e água consiste de uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição, que resultam de degradação química e biológica de resíduos de plantas e animais e de atividades sintéticas dos microorganismos (SILVA, 2000).

De todos os componentes do solo, a matéria orgânica é, sem dúvida, um dos principais constituintes. Em geral, a fração orgânica do solo tem um papel fundamental na regulação dos processos químicos que ali ocorrem, influi sobre as características físicas e é o centro de quase todas as atividades biológicas, incluindo fauna, flora e sistemas de raízes de plantas superiores (ALLISON, 1982).

A matéria orgânica pode ser dividida em substâncias húmicas e substâncias não húmicas.

As substâncias não-húmicas apresentam características químicas bem definidas: incluindo-se nesse grupo os carboidratos, as proteínas, os peptídeos, os aminoácidos, os ácidos graxos, as ceras e os ácidos orgânicos de massa molar baixa. Esses compostos são mais facilmente degradados por microorganismos possuindo, portanto, curto tempo de vida no ambiente.

As substâncias húmicas não apresentam características químicas e físicas bem definidas (tais como: ponto de fusão, índice de refração, composição elementar, espectro na região do UV etc.). As substâncias húmicas, que se constituem de ácido húmico, ácido fúlvico e humina, pertence a um grupo heterogêneo de compostos originários da degradação química e biológica de resíduos de plantas e da atividade metabólica de microrganismos (KONONOVA, 1966 e STEVENSON, 1994). Os produtos formados tendem a associar-se em estruturas complexas que são mais estáveis que os materiais de origem (SCHNITZER e KHAN, 1978).

As substâncias húmicas são constituídas de estruturas poliméricas amorfas em vários graus de polidispersão, de cor escura, caráter ácido, predominantemente aromático, hidrofílicas, natureza polieletrólítica e massa molar entre algumas centenas até milhares (JAVARONI, 1993). As substâncias húmicas presentes no vermicomposto são macromoléculas amorfas que podem existir como partículas tridimensionais ou como envoltório de partículas minerais (ATIYEH et al, 2002). São encontrados na literatura dados de substâncias húmicas contendo frações de massa molar variando desde 340 a valores superiores a 8500 (MESSIAS, 2004). Entretanto, nenhum conceito com aceitação geral é encontrado, dada a sua natureza complexa e heterogênea. Algumas colocam em evidência sua natureza polimérica, outras a solubilidade ou ainda a sua coloração escura. Atualmente, a definição mais aceita é de que substâncias húmicas são biopolímeros, possuindo alto poder de interagir com íons metálicos e moléculas orgânicas de baixo massa molar (MESSIAS, 2004).

Suas propriedades físico-químicas estão relacionadas à conservação do solo, complexação, transporte e biodisponibilidade de metais, interação com pesticidas etc. (MITCHELL, 1997; KONONOVA, 1966).

Em termos de composição química, as substâncias húmicas apresentam anéis aromáticos substituídos, os quais são geralmente grupos carboxílicos, hidroxílicos e carbonílicos. Em termos de propriedades físicas, as substâncias húmicas são materiais de cargas variáveis, nos quais os grupos carboxílicos e fenólicos dissociam-se gradualmente quando do aumento de pH. Isto leva à formação de cargas negativas que criam sítios trocadores de cátions.

3.1.1.1. Fracionamento das substâncias húmicas

As substâncias húmicas são usualmente fracionadas com base nas suas solubilidades em meio aquoso. As frações obtidas por esse meio incluem:

- **ácidos fúlvicos:** fração solúvel em meios alcalino e ácido;
- **ácidos húmicos:** fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido ($\text{pH} < 2$);
- **humina:** fração insolúvel em qualquer condição de pH.

Dos ácidos húmicos pode ser extraído o ácido himatomelânico, que é a parte dos ácidos húmicos solúveis em álcool (REZENDE, 1999).

Cada uma dessas frações é apresentada como uma mistura heterogênea e complexa, geralmente com estruturas irregulares e com uma grande variedade de massas molares.

A solubilização dos ácidos húmicos em meio alcalino se deve à conversão dos grupos ácidos (principalmente carboxílicos e fenólicos) em íons. A repulsão eletrostática entre os íons formados e as argilas (também carregadas negativamente) e a repulsão intramolecular, que leva a uma conformação menos “enovelada” dos ácidos húmicos, facilita sua hidratação. Ressalta-se, porém, que sais (humatos) de cátions polivalentes não são solúveis (MESSIAS, 2004).

A conformação estrutural das substâncias húmicas depende principalmente de aspectos como pH, concentração iônica do meio e grau de complexação dos grupamentos. Baseado em estudos de pressão de superfície e estudos viscosimétricos, Ghosh e Schnitzer (1982) sugerem um modelo para a conformação de ácido húmico em função do pH e da concentração iônica, como mostra a Tabela 7. O pH influencia na ionização dos grupamentos ácidos, tendo como consequência uma variação da quantidade de cargas formais na cadeia. A repulsão dessas cargas, visando-se a uma energia mínima, faz com que o esqueleto da molécula seja mais ou menos aberto. Portanto, o pH e a concentração iônica apresentam-se como variáveis de grande importância, pois alteram a estrutura macromolecular e a solubilidade das substâncias húmicas (SILVA, 2000).

Tabela 7 - Conformação de substâncias húmicas em função do pH e da concentração iônica.

		Conc. do eletrólito (mol/L)				pH			
		Conc. do ácido	0,001	0,005	0,010	0,050	2,0	3,5	6,5
Ácido fúlvico	Baixa
	Alta
Ácido Húmico	Baixa
	Alta

→ → →

Enovelamento da macromolécula do AH →

O percentual de material húmico extraído varia consideravelmente de um tipo de matriz para outro e, em geral, é maior quando se aumenta o pH do extrator e a temperatura de extração (STEVENSON, 1994).

De acordo com Stevenson (1994), o método de extração ideal seria aquele que permitisse o isolamento dos ácidos húmicos inalterados, livres de contaminantes e representativos de toda a amplitude de massas molares, e que fosse aplicável a

qualquer tipo de matriz. Entretanto, tal método ainda não foi desenvolvido e, provavelmente, nunca o será, dada a complexidade da matriz.

Pode-se dizer que a polimerização muda sistematicamente com o aumento da massa molar. Os ácidos fúlvicos têm baixa massa molar, possuem alto teor de oxigênio, mais baixo teor de carbono e nitrogênio quando comparados aos ácidos húmicos, composto de alta massa molar. A acidez do ácido fúlvico é consideravelmente maior do que a do ácido húmico.

As substâncias húmicas, humina e ácido fúlvico, parecem ser semelhantes estruturalmente, diferindo na massa molar, quantidade de grupos funcionais e interação com os constituintes inorgânicos do solo.

As principais características dos ácidos húmicos são a sua habilidade em interagir com argilas minerais e compostos orgânicos, e de formar complexos solúveis e insolúveis em água, com íons e óxidos hidratados de metais.

3.1.1.2. Estruturas químicas propostas para os ácidos húmicos

Os ácidos húmicos são, geralmente, os principais constituintes do húmus natural, devido a apresentar-se em maior quantidade. Várias têm sido as estruturas propostas para este material. A estrutura proposta por Stevenson (1985) (Figura 42) mostra grupos OH fenólicos livres e ligados, estruturas quinônicas, nitrogênio ligando unidades estruturais e grupos COOH em diferentes pontos dos anéis aromáticos. Esses grupos seriam, então, os responsáveis pela atividade química e biológica dessas substâncias, nos ecossistemas aquáticos e terrestres (STEVENSON, 1994).

Figura 42 - Modelo de ácido húmico proposto por STEVENSON em 1982 (adaptado de STEVENSON, 1985).

A Figura 43 apresenta a estrutura proposta por Schulten e Schnitzer (1993). Essa estrutura apresenta uma maior predominância de grupos alifáticos. Entretanto, não estão apresentados os grupamentos quinônicos, que são responsáveis por grande parte das características redox das moléculas (SCHULTEN e SCHNITZER, 1993).

Figura 43 – Modelo de ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1993).

Sein Jr. et al. (1999) construíram uma proposta de estrutura parcial de ácido húmico, como mostra a Figura 44, levando em consideração o aspecto tridimensional da molécula, utilizando simulações computacionais. Os espaços

intersticiais da molécula proporcionam a geometria necessária para o aprisionamento e/ou quelação de outras substâncias .

Figura 44 – Estrutura tridimensional proposta por Sein Jr. et. al

A presença de cargas elétricas na estrutura macromolecular dos ácidos húmicos desenvolve características polieletrólíticas que permitem formar ligações de hidrogênio com as águas de hidratação dos cátions metálicos, bem como interações eletrostáticas mais fracas como forças de van der Waals (SPOSITO, 1989). As propriedades polieletrólíticas das substâncias húmicas têm um importante papel no ambiente pela sua influência na especiação de íons metálicos e devido ao fato de se ligarem com poluentes orgânicos muitas vezes contribuindo para degradá-los.

Devido à natureza heterogênea e complexa das substâncias húmicas, apesar dos muitos estudos na área, pouco se sabe sobre a formação, síntese e estrutura química das substâncias húmicas (SCHULTEN e SCHNITZER, 1995). Assim, é importante o desenvolvimento de pesquisas que permitam um maior entendimento das principais características das substâncias húmicas, proveniente da vermicompostagem.

Estudos de espectroscopia no IV sobre o ácido húmico de vermicomposto proveniente de esterco bovino mostraram acentuadas diferenças na composição desse material quando comparado com o ácido húmico de turfa ou solo e, ainda, que a concentração de nitrogênio em ácido húmico de vermicomposto foi aproximadamente 2 vezes maior que no ácido húmico de turfa (LANDGRAF e REZENDE, 1997 e LANDGRAF et al.,1999). Messias (2004) utilizou-se de várias técnicas analíticas para verificar as diferenças na composição de ácidos húmicos extraídos de turfa e vermicomposto.

3.2. OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo estudar as propriedades químicas e físicas das amostras dos experimentos A, B, C, D, E e F durante a biorremediação, com o intuito de monitorar a dinâmica de mineralização, ou seja, de degradação. Além disso, procura-se extrair e caracterizar os ácidos húmicos das amostras de cada experimento, através de análise elementar, espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível e no infravermelho.

3.3. METODOLOGIA

Para efeito de enriquecimento deste trabalho realizou-se uma nova batelada de experimentos utilizando esterco bovino pré-compostado por 15 dias como matéria orgânica, como mencionado no capítulo II (página 99). Verificaram-se as diferenças nas condições químicas e físicas referentes à humificação entre o processo de biorremediação utilizando esterco bovino sem pré-compostar e pré-compostado.

3.3.1. Análises granulométricas do solo

Foi realizada análise granulométrica do solo utilizado no estudo para fins de caracterização da composição do mesmo. A análise granulométrica foi realizada seguindo a norma técnica NBR 7181/1984 (ABNT, 1984). Para a análise do solo utilizou-se um jogo de peneiras de número: 16, 40, 60, 100 e 230 em mesa agitadora por dez minutos. As determinações das frações silte e argila são feitas pelo método do densímetro, segundo a mesma norma técnica (NBR 7181/1984). A análise foi realizada no Laboratório de Estradas do Departamento de Transportes da Universidade de São Paulo, Campus São Carlos.

3.3.2. Características físico-químicas

Determinaram-se as características químicas (pH, matéria orgânica, CTC, carbono orgânicos total) e física (umidade). Estas análises são essenciais para verificar o grau de nutrientes e fonte de carbono para as minhocas durante o tratamento, além de mudanças nas condições físicas e químicas durante a vermicompostagem.

3.3.2.1. Determinação do pH

Quando se determina o pH, está-se determinando a acidez ativa, ou seja, a parcela do hidrogênio que está ionizado e, portanto, na forma de H^+ . A parte não-ionizada do hidrogênio é chamada acidez potencial. Em solos, a maior parte do hidrogênio não está ionizada. Isso quer dizer que o comportamento do solo assemelha-se ao de ácidos fracos.

As amostras secas em estufa a aproximadamente 50°C por 24 h foram trituradas e peneiradas em malha de 250 μm de diâmetro para remover as

impurezas. Para a determinação do pH, 10 g das amostras foram suspensas em uma solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com agitação ocasional por 30 minutos, tendo, então, o pH determinado (CLAESSEN, 1997).

3.3.2.2. Teor de matéria orgânica

Das amostras foram retiradas alíquotas “*in natura*”, que foram trituradas em almofariz e pistilo, e peneiradas em malha de $250 \mu\text{m}$ para homogeneização das partículas, secas a 50°C até massa constante, e mantidas dentro de um dessecador até a sua análise. O teor de matéria orgânica foi determinado por calcinação em mufla a 550°C , por 4 horas (ALLISON, 1965; KIEHL, 1985). Pesaram-se 10 g da amostra, que foi submetida à 550°C por 4 horas em mufla e resfriada em ambiente livre de umidade (dessecador). Queima-se o material orgânico, restando o inorgânico e por diferença determina-se o teor de matéria orgânica nas amostras. A determinação obedece à Equação 6:

$$\% \text{MO} = (P_s - P_m / P_s) * 100 \quad (6)$$

onde:

%MO= matéria orgânica em porcentagem

P_m = massa (em g) após ser submetida à combustão

P_s = massa (em g) total ou inicial

3.3.2.3. Determinação da umidade do solo a $100-110^\circ\text{C}$

Para determinar a umidade (CLAESSEN, 1997; KIEHL, 1985), 10 g da amostra *in natura* foram levados à estufa por 24 horas a $100 - 110^\circ\text{C}$. Após esse tempo, deixou-se esfriar até massa constante, em dessecador, determinando-se a umidade pela Equação 7:

$$\%U_{(100-110^{\circ}\text{C})} = 100(p - p_1)/p \quad (7)$$

onde:

p = massa (em g) de amostra ao natural

p₁ = massa (em g) da amostra seca a 100-110°C

Durante os experimentos, os teores de umidade foram controlados de forma a serem mantidos em torno de 35 a 45%. Lelis et al. (1999) observaram que a manutenção do teor de umidade proporciona a maximização da velocidade de degradação, a redução dos impactos ambientais associados ao processo e a eliminação dos organismos patogênicos.

3.3.2.4. Determinação da capacidade de troca catiônica (CTC)

Entende-se por CTC efetiva ou potencial a capacidade de troca de cátions ou a capacidade em reter cátions próximos ao valor de seu pH natural (RAIJ et al., 1996). A acidez (H + Al) liberada pela reação com solução não tamponada de KCl pode ser designada como acidez real e é utilizada para determinar o que se denomina de CTC efetiva, que é definida como a soma dos cátions metálicos totais trocáveis (bases) + (H + Al).

As amostras secas em estufa a aproximadamente 50°C por 24 h foram trituradas e passadas em peneira de malha de 250 µm de diâmetro para remover as impurezas.

3.3.2.4.1. Determinação dos cátions metálicos totais trocáveis

Foram pesados 2,50 g de amostras, às quais adicionaram-se 25 mL de CH₃COOH 1,00 mol L⁻¹. A suspensão foi agitada por uma hora e, então, foi determinado o pH, assim como o pH da solução de CH₃COOH.

Para os cálculos dos cátions metálicos totais trocáveis das amostras foi usada a Equação 8 (JACKSON, 1967):

$$\text{Cátions metálicos trocáveis (cmol}_c \text{ kg}^{-1}) = [\text{pH}_1 - \text{pH}_2] \times 22 \quad (8)$$

em que:

pH_1 = pH da suspensão

pH_2 = pH da solução de ácido acético

22 = constante logarítmica

A determinação dos cátions metálicos totais trocáveis baseia-se no deslocamento dos cátions metálicos trocáveis dos componentes da amostra pelo próton do CH_3COOH . Mede-se cuidadosamente a variação de pH ocorrida, determinando-se a quantidade de íons H^+ deslocados. Os cátions trocáveis correspondem à soma dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Na^+ .

3.3.2.4.2. Acidez trocável

A acidez ($\text{H} + \text{Al}$) liberada é determinada pela reação com solução não tamponada de KCl (CLAESSEN, 1997).

Foram colocados 5 g das amostras em erlenmeyer de 125 mL e adicionados 50 mL de KCl 1 mol L^{-1} . Agitou-se manualmente algumas vezes e deixou-se em repouso durante 30 minutos. Filtrou-se em papel de filtro, adicionando-se duas porções de 10 mL de KCl 1 mol L^{-1} . Adicionou-se ao filtrado 6 gotas de fenolftaleína a 0,1% m/v e titulou-se com NaOH 0,01 mol L^{-1} . Pela Equação 9, determinou-se a acidez trocável.

$$\text{Acidez trocável (cmol}_c \text{ kg}^{-1}) = (V \times C \times 100) / m \quad (9)$$

onde:

V = volume (em mL) de NaOH gastos na titulação

C= concentração (em mol L⁻¹) do NaOH

m= massa (em g) da amostra

3.3.2.5. Determinação do carbono orgânico total

O carbono total é determinado pela oxidação do carbono orgânico e inorgânico da amostra a CO₂, devido ao aumento de temperatura à 900 °C. A determinação do carbono inorgânico é realizada quando se acidifica, com ácido fosfórico, e aquece-se a amostra a 200°C, o que leva à liberação de CO₂ proveniente do carbono inorgânico. Por diferença do carbono total e inorgânico calcula-se o valor do carbono orgânico total das amostras.

O dióxido de carbono pode, também, ser determinado via condutividade da solução, redução a metano e análise deste gás por detecção por ionização em chamas, ou medido diretamente por espectrometria de infravermelho. A análise através de TOC possui as seguintes vantagens: é uma técnica rápida; é altamente reprodutível; pode ser facilmente automatizada; entre outras (REEVE, 1994).

Foi usado um aparelho carbono total, modelo TOC-V_{CPH}, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM-5000A, marca SHIMADZU. As curvas analíticas foram construídas com padrão de biftalato de potássio para análise de carbono total e carbonato de sódio anidro para análise de carbono inorgânico das amostras. Nas análises de carbono total, as amostras foram oxidadas a 900°C, utilizando-se uma vazão de O₂ de 0,5 L min⁻¹. Nas análises de carbono inorgânico, as amostras foram acidificadas com ácido fosfórico e aquecidas a 200°C (vazão de O₂ de 0,5 L min⁻¹). Determina-se o carbono total e inorgânico e por diferença calcula-se o valor do carbono orgânico total das amostras (SHIMADZU, 2001).

Foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra, seca em estufa a 50°C por 24 h e triturada, a qual foi colocada no equipamento TOC para determinação de carbono total e inorgânico. Por diferença calculou-se o valor do carbono orgânico total das amostras.

3.3.3. Os Ácidos húmicos

3.3.3.1. A extração

Foram extraídos os ácidos húmicos somente das amostras do 1º, correspondendo ao tempo 0 h, e 90º dia. Os ácidos húmicos foram extraídos e purificados de acordo com a metodologia convencional estabelecida pela Sociedade Internacional para Substâncias Húmicas, baseada em solubilidade em solução alcalina de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e precipitação em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

- 150 g da amostra foi transferida a um béquer no qual foi adicionado 1,0 L de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹. A suspensão foi agitada por 1 hora.
- Depois de removido o sobrenadante por sifonação, foi adicionado ao resíduo 1,0 L de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A mistura foi agitada por 4 horas e, em seguida, deixada em repouso por 12 horas à temperatura ambiente.
- A mistura foi centrifugada a 7.500 rpm ($5,53 \times 10^3$ g) por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado e, depois, acidificado com uma solução de HCl 6 mol L⁻¹ até pH 1,0 (aproximadamente 500 mL) e deixado em repouso por 12 horas.
- O precipitado, ácido húmico, foi separado da fração solúvel, ácido fúlvico, por nova centrifugação a 7.500 rpm por 20 minutos.

- Em um béquer de plástico, foram adicionados ao ácido húmico cerca de 250 mL de solução composta de HCl 0,1 mol L⁻¹ e HF 0,3 mol L⁻¹. Deixou-se em agitação por 4 horas e em repouso por, no mínimo, 24 horas.

- A suspensão foi centrifugada (7500 rpm por 20 minutos) e, após se eliminar o sobrenadante, o resíduo foi transferido, com auxílio de água destilada, para uma membrana de diálise da marca Spectrapor (Thomas Scientific), com 65 cm de comprimento por 50 mm de largura, capacidade de 8,0 mL cm⁻¹ e porosidade para moléculas com massa molar de 6000 a 8000 daltons. Essa membrana ficou em um recipiente plástico com água destilada e desionizada (trocada duas vezes por dia) sob agitação constante por aproximadamente 5 dias.

- O ácido húmico foi então liofilizado em um liofilizador modelo FD1-060E da marca Heto Laber Equipament e mantido em dessecador.

Antes de serem utilizadas na purificação do ácido húmico, as membranas de diálise foram devidamente tratadas para remoção de glicerina, traços de compostos sulfurosos e metais, seguindo o procedimento estabelecido por McPhie:

- As membranas foram fervidas por 1 hora em 1 litro de etanol a 50%.
- As membranas foram, então, agitadas por 1 hora à temperatura ambiente em solução de NaHCO₃ 0,01 mol L⁻¹ e EDTA dissódico 0,001 mol L⁻¹.
- Repetiu-se o procedimento com água destilada, depois com nova solução de NaHCO₃ 0,01 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ e, por fim, com água destilada.

A quantidade extraída de ácido húmico (%) foi calculada segundo a Expressão 10:

$$\%AH = 100 \cdot p_1/p \quad (10)$$

onde:

%AH = quantidade extraída de ácido húmico

p = massa (em g) de amostra ao natural

p_1 = massa (em g) da amostra extraída

Os valores da quantidade extraída de ácido húmico foram corrigido para base seca e sem cinzas (valor corrigido = valor original $\times$ 100 $\div$ (100 – teor de umidade – teor de cinzas))

3.3.3.2. Teor de Cinzas

O teor de cinzas corresponde à quantidade de matéria inorgânica, especialmente sílica e metais, presentes no ácido húmico. Esse valor reflete na eficiência da extração e purificação. Valores altos de cinzas podem comprometer a interpretação da análise elementar.

Aproximadamente 50,0 mg da amostra de ácido húmico foram colocados em uma mufla, a 550°C, por 4 horas, em um cadinho de platina previamente tarado. O teor de cinzas foi calculado seguindo a Equação 11:

$$C = 100 \frac{m}{m_0} \quad (11)$$

em que: C = teor de cinzas (em %);

m = massa (em miligramas) da amostra após calcinação;

m_0 = massa (em miligramas) da amostra total.

3.3.3.3. Análise Elementar (CHNS)

Os primeiros experimentos para determinação da composição elementar das substâncias húmicas foram feitos por Sprengel e Berzelius entre os anos de 1826 e 1845 (STEVENSON, 1994). Segundo eles, as substâncias húmicas eram

constituídas essencialmente de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, sendo C e O os elementos mais abundantes.

Os métodos para determinação desses elementos são muito variados, dentre eles os métodos químicos. Assim, carbono e hidrogênio podem ser determinados por combustão completa a seco, nitrogênio pelos métodos de Dumas ou de Kjeldahl, oxigênio por pirólise redutiva e enxofre por combustão (MESSIAS, 2004).

Entretanto, a utilização de analisadores elementares automáticos trouxe avanços consideráveis nesse sentido, permitindo análises rápidas e confiáveis. Os analisadores elementares atuais são baseados na oxidação da amostra à alta temperatura, sendo os gases resultantes separados por uma coluna cromatográfica e detectados, geralmente, por condutividade térmica (SKOOG et al., 2002).

Informações isoladas sobre a composição elementar dessas substâncias não são muito conclusivas, e as razões atômicas (H/C, O/C, C/N) têm sido preferencialmente utilizadas para estabelecer o grau de condensação, as transformações diagenéticas, bem como as condições ambientais sob as quais elas foram formadas (MESSIAS, 2004).

A razão H/C é freqüentemente associada ao grau de condensação ou de aromaticidade, e este, por sua vez, ao grau de humificação, sendo que maiores valores de H/C (ou menores valores de C/H) indicam maior quantidade de grupos alifáticos, típicos de materiais menos humificados (STEVENSON, 1994). A razão O/C indica o teor de grupos oxigenados presentes na molécula (MESSIAS, 2004).

As análises foram realizadas em um analisador elementar Carlo Erba Instruments EA 1110 CHNS-O, em que foram utilizados os seguintes padrões: L-cistina, sulfanilamida, DL-metionina e BBOT (2,5-bis-(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)-triofeno). Foram pesados, em cada análise, cerca de 2 mg de amostra seca em

estufa de 50 a 55°C por 24 h . Os valores de C, H, N e S (porcentagem em massa) foram corrigidos para base sem cinzas (valor corrigido = valor original x 100 ÷ (100 - teor de cinzas)). O teor de oxigênio foi determinado por diferença a 100% a partir dos valores de C, H, N e S corrigidos.

Os parâmetros H/C, O/C, C/N e (O + N)/C foram determinados pelas razões atômicas, ou seja, dividindo-se previamente as porcentagens em massa dos elementos por suas respectivas massas atômicas.

3.3.3.4. Acidez Total, Carboxílica e Fenólica

A determinação de acidez em ácidos húmicos é um importante passo na sua caracterização, pois indica o número de grupos ácidos (essencialmente carboxílicos e fenólicos) presentes na estrutura. O método mais utilizado baseia-se em titulação potenciométrica indireta, com hidróxido de bário (para acidez total) e acetato de cálcio (para acidez carboxílica) (SCHNITZER e GUPTA, 1965; SCHNITZER e KHAN, 1972; LANDGRAF et al., 1998; POPPI e TALAMONI, 1992).

3.3.3.4.1. Acidez total

Uma amostra de 100 mg de ácido húmico foi colocada em um erlenmeyer de 25 mL, juntamente com 10 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de bário (Ba(OH)₂). A água utilizada para preparar a solução alcalina foi previamente fervida para retirada de CO₂. Foi também preparada uma solução referência (branco), constituída apenas de 10 mL da solução de Ba(OH)₂. Passou-se um fluxo de nitrogênio nos erlenmeyers, que foram então submetidos à agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum, sendo coletados 5 mL do filtrado, que foi titulado potenciometricamente com

uma solução padrão de HCl 0,05 mol L⁻¹. O ponto de equivalência foi determinado em pH 8,4. A acidez total foi calculada pela Equação 12.

$$A_T = \frac{(V_{\text{branco}} - V) \cdot C_a}{m_{AH}} \cdot \frac{V_{\text{base}}}{V_{\text{aliquota}}} \quad (12)$$

em que: A_T = acidez total (em mmol_c g⁻¹);

V_{branco} = volume de HCl usado na titulação do branco;

V = volume de HCl usado na titulação da amostra;

C_a = concentração da solução de HCl;

m_{AH} = massa de ácido húmico;

V_{base} = volume total de Ba(OH)₂ utilizado (10 mL);

V_{aliquota} = volume da alíquota utilizado na titulação (5 mL).

3.3.3.4.2. Acidez carboxílica

Uma amostra de 50 mg de ácido foi colocada em um erlenmeyer de 25 mL, juntamente com 20 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de acetato de cálcio (Ca(CH₃COO)₂). A água utilizada para preparar a solução foi previamente fervida para retirada de CO₂. Foi também preparado um branco, constituído apenas de 20 mL da solução de Ca(CH₃COO)₂. Passou-se um fluxo de nitrogênio nos erlenmeyers, que foram então submetidos à agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum, sendo coletados 10 mL do filtrado, que foi titulado potenciométricamente com uma solução padrão de NaOH 0,05 mol L⁻¹. O ponto de equivalência foi determinado em pH 9,8. A acidez total foi calculada pela Equação 13.

$$A_C = \frac{(V - V_{\text{branco}}) \cdot C_b}{m_{AH}} \cdot \frac{V_{\text{acetato}}}{V_{\text{aliquota}}} \quad (13)$$

em que: A_C = acidez carboxílica (em mmol_c g⁻¹);

V = volume de NaOH usado na titulação da amostra;

V_{branco} = volume de NaOH usado na titulação do branco;

C_b = concentração da solução de NaOH;

m_{AH} = massa de ácido húmico;

V_{acetato} = volume total de acetato de cálcio utilizado (20 mL);

$V_{\text{alíquota}}$ = volume da alíquota utilizado na titulação (10 mL).

A determinação da acidez fenólica foi feita por diferença entre a acidez total e a acidez carboxílica.

3.3.3.5. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta/Visível

Através da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível, é possível calcular a razão E_4/E_6 (razão entre as absorbâncias a 465 e a 665 nm). Essa razão é um primeiro indicativo da proporção de grupos aromáticos. Quanto maior a aromaticidade, menor a razão E_4/E_6 . Entretanto, deve-se levar em conta que essa relação deve ser interpretada com cuidado, pois a comparação entre amostras bem distintas pode não ser conclusiva (MESSIAS, 2004).

Cerca de 5,0 mg de ácido húmico purificado foram dissolvidos em 50,0 mL de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 8,4. As medidas de absorbância da solução foram obtidas a partir do espectro na região do visível, utilizando um espectrofotômetro de UV-Visível modelo V-630 da marca Jasco e uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Com os valores de absorbância nos comprimentos de onda 465 e 665 nm, calculou-se a razão E_4/E_6 .

3.3.3.6. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)

De acordo com Stevenson (1994), a espectroscopia no infravermelho permite obter informações sobre a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural dos grupos funcionais (principalmente funções oxigenadas) presentes nas substâncias húmicas, avaliar os efeitos provocados por modificação química, tais como metilação e acetilação, estabelecer a presença ou a ausência de impurezas inorgânicas (metais, argilo-minerais) e analisar interações entre as substâncias e compostos orgânicos ou metais.

A absorção da radiação na região do infravermelho pela matéria corresponde à energia de vibração e rotação associada a uma ligação. Existem 2 tipos de vibrações moleculares: os estiramentos ou deformações axiais (ν) (simétricas e assimétricas), que correspondem ao movimento rítmico de expansão e contração ao longo do eixo da ligação, e as deformações angulares ou simplesmente deformações (δ), nas quais ocorre uma variação no ângulo da ligação entre os átomos (SILVERSTEIN et al., 1994). Em geral, o espectro é obtido em transmitância ou em absorbância em função do número de ondas, que varia normalmente de 4.000 a 400 cm^{-1} (2,8 a 50 μm). Atualmente, a maioria dos espectrômetros utiliza a transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros na região do infravermelho dos ácidos húmicos são relativamente simples, possuindo poucas bandas de absorção e geralmente alargadas. A complexidade do ambiente química que envolve os grupamentos funcionais dos ácidos húmicos resulta em uma série de sobreposições de bandas de absorção (MESSIAS, 2004).

As possíveis atribuições das principais bandas de absorção usualmente observadas nos espectros no infravermelho dos ácidos húmicos estão mostradas a seguir (MESSIAS, 2004):

- 3.400 – 3.300 cm^{-1} : estiramento de O–H;
- 3.077 – 3.030 cm^{-1} : estiramento de C–H de aromáticos e olefinas (pode estar encoberto pela banda de estiramento de O–H);
- 2.940 – 2.840 cm^{-1} : estiramento simétrico e assimétrico de C–H alifático;
- 2.750 – 2.400 cm^{-1} : estiramento de O–H de grupos carboxílicos;
- 1.725 – 1.720 cm^{-1} : estiramento de C=O de ácidos carboxílicos;
- 1.660 – 1.630 cm^{-1} : estiramento de C=O de amidas e quinonas e de cetonas conjugadas com ligação de hidrogênio;
- 1.650 – 1.580 cm^{-1} : estiramento simétrico de C=O de íons carboxilatos;
- 1.630 – 1.600 cm^{-1} : estiramento de C=C aromático;
- 1.590 – 1.520 cm^{-1} : deformação de N–H de amidas e estiramento C=N;
- 1.500 – 1.400 cm^{-1} : estiramento de C=C aromático;
- 1.400 – 1.380 cm^{-1} : estiramento de C–O fenólico, deformação de O–H carboxílico, deformação de C–H alifático e estiramento assimétrico de C=O de carboxilatos;
- 1.280 – 1.200 cm^{-1} : estiramento de C–O de éteres, ésteres e fenóis e deformação de O–H carboxílico;
- 1.170 – 1.000 cm^{-1} : estiramento de C–O de estruturas polissacarídicas;
- 1.050 – 950 cm^{-1} : estiramento de C–O de estruturas polissacarídicas e estiramento de Si–O (impurezas do tipo silicato);
- 950 – 670 cm^{-1} : deformação no plano e fora do plano de C–H aromático.

Bandas próximas de 1.610 cm^{-1} são geralmente atribuídas a estiramentos C=C de aromáticos; entretanto, ligações duplas não aromáticas e quinonas podem absorver nessa região. A ligação C=O de ácidos carboxílicos absorve em 1.720 cm^{-1} . Por sua vez, o íon carboxilato (COO^-), resultado da desprotonação de grupos carboxílicos, absorve na região entre 1.690 e 1.660 cm^{-1} (MESSIAS, 2004).

Stevenson (1994) classificou os espectros de substâncias húmicas em 3 tipos. Os espectros de tipo I são caracterizados por bandas de absorção fortes e evidentes em 3.400 , 2.900 , 1.720 , 1.600 e 1200 cm^{-1} . A absorção na região de 1600 cm^{-1} possui intensidade semelhante à absorção em 1.200 cm^{-1} . Os espectros do tipo III apresentam as mesmas absorções características dos espectros do tipo I, com a diferença de uma absorção em 2.900 cm^{-1} mais intensa e com o aparecimento de uma absorção forte em 1.540 cm^{-1} . Os espectros do tipo II são característicos de moléculas húmicas de menor massa molar (ácidos fúlvicos) e apresentam, além dessas absorções, uma absorção muito intensa em 1.720 cm^{-1} .

A relação entre as absorbâncias em 2.927 e em 1.050 cm^{-1} (relação entre grupos apolares e polares) fornece o índice de hidrofobicidade (quanto maior esse índice, maior resistência à degradação microbiana). A relação entre as absorbâncias em 1.660 e em 2.929 cm^{-1} corresponde ao índice de aromaticidade.

As amostras de ácido húmico foram analisadas em um espectrofotômetro com transformada de Fourier da marca Bomem MB-102. Pesou-se, em uma balança com precisão de $0,01\text{ mg}$, aproximadamente $0,50\text{ mg}$ de amostra e, após adicionar $150,0\text{ mg}$ de KBr, a mistura foi pulverizada e prensada, formando uma pastilha, que foi então analisada no espectrofotômetro. Efetuaram-se, para cada análise, 32 varreduras de 4.000 a 300 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Características do solo estudado

A caracterização física e química do solo estudado encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização física e química do solo utilizado

Características	Valores
pH ^a	4,51 ± 0,01*
Carbono orgânico (g kg ⁻¹) ^b	8,6 ± 0,3*
Umidade (%) ^c	7,01 ± 0,09*
Teor de Matéria orgânica (%) ^d	1,62 ± 0,05*
CTC (cmol _c kg ⁻¹) ^e	1,32 ± 0,00*
Argila (%) ^f	3,3
Silte (%) ^f	6,7
Areia (%) ^f	90

^adeterminação da atividade hidrogeniônica através de uma suspensão com 25,00 mL de solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹ e 10,00 g de cada amostra coletada; ^bmedidor de carbono total, modelo TOC-V_{CPH}, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM-5000A, marca SHIMADZU, com detector de combustão; ^cem estufa a 60-65°C e a 100-110°C; ^dcalcinação em mufla a 500°C por 4 h; ^esuspensão em CH₃COOH; ^fjogo de peneiras de números: 16, 40, 60, 100 e 230, as quais foram agitadas em mesa agitadora por dez minutos. As determinações da fração silte e argila foram feitas pelo método do densímetro, da norma técnica (NBR). *Experimentos feitos em triplicata.

A curva de distribuição granulométrica para a determinação das frações granulométrica do solo utilizado neste estudo encontra-se na Figura 45.

Figura 45 - Curva de distribuição granulométrica do solo.

A fração mineral do solo é bem estável, e a determinação da participação em peso dos diferentes tamanhos das partículas revela a composição textural do solo. O tamanho das partículas a que se refere cada fração textural é definido conforme o aspecto funcional da partícula, sendo assim, uma partícula mais grosseira (maior diâmetro) apresenta um comportamento muito diferente de uma partícula mais fina. A Sociedade Brasileira de Ciências do Solo adota as seguintes dimensões para cada partícula: argila ($< 0,002$ mm), silte ($0,002$ a $0,06$ mm), areia ($0,06$ a 2 mm) e pedregulho (> 2 mm). Pelo gráfico verifica-se que o solo apresenta 3,3% de argila, 6,7% de silte e 90% de areia. O solo apresenta uma quantidade maior de areia, isso significa que esse solo tem baixa retenção de umidade, agregação, superfície específica e capacidade de troca catiônica, e alta porosidade e densidade.

3.4.2. Características físicas e químicas das amostras durante o processo

Seguem nas Figuras 46, 47 e 48, os resultados referentes ao teor de matéria orgânica (%), capacidade de troca catiônica (CTC) ($\text{cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$) e pH nos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar e pré-compostado, respectivamente, sendo que (A) corresponde ao experimento contendo 0% de esterco bovino e 100% solo (sem minhocas); (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo e (F) 100% de esterco bovino e 0% solo, respectivamente.

Figura 46 – Teor de matéria orgânica das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado. *Coletas dos experimentos realizadas em triplicata.

Figura 47 – CTC das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado. *Coletas dos experimentos realizadas em triplicata.

Figura 48 – pH das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado. *Coletas dos experimentos realizadas em triplicata.

As análises químicas e físicas permitiram acompanhar o grau de transformação que o material foi sofrendo durante o processo de decomposição. Percebe-se pela Figura 46, que há uma diminuição do teor de matéria orgânica nos experimentos C, D, E e F ao longo do processo da vermicompostagem. Isso se deve ao processo de mineralização que ocorreu durante o processo de vermicompostagem. A diminuição do teor de matéria orgânica e, conseqüentemente, o aumento do teor de cinzas que ocorre no processo, devido à simultânea humificação e mineralização, é uma maneira de se acompanhar a marcha de decomposição. Essa mineralização está ligada não só ao trabalho realizado pelas minhocas, como também a uma ação conjunta das minhocas e dos microorganismos contidos no meio. Esse material apresenta como vantagem maior retenção de umidade e mineralização mais lenta.

A CTC tem sua origem nas cargas negativas oriundas dos grupos carboxílicos e fenólicos. Tais grupos apresentam um átomo de hidrogênio ionizável ligado ao oxigênio. A dissociação do hidrogênio deixa sítios negativos nos ácidos húmicos, os quais podem atrair outros cátions como cálcio, magnésio e potássio. O grau de ionizáveis depende do pH do meio (REZENDE, 1999). Assim, observando-se a concentração de grupos carboxílicos (página 155), pode-se notar que pouca variação ocorreu entre o início e o final do processo de vermicompostagem. Em trabalhos anteriores (LANDGRAF et. al, 1999) já foi observado que os ácidos húmicos provenientes de vermicomposto, comparativamente aos do solo e de turfa, são mais alifáticos e menos aromáticos, têm mais grupos oxigenados na forma de ésteres e alcoóis e menos grupos ácidos. Portanto, a CTC, estando relacionada à concentração de grupos ácidos, e sendo esses grupos menos presentes, é lícito esperar pouca variação no tocante à CTC.

Percebe-se também uma diminuição do pH nos experimentos onde o pH era maior que 7, e um aumento do pH nos experimentos onde o pH era menor do que 7 (Figura 48), tendendo-se ao pH próximo à neutralidade ($\text{pH} = 7$). Segundo Bidone (1995), do esôfago das minhocas saem pequenas bolsas, as glândulas calcíferas que segregam carbonato de cálcio, controlando o teor desse elemento no organismo do animal. O CO_2 produzido pela respiração é eliminado com o excesso de cálcio absorvido do solo, formando o CaCO_3 , que é lançado ao exterior junto com partículas não-digeridas, na forma de excrementos. Assim, as constantes adições de carbonato de cálcio contribuem para o aumento do pH. Isso sugere uma participação da minhoca na elevação do pH no ambiente onde ocorreu a vermicompostagem. Por outro lado, Albanell et al. (1988) e Haimi et al. (1986) atribuem a diminuição do pH à produção de CO_2 e de ácido orgânico por atividade microbial presente durante o processo de vermicompostagem.

A Figura 49 mostra o teor de umidade (%) nos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar e pré-compostado, respectivamente, durante o processo de biorremediação. A umidade nos experimentos B, C, D, E e F variou de 20 a 70 % durante o processo.

Figura 49 – Teor de umidade das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado. *Coletas dos experimentos realizadas em triplicata.

A Figura 50 mostra as curvas analíticas construídas com padrão de biftalato de potássio, seco em estufa por 24 h, para análise de carbono total, utilizando-se um aparelho carbono total.

Figura 50 – Curvas analíticas utilizadas para a determinação de carbono orgânico total - (A) em mg L⁻¹ e (B) em mg.

Durante o processo há formação de um material mais estabilizado, isto é, com carbono na forma humificada, isso faz com que haja uma diminuição da concentração de carbono orgânico (Figura 51).

Figura 51 – Carbono orgânico das amostras durante a vermicompostagem nos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar. *Coletas dos experimentos realizadas em triplicata.

3.4.3. Ácidos húmicos

3.4.3.1. Extração dos ácidos húmicos

A Figura 52 mostra o teor de ácido húmico extraídos das amostras dos experimentos B, C, D, E e F do 1º e 90º dia de vermicompostagem utilizando esterco bovino sem pré-compostar (A) e pré-compostado (B).

Figura 52 - Teor de ácidos húmicos nas amostras dos experimentos B, C, D, E e F do 1º e 90º dia de vermicompostagem utilizando esterco bovino sem pré-compostar (A) e pré-compostado (B).

O teor de ácido húmico aumentou em todos os experimentos após o processo de vermicompostagem. Neste caso, pode-se dizer que houve uma estabilização do material, ou seja, com maior conteúdo de carbono na forma humificada. O processo de compostagem e a ação das minhocas alteram qualitativa e quantitativamente a composição das substâncias húmicas e dos materiais orgânicos. Esse material encontra-se em estado mais avançado de decomposição e humificação. A ação conjunta dos microorganismos e das minhocas inicia uma rápida decomposição do material orgânico, a qual aumenta com o tempo. Este resultado se deve à intensa digestão da matéria orgânica por esses organismos.

Além da remoção dos poluentes (HPAs) durante o processo da vermicompostagem, obtém-se, também, um solo mais rico em nutrientes. As minhocas ingerem e digerem os resíduos orgânicos, dejetando excrementos com forma especial, constituído de agregados de terra e matéria orgânica digerida, os quais recebem o nome de coprólitos (em inglês “casting”). Os coprólitos contêm nutrientes para as plantas em maior concentração que o solo onde se encontram devido ao metabolismo da minhoca. Isto ocorre devido ao solo contendo coprólito estar agora misturado com matéria orgânica e mais as secreções intestinais e urinárias. O material dejetado encontra-se em estado mais avançado de decomposição, sendo de assimilação mais fácil pelas raízes das plantas. Os coprólitos sempre são mais neutros do que os solos originais, mesmo quando estes são ácidos ou alcalinos. Os dejetos são pobres em argila e ricos em matéria orgânica, nitrato, fósforo, cálcio e magnésio, e elevada porcentagem de umidade. Há também uma produção acelerada de ácido húmicos graças à digestão e à semi-decomposição provocada pelas minhocas.

3.4.3.2. Teor de cinzas

Os resultados de teor de cinzas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Teor de cinzas (%) das amostras de ácidos húmicos.

Experimentos	Sem pré-compostar		Pré-compostado	
	1º dia	90º dia	1º dia	90º dia
B	1,86	0,62	5,17	1,00
C	2,54	2,44	6,78	33,57
D	3,09	1,29	5,18	4,68
E	2,34	0,00	0,00	3,89
F	0,86	0,00	0,00	1,61

Como pode ser observado na Tabela 9, os teores de cinzas dos ácidos húmicos ficaram abaixo de 5%, o que pode ser considerado satisfatório para as análises subseqüentes, com exceção das amostras dos experimentos C, utilizando esterco bovino pré-compostado. Estes valores foram levados em consideração para os resultados posteriores, pois representam erro experimental durante a metodologia de extração.

3.4.3.3. Razão C/N dos ácidos húmicos

Os valores de porcentagem em massa de C, H, N, S e O, e as razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C das amostras de ácidos húmicos extraídos do experimentos B, C, D, E e F, utilizando esterco bovino sem pré-compostar e pré-compostado estão mostrados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10 - Teor (em massa) de C, H, N, S e O, e razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C das amostras de ácidos húmicos, utilizando esterco bovino sem pré-compostar.

Experimentos	1º dia					90º dia				
	B	C	D	E	F	B	C	D	E	F
C (%)	60,12	55,10	55,06	54,51	52,53	54,64	53,86	51,74	52,16	51,46
H (%)	8,05	7,02	6,69	6,25	6,42	7,34	6,51	6,65	6,15	6,28
N (%)	2,82	2,82	2,97	2,91	2,87	3,33	3,29	3,22	3,39	3,24
S (%)	2,58	3,33	2,41	2,79	3,18	3,31	2,52	3,34	2,39	3,15
O (%)	26,43	31,74	32,87	33,54	35,00	31,38	33,82	35,05	35,91	35,88
H/C	1,61	1,53	1,46	1,38	1,47	1,61	1,45	1,54	1,41	1,46
O/C	0,33	0,43	0,45	0,46	0,50	0,43	0,47	0,51	0,52	0,52
C/N	24,87	22,78	21,60	21,88	21,38	19,15	19,12	18,76	17,96	18,54
(O + N)/C	0,48	0,62	0,64	0,66	0,71	0,63	0,68	0,73	0,74	0,75

Tabela 11 - Teor (em massa) de C, H, N, S e O, e razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C das amostras de ácidos húmicos, utilizando esterco bovino pré-compostado.

Experimentos	1º dia					90º dia				
	B	C	D	E	F	B	C	D	E	F
C (%)	60,27	51,60	59,49	52,97	50,98	52,04	52,73	54,41	53,87	52,10
H (%)	7,37	5,23	7,65	6,44	5,93	6,41	7,91	6,71	6,93	6,34
N (%)	2,82	2,74	2,98	2,94	3,43	3,52	3,69	3,51	3,18	3,33
S (%)	2,40	2,15	3,08	3,17	2,74	2,65	3,77	3,00	4,43	3,10
O (%)	27,13	38,29	26,81	34,47	36,92	35,39	31,90	32,37	31,59	35,13
H/C	1,47	1,22	1,54	1,46	1,40	1,48	1,80	1,48	1,54	1,46
O/C	0,34	0,56	0,34	0,49	0,54	0,51	0,45	0,45	0,44	0,51
C/N	24,93	22,01	23,32	21,01	17,33	17,24	16,68	18,10	19,75	18,26
(O + N)/C	0,49	0,79	0,49	0,70	0,78	0,74	0,66	0,65	0,64	0,73

Os teores de nitrogênio nas amostras de ácido húmico aumentam com o tempo, com exceção das amostras do experimento F utilizando esterco bovino pré-compostado.

As razões H/C indicam a proporção de estruturas condensadas, sendo que maiores valores de H/C indicam maior quantidade de grupos alifáticos. As razões O/C indicam o teor de grupos oxigenados.

As razões H/C e C/N tendem a diminuir e a razão O/C a aumentar com o tempo de compostagem ou vermicompostagem.

A Figura 53 mostra a razão C/N dos ácidos húmicos extraídos dos experimentos do 1º e 90º dia de vermicompostagem utilizando esterco bovino sem pré-compostar e pré-compostado.

Figura 53 – Razão C/N do ácido húmico extraído dos experimentos utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

A razão C/N indica o grau de incorporação de nitrogênio na estrutura húmica. A determinação da relação C/N é considerada um dos mais simples métodos para se avaliar a capacidade de assimilação pelas plantas do nitrogênio em um resíduo orgânico. Segundo as Tabelas 10 e 11, a razão C/N dos ácidos húmicos variou de 17,96 a 19,15 para as amostras dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar após o 90º dia do processo. Já para os experimentos utilizando esterco bovino pré-compostado as razões C/N variaram de 16,68 a 19,75 após o 90º dia do processo. Segundo Kayhanian e Tchobanoglous (1993), a relação C/N do húmus estabilizado, pronto para ser utilizado nas culturas, deve estar entre 15 a 20. Assim as razões C/N dos experimentos após o processo estão dentro desses limites.

Observa-se pela Figura 53 um decréscimo nas razões C/N após o 90º dia, exceto no experimento F utilizando esterco bovino pré-compostado. De acordo com Atiyeh et al. (2001), a acelerada humificação do vermicomposto reflete em um decréscimo da C/N e o aumento de nutrientes minerais (P, K e Na), e está relacionada com a mineralização da matéria orgânica pelas minhocas.

3.4.3.4. Acidez Total, Carboxílica e Fenólica

Os gráficos titulométricos para as determinações da acidez total estão mostradas nas Figuras de 54 a 58. Os resultados da análise de acidez estão mostrados na Tabela 12 e 13.

Figura 54 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$) com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 25% de esterco bovino bovino e 25% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 55 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$) com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 50% de esterco bovino bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 56 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$) com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 60% de esterco bovino bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 57 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$) com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referentes aos experimentos de 75% de esterco bovino bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 58 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$) com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) referente aos experimentos de 100% de esterco bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Os gráficos titulométricos para as determinações da acidez carboxílica estão mostradas nas Figuras de 59 a 63.

Figura 59 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 25% de esterco bovino e 25% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 60 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 50% de esterco bovino bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 61 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 60% de esterco bovino bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 62 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos experimentos de 75% de esterco bovino bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 63 - Curvas titulométricas de ácidos húmicos (dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referente aos experimentos de 100% de esterco bovino bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Tabela 12 - Acidez total, carboxílica e fenólica das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos utilizando esterco bovino sem pré-compostar (valores em $\text{mmol}_c \text{ g}^{-1}$).

Experimentos	Acidez total		Acidez carboxílica		Acidez fenólica	
	1º dia	90º dia	1º dia	90º dia	1º dia	90º dia
B	5,35	4,39	0,90	0,90	4,44	3,49
C	5,17	5,89	0,84	0,95	4,33	4,94
D	5,49	6,00	1,08	1,09	4,41	4,91
E	6,08	6,07	1,06	1,16	5,02	4,91
F	6,72	6,23	1,09	1,24	5,64	4,99

Tabela 13 - Acidez total, carboxílica e fenólica das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos utilizando esterco bovino pré-compostado (valores em $\text{mmol}_c \text{ g}^{-1}$).

Experimentos	Acidez total		Acidez carboxílica		Acidez fenólica	
	1º dia	90º dia	1º dia	90º dia	1º dia	90º dia
B	4,40	4,94	0,90	0,90	3,50	4,04
C	3,67	4,09	1,14	1,14	2,53	2,96
D	4,89	6,16	1,24	1,24	3,64	4,91
E	5,93	5,93	1,30	1,30	4,63	4,63
F	5,89	5,91	1,26	1,27	4,63	4,65

Observa-se que os ácidos húmicos apresentaram um aumento na acidez total, comparando-se o 1º dia ao 90º dia, já para experimentos B e F utilizando-se esterco bovino sem pré-compostar não se obteve o mesmo resultado. Durante o processo de estabilização, tem-se uma diminuição dos grupos alifáticos na estrutura

da matéria orgânica e a formação de anéis aromáticos substituídos, os quais são geralmente grupos carboxílicos, hidroxílicos e carbonílicos, assim há uma maior tendência ao aumento desses grupos durante o processo de vermicompostagem.

3.4.3.5. Espectros de absorbância na região do UV/visível

Os espectros de absorbância na região do UV/visível das amostras de ácido húmico estão mostrados nas Figuras de 64 a 68. Alguns espectros de ácidos húmicos extraídos das amostras após o 90^o dia de vermicompostagem apresentaram um ombro próximo a 280 nm, característico de grupos cromóforos, como estruturas insaturadas e/ou aromáticas (MESSIAS, 2004).

Figura 64 - Espectros de absorbância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 25% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 65 - Espectros de absorvância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 50% de esterco bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 66 - Espectros de absorvância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 67 - Espectros de absorvância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 75% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 68 - Espectros de absorvância no UV/Visível das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 100% de esterco bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Os valores da razão E_4/E_6 obtidos pelos ácidos húmicos de vermicomposto (Tabela 14) estão de acordo com os valores citados na literatura (HERVAS et al., 1989; LANDGRAF et al., 1999). Não se chegou a nenhuma conclusão, pois o tempo de formação de um ácido húmico, que neste caso é de 3 meses, é muito pequeno para refletir em uma mudança na razão E_4/E_6 .

Tabela 14 - Valores de E_4/E_6 das amostras de ácidos húmicos.

Experimentos	sem pré-compostar		pré-compostado	
	1º dia	90º dia	1º dia	90º dia
B	2,35	3,65	3,04	4,03
C	4,88	3,86	3,30	3,20
D	5,32	4,18	3,33	3,81
E	5,30	5,41	5,43	5,20
F	5,05	2,82	3,66	5,09

3.4.3.6. Espectros no infravermelho

As Figuras 69 a 73 mostram os espectros no infravermelho (modo transmitância) das amostras de ácido húmico do vermicomposto extraídos dos experimentos B, C, D, E e F.

Figura 69 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 25% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 70 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 50% de esterco bovino e 50% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 71 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 60% de esterco bovino e 40% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 72 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 75% de esterco bovino e 75% solo a 2% diesel (v/v) utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Figura 73 - Espectros no infravermelho das amostras de ácidos húmicos extraídos dos experimentos de 100% de esterco bovino utilizando esterco bovino (A) sem pré-compostar e (B) pré-compostado.

Podem ser observados nos espectros referentes a Figuras de 69 a 73:

larga banda centrada em 3.410 cm^{-1} associada ao estiramento OH de fenóis e álcoois, além de água, presente como impureza;

picos em 2.923 e 2.850 cm^{-1} , devido a estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente, de C–H alifático;

picos em 1.630 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento C=O dos grupos carboxilatos (COO^-) e picos menos visíveis em 1.720 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O dos grupos carboxílicos (COOH); ao pico em 1.630 cm^{-1} sobreposto ao estiramento C=C de aromático;

picos em 1.510, 1.461 e 1.422 cm^{-1} associados ao estiramento C=C aromático;

pico em 1.238 cm^{-1} , de estiramento C–O e deformação O–H de grupos carboxílicos

Analisando os espectros, observa-se pouca diferença entre eles, relacionados ao 1º e ao 90º dia do processo. No pré-compostado observa-se um ligeira diminuição (muito discreta) no índice da aromaticidade, colaborando com a razão H/C (página 148 e 149). No início do processo a degradação é acelerada, favorecendo a formação dos ácidos húmicos. No final do processo (90º dia), com a formação de ácidos húmicos, cujo material encontra-se mais estabilizado, ocorre uma desaceleração da degradação, tendendo a um aumento do índice de hidrofobicidade. No entanto, não se chegou a nenhuma conclusão, pois o tempo de formação de um ácido húmico, que neste caso é de 3 meses, é muito pequeno para refletir em qualquer mudança.

3.5. CONCLUSÕES

Durante o processo de biorremediação, percebem-se grandes diferenças nas características químicas e físicas do solo, como, por exemplo, a diminuição no teor de matéria orgânica (%) e aumento do teor de cinzas (%). Percebe-se também uma diminuição na concentração de carbono orgânico (g kg^{-1}). Os solos após o processo tendem à neutralização, mesmo quando os solos originais apresentam caráter ácido ou alcalino.

Um aumento do teor de ácido húmico em todos os experimentos foi alcançado, o que se relaciona ao processo de humificação. Percebem-se diferenças

nas características dos ácidos húmicos extraídos dos experimentos do 1º e 90º dia do processo, como por exemplo, a diminuição na razão C/N.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU JUNIOR., C.H.; TAKASHI MURAOKA, T.; OLIVEIRA, F.C. Cátions Trocáveis, Capacidade de Troca de Cátions e Saturação por Bases em solos brasileiros adubados com composto de lixo urbano. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 813-824, 2001.
- ALBANELL, E.; PLAIZATS, J.; CABRERO, T. Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia fetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. **Biology and Fertility of soils**, v. 6, p. 266-269, 1988.
- ALLISON, L.E. Organic Carbon. In: BLACK, C.A.; EVANS, D.D.; WHITE, J.L. ENSIMINGER, L.E.; CLARK, F.E.; DDINAUER, R.C. (Eds.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 1367-1378
- ALLISON, F.E. **Soil organic matter and its role in crop production**. New York: Elsevier, 1982. 637p.
- AQUINO, M. A ; Almeida, D. L.; Freire, L. R.; Polli, H. Reprodução de minhocas (*Oligochaeta*) em esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 161-168, 1994.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR: 7181/1984**: solo: análises granulométricas de solo: método de ensaio. Rio de Janeiro, 1984.
- ATIYEH, R.M; EDWARDS, C.A.; SUBLER, S.; METZGER, J.D. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical proprieties and plant growth. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 11-20, 2001.
- ATIYEH R.M.; LEE S.; EDWARDS C.A.; ARANCON N.Q.; METZGER J.D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 7-14, 2002.
- BIDONE, Francisco Ricardo Andrade. **Vermicompostagem dos resíduos sólidos de curtume, brutos e previamente lixiviados, utilizando composto de lixo orgânico urbano como substrato**. 1995. 294f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.
- CLAESSEN, M.E.C. (Org.). **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos EMBRAPA, 1997. p.83.
- CANTI M.G.; PIEARCE T.G. Morphology and dynamics of calcium carbonate granules produced by different earthworm species. **Pedobiologia**, v. 47,p. 511-521, 2004.
- ELVIRA, C.; GOICOECHEA, M.; SAMPDRO, L.; MATO, S.; NOGALES, R. Bioconversion of solid paper-pulp mill sludge by earthworms. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 173-177,1996.

ELVIRA, C.; DOMINGUEZ, J.; BRIONES, M.J.I. Growth and reproduction of *Eisenia andrei* and *E. fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in different organic residues. **Pedobiologia**, v. 4, p. 377-384, 1996.

GHOSH, K; SCHNITZER, M. A scanning electron- microscopic study of effects of adding neutral electrolytes to solutions of humic substances. **Geoderma**, v. 28, p. 53-56, 1982.

HAIMI, J.; HUHTA, V. Capacity of various organic residues to support adequate earthworm biomass for vermicomposting. **Biology and Fertility of Soils**, v. 2, p. 23-27, 1986.

HARRIS, G.D.; PLATT, W.L.; PRICE, B.C. Vermicomposting in a rural community, **Biocycle**, v. 31, p. 48-51, 1990.

HERVAS, L.; MAZUELOS, C.; SENESI, N.; SAIZ-JIMENEZ, C. Chemical and physico-chemical characterization of vermicomposts and their humic acid fractions. **Science Total Environmental**, v. 81/82, p. 543-550, 1989.

IMBAR, Y.; CHEN, Y. The use of compostad separated cattle manure marc as pest substitut in horticulture. **Acta Horticulture**, v. 178, p. 147-154, 1986.

JACKSON, M.L. **Soil chemistry analysis**. New Delhi: India Privatte, 1967. p.57-81.

JAVARONI, Rita de Cássia Alonso. **Aspectos analíticos de interação de ácidos húmicos com os cátions metálicos Fe^{+3} , Vo^{+2} e o herbicida atrazine**. 1993. 144f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química de São Carlos- Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

KAYHANIAN, M. ; TCHOBANOGLIOUS G. Innovative two-stage process for the recovery of energy and compost from the organic fraction of municipal solid waste (MSW), **Water Science and Technology**, v. 27, p. 133-143,1993.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Editora agronômica Ceres, 1985. 492p.

KONONOVA, M. M. **Soil organic matter: its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1966. 544p.

LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Revista Ciência & Cultura. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 49, n. 1/2, p. 117-120, 1997.

LANDGRAF, M.D.; SILVA, S.C.; REZENDE, M.O.O. Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. **Analytica Chimica Acta**, v. 368, p. 155-164, 1998.

LANDGRAF, M.D.; ALVES, M.R.; SILVA, S.C.; REZENDE, M.O.O. Caracterização de ácidos húmicos de vermicomposto de esterco bovino compostado durante 3 e 6 meses. **Química Nova**, v. 22, p. 483-486, 1999.

LELIS, M.P.N.; FERREIRA NETO, J.T. A influência da umidade na velocidade de degradação e no controle de impactos ambientais da compostagem. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20., 1999, Rio de Janeiro. **Anais ...**, Rio de Janeiro: ABES, 1999. 10p.

LOH, T.C.; LEE, Y.C.; LIANG, J.B.; TAN, D. Vermicomposting of cattle and goat manures by *Eisenia foetida* and their growth and reproduction performance. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 111-114, 2005.

LONGO, A.D. **Minhoca**: de fertilizadora do solo a fonte alimentar. São Paulo: Ícone, 1987. 79p.

MESSIAS, Rossine Amorim. **Avaliação estrutural de ácidos húmicos de vermicomposto e turfa por diferentes técnicas de caracterização**. 2004. 134f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MITCHELL, A. Production of *Eisenia fetida* and vermicompost from feed-lot cattle manure. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, p. 763-6, 1997.

PARKIN, B.T.; BERRY, E.C. Microbial nitrogen transformation in earthworm burrows. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1765-1771, 1999.

POPPI, N.R.; TALAMONI, J. Estudo dos ácidos húmico e fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. **Química Nova**, v. 15, p. 281-285, 1992.

RAIJ, B. van.; CANTARELA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas : Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996. 285p. (Boletim Técnico nº 100)

REEVE, R.N. **Environmental analysis**. London: John Wiley, 1994. 263p.

REZENDE, Maria Olímpia Oliveira. **A importância ambiental das substâncias húmicas**. 1999. 152f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

RODRIGUES, V.C; THEODORO, V.C A.; ANDRADE I.V.; NETO, A. N.; RODRIGUES, V.N. Produção de minhocas e composição mineral do vermicomposto e das fezes procedentes de bubalinos e bovinos. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1409-1418, 2003.

SCHNITZER, M.; GUPTA, U.C. Determination of acidity in soil organic matter. **Soil Science Society**, v. 27, p. 274-277, 1965.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Humic substances in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1972. p.127

SCHNITZER, M; KHAN, SU. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1978. 319p.

SCHULTEN, H.-R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept of humic substances. **Naturwissenschaften**, v. 80, p. 29-30, 1993.

SCHULTEN, H.-R.; SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, p. 487-498, 1995.

SEIN JUNIOR., L.T.; VARNUM, J.M.; JANSEN, S.A. Conformational modeling of a new building block of humic acid: approaches to the lowest energy conformer. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 546-552, 1999.

SHARMA, S.; PRADHAN, K.; SATYA, S.; VASUDEVAN, P. Potentiality of earthworms for waste management and in other uses – a review. **The Journal of American Science**, v. 1, p. 4-16, 2005.

SHIMADZU. **SOLID Sample module- 5000A for TOC-V serie total organic carbon analyzers**: user manual. Kyoto: Shimadzu, 2001/1. 144p.

SHIPITALO, M.J.; R. PROTZ. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. **Geoderma**, v. 45, p. 357-374, 1989.

SILVA, Wilson Tadeu Lopes da. **Estudo das interações entre ácidos húmicos e cobre (II) através do uso de eletrodos de pasta de carbono modificado**. 2000. 107f. Tese (Doutorado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994. 387p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; TIMOTHY, A. N. **Princípios da análise instrumental**, 5. ed., Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SPOSITO, G. CRC - Critical Reviews in Environmental. **Control**, v.16, n.2, p.195-222, 1989.

STEVENSON, F.J. Geochemistry of soil humic substances. In: AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MacCARTHY, P. (Eds.). **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley, 1985. p.13-52.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry**: genesis, composition, reactions. New York: John Wiley, 1994. 496p.

TEIXEIRA J.C. **Fisiologia digestiva dos animais ruminantes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 270p.

THOMSEN, I.K. C and N transformations in ¹⁵N cross-labelled solid ruminant manure during anaerobic and aerobic storage. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 267-274, 2000.

WALLACE, A. Soil organic matter is essential to solving soil and environmental problems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 25, p. 15-28, 1994.

CAPITULO IV
O estudo da sorção dos
compostos naftaleno,
antraceno e b[a]pireno
no solo e vermicomposto

4.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Comumente a relação entre o soluto adsorvido e a concentração de soluto na solução solo são quantificadas pelos isoterms de sorção. Considerando-se que as isotermas de sorção no solo muitas vezes variam fortemente de lugar para lugar, são necessários estudos mais detalhados do comportamento de metais e compostos orgânicos em solo brasileiro, para melhor adequação dos modelos às condições climáticas e ambientais brasileiras (D'AGOSTINHO e FLUES (2006).

É importante conhecer a capacidade de sorção e de complexação de substâncias húmicas com compostos orgânicos, tais como HPAs e metais e a influência das substâncias húmicas quanto ao transporte e destino destes compostos em solos para se avaliar o impacto ambiental por eles causados (MORAES e REZENDE, 2000).

Como dito no capítulo I, os HPAs são adsorvidos nas partículas sólidas do solo, pois apresentam baixa solubilidade em água e alta hidrofobicidade (MIÈGE et al., 1998). No solo, a maioria dos HPAs são fortemente adsorvidos na matéria orgânica, o que os torna relativamente indisponíveis para o processo de degradação. Os HPAs podem, então, permanecer no solo por muito tempo, possuindo um longo tempo de residência, apesar dos HPAs de baixa massa molar serem praticamente perdidos por processos de degradação, volatilização e lixiviação (WIIDFL et al., 1992).

O efeito de sorção geralmente aumenta com o número de anéis benzênicos e o aumento da massa molar dos HPAs, visto que isto implica em forte lipofilicidade. Além disso, tem sido mostrado que a degradabilidade e a capacidade de serem

extraídos diminui conforme aumenta o tempo em que permanecem em contato com o solo, fenômeno chamado de envelhecimento (aging). O envelhecimento é principalmente um resultado de lenta difusão para dentro da matéria orgânica do solo, mas há outros mecanismos envolvidos, incluindo a formação de ligação residual e interação física com os microporos do solo. O processo de sorção e envelhecimento limita, por um lado, a degradabilidade dos contaminantes; por outro lado, este processo reduz a toxicidade do solo contaminado, baixando a fração disponível aos organismos vivos (LUNSTEDT, 2003).

É importante avaliar a sorção desses compostos ao se fazer o estudo de biorremediação, o qual será levado a efeito quando da proposta de metodologias de descontaminação de solo utilizando-se vermicompostagem. O transporte, transformações e efeitos biológicos desses compostos no solo e sistemas aquáticos dependem fortemente de sua capacidade de retenção pela fase sólida organo-mineral.

4.1.1. Conceito teórico de sorção

De acordo com a terminologia da IUPAC, a sorção é o enriquecimento de uma ou mais espécies químicas em uma interface (CALVET, 1989). Para solos e seus constituintes em condições naturais, sorção é a passagem de um soluto da fase aquosa para a superfície de um adsorvente sólido e a dessorção é o processo reverso. O soluto pode ser uma molécula neutra ou uma espécie iônica e o processo pode acontecer em meios macro ou microporos.

Para Ruthven (1984) a sorção é o processo de transferência de um ou mais constituintes (adsorbatos) de uma fase fluida (adsortivo) para a superfície de uma fase sólida (adsorvente). No processo de sorção as moléculas presentes na fase

fluída são atraídas para a zona interfacial devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente.

O fenômeno de sorção decorre da partição dos compostos entre as fases sólidas e a solução do solo, sendo dependente das propriedades físico-químicas dos colóides do solo e do composto. A sorção pode ser classificada como sorção química, na qual estão envolvidas altas energias de ativação do processo com transformação dos compostos, e/ou sorção física, cujas energias são mais baixas e a natureza química das espécies envolvidas é preservada (RUTHVEN, 1984). Quando o sólido é, por exemplo, iônico e a molécula que se adsorve é polarizável, a ligação formada é forte e passa a ser conhecida como sorção química ou quimiossorção. Se a ligação é fraca, a sorção é conhecida como sorção física ou fisiossorção.

As forças envolvidas na sorção física incluem as forças de van der Waals (repulsão e dispersão) e interações eletrostáticas compreendendo as interações de polarização, dipolo e quadrupolo. As contribuições das forças de van der Waals estão sempre presentes, enquanto as contribuições eletrostáticas são significativas apenas no caso de adsorventes que possuem uma estrutura iônica (RUTHVEN, 1984). A sorção física ocorre por uma diferença de energia e/ou forças de atração que tornam as moléculas fisicamente presas ao sólido. Estas interações têm um longo alcance, porém são fracas. A energia produzida quando uma partícula é fisicamente adsorvida é da mesma ordem da entalpia de condensação. Este tipo de sorção é sempre exotérmica e reversível. O equilíbrio é estabelecido rapidamente, a menos que ocorra a difusão através da estrutura porosa. A fisiossorção corresponde a uma interação de natureza puramente eletrostática entre a partícula e os átomos superficiais do sólido. Origina-se pela atração entre dipolos permanentes ou

induzidos, sem alteração dos orbitais atômicos ou moleculares das espécies comprometidas. Recebe também o nome de sorção de van der Waals (DROGUETT, 1983).

Deste modo, nas vizinhanças da superfície do adsorvente ocorre uma mudança das propriedades da fase fluida, sendo esta região tratada como uma fase termodinamicamente diferente. É conveniente considerar esta camada interfacial como sendo composta pela camada da superfície do adsorvente, chamada simplesmente de superfície do adsorvente, e o espaço de sorção no qual o enriquecimento do adsorvivo pode ocorrer. Sendo assim, podemos definir a sorção física como aquela que ocorre quando as forças intermoleculares de atração das moléculas na fase fluida e da superfície sólida são maiores que as forças atrativas entre as moléculas do próprio fluido (RUTHVEN, 1984).

Entretanto, a quimiossorção corresponde a uma interação de tipo químico, na qual os elétrons de ligação entre as moléculas e o sólido experimentam reordenamento e os orbitais respectivos mudam de forma, de modo similar a uma reação química. Mas nem sempre a alteração eletrônica é completa no sentido das ligações químicas, covalentes ou iônicas; pode ocorrer somente uma modificação ou deformação parcial dos orbitais (DROGUETT, 1983).

A sorção química envolve a interação química entre o fluido adsorvido e o sólido adsorvente, conduzindo à formação de um composto químico de superfície ou complexo de sorção. Neste caso, o calor de sorção é da mesma ordem de grandeza dos calores de reação. Por esta razão, somente a sorção física é apropriada a uma operação contínua em estágios. Além disso, na sorção física podem formar-se camadas moleculares sobrepostas, enquanto que na sorção química se forma uma única camada molecular adsorvida (monocamada) (RUTHVEN, 1984). A entalpia de

sorção química é muito maior que a da sorção física. Com exceção de alguns casos, a sorção química é exotérmica e reversível.

Oliveira (2003) sumariza, segundo a Tabela 15, as principais características das reações envolvendo a quimissorção e a fisiossorção.

Tabela 15 - Características que identificam o tipo de sorção (química ou física) (OLIVEIRA, 2003)

Sorção Química ou Quimiossorção	Sorção Física ou Fisiossorção
<ol style="list-style-type: none"> 1. Fenômeno que ocorre por forças químicas que conduzem a ligações que são eletrostáticas ou que envolvam compartilhamento de elétrons. 2. Caso haja na superfície de um material, átomos que podem não estar ligados completamente com os vizinhos, sobrando valências livres, dependendo das condições térmicas, poderá haver formação de ligações químicas entre as valências livres. 3. Há uma interação química entre o sólido e a substância adsorvida. 4. São encontrados grandes valores para o calor de sorção, raramente é menor que 20 kcal/mol. 5. As moléculas não são atraídas para todos os pontos da superfície, mas especialmente para centros ativos; logo, as forças de quimiossorção são bem mais específicas e a atração química entre o sólido e as moléculas de fluido saturam-se quando todos os centros ativos estiverem ocupados. 6. Não se prolonga além da primeira camada, mas é possível que depois se dê adicionalmente sorção física. 7. Devido à alta energia de ativação, a temperatura auxilia o processo de sorção. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fenômeno reversível que ocorre por forças entre as moléculas do sólido e as espécies a ser adsorvida. 2. As forças que envolvem este fenômeno são de van der Waals; logo, são forças relativamente fracas e geralmente mais fáceis de serem revertidas. 3. O calor liberado por um mol de soluto adsorvido varia de 2 a 6 kcal/mol, mas as vezes ocorre até na faixa de 20 kcal/mol. A magnitude do calor de sorção é um dos melhores critérios de diferenciação. 4. A quantidade de material fisicamente adsorvido aumenta com o decréscimo da temperatura de sorção. 5. O equilíbrio entre a superfície sólida e as moléculas do fluido é rapidamente alcançado. 6. As moléculas são atraídas para todos os pontos da superfície. 7. É limitado apenas ao número de moléculas que se pode encaixar na camada – não se limita a uma monocamada, até que a concentração da fase adsorvida seja igual a do fluido. 8. Ao assegurar uma concentração suficiente no fluido, as forças de sorção física podem continuar a ter influência até terem se acumulado várias camadas de moléculas sobre a superfície do sólido.

Freqüentemente, a adsorção é definida como o fenômeno de retenção. O fenômeno inverso é chamado de dessorção, responsável por liberar o composto orgânico dos colóides do solo e permitir sua transformação ou transporte.

A sorção pode ser avaliada quantitativamente através das isotermas. O procedimento experimental é bastante simples: basta colocar em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido com diferentes massas de adsorvente até

atingir o equilíbrio. Após a filtração pode-se obter a concentração de equilíbrio em solução (C_e em mg.L^{-1}) e a quantidade de material adsorvido por massa de solo (x/m em mg.g^{-1}). Os gráficos x/m em função de C_e são as isotermas e podem apresentar-se de várias formas, fornecendo informações importantes sobre o mecanismo de sorção. Elas mostram a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes em uma determinada temperatura (RUTHVEN, 1984). Algumas formas mais comuns estão apresentadas na Figura 74.

Figura 74 – Isotermas de sorção (VIEIRA, 1996)

4.1.2. Isoterma de sorção

A isoterma de sorção representa a relação entre a quantidade de um composto adsorvido a partir de soluções a várias concentrações e a quantidade remanescente nestas soluções, após determinado período de equilíbrio com um dado solo, à temperatura constante (VIEIRA et al., 1999; ARANTES et al., 2006).

Quantifica-se a sorção dos compostos pelo solo e pela matéria orgânica conforme a Expressão 14:

$$x/m = (C_i - C_e) * v/m \quad (14)$$

Em que:

x/m = quantidade do HPA sorvida por massa de solo (mg kg^{-1});

C_i = concentração do HPA inicial (mg L^{-1});

C_e = concentração do HPA na solução em equilíbrio com o solo (mg L^{-1});

v = volume da solução do HPA adicionado (mL); e

m = massa de solo utilizada (g).

Vários modelos matemáticos de isotermas que descrevem a relação de sorção para um composto no solo e seus constituintes são descritos na literatura (RUTHVEN, 1984). O modelo de Freundlich tem sido largamente utilizado porque garante boa linearidade para solos (VIEIRA et. al, 1999; ARANTES et. al, 2006).

A forma da isoterma de Freundlich é representada como na Equação 15:

$$x/m = K_f.C_e^{1/n} \quad (15)$$

Na Equação 15, K_f é a constante de Freundlich (quando $1/n$ difere de 1, a unidade de K_f é $\text{mg}^{1-1/n}\text{kg}^{-1}\text{L}^{1/n}$) e $1/n$ uma constante (índice de intensidade da sorção) que depende da substância adsorvida e do meio adsorvente. Os resultados foram ajustados usando a regressão linear na forma logarítmica da equação de

Freundlich (Equação 16) e os valores K_f e $1/n$ da sorção dos HPAs foram determinados (VIEIRA et al., 1999; ARANTES et al., 2006).

$$\log(x/m) = \log K_f + 1/n \log Ce \quad (16)$$

Tanto K_f como $1/n$ são parâmetros de regressão característicos para cada sistema solo-composto. Sob as condições experimentais, a capacidade de sorção (K_f) é a quantidade do composto adsorvido ou remanescente no solo, quando a concentração da solução no equilíbrio é igual à unidade ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). O parâmetro $1/n$ indica o grau em que a isoterma de sorção do composto no solo é função da concentração da solução em equilíbrio. Isto significa que a isoterma será estritamente linear quando o valor obtido para $1/n$ for igual à unidade.

A isoterma de dessorção representa a relação entre a quantidade de um composto ainda remanescente no solo e em outros substratos, após o processo de dessorção, e a quantidade liberada para a solução aquosa, originalmente sem o composto, após o equilíbrio a uma dada temperatura.

4.1.2.1. As classes das isotermas de sorção

As isotermas de sorção são divididas em quatro principais classes, de acordo com sua inclinação inicial e, cada classe, por sua vez, em vários subgrupos, baseados na forma das partes superiores da curva (FALONE e VIEIRA, 2004; CALVET, 1989). As quatro classes foram nomeadas de isotermas do tipo S ("Spherical"), L ("Langmuir"), H ("High affinity") e C ("Constant partition"), apresentadas na Figura 75.

Figura 75– Classificação das isothermas de sorção.

4.1.2.1.1. Isothermas do tipo S

Este tipo de isoterma tem inclinação linear e convexa em relação à abscissa. A sorção inicial é baixa e aumenta à medida que o número de moléculas adsorvidas aumenta. Isto significa que houve uma associação entre moléculas adsorptivas chamadas de sorção cooperativa.

4.1.2.1.2. Isothermas do tipo L

A forma L possui inclinação não-linear e côncava em relação à abcissa. Nesse caso, há uma diminuição da disponibilidade dos sítios de sorção quando a concentração da solução aumenta.

4.1.2.1.3. Isothermas do tipo H

Trata-se de um caso especial de curva do tipo L e é observada quando a superfície do adsorvente possui alta afinidade pelo soluto adsorvido.

4.1.2.1.4. Isotermas do tipo C

Corresponde a uma partição constante do soluto entre a solução e o adsorvente, dando à curva um aspecto linear. As condições que favorecem as curvas do tipo C são substratos porosos flexíveis e regiões de diferentes graus de solubilidade para o soluto.

As isotermas do tipo C e L são freqüentemente muito próximas, podendo ser, em muitos casos, consideradas do mesmo tipo.

4.2. OBJETIVOS

Estudar a sorção de naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno em vermicomposto, solo e solo calcinado para fins de enriquecimento no estudo da biorremediação de solos impactados por estes compostos.

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Reagentes e solventes utilizados no experimento de sorção

Todos os solventes utilizados nos experimentos foram de grau analítico: acetonitrila (HPLC) e as soluções preparadas com água livre de orgânicos. O padrão de referência de naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno foram obtidos da Supelco (USA). As soluções de diferentes concentrações foram preparadas pela diluição do padrão do naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno em solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, para manter a concentração iônica próxima àquela da solução do solo.

4.3.2. Coleta e preparo das amostras

O solo utilizado nos estudo de sorção foi o mesmo utilizado em todo trabalho, ou seja, um solo não cultivado e coletado a uma profundidade de

aproximadamente 10 cm. O solo foi seco à temperatura ambiente e posteriormente macerado, sendo, em seguida, armazenado em vidraria apropriada, esterilizada e devidamente etiquetada.

O húmus de minhoca foi coletado em um minhocário montado no mesmo local da coleta do solo. A vermicompostagem se processou da seguinte maneira: em uma caixa de 0,70 m³ foi adicionado esterco bovino previamente lavado e a esta caixa foram inoculadas 400 minhocas da espécie *Eisenia foetida* e o material foi vermicompostado por 3 meses. Após decorrido esse tempo foram retiradas as amostras de vermicomposto que foram secas à temperatura ambiente, maceradas e armazenado em vidraria apropriada.

Para obtenção das amostras calcinadas (livres de matéria orgânica), colocou-se em cadinho uma determinada quantidade de solo, a qual foi mantida à 550 °C por 4 h, em mufla.

4.3.3. Sorção dos HPAs em vermicomposto, solo e solo calcinado

Os ensaios de sorção foram realizados colocando-se 1,00 g de cada matriz em erlenmeyers de 150 mL e adicionando-se 10,0 mL de soluções em diferentes concentrações do naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0 mg.L⁻¹), tendo solução aquosa de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ como eletrólito-suporte. As amostras foram submetidas à agitação orbital em uma mesa agitadora do sistema matriz/solução por 12 horas, à temperatura ambiente e no pH natural da matriz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 15.000 rpm (AIROLDI, 2001). Os sobrenadantes foram retirados cuidadosamente, filtrados em filtro de 0,45µm e posteriormente analisados por HPLC. Utilizou-se o detector de fluorescência, segundo a metodologia analítica proposta no capítulo I.

Foram feitas várias diluições visando chegar às concentrações ideais para obtenção da melhor e mais eficiente detecção do composto estudado de acordo com condições cromatográficas.

Os compostos naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno apresentam 2, 3 e 5 anéis aromáticos, respectivamente. Esses compostos foram escolhidos de acordo com o número de anéis aromáticos apresentados em sua estrutura.

Os resultados foram utilizados nos gráficos de sorção baseados na equação de Freundlich. Foram realizados os gráficos de isotermas de sorção para os HPAs estudados (BENEDITO FILHO, 1999; VIEIRA, 1996; VIEIRA et al., 1999; AIROLDI, 2001; LANDGRAF, 1998).

4.3.4. Coeficiente de distribuição (K_d) e coeficiente de distribuição do contaminante na fração orgânica do solo (K_{oc})

Foram calculados os valores de K_d (constante de distribuição em dada concentração), ou também chamado de coeficiente de distribuição, próprio para a comparação da capacidade adsorviva entre o composto e o solo e o vermicomposto (ARANTES et al., 2006), conforme a Equação 17.

$$K_d = (x / m) / C_e \quad (17)$$

Onde:

K_d = coeficiente de distribuição ($L \text{ kg}^{-1}$);

x/m = quantidade do HPA sorvida por massa de solo ($mg \text{ kg}^{-1}$);

C_e = concentração do HPA na solução em equilíbrio com o solo ($mg \text{ L}^{-1}$);

Devido à importância do carbono orgânico presente no solo no processo de sorção e distribuição de compostos orgânicos, o coeficiente de distribuição (K_d) é

geralmente expresso por coeficiente de distribuição do contaminante na fração orgânica do solo (K_{oc}) (ARANTES et al., 2006), apresentado na Equação 18.

$$K_{oc} = (K_d / C) * 1000 \quad (18)$$

Em que:

K_{oc} = coeficiente de distribuição normalizado pelo carbono orgânico ($L\ kg^{-1}$ substância orgânica);

C = teor de carbono orgânico ($g\ kg^{-1}$).

4.4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Uma avaliação das curvas de sorção não-linearizadas mostra que as curvas obtidas para o composto naftaleno nos ensaios de sorção seguiram uma tendência para isotermas de sorção do tipo L e para o antraceno (como exemplo, Figura 76) seguiram uma tendência para isotermas de sorção do tipo C. Já para benzo[a]pireno seguiu-se uma tendência para isotermas do tipo S para ensaios de sorção em solo e solo calcinado e do tipo C para o ensaio de sorção em vermicomposto. A maioria dos estudos de sorção para compostos apolares tem observado isotermas do tipo L (Langmuir) ou C (partição constante) segundo D`Agostinho e Flues (2006).

Figura 76 – Isoterma de Freundlich da sorção do antraceno (A) e naftaleno (B) em vermicomposto (concentração de naftaleno sorvido por g de vermicomposto versus concentração em equilíbrio).

As Figuras 77, 78 e 79 mostram a forma linearizada de isoterma de Freundlich de sorção do naftaleno em vermicomposto, solo e solo calcinado (ALVES et. al, 2001).

Figura 77 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do naftaleno em vermicomposto (log da concentração de naftaleno sorvido por g de vermicomposto versus log da concentração em equilíbrio).

Figura 78 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do naftaleno em solo (log da concentração de naftaleno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio).

Figura 79– Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do naftaleno em solo calcinado (log da concentração de naftaleno sorvido por g de solo calcinado versus log da concentração em equilíbrio).

As Figuras 80, 81 e 82 mostram a forma linearizada de isoterma de Freundlich de sorção do antraceno em vermicomposto, solo e solo calcinado.

Figura 80 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do antraceno em vermicomposto (log da concentração de antraceno sorvido por g de vermicomposto versus log da concentração em equilíbrio).

Figura 81 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do antraceno em solo (log da concentração de antraceno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio).

Figura 82 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do antraceno em solo calcinado (log da concentração de antraceno sorvido por g de solo calcinado versus log da concentração em equilíbrio).

As Figuras 83, 84 e 85 mostram a forma linearizada de isoterma de Freundlich de sorção do benzo[a]pireno em vermicomposto, solo e solo calcinado.

Figura 83 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do benzo[a]pireno em vermicomposto (log da concentração de benzo[a]pireno sorvido por g de vermicomposto versus log da concentração em equilíbrio)

Figura 84 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do benzo[a]pireno em solo (log da concentração de benzo[a]pireno sorvido por g de solo versus log da concentração em equilíbrio).

Figura 85 – Forma linearizada da isoterma de Freundlich da sorção do benzo[a]pireno em solo calcinado (log da concentração de benzo[a]pireno sorvido por g de solo calcinado versus log da concentração em equilíbrio).

As isotermas obtidas (Figura 84 e 85) para benzo[a]pireno indicam uma tendência à isoterma de sorção do tipo S (sigmoidal). Segundo D'Agostinho e Flues (2006) um levantamento mais detalhado da literatura mostrou que vários pesquisadores também observaram isotermas de sorção do tipo S para compostos orgânicos apolares. Mas até hoje, ainda não foi estabelecido um conceito claro para explicar o comportamento de interação de compostos orgânicos apolares com o solo. D'Agostinho e Flues (2006) também afirmam que vários autores sugerem alguns mecanismos de interação e comportamentos das curvas de sorção para compostos orgânicos apolares. Porém, a maioria dos estudos realiza os experimentos em meio aquoso e nem sempre utilizam como adsorvedor um solo

natural, mas sim argilominerais específicos ou ácido húmico puro, que, na realidade não representam fielmente o solo natural. É, portanto, muito difícil comparar os resultados deste trabalho, onde se estudou um solo natural, com trabalhos da literatura.

A maioria dos pesquisadores concorda que o comportamento de retenção de compostos orgânicos no solo é fortemente dependente da matéria orgânica do solo. D'Agostinho e Flues (2006) observaram que sistemas de sorção de solos com baixos teores de matéria orgânica tendem a gerar isothermas tipo S. De acordo com Stevenson (1994), o ácido húmico é o constituinte da matéria orgânica que é mais insolúvel e tende a se fixar à superfície das partículas inorgânicas do solo (principalmente argilominerais, devido a sua área específica), modificando os pontos de sorção para os poluentes orgânicos. Ele também afirma que isothermas tipo S ocorrem normalmente quando o sistema adsorvedor (solo) tem elevada afinidade com o solvente.

A matéria orgânica do solo é considerada heterogênea e consiste de componentes "hard" e "soft" (Figura 86), que exibem comportamentos de sorção diferentes para compostos orgânicos. Os componentes mais acessíveis são denominados matéria orgânica tipo borracha ("soft" ou "rubbery") e os componentes menos acessíveis são denominados rígidos ou vítreos ("hard" ou "glassy") que exibem comportamentos de sorção diferentes. O poluente orgânico pode ser sorvido superficialmente pela matéria orgânica aderida à fração mineral ou à fração orgânica solúvel. Em uma segunda etapa, o poluente orgânico pode difundir para dentro dos microporos e interagir com a matéria orgânica "soft" (microporos mais acessíveis) ou "hard" (microporos menos acessíveis). As maioria dos adsorvedores são corpos altamente porosos, com área superficial interna muito grande. A superfície externa

constitui somente uma pequena fração da superfície total do adsorvedor. Em geral, uma sorção não-linear é resultado do processo de sorção na fração "hard" da matéria orgânica do solo (D'AGOSTINHO e FLUES, 2006).

Figura 86– Comportamento do contaminante no solo (D' AGOSTINHO e FLUES, 2006).

A Tabela 16 apresenta os dados de sorção do naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno segundo o modelo de Freundlich para vermicomposto, solo e solo calcinado.

Tabela 16 - Dados de sorção dos HPAs estudados segundo o modelo de Freundlich

HPAs	matriz	sorção			
		Log K_f	K_f	1/n	R
Naftaleno	vermicomposto	2,16	146,89	0,76	0,91
	solo	1,80	63,41	0,85	0,91
	Solo calcinado	2,12	131,27	1,13	0,95
Antraceno	vermicomposto	2,45	278,84	1,30	0,98
	solo	2,67	465,03	1,47	0,97
	Solo calcinado	2,62	417,37	1,40	0,95
B[a]pireno	vermicomposto	3,86	7231,86	1,55	0,96
	solo	4,02	10453,22	0,99	0,60
	Solo calcinado	3,80	6263,69	0,87	0,77

O ajuste à equação linear produziu valores de R ligeiramente superiores na sorção para naftaleno e antraceno. Já para o benzo[a]pireno obteve-se valor de R superior para vermicomposto.

Pode-se observar que o benzo[a]pireno apresenta valores de K_f relativamente altos em todas as matrizes, o que indica que a sorção de benzo[a]pireno foi relativamente alta quando comparada aos demais compostos.

Não se observou nenhum resultado que possa indicar se a matéria orgânica é um fator importante na sorção desses compostos.

Sabendo-se que capacidade de sorção e dessorção (K_f) é a quantidade do composto adsorvido ou remanescente no solo, quando a concentração da solução no equilíbrio é igual à unidade, e analisando os valores de K_f de sorção nesse estudo, fica bem claro que o efeito de sorção geralmente aumenta com o número de anéis benzênicos e o aumento da massa molar dos HPAs, e que a persistência de HPAs no ambiente solo e vermicomposto estão possivelmente relacionadas com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA. Os HPAs de baixa massa molar são mais facilmente dissolvidos e adsorvem menos no sistema solo e vermicomposto, tornando-se disponíveis para vários processos de degradação. Os HPAs de alta massa molar, por outro lado, são mais adsorvidos, sendo por essa razão mais recalcitrantes à degradação e tendem a se acumular em diferentes compartimentos ambientais. Além disso, a degradabilidade e a capacidade de serem extraídos diminui conforme aumenta o tempo que este permanece em contato com o matriz, fenômeno chamado de envelhecimento.

Os valores de $1/n$ na Tabela 16 estão longe do valor unitário, indicando uma falta de ajuste segundo o modelo de Freundlich, evidenciando que este modelo não seria o mais adequado para o tratamento destes dados, seria mais adequado buscar um novo modelo que melhor se ajuste.

4.4.1. Determinação de coeficiente de distribuição (K_d)

Outro fator de grande importância é que a sorção de compostos orgânicos no solo varia fortemente de lugar para lugar no campo. Grande parte dos dados apresentados pela EPA (2008) foram obtidos por experimentos realizados em amostras de ácidos húmicos puros, sedimentos e argilominerais específicos ao invés de um solo natural. Portanto, estudar e determinar estes coeficientes (K_d e K_{oc}) em amostras de solo natural, que apresentam uma combinação de sítios sorvedores (como argilominerais e ácidos húmicos) é muito mais complexo.

As Tabelas 17 e 18 trazem os coeficiente de distribuição em dada concentração e coeficiente de distribuição em relação ao teor de carbono orgânico do vermicomposto e solo utilizado neste trabalho.

Tabela 17 – Coeficiente de distribuição (K_d) em $L\ kg^{-1}$ em dada concentração e coeficiente de distribuição em relação ao teor de carbono orgânico (K_{oc}) $L\ kg^{-1}$ do vermicomposto.

Concentração ($mg\ L^{-1}$)	naftaleno		antraceno		benzo[a]pireno	
	K_d	K_{oc}	K_d	K_{oc}	K_d	K_{oc}
0,1	15	61	56	231	149	617
0,25	74	307	63	260	317	1313
0,5	57	236	175	724	418	1733
0,75	64	264			579	2399
1	108	447	140	582	1216	5039
2	70	291	74	305	904	3745
4	189	782	224	926		
6	265	1096	216	894	3175	13155
8	256	1059	202	837	3604	14932
10	173	715	211	875	852	3529
15	134	556	237	982	1793	7428
20	92	381	204	845	2012	8335

Tabela 18 – Coeficiente de distribuição (K_d) em $L\ kg^{-1}$ em dada concentração e coeficiente de distribuição em relação ao teor de carbono orgânico (K_{oc}) $L\ kg^{-1}$ do solo.

Concentração ($mg\ L^{-1}$)	naftaleno		antraceno		benzo[a]pireno	
	K_d	K_{oc}	K_d	K_{oc}	K_d	K_{oc}
0,1	43	3949	52	4763	575	52371
0,25	175	15976	65	5888	1492	135967
0,5	177	16145	110	10018	2724	248239
0,75	103	9365			6200	564934
1	178	16241	120	10938	2778	253106
2	210	19178	108	9838	41559	3786658
4	379	34574	158	14407	83084	7570275
6	274	24990	169	15354	46849	4268688
8	328	29919	412	37536	44918	4092728
10	177	16110	380	34601	50916	4639224
15	50	4550	396	36064	37328	3401187
20	17	1545	216	19707	6070	553042

A idéia deste estudo foi comparar os dados experimentais de K_d com dados da literatura e discussão dos principais motivos da variação dos valores de K_d experimentais quando comparados com a literatura. O parâmetro K_d ($L\ kg^{-1}$) é uma importante ferramenta na estimativa do potencial de sorção do contaminante dissolvido em contato com o solo e vermicomposto. Quanto maior o K_d , maior a tendência do contaminante ficar adsorvido ao solo ou ao vermicomposto.

K_{oc} é, portanto, o coeficiente de distribuição do contaminante entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo. A força de sorção entre naftaleno, antraceno e b[a]pireno e o solo é medida pelo coeficiente de distribuição K_{oc} , que depende das propriedades físico-químicas deste contaminante e da porcentagem de carbono orgânico do solo.

Os valores de K_{oc} são normalmente determinados com base nos valores de K_d e corrigidos pela fração orgânica do solo. No manual de valores de K_{oc} para solo ("Soil Screening Guidance", EPA, 2008) são apresentadas amplas faixas de valores de K_{oc} para um grande número de compostos orgânicos, que foram obtidas, em sua maioria, por isotermas de sorção.

O coeficiente de distribuição K_d foi obtido através da porção linear da isoterma de sorção. O K_d foi determinado pela relação $K_d = \Delta(x/m) / \Delta C_e$. Para efeito de avaliação dos dados obtidos, os valores de K_d experimentais foram comparados com os valores de K_d calculados a partir de valores de K_{oc} da literatura EPA (2008), Tabela 19.

Tabela 19 - Comparação dos valores de coeficiente de distribuição (K_d) de naftaleno, antraceno e benzo[a]pireno com base nos dados de K_{oc} segundo EPA (2008) com os dados obtidos experimentalmente das amostras de solo e vermicomposto

	K_{oc} min.-máx ($\times 10^3 \text{ L kg}^{-1}$)	Número de dados publicados	K_d calculado min.-máx vermicomposto ($\times 10^3 \text{ L kg}^{-1}$)	K_d calculado min.-máx solo ($\times 10^3 \text{ L kg}^{-1}$)	K_d experimental vermicomposto ($\times 10^3 \text{ L kg}^{-1}$)	K_d experimental solo ($\times 10^3 \text{ L kg}^{-1}$)
naftaleno	0,83-1,95	20	0,20 – 0,47	0,009 -0,021	0,10	0,017
antraceno	14,5 - 33,9	9	3,50 -8,18	0,159 – 0,372	0,207	0,220
B[a]pireno	479 - 2130	3	115,6 – 514,1	5,26 – 23,4	2,06	6,20

Avaliando-se a Tabela 19 observa-se que o valor calculado de K_d em alguns casos é maior que o valor de K_d obtido experimentalmente neste estudo.

A seguir serão discutidas as possíveis razões que afetaram o valor de K_d obtido experimentalmente a ser inferior ao valor encontrado na literatura.

Os valores de K_{oc} publicados pela EPA e apresentados na Tabela 19 foram obtidos com base em revisão da literatura e mostram que estes dados apresentam grande variação entre si, muitas vezes em várias ordens de grandeza. Essa variação pode ser atribuída a vários fatores, que segundo a EPA podem estar relacionados à: diferenças nas propriedades das amostras de solo; diferenças nos ensaios e método analítico utilizado, e erros experimentais ou de medidas.

Verificou-se também que na literatura poucos foram os estudos experimentais realizados para obtenção de K_{oc} em benzo[a]pireno. É surpreendente que os valores de K_{oc} para compostos orgânicos não ionizáveis, grupo onde se inclui o benzo[a]pireno, sejam muito pequenos, principalmente para este composto cujo grau de toxicidade e fator carcinogênico é muito elevado. Essa escassez de dados na

literatura de K_d ou K_{oc} mostra a dificuldade desse trabalho e a complexidade da pesquisa desses coeficientes.

Como dito anteriormente, os dados aqui presentes foram obtidos por experimentos realizados com amostras mais complexas, e daí a provável razão do alto grau de incerteza obtida em alguns casos na comparação dos dados de K_d deste trabalho com a literatura. Além disso, existem poucas referências na literatura sobre experimento de K_{oc} realizados em amostras de solo natural e praticamente não existem referências de experimentos em amostras de solo tropical (D'AGOSTINHO e FLUES, 2006).

Outra razão para a provável incerteza nos valores experimentais de K_d dos compostos estudados podem estar relacionada à hidrofobicidade. A propriedade hidrofóbica favorece a sorção dos compostos orgânicos à matéria orgânica do solo. As características húmicas do solo e vermicomposto apresentam complexidade estrutural e composição química pouco definida e, portanto, as interações entre esses compostos e a matéria húmica do solo podem ocorrer por diferentes processos, ainda não completamente conhecidos (D'AGOSTINHO e FLUES, 2006).

4.5. CONCLUSÕES

Neste estudo, fica bem claro que o efeito de sorção geralmente aumenta com o número de anéis benzênicos e o aumento da massa molar dos HPAs, e que a persistência de HPAs no ambiente estão possivelmente relacionadas com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA.

Estudar e determinar os coeficientes em amostras de solo natural, que apresentam uma combinação de sítios sorvedores é muito mais complexo. E assim torna-se claro a importância de se obter resultados detalhados do comportamento

desses contaminantes em solo brasileiro, para melhor adequação dos modelos pré-existent às condições climáticas e ambientais brasileiras, bem como para o estudo de biorremediação em solo contaminado por esses compostos.

O valor calculado de K_d em alguns casos é maior que o valor de K_d obtido experimentalmente neste estudo. As possíveis razões que afetaram o valor de K_d obtido experimentalmente a ser inferior ao valor encontrado na literatura pode estar relacionado com a dificuldade em realizar experimentos com amostras muito complexas. Existem estudos com solos *in natura* e praticamente não existem referências de experimentos em amostras de solo tropical, além da escassez de dados literários. Outra razão para a provável incerteza pode estar relacionada à hidrofobicidade do meio.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, Flávia Pereira da Silva. **Avaliação de processos de degradação de pesticidas organoclorados para a descontaminação de matrizes ambientais**. 2001. 167f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- ALVES, M. R.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Sorption and desorption of the herbicide alachlor on humic acid fractions from two vermicomposts. **Journal Environmental Science Health**, v. 36, n. 6, p. 797-808, 2001.
- ARANTES, S. A. C. M.; LIMA, J. M.; NÓBREGA, J. C. A.; GULHERME, L. R. G.; JULIÃO, L. G. F.; JESUS, E. A. Sorção da atrazina em solos representativos da sub-bacia do rio das Mortes - MG. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, p. 101-110, 2006.
- CALVET, R. Adsorption of organic chemicals in soils. **Environmental health perspectives**, v. 83, p. 145-177, 1989.
- BENEDITO FILHO, Antônio. **Influência do vermicomposto na sorção de atrazina associado ao cultivo de milho**. 1999. 98f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.
- D'AGOSTINHO, A.; FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) de benzo[a]pireno em solo por isotermas de sorção. **Química Nova**, v. 29, p. 657-661, 2006.
- DROGUETT, S. E. **Elementos de Catalisis Heterogênea**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1983. p. 4-12.
- ENVIRONMENTAL POLLUTION AGENCY (EPA). **Part 5: Chemical-Specific Parameters**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oerrpage/superfund/health/conmedia/soil/toc.htm>>. Acesso em: 18 ago. 2008.
- FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. Adsorção/dessorção do explosivo tetril em turfa e em argilossolo vermelho amarelo. **Química Nova**, v. 27, p. 849-854, 2004.
- LANDGRAF, M. D.; SILVA, S. C.; REZENDE, M. O. O. Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. **Analytica Chimica Acta**, v. 368, p. 155-164, 1998.
- LUNSTEDT, Staffan . **Analysis de PAHs and transformation products in contaminated soil and remedial processes**. 2003. 56f. Tese (Doutorado) - Faculty of Science and Technology, Department of Chemistry, Umeå University, Sweden, 2003. Disponível em: < <http://www.diva-portal.org/umu/theses/abstract.xsql?dbid=57>>. Acesso em: 19 ago. 2008.
- MIÈGE, C. ; DUGAY, J. ; HENNION, M. C. Optimization and validation and supercritical fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic

hydrocarbons in sewage sludge's by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. **Journal of Chromatograph A**, v. 823, p. 219-230, 1998.

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Influência da argila tipo montmorillonita sobre a adsorção/dessorção dos herbicidas propazina e paraquat. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 10, p. 63-74, 2000.

OLIVEIRA, Débora Machado de. **Aplicação da técnica de solidificação/estabilização para resíduos oleosos da indústria petrolífera, utilizando solo argiloso e bentonita**. 2003. 139f. Dissertação (Mestrado) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

RUTHVEN, D.M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. New York: John Wiley, 1984. 433p.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: John Wiley, 1994. 496p.

VIEIRA, Eny Maria. **Estudo de adsorção/dessorção do herbicida 2,4D no solo e nas substâncias húmicas**. 1996. 109f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G. S.; LANDRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo a ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v. 22, p. 305-308, 1999.

WIIDFL, S. R.; BERROW, M. L.; MCGRATH, S. P.; JONES, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. **Environmental Pollution**, v. 76, p. 25-32, 1992.

CAPITULO V

Conclusões Finais

Os 17 HPAs podem ser bem separados e determinados por CLAE com detector UV-Vis e fluorescência usando uma coluna C-18. A extração por ultra-som foi escolhida para a extração dos HPAs na matriz solo porque apresentou alta eficiência de extração, além de minimizar o uso de solvente e não levar a perda por evaporação. A acetona foi o melhor solvente avaliado para a extração dos 17 HPAs em solo.

Verificou-se através da determinação da concentração dos contaminantes, que houve uma remoção dos HPAs durante o processo de biorremediação. Observa-se que o composto naftaleno é muito suscetível a degradação, por apresentar baixa massa molar e de baixo ponto de ebulição e com maior polaridade que os demais HPAs, tendendo a ser facilmente evaporado para o ambiente e a dissolver-se melhor em água.

Relacionando-se o percentual de remoção de cada HPA (Tabela 6, capítulo II, página 91) durante a biorremediação com alguma de suas propriedades físico-químicas mencionadas na Tabela 1 do capítulo I, página 26, nota-se pela Figura 87 que o percentual de remoção durante a biorremediação diminui com o aumento da massa molar. Neste estudo fica claro que a persistência de HPAs no ambiente solo está relacionada com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA e sua massa molar. Esse mesmo comportamento é observado ao montar-se um gráfico do percentual de remoção versus K_{ow} (Figura 88).

Fica evidente também através do estudo da sorção dos compostos naftaleno (um anel aromático), antraceno (três anéis aromáticos) e benzo[a]pireno (cinco anéis aromáticos) que o efeito de sorção e a persistência de HPAs no ambiente solo e

vermicomposto estão relacionadas com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA e o aumento da massa molar. Na tabela 16, página 186, capítulo IV, evidencia-se que a capacidade de sorção (K_f) aumenta com o número de anéis benzênicos e o aumento da massa molar dos HPAs.

Figura 87 – Percentual de remoção do HPA durante o biorremediação versus massa molar do HPA. Onde: (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo.

Figura 88 – Percentual de remoção do HPA durante o biorremediação versus Kow. Onde: (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo.

Já a Figura 89 mostra o gráfico da remoção do HPA versus sua solubilidade em água, percebe-se um aumento da remoção dos HPAs com o aumento da solubilidade em água. Os compostos com maior solubilidade em água são mais polares e mais voláteis, portanto são mais susceptíveis à degradação. Já os compostos mais apolares tendem a adsorverem nas partículas do solo com maior facilidade e são menos suscetíveis à degradação.

Figura 89 – Percentual de remoção do HPA durante o biorremediação versus solubilidade em água. Onde: (B) 25% de esterco bovino e 75% solo; (C) 50% de esterco bovino e 50% solo; (D) 60% de esterco bovino e 40% solo; (E) 75% de esterco bovino e 25% solo.

Durante o processo de biorremediação, percebem-se diferenças nas características químicas e físicas do solo, como, por exemplo, a diminuição no teor de matéria orgânica (%). Há um aumento do teor de ácido húmico em todos os experimentos, o que se relaciona ao processo de humificação e mineralização.

TRABALHOS FUTUROS

- Monitorar a concentração dos HPAs durante a biorremediação através de um espectrômetro de massas.
- Estudar os possíveis produtos da degradação dos HPAs e sua toxicidade no ambiente após um processo de biorremediação utilizando-se minhocas, além de fazer um controle de sua concentração através de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas.
- Fazer um estudo sobre as concentrações letais de HPAs e de diesel para as minhocas através de ensaios ecotoxicológicos, com o intuito de saber a concentração inicial que se deve ter para haver uma reprodutibilidade bem sucedida da biorremediação utilizando-se minhocas.
- Aplicar este processo de remediação em larga escala, como, por exemplo, postos de gasolina, onde haja uma contaminação do solo por vazamento de combustíveis.