

PATRÍCIA FALEIRO PIMENTEL

**FENANTRENO REMANESCENTE PARA A AVALIAÇÃO DE
BIODISPONIBILIDADE DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM SOLOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA – MG

MINAS GERAIS – BRASIL

2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P644f
2009

Pimentel, Patricia Faleiro, 1961-

Fenantreno remanescente para a avaliação de biodisponibi-
lidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos /
Patricia Faleiro Pimentel. – Viçosa, MG, 2009.
xiv, 102f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 93-102.

1. Fenantreno. 2. Solos - Poluição. 3. Hidrocarbonetos
policíclicos. 4. Hidrocarbonetos aromáticos. 5. Extração
(Química). 6. Água. 7. Indicadores biológicos.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

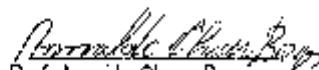
CDD 22.ed. 639.276

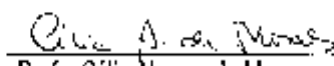
PATRICIA FAJEIRO PIMENTEL

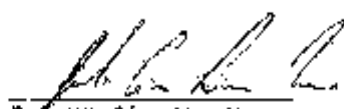
**FENANTRENO REMANESCENTE PARA A AVALIAÇÃO DE
BIODISPONIBILIDADE DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM SOLOS**

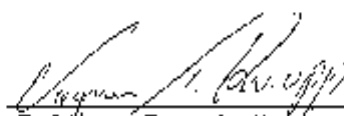
Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de Doctor
Scientiae.

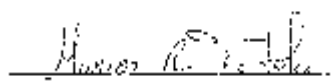
APROVADA: 31 de julho de 2009


Prof. Arnaldo Chaer Borges


Profa. Célia Alencar de Moraes


Prof. Júlio César Lima Neves
(Co-orientador)


Prof. Wagner Fernandes Knapp


Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

Para Felipe e Marcus, com amor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela orientação, incentivo e paciência durante a realização desse trabalho.

Aos professores Júlio César Lima Neves e Juraci Alves de Oliveira, pela co-orientação, amizade, confiança e exemplo de dedicação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e contribuição à formação científica e pessoal.

À Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) pela liberação, apoio à pesquisa e disposição da infra-estrutura, sem os quais a conclusão desse trabalho não seria possível.

Aos professores do Departamento de Microbiologia (DMB), pelos conhecimentos transmitidos durante o curso que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho.

Às Coordenadoras do Programa de Pós Graduação, Célia Alencar de Moraes e Elza Fernandes de Araújo, pelas palavras de incentivo e confiança nos momentos de dificuldades.

À Nilcéia e aos demais funcionários da Secretaria do DMB/UFV.

Aos técnicos e auxiliares do DMB e BIOAGRO, pelo auxílio em todas as etapas do trabalho.

Aos colegas do LBBMA, Aline, Tânia, Péricles, Patrícia Leal, Adriano, Bruna, Nívea, Cássia, Rose, Adélia, Maíke, Fabiane, pela amizade, compreensão e ajuda na execução dos experimentos.

Aos estagiários: Ivan, Guilherme, Marcela do LBBMA/UFV e a Fernanda do SAM/CETEC, que muito me ensinaram.

Ao Dr. Vagner Fernandes Knupp do SAM/CETEC, pelo auxílio na condução das análises cromatográficas, sugestões, incentivo e confiança.

Ao Laboratório de Irradiação Gama do CDTN, na pessoa do Dr. Fausto Carvalho Pinto, pela esterilização dos solos.

Aos colegas da Pós-graduação, pela amizade e convívio.

Aos colegas e amigos do SDB/CETEC, Mércia, Carla, Lincoln, Graça, Jacira, Eloisa, Claudia, João, Karyne, Christiane e Inês, pela amizade.

Aos amigos do CETEC, pela confiança e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À minha família, que de alguma forma esteve presente nesses anos de muito estudo e trabalho, em especial às minhas irmãs Paula e Júnia e meus tios Evani e Élson, que me acolheram.

Aos amigos, Miriam, Wanessa, Isabella, Kledna, Ulisses, Agenor, Irene, Marlon e Maurício pelo apoio, companheirismo e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao meu filho Felipe, por movimentar a minha vida.

Ao Marcus Cezar Castor da Nobrega, pelo seu amor incondicional.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	5
2.2 Comportamento dos PAHs no Meio Ambiente	6
2.3 Contaminação dos Solos Por PAHs	9
2.4 Critérios de Qualidade Ambiental para os PAHs em Solos.....	10
2.5 Avaliação de Risco.....	11
2.6 Envelhecimento dos PAHs nos Solos	13
2.7 Sorção de PAHs no Solo	14
2.7.1 Modelos de Sorção de PAHs nos Solos.....	15
2.8 Biodisponibilidade e Bioacessibilidade dos PAHs nos Solos.....	18
2.8.1 Métodos para Determinação da Biodisponibilidade e Bioacessibilidade de PAHs nos Solos	20
2.8.2 Métodos Biológicos	32
2.9 Metodologia do Fósforo Remanescente.....	36
3. OBJETIVO.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Solos - Amostragem e Processamento	42
4.2 Determinação das Doses de Alerta de Fenantreno para os Métodos de Extração	43
4.2.1 Contaminação e Manutenção dos Solos	43

4.2.2	<i>Determinação das Doses de Alerta de Fenantreno para os Métodos de Extração</i>	44
4.2.3	<i>Análise do Fenantreno Extraído</i>	45
4.2.4	<i>Determinação da Massa Seca das Amostras de Solo</i>	47
4.3	<i>Determinação do Efeito do Fenantreno sobre Indicadores Biológicos nos Solos</i>	47
4.3.1	<i>Ensaio de Germinação de Sementes</i>	47
4.3.2	<i>Ensaio de Respirometria</i>	48
4.3.3	<i>Contagem de Bactérias Heterotróficas (CBH) nos Solos</i>	49
4.4	<i>Correlações entre as Doses de Alerta para os Métodos de Extração e o Efeito do Fenantreno sobre Indicadores Biológicos</i>	50
4.4.1	<i>Desenvolvimento da Metodologia para a Determinação do Fenantreno Sobrenadante</i>	50
4.5	<i>Análises Estatísticas</i>	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	<i>Solos Estudados</i>	54
5.2	<i>Determinação das Doses de Alerta para os Métodos de Extração</i>	55
5.2.1	<i>Extração de Fenantreno com HPCD</i>	55
5.2.2	<i>Extração de Fenantreno com TENAX</i>	58
5.2.3	<i>Extração de Fenantreno com ÁGUA</i>	61
5.2.4	<i>Eficiência de Extração de Fenantreno Pelos Três Extratores</i>	64
5.2.5	<i>Relação Entre os Atributos dos Solos e a Extração de Fenantreno pelos Extratores</i>	67
5.3	<i>Desenvolvimento da Metodologia de Determinação do Fenantreno Sobrenadante</i>	72
5.3.1	<i>Ensaio de Sorção de Fenantreno em Solução Aquosa com CaCl₂</i>	72
5.3.2	<i>Ensaio de Sorção do Fenantreno em solução aquosa de HPCD</i>	74
5.3.3	<i>Determinação do Fenantreno Remanescente</i>	82
5.3.4	<i>Validação do Método de Extração de Fenantreno Remanescente como Estimador da Dose de Alerta</i>	84
6.	CONCLUSÕES	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
GC/FID	Gas Chromatography / Flame Ionization Detector
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
K _{oc}	Coefficiente de partição octanol carbono
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol água
pH	Potencial hidrogeniônico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTA	Capacidade de troca aniônica
CTC	Capacidade de troca catiônica
CTC (argila)	Atividade da argila (cmol _c . kg de argila ⁻¹)
CTC ef	Capacidade de troca de cátions efetiva (cmol _c kg ⁻¹)
dag	Decagrama (unidade de massa) = 10 g
dm ³	Decímetro cúbico (unidade de volume) = 1 litro
EPA	Environmental Protection Agency
HPCD	Hydroxipropil-β-ciclodextrina
cmol _c	Centimol de carga (unidade de capacidade de troca
1 meq.100 g ⁻¹	1 cmol _c .kg ⁻¹ = 10 mmol _c .kg ⁻¹
MO	Matéria orgânica (g.kg ⁻¹) = C (g.kg ⁻¹) x 100/58
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
SPE	Extração em fase sólida
USEPA	United States Environmental Protection Agency
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
NBR	Norma Brasileira

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de calibração para o fenantreno em HPCD, utilizada para o cálculo da concentração presente nas amostras de solo.	53
Figura 2: Fenantreno recuperado pela extração por HPCD, em função do fenantreno adicionado aos diferentes solos.	57
Figura 3: Fenantreno recuperado pela extração por TENAX, em função do fenantreno adicionado aos diferentes solos.	60
Figura 4: Fenantreno recuperado pela extração por ÁGUA, em função do fenantreno adicionado aos diferentes solos.	63
Figura 5: Declividades das equações de regressão linear entre as concentrações de fenantreno extraído por HPCD e ÁGUA e a dose de fenantreno aplicada aos solos, após 5 dias de contato.	67
Figura 6: Isotermas de sorção do fenantreno por 6 solos.	76
Figura 7: Isotermas de Freundelich linearizadas para os dados experimentais de sorção de fenantreno pelos 6 solos.	79
Figura 8: Relação entre as doses de fenantreno adicionadas aos solos e as recuperadas em solução de HPCD.	84
Figura 9: Correlação entre a recuperação do fenantreno em solução na dose 3 aplicada e o teor de argila dos solos.	85
Figura 10: Relação entre as concentrações de fenantreno remanescente na dose de 10 mg.L ⁻¹ e as concentrações de fenantreno nos solos (µg.g de solo ⁻¹) a partir das quais se observou efeito biológico.	87
Figura 11: Relação entre a concentração de fenantreno recuperado para cada método de extração na dose de resposta biológica, em função da concentração do fenantreno no sobrenadante, durante os ensaios de sorção a partir de uma solução de HPCD contendo 10 mg.L ⁻¹	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela USEPA.....	6
Quadro 2: Taxas de degradação de algumas espécies de PAHs.	7
Quadro 3: Métodos usados na avaliação da biodisponibilidade de PAHs.	23
Quadro 4: Classificação dos solos	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos 16 PAHs estudados:	8
Tabela 2: Caracterização físico-químicas dos solos estudados.....	43
Tabela 3: Propriedades físico-químicas, termodinâmicas e $K_{d_{oc}}$ estimado do fenantreno.	51
Tabela 4: Cálculo das doses de fenantreno adicionadas aos tubos, a partir da solução- estoque, de forma a se obter as concentrações desejadas de fenantreno.....	52
Tabela 5: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 5 dias, com HPCD.....	56
Tabela 6: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 120 dias, com HPCD.....	56
Tabela 7: Comparação entre as inclinações das equações da regressão linear entre as concentrações de fenantreno recuperado por HPCD e fenantreno adicionado aos diferentes solos.....	58
Tabela 8: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído com TENAX dos solos envelhecidos por 5 dias	59
Tabela 9: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído com TENAX dos solos envelhecidos por 120 dias	59
Tabela 10: Comparação entre as inclinações das equações da regressão linear entre as concentrações de fenantreno recuperado por TENAX e fenantreno adicionado aos diferentes solos.....	61
Tabela 11: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 5 dias, com ÁGUA.....	62
Tabela 12: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 120 dias, com ÁGUA.....	62
Tabela 13: Comparação entre as inclinações das equações da regressão linear entre as concentrações de fenantreno recuperado por ÁGUA e fenantreno adicionado aos diferentes solos.....	64
Tabela 14. Valores das declividades média, máxima e mínima, do desvio padrão e do coeficiente de variação (CV%) das equações de regressão linear entre o teor de fenantreno extraído pelos diferentes extratores e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solos, nos dois tempos de contato.....	65

Tabela 15: Relação entre as declividades das equações de regressão da extração do fenantreno dos solos com 5 e 120 dias.....	66
Tabela 16: Coeficientes de correlação entre as declividades das equações de regressão linear entre as concentrações de fenantreno extraído e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solos, obtidos com os três extratores aos 5 e aos 120 dias, e independentemente do tempo de contato	67
Tabela 17: Coeficientes de correlação entre os teores de fenantreno obtidos pelos extratores em cada tempo de contato, independentemente do tipo de solo	70
Tabela 18: Coeficientes de correlação entre as declividades das extrações de fenantreno, em cada tempo de contato e as características dos solos	70
Tabela 19: Coeficientes de correlação entre as declividades das extrações de fenantreno e algumas características dos solos, independentemente do tempo de contato.....	71
Tabela 20: Resultados de sorção do fenantreno, em solução aquosa de HPCD, por 6 solos	75
Tabela 21: Análise de regressão linear dos dados de sorção obtidos nos 6 solos.....	77
Tabela 22: Análise de regressão provenientes do ajuste de sorção do fenantreno no modelo linear de Langmuir para os diferentes solos.....	77
Tabela 23 Estimativa dos parâmetros de Freundlich para a sorção do fenantreno nos 6 solos estudados.....	81
Tabela 24: Coeficientes de correlação entre algumas características dos solos e o fenantreno recuperado em solução, para cada dose (mg.L^{-1}) adicionada aos solos.....	83
Tabela 25: Doses de fenantreno aplicado aos solos ($\mu\text{g.g}^{-1}$), para cada solo, onde foram identificadas os primeiros efeitos significativos nos ensaios biológicos	86
Tabela 26: Coeficientes de correlação entre o fenantreno no sobrenadante na dose de 10 mg.L^{-1} e a primeira dose de resposta dos ensaios biológicos, nos dois tempos de contato	88
Tabela 27: Concentrações de fenantreno recuperadas pelos diferentes métodos de extração nas doses adicionadas aos solos, a partir dos quais foi observado efeito significativo nos ensaios biológicos, após 5 dias de contato	88
Tabela 28: Concentrações de fenantreno recuperadas pelos diferentes métodos de extração nas doses adicionadas aos solos, a partir dos quais foi observado efeito significativo nos ensaios biológicos, após 120 dias de contato	89

RESUMO

PIMENTEL, Patrícia Faleiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Fenantreno remanescente para a avaliação de biodisponibilidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Júlio César Lima Neves e Juraci Alves de Oliveira

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são contaminantes gerados pela combustão incompleta da matéria orgânica. Existe uma grande preocupação com relação aos seus efeitos sobre o meio ambiente e à saúde humana. A biodisponibilidade dos PAHs tem conseqüências significativas para o ambiente e para os seres humanos, uma vez que esses compostos afetam os ecossistemas e, em especial, a cadeia alimentar. A determinação precisa dos efeitos dos contaminantes sobre espécies individuais, populações, comunidades e ecossistemas é limitada pelas incertezas na quantificação da exposição dos receptores. Até o momento, não existe uma estratégia uniforme para se avaliar a biodisponibilidade de contaminantes para os organismos do solo, apesar do desenvolvimento de inúmeras abordagens, conceitos e métodos. Nesse trabalho foram selecionados seis solos de várias regiões do Estado de Minas Gerais, com diferentes características químicas e físicas. Os solos foram usados para estudar: a) a extração de fenantreno dos solos, 5 e 120 dias após a contaminação, por três extratores (HPCD, TENAX-TA e ÁGUA), definindo-se a relação entre o fenantreno adicionado e o extraído pelos extratores, nos tempos de contato; b) a influência de características do solo na extratibilidade do fenantreno pelos extratores; c) o efeito do fenantreno sobre indicadores biológicos nos solos, nos dois tempos de contato e definição da primeira dose causadora de efeito detectável sobre os organismos; d) curvas de sorção de fenantreno pelos 6 solos, em solução de HPCD; e) desenvolvimento da metodologia de determinação do fenantreno sobrenadante, após o contato do solo com solução de fenantreno em HPCD, pela correlação das concentrações de fenantreno recuperadas nos ensaios de sorção com as características físico-químicas dos solos. A concentração de

fenantreno na solução de HPCD que apresentou maior correlação com as características do solo foi, então, relacionada com o fenantreno extraído pelos três métodos de extração e com as doses de respostas biológicas obtidas com os solos contaminados com fenantreno por 5 e 120 dias. Como resultado, foi proposta uma nova metodologia de avaliação da capacidade de retenção de fenantreno por diferentes tipos de solo, denominada de **Fenantreno-remanescente**. Os efeitos das variações de características de solo sobre a eficiência de extração pelo método proposto e sobre a biodisponibilidade do contaminante foram eliminados, tornando o método aplicável a uma variedade de tipos de solos ou de resíduos sólidos.

ABSTRACT

PIMENTEL, Patrícia Faleiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Remaining phenanthrene as a tool for accessing bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbon in soils.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Júlio César Lima Neves and Juraci Alves de Oliveira

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are contaminants generated by incomplete combustion of organic matter. There is great concern regarding their effects on the environment and human health. The bioavailability of PAHs has significant consequences for human beings, since these compounds affect ecosystems and, in particular, the food chain. Precise determination of the effects of contaminants on individual species, populations, communities and ecosystems is limited by uncertainties in the quantification of exposure of receptors. To date, there is not a uniform strategy for assessing the bioavailability of contaminants to soil organisms, despite the development of several approaches, concepts and methods. In this work we selected six soils from various regions of the Minas Gerais state, Brazil, with different chemical and physical characteristics. The soils were used to study: a) the extraction of phenanthrene from the soils after 5 and 120 of contamination time using three extractors (HPCD, TENAX-TA, and WATER), defining the relationship between added and extracted phenanthrene, in each contact time; b) the influence of soil characteristics on the extractability of phenanthrene by the extractors; c) the phenanthrene effect on soil biological indicators in both contact times, defining the first phenanthrene concentration that caused effect on the organisms; d) phenanthrene sorption curves in the 6 soils, in HPCD solution; e) the development of methodology to determine the phenanthrene supernatant, after soil contact with phenanthrene in HPCD solution, correlating the phenanthrene concentrations recovered in sorption tests with the characteristics of the soils. The concentration of phenanthrene in the HPCD solution that showed the highest correlation with soil characteristics was then correlated with

the phenanthrene extracted by the 3 extraction methods and concentration of biological responses obtained with soils contaminated with phenanthrene for 5 and 120 days. As a result, we proposed a new methodology to assess the retention capacity of phenanthrene by different types of soil, named **Remaining-Phenanthrene**. According to this methodology, the effects of soil properties on the extraction efficiency of the method proposed and on the bioavailability of the contaminant were eliminated, making the method applicable to a variety of soils or solid wastes.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e o desenvolvimento industrial resultam no consumo de quantidades crescentes de combustíveis, solventes, metais pesados, fertilizantes e pesticidas. Embora muitas dessas substâncias sejam utilizadas ou destruídas, um grande percentual é lançado na atmosfera, na água e no solo, causando contaminação do meio ambiente. A sociedade contemporânea está cada vez mais preocupada com os efeitos dos produtos químicos sobre o homem e o ambiente. Em resposta ao aumento da contaminação ambiental, a comunidade internacional vem exigindo o desenvolvimento de ferramentas que permitam avaliar, com precisão, os riscos químicos, físicos e biológicos dos contaminantes.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são contaminantes gerados continuamente pela combustão incompleta da matéria orgânica nos incêndios florestais, no aquecimento doméstico, no tráfego de automóveis, em processos de pirólise, pelo derramamento de produtos de petróleo e pela incineração de lixo. Atualmente, mais de 100 PAHs são reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Apesar disso, somente 16 PAHs são considerados de máxima prioridade para a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. Conseqüentemente, existe uma grande preocupação com relação aos seus efeitos sobre o meio ambiente e à saúde humana.

O termo PAH se refere aos hidrocarbonetos que contêm dois ou mais anéis benzênicos fundidos na forma linear, angular ou agrupados. Sua persistência bioquímica vem da densa nuvem de p -elétrons em ambos os lados das estruturas do anel, tornando-os resistentes ao ataque nucleofílico. Além disso, dados o alto coeficiente de partição octanol-água e a alta relação sólido/água, esses compostos apresentam baixa solubilidade em água, o que não favorece a utilização imediata pelos microrganismos e promove seu acúmulo nas fases sólidas dos ambientes terrestres. Como resultado, eles se acumulam nas partículas finas e na matéria orgânica de solos e sedimentos, tornando-os assim reservatórios de PAHs (JOHNSSEN *et al.*, 2005).

Quando um PAH é incorporado ao solo, parte pode ser perdida por processos de biodegradação, lixiviação ou volatilização, mas parte também pode acumular-se na biota ou ser retida pelos minerais e fração orgânica do solo. Vários fatores controlam o comportamento e o destino dos PAHs, incluindo o tipo de solo e as propriedades físico-químicas do contaminante (REID *et al.*, 2000a).

Normalmente, com o aumento do tempo de contato entre o contaminante e o solo, há uma diminuição na disponibilidade biológica e química, reflexos de um processo denominado de “envelhecimento” por ALEXANDER, em 1995. Com o tempo, a fração disponível ou biodisponível diminui de maneira bifásica, isto é, uma parte é degradada ou perdida do solo e outra é transformada em uma fração recalcitrante.

Os principais mecanismos envolvidos no envelhecimento de contaminantes no solo são a adsorção e a difusão (seqüestro), que são interações entre o contaminante e a fração sólida do solo (fração mineral e orgânica) (XING & PIGNATELLO, 1997; SCHLEBAUM *et al.*, 1998). Esses mecanismos, juntamente com as características físico-químicas do contaminante, determinam o seu envelhecimento nos solos (ALEXANDER, 2000). Sabe-se que as interações entre o solo e os compostos orgânicos hidrofóbicos (HOCs) são influenciadas pela quantidade e natureza da matéria orgânica do solo, pelos constituintes inorgânicos, em particular o tamanho e estrutura dos poros, pela atividade microbiana e pela concentração do contaminante (HATZINGER & ALEXANDER, 1995; NAM & ALEXANDER, 1998; GUTHRIE & PFAENDER, 1998).

A biodisponibilidade dos compostos orgânicos persistentes, como os PAHs, tem conseqüências significativas para os seres humanos, ao afetar os ecossistemas e, em especial, a cadeia alimentar. A determinação precisa dos efeitos dos contaminantes sobre espécies individuais, populações, comunidades e ecossistemas é limitada pelas incertezas na quantificação da exposição dos receptores (QUINONES-RIVERA *et al.*, 2003). A análise de risco ambiental desses compostos (ARA), baseada na quantidade total presente no solo, água e ar, não indica necessariamente a quantidade que está disponível para ser absorvida pelos organismos vivos. O contaminante, interagindo com as frações sólidas orgânicas e inorgânicas do solo, torna-se progressivamente menos disponível, fato atribuído ao seu transporte para os agregados do solo e micro-poros, onde fica inacessível para os microrganismos, ou à adsorção. Entretanto, o contaminante pode ser liberado com o tempo, em decorrência de alterações nas propriedades do

adsorvente, da migração lenta dos compostos para áreas acessíveis ou da mudança do contaminante para a forma disponível (SEMPLE *et al.*, 2007).

Nos estudos de avaliação de risco de áreas contaminadas é recomendada a aplicação de testes ecotoxicológicos nos extratos dos solos usando bioensaios, para complementar os resultados das análises químicas, que incluem testes de toxicidade para animais, plantas e microrganismos. Esses indicadores mostram o nível de toxicidade dos poluentes para os seres vivos e o seu potencial genotóxico. Entretanto, esses bioensaios não consideram os processos nos ecossistemas e os fatores ambientais que influenciam a toxicidade. Apesar da utilidade dessas ferramentas, a quantidade de compostos químicos em um ecossistema, bem como a diversidade de espécies e de funções biológicas e ecológicas, fazem com que nem sempre os resultados obtidos retratem o risco real da contaminação. De acordo com FENT (2004), para entender os efeitos ecotoxicológicos em ecossistemas contaminados, é necessário o desenvolvimento de uma abordagem integrada, considerando os conceitos ambientais, químicos, toxicológicos e ecológicos.

O conceito de biodisponibilidade originou-se do fato de que os efeitos danosos aos organismos expostos e aos ecossistemas não são causados pela quantidade total dos compostos químicos presentes no ambiente, mas apenas por uma fração dessas, a biodisponível. O principal objetivo dos estudos em biodisponibilidade é, então, a descrição mais realista dos efeitos da exposição de organismos a matrizes ambientais contaminadas. Para os ambientes de solo, em particular, isso é uma tarefa necessária e difícil, já que os solos são caracterizados por sistemas trifásicos altamente complexos (matriz do solo, água e espaço poroso), múltiplos processos (distribuição, sorção, transformação e quebra) e alta variabilidade no tempo e no espaço (HAWS *et al.*, 2006). Até o momento, não existe uma estratégia uniforme para se avaliar a biodisponibilidade de contaminantes para os organismos do solo, apesar do desenvolvimento de inúmeras abordagens, conceitos e métodos (WILSON & NAIDU, 2008).

A avaliação de risco e as medidas reguladoras para a proteção dos solos (liberação de compostos químicos, valores limites e metas de remediação de solos) estão particularmente sujeitos a incertezas consideráveis, à medida que os valores totais e nominais das concentrações são a base da avaliação da exposição. A desconsideração da biodisponibilidade, na prática, pode resultar na super ou subestimação dos riscos dos compostos químicos presentes nos solos.

Este trabalho propõe uma nova abordagem para definição de valores-limite para contaminantes ambientais em solos. A metodologia está baseada na adoção de um mensurador de capacidade de retenção do contaminante nos solos como critério de predição de resposta biológica. Uma vez desenvolvido, o procedimento permitirá que métodos de extração/quantificação padronizados sejam empregados para avaliação da presença de frações biodisponíveis, independentemente do conhecimento do comportamento do contaminante em cada matriz porosa, em particular. O modelo poderá ser extrapolado para outros tipos ou classes de contaminantes, ao definir valores-limite por procedimentos padronizados, baseando-se na avaliação da biodisponibilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs)

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos (POTIN *et al.*, 2004). Os PAHs formam um grupo vasto e heterogêneo, sendo que os compostos mais tóxicos conhecidos dessa família são as moléculas formadas por quatro a sete anéis. Essas substâncias têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais (NETTO, 2000).

Em razão de sua característica fortemente apolar, os PAHs são lipossolúveis e prontamente absorvidos pelos seres vivos. A preocupação com a sua presença no ambiente se deve a possibilidade desses compostos reagirem com o DNA, tornando-se mutagênicos e carcinogênicos aos seres humanos e animais. A exposição ocorre por inalação, exposição oral ou dérmica (NETTO *et al.*, 2000). As estruturas e efeitos dos 16 PAHs considerados de máxima prioridade para a USEPA estão apresentados no Quadro 1.

Os PAHs são introduzidos no meio ambiente por fontes naturais e antropogênicas. As fontes naturais incluem a combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica e as emissões vulcânicas. Já as antrópicas estão ligadas às atividades industriais, como queima de combustíveis fósseis, emissão de efluentes industriais e esgotos domésticos, vazamentos de petróleo, incineração de lixo, produção industrial dos PAHs (fabricação de corantes, de fibras sintéticas e de preservantes de madeira), produção de carvão vegetal, extração e gaseificação do carvão mineral e nos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BANFORTH & SINGLETON, 2005).

2.2 Comportamento dos PAHs no Meio Ambiente

Os PAHs podem estar presentes nos compartimentos água, solo, sedimento e atmosfera. Na atmosfera, são encontrados na fase gasosa ou adsorvidos no material particulado. A partir da atmosfera, os PAHs são transferidos e depositados nos solos, na água e nos sedimentos. No solo, esses compostos encontram-se adsorvidos na fase sólida, mas podem ser lixiviados e contaminar a água subterrânea. Ao longo do seu transporte, os PAHs podem passar por transformações por meio de mecanismos físicos, químicos e biológicos, como espalhamento, evaporação, dissolução, emulsificação, adsorção, biodegradação, foto-oxidação e sedimentação (NRC, 1985).

Quando depositados nos solos e sedimentos, os PAHs podem sofrer biodegradação pela ação de bactérias e fungos. Essa degradação biológica depende de fatores como disponibilidade de nutrientes, presença de substratos alternativos, concentração dos compostos e número de microrganismos. Os compostos de baixo peso molecular são mais facilmente degradados, enquanto que as espécies alifáticas e aromáticas de alto peso molecular são mais resistentes e podem persistir por muitos anos no ambiente. O Quadro 2 apresenta a meia vida de alguns PAHs no meio ambiente (KENNISH, 1997).

Quadro 1: Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela USEPA

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito
Naftaleno		tóxico	Acenaftileno		mutagênico
Acenafteno		mutagênico	Fluoreno		mutagênico
Antraceno		mutagênico	Fenantreno		tóxico e mutagênico
Fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Pirceno		carcinogênico e mutagênico
Criseno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (a) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Denzo (b) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Denzo (k) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (a) pireno		carcinogênico e mutagênico	Dibenzo (a,h) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (g,h,i) perileno		carcinogênico	Indeno (1,2,3 cd) pireno		carcinogênico

Fonte: SIMS *et al.*, 1988.

Quadro 2: Taxas de degradação de algumas espécies de PAHs.

Espécies de PAHs	Número de anéis	Meia Vida (dias)
Naftaleno	2	14-320
Antraceno	3	~130
Fluoreno	3	37
Benzo(a)antraceno	4	1100
Pireno	4	238
Criseno	4	510
Benzo(a)pireno	5	>1400

Fonte: USEPA, 2000.

As propriedades físico-químicas dos PAHs são importantes, uma vez que determinam o seu comportamento e distribuição dentro dos diferentes compartimentos ambientais. Os valores de algumas constantes físico-químicas relevantes para a compreensão do comportamento ambiental e toxicológico desses compostos são apresentados na Tabela 1.

A partir dos dados mostrados na Tabela 1, pode-se observar algumas características gerais dos PAHs: são sólidos à temperatura ambiente, tem altos pontos de ebulição (218 a 496°C) e de fusão (80 a 262°C), baixa solubilidade em água; são solúveis em solventes orgânicos e altamente lipofílicos. Suas afinidades por fases orgânicas, lipofílicas, expressas pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), são elevadas (entre 3,4 a 7,1), indicando que podem ser absorvidos por diversos tecidos biológicos como, por exemplo, a pele (NETTO, 1999). O K_{ow} é definido como a relação da concentração em equilíbrio de um contaminante orgânico na fase octanol em relação à concentração do contaminante na fase aquosa. É considerado um parâmetro importante para avaliar a mobilidade dos compostos orgânicos, pois define a hidrofobicidade do composto. O valor de K_{ow} pode ser usado para estimar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos que não interagem eletricamente com a superfície do solo, sendo bastante utilizado na área ambiental (D'AGOSTINHO & FLUES, 2006).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos 16 PAHs estudados:

Composto	Peso Molecular (u.m.a.)	Ponto de Fusão (° C)	Ponto de Ebulição (° C)	Solubilidade em água a 25° C (mg.L ⁻¹)	Coefficiente de partição octanol/ água (log Kow)	Coefficiente de partição octanol/ carbono (Log Koc)
Naftaleno	128,17	80	218	30	3,40	3,11
Acenaftileno	152,20	92	265	3,93	4,07	1,40
Acenafteno	154,21	96	279	3,47	3,92	3,66
Fluoreno	166,22	116	293	1,98	4,18	3,86
Antraceno	178,12	216	340	7x10 ⁻²	4,60	4,15
Fenantreno	178,23	101	340	1,29	4,50	4,15
Pireno	202,26	149	360	1,4x10 ⁻¹	5,18	4,58
Fluoranteno	202,26	111	-	2,6x10 ⁻¹	5,22	4,58
Benzo(a)antraceno	228,29	158	400	1,4x10 ⁻²	5,61	5,30
Criseno	228,29	255	-	2x10 ⁻³	5,91	5,30
Benzo(a)pireno	252,31	179	496	3,8x10 ⁻³	6,50	6,74
Benzo(b)fluoranteno	252,32	167	-	1,2x10 ⁻³	6,12	5,74
Benzo(k)fluoranteno	252,32	217	480	5,5x10 ⁻⁴	6,84	5,74
Benzo(g,h,i)perileno	276,23	222	-	2,6x10 ⁻⁴	7,10	6,20
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	276,23	163	-	6,2x10 ⁻²	6,58	6,20
Dibenzo(a,h)antraceno	278,35	262	-	5,0x10 ⁻³	6,50	6,52

Fonte: IPCS, 1998

A solubilidade em água diminui com o aumento do tamanho da molécula e, com exceção do naftaleno, que é relativamente solúvel (32 mg.L^{-1}), os PAHs têm baixa solubilidade em água. Seus coeficientes de partição entre carbono orgânico e água (Koc) também são elevados e, como resultado, em sistemas aquosos, os PAHs tendem a concentrar-se em sedimentos ou ficam associados à matéria orgânica em suspensão. O Koc, definido como a razão entre a concentração da substância que se encontra dissolvida na parte gordurosa e na parte aquosa da matéria orgânica, é utilizado para avaliar a tendência à solubilidade dos compostos orgânicos em lipídeos e, conseqüentemente, sofrer sedimentação. Quanto maior o Koc, maior será a preferência de acumulação dos poluentes nos sedimentos (VEIGA, 2003).

2.3 Contaminação dos Solos Por PAHs

A contaminação dos solos com PAHs é uma conseqüência típica da atividade antropogênica. Independentemente da atividade industrial, os vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento dos postos de combustíveis, os motores veiculares, as oficinas mecânicas e as garagens de automóveis podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos (LIMA *et al.*, 1998). Como resultado, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos PAHs que, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos (JACQUES *et al.*, 2007b).

Os solos são definidos como sendo a parte desintegrada da camada superficial da crosta terrestre, constituída de material incoerente ou de fraca coerência, como por exemplo, cascalho, areia, silte, argila ou qualquer mistura desses materiais. Em pedologia: material terrestre, alterado por agentes físicos, químicos e biológicos e que serve de base para as raízes das plantas (<http://www.sct.rs.gov.br/redehidro> - acesso em 30/Mai/2007).

Os produtos de petróleo podem ser retidos pelos sólidos do solo, tanto por infiltração e retenção nos poros como por adsorção à superfície das partículas. As propriedades químicas e físicas da parte sólida do solo, incluindo o estado de hidratação, textura e matéria orgânica, controlam o grau de penetração e adsorção dos hidrocarbonetos.

Os solos são matrizes complexas, sistemas dinâmicos nos quais ocorrem inúmeros processos. A composição e características do solo (pH, microorganismos presentes, umidade, etc.) são fatores que influenciam o comportamento de um composto orgânico adicionado a este solo. Suas propriedades mais importantes são: quantidade, tipo e modelo de distribuição de argila. A matéria orgânica é, com a argila, o principal constituinte responsável pela interação com compostos orgânicos. Sua constituição é principalmente de ácidos húmicos e fúlvicos que, devido a grupos funcionais tais como carboxila e hidroxilas fenólicas, facilitam essas interações. As ligações podem ocorrer por covalência, formação de complexos, formação de pontes de hidrogênio ou interações de van der Waals (PICÓ *et al.*, 1994).

2.4 Critérios de Qualidade Ambiental para os PAHs em Solos

No Brasil, somente o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos PAHs. Os valores de referência de qualidade próprios para a avaliação dos graus de poluição do solo e das águas subterrâneas foram definidos após estudos desenvolvidos pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Como resultado, foi publicado, em 2001, a primeira lista de valores orientadores para Solos e Águas Subterrâneas para o Estado de São Paulo, contemplando 37 substâncias e o Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo (CETESB, 2001). Entre os 16 PAHs prioritários, apenas o naftaleno foi contemplado nessa lista.

Em dezembro de 2005, a CETESB publicou no Diário Oficial do Estado a DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005, contendo uma nova lista de valores orientadores, contemplando 84 substâncias, entre elas, 10 PAHS. Também foram definidos três valores orientadores para solo e água subterrânea:

Valor de Referência de Qualidade - VRQ é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea.

Valor de Prevenção - VP é a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea. Este valor indica a qualidade de um solo capaz de sustentar as suas funções primárias, protegendo-se os receptores ecológicos e a qualidade das águas subterrâneas. Foi determinado para o solo com base em ensaios com receptores ecológicos.

Valor de Intervenção - VI é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos à saúde humana, considerando um cenário de exposição genérico. Para o solo, foram estabelecidos cenários de exposição Agrícola-Área de Proteção Máxima - APM_{Max}, Residencial e Industrial.

A área será classificada como Área Contaminada sob Investigação quando houver constatação da presença de contaminantes no solo ou na água subterrânea em concentrações acima dos Valores de Intervenção, indicando a necessidade de ações para resguardar os receptores de risco, devendo seguir os procedimentos de gerenciamento de áreas contaminadas.

Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre PAHs está, nos Estados Unidos, sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA, 2003), e na União Européia, pela Comissão das Comunidades Européias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, a qual é utilizada por alguns órgãos ambientais brasileiros.

2.5 Avaliação de Risco

A remediação dos solos e das águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos envolve altos custos e longos períodos de tempo. Assim, devido a esses altos custos de recuperação, a tomada de decisão sobre as metas de remediação, geralmente é baseada nos resultados das Avaliações de Riscos a Saúde Humana e ao Meio Ambiente. Trata-se de um processo decisório, que fornece o embasamento científico necessário para tomada de decisões que priorizem as áreas a serem remediadas em função do risco admissível para o local (PEDROZO *et al.*, 2002).

O processo da avaliação de risco ambiental (ARA) vem evoluindo desde que foi elaborado, em 1992, pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - USEPA). Entretanto, no Brasil, apenas o Estado de São Paulo possui uma proposta de metodologia de avaliação de risco, em caráter preliminar. Por isso, os órgãos de controle ambiental têm aceitado e recomendado o uso metodologias de outros países como EUA, Canadá, Alemanha e Holanda. (PEDROZO *et al.*, 2002).

O Brasil possui grande diversidade de ecossistemas, que carecem de estudos que dêem suporte ao entendimento da dinâmica e da estrutura dos seus múltiplos

componentes, informação fundamental para a avaliação do risco ecológico. O conhecimento das flutuações na estrutura e função das populações que compõem o conjunto de organismos de um dado ecossistema, em resposta a variações nas concentrações dos contaminantes, possibilita avaliar a relação dos organismos presentes com os contaminantes de interesse e caracterizar sua importância e seus danos potenciais para os ecossistemas aquáticos e terrestres (WALKER *et al.*, 2001).

A avaliação de risco ambiental envolve três etapas em um processo contínuo:

1. Identificação do problema;
2. Análise da exposição e dos efeitos toxicológicos;
3. Caracterização do risco.

Inicialmente, são identificados e quantificados os contaminantes presentes no ambiente, ou ao menos sua ordem de grandeza. Essa caracterização deve ser acompanhada de uma descrição das formas específicas de toxicidade dos contaminantes e dos meios de contaminação envolvidos (HACON, 2003).

A avaliação da relação dose-resposta é o processo de caracterização da relação entre a dose administrada ou recebida de uma ou mais substâncias e a incidência de um dado efeito deletério significativo no ambiente ou numa população exposta a essas substâncias (USEPA, 1989b). A magnitude da exposição é determinada pela medida ou estimativa de um agente químico disponível no meio (ar, água ou solo) e por sua capacidade de incorporação num organismo durante período específico. Uma vez definidos os receptores expostos aos agentes químicos, é determinada a frequência e a duração da exposição, que podem estar associadas à sazonalidade da região, ao ciclo reprodutivo, dentre outros (HACON, 2003).

A caracterização do risco é a etapa final do processo analítico. Nela, as etapas anteriores são integradas e apresentadas de forma sintetizada em termos de risco qualitativo (avaliação da toxicidade da substância) e quantitativo (resultados da avaliação da exposição) para qualquer perigo associado ao agente de interesse liberado no sistema ambiental (HACON, 2003). A partir dessa caracterização, é possível propor ações de remediação ou preventivas, considerando a ocorrência da exposição e os efeitos atuais e futuros.

2.6 Envelhecimento dos PAHs nos Solos

Quando um PAH entra no solo, fica sujeito a uma série de processos que determinam seu destino no meio ambiente. Parte pode ser perdida por processos de degradação, lixiviação, transformação química, fotólise, volatilização, incorporação em planta e animais e sorção na fase sólida do solo (MACLEOD *et al.*, 2001; SEMPLE *et al.*, 2001; MALISZEWSKA-KORDYBACH, 2005). Entretanto, com o tempo de contato, as associações entre os contaminantes e as frações do solo ficam mais fortes, num processo denominado de envelhecimento, descrito por ALEXANDER, em 1995.

A partir da aplicação inicial ao solo, a maioria dos compostos orgânicos apresenta uma perda inicial rápida das frações facilmente extraíveis ou biodisponíveis. Com o aumento do tempo de contato, a taxa de perda diminui, produzindo uma curva bifásica. Essa fração que permanece no solo, pode ser dividida em 2 porções: a fortemente ligada ou recalcitrante, que não está prontamente biodisponível, mas pode ser extraída por solventes orgânicos e a fração ligada irreversivelmente, ou não extraível (REID *et al.* 2000a; MACLEOD *et al.*, 2001; SEMPLE *et al.* 2001). A estabilidade da fração recalcitrante é muito importante para a avaliação da toxicidade do composto no solo.

ALEXANDER (2000) e MACLEOD *et al.* (2001) propuseram que o risco de envenenamento por contaminantes orgânicos, bem como a biodisponibilidade, diminuem com o tempo. O envelhecimento é uma consequência do seqüestro dos compostos orgânicos pela matriz do solo, que é sorvido pelos constituintes do solo ou aprisionados nos micro poros, ficando assim inacessíveis para a biota (ALEXANDER 2000; REID *et al.*, 2000a). Apesar de também ocorrer sorção nos componentes minerais e não iônicos (BALL & ROBERTS 1991a, b), acredita-se que a sorção na matéria orgânica do solo é o processo dominante (HATZINGER & ALEXANDER 1997; NAM *et al.*, 1998; ALEXANDER, 2000), cujos mecanismos envolvidos ainda não estão bem esclarecidos (STOKES *et al.*, 2006). As interações entre o solo e os HOCs são influenciadas pela quantidade e natureza da matéria orgânica do solo, pelos constituintes inorgânicos, em particular o tamanho e estrutura de poro, pela atividade microbiana e pela concentração do contaminante (HATZINGER & ALEXANDER, 1995; NAM & ALEXANDER, 1998; GUTHRIE & PFAENDER, 1998). Os principais mecanismos envolvidos no envelhecimento são a adsorção e a difusão (coletivamente chamados de seqüestro), que são interações entre o contaminante e a fração sólida do solo, (fração mineral e orgânica) (XING & PIGNATELLO, 1997; SCHLEBAUM *et al.*, 1998). Esses

mecanismos, juntamente com as características físico-químicas do contaminante, determinam o seu envelhecimento nos solos (ALEXANDER, 2000).

2.7 Sorção de PAHs no Solo

Como poluente dos solos, os PAHs são considerados persistentes devido à sorção. Isso significa que eles migram para o solo, mas não formam ligações covalentes com o material. A acumulação na matéria orgânica é mais uma consequência da sua baixa reatividade, volatilidade e solubilidade na água do que das ligações químicas (JONKER & SMEDES, 2000; CORNELISSEN *et al.*, 2005).

A sorção no solo é considerada como um processo de equilíbrio, não sendo, necessariamente, permanente. O movimento molecular e microscópico aleatório persiste, mas não causa transporte de massa líquida, no estado de equilíbrio. O limite e a tendência para a dessorção dos PAHs nos solos influencia o destino da poluição e restringe sua exposição aos organismos, ambientes e ecossistemas presentes nas vizinhanças (REICHENBERG & MAYER, 2006).

A sorção hidrofóbica é um mecanismo de retenção de compostos orgânicos na matéria orgânica do solo. Caracteriza-se pelo processo de distribuição do composto entre duas fases (solução do solo/matéria orgânica do solo) por diferença de solubilidade. A matéria orgânica atua como meio solubilizante e concentrador para as substâncias orgânicas dissolvidas na água, de forma semelhante a um solvente orgânico (YONG *et al.*, 1992).

A tendência de um composto ser particionado na fase orgânica a partir da água é maior quanto menor for sua polaridade (YONG *et al.*, 1992). Devido à sorção das substâncias orgânicas ocorrerem principalmente na fase orgânica, o transporte no solo é controlado pelo teor de matéria orgânica. No caso de solos não saturados, secos ou com baixo teor de matéria orgânica, a fração argila e o óxido de ferro livre passam a ter importância (BORGES, 1996).

Uma vez que a composição da fase sólida do solo determina a sua capacidade de sorção de PAHs, é de se esperar que solos com diferentes em teores de matéria orgânica e composição mineralógica apresentem diferentes capacidades de sorção e de biodisponibilidade desses compostos aos organismos do solo. Nesse contexto, CARMICHAEL & PFAENDER (1997) observaram que quanto maior o conteúdo de C orgânico, menor foi a mineralização e a dessorção do fenantreno do solo. NAM *et al.*

(1998) avaliaram a mineralização do antraceno em seis solos e demonstraram que houve maior sorção desse PAH nos solos com carbono orgânico maior que 20 g.kg⁻¹ e, conseqüentemente, menor mineralização. Esses resultados indicaram que a sorção dos PAHs no solo influencia a biodisponibilidade desses compostos à microbiota degradadora e, conseqüentemente, a sua eliminação do ambiente.

2.7.1 Modelos de Sorção de PAHs nos Solos

A adsorção pode ser avaliada quantitativamente por meio das isotermas. No procedimento experimental, coloca-se em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido com diferentes massas de adsorvente até se atingir o equilíbrio. Após a separação, pode-se obter a concentração de equilíbrio em solução (C_{eq}, em mg.L⁻¹) e a quantidade de material adsorvido (q, em mg.g⁻¹). Os gráficos assim obtidos são as isotermas e podem apresentar-se de várias formas, fornecendo informações importantes sobre o mecanismo de adsorção. Elas mostram a relação de equilíbrio entre a fase fluida e as partículas adsorventes, em uma determinada temperatura. (GILES *et al.*, 1974).

A principal variável obtida da construção das isotermas corresponde à captação, simbolizada pela letra “q”, que expressa a quantidade do composto adsorvido por massa unitária de adsorvente; esta variável é calculada utilizando-se a Equação 1:

$$q = \frac{V \times (C_i - C_f)}{m} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

q: Captação do composto (g do adsorbato.g do adsorvente⁻¹)

C_i: Concentração inicial do composto (mg.L⁻¹)

C_{eq}: Concentração do composto no equilíbrio (mg.L⁻¹)

V: Volume da solução (L)

M: Massa do adsorvente (g)

As isotermas de adsorção refletem um processo em que o composto ligado ao adsorvente se encontra num estado de equilíbrio com suas espécies que ainda estão em solução. Uma vez atingido o equilíbrio, o sistema de sorção permanece teoricamente em estado estável, com certa quantidade de espécies ligadas e imobilizadas na fase sólida, enquanto que a outra porção se encontra dissolvida na solução (VOLESKY, 2003).

Traçando-se as isotermas, a concentração inicial do adsorbato não possui um papel importante na caracterização do equilíbrio, pois é a concentração final que influi diretamente sobre ele. Além disso, o tempo de contato entre as duas espécies deve ser tal que os resultados obtidos mediante a experimentação permitam atingir o equilíbrio com facilidade (VOLESKY, 2003).

As equações que são freqüentemente usadas para ajustar os dados de isotermas de sorção e que consideram sistemas de apenas um soluto foram desenvolvidas por Langmuir e Freundlich (VOLESKY, 2003).

Isoterma de Langmuir

Em 1916, o modelo de Langmuir foi desenvolvido para representar a sorção química de gases e vapores em sítios distintos de adsorção contidos em sólidos. Entretanto, esse modelo vem sendo empregado para descrever a sorção de solutos contidos em soluções líquidas. A expressão da isoterma de Langmuir é apresentada na Equação 2:

$$q = \frac{q_{\max} \times k \times C_{eq}}{1 + k \times C_{eq}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

k: Constante relacionada com a energia de adsorção/dessorção ($L \cdot mg \text{ adsorbato}^{-1}$).

q: Captação das espécies ($mg \text{ de adsorbato} \cdot g \text{ de adsorvente}^{-1}$).

q max: Captação máxima na completa saturação da superfície, ($mg \text{ de adsorbato} \cdot g \text{ de adsorvente}^{-1}$).

Ceq: Concentração final de soluto no equilíbrio ($mg \cdot L^{-1}$).

A Equação 2 pode ser rearranjada, obtendo-se assim a seguinte forma linearizada, representada pela Equação 3:

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{q_{\max} \times k} + \frac{1}{q_{\max}} \quad \text{Equação 3}$$

Com a Equação 3 se obtêm os parâmetros de Langmuir qmax e K pelos coeficientes angular e linear da reta, respectivamente.

Isoterma de Freundlich

Em 1906, Freundlich propôs uma equação puramente empírica para expressar a adsorção de gases em superfícies sólidas. Este modelo considera a existência de uma

estrutura em multicamadas, e não prevê a saturação da superfície pelo processo de adsorção (VOLESKY, 2003).

A isoterma de Freundlich corresponde a uma distribuição exponencial de vários sítios de adsorção com energias diferentes, ou seja, considera a adsorção em multicamadas e é útil para descrever a adsorção em superfícies altamente heterogêneas (FRITZ & SCHLUNDER, 1981). Além disso, no gráfico, perto da origem, ou seja, para baixas concentrações finais (C_{eq}), não existe linearidade e a curva permanece de forma assintótica ao eixo da concentração. A Equação 4 descreve o modelo de Freundlich:

$$q = K_F \times C_e^n \quad \text{Equação 4}$$

Onde K_F e n são os parâmetros empíricos de Freundlich.

O expoente n representa adsorção favorável quando apresenta valor inferior a 1, indicando a tendência do soluto em migrar para o sólido. A Equação 4 pode ser linearizada, de maneira que os parâmetros de Freundlich possam ser determinados pelos coeficientes angular e linear da reta (Equação 5):

$$\log q = \log K_F + n \log C_{eq} \quad \text{Equação 5}$$

O comportamento de sorção e de mobilidade dos PAHs no solo pode ser avaliado pelos seguintes parâmetros:

- ✓ Coeficientes de distribuição ou de partição entre solo-água (K_d)
- ✓ Coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo (K_{oc})
- ✓ Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow})

O K_d ($L.kg^{-1}$) é calculado pela Equação 6. É uma importante ferramenta na estimativa do potencial de adsorção do contaminante dissolvido em contato com o solo. Quanto maior o K_d , maior a tendência do contaminante ficar adsorvido ao solo ou sedimento (CETESB, 2001).

$$K_d = \frac{S}{C} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

S: massa do contaminante por volume unitário de sólido seco ($mg.kg^{-1}$)

C: massa do contaminante por volume unitário de líquido ($mg.L^{-1}$).

Devido à importância do carbono orgânico presente no solo na sorção e distribuição de compostos orgânicos, o K_d é geralmente expresso por K_{oc} , de acordo com a Equação 7.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

f_{oc} : fração de carbono orgânico (kg substância orgânica. kg solo seco⁻¹).

O valor de K_{ow} , calculado de acordo com a Equação 8, pode ser usado para estimar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos que não interagem eletricamente com a superfície do solo e para a previsão de outros parâmetros, como K_{oc} , quando este não se encontra disponível na literatura (KEHEW, 2001).

$$K_{ow} = \frac{\text{Concentração do composto químico em octanol}}{\text{Concentração do composto químico em água}} \quad \text{Equação 8}$$

O K_{oc} está fortemente correlacionado com K_{ow} numa relação linear, expressa pela Equação 9:

$$\log K_{oc} = a \log K_{ow} + b \quad \text{Equação 9}$$

Onde a e b são coeficientes relacionados com os compostos e tipo de matéria orgânica sobre o solo.

Assim, podemos afirmar que K_d , K_{oc} e K_{ow} são de fundamental importância para a previsão da mobilidade dos PAHs. Portanto, quanto maior o conhecimento desses coeficientes e suas interações com o solo, melhor o entendimento da mobilidade de compostos hidrofóbicos como os PAHs no meio ambiente.

2.8 Biodisponibilidade e Bioacessibilidade dos PAHs nos Solos

O termo biodisponibilidade vem sendo usado nas várias áreas científicas que estudam as interações entre as células vivas e os compostos químicos. Suas definições na literatura variam em detalhe e complexidade, levando a confusões e inconsistências (SEMPLE *et al.*, 2007), o que pode ser confirmado pelo histórico das definições de biodisponibilidade encontradas na literatura:

SPACIE & HAMELINK (1995): “Porção da quantidade ou concentração total de um composto químico no ambiente que está potencialmente disponível para a ação biológica”.

BOSMA *et al.* (1997): definiram o número da biodisponibilidade (Bn) como a capacidade de um organismo ou uma população do ambiente em transformar um composto químico.

HERRCHEN *et al.* (1997): “a quantidade de composto absorvida por um organismo como resultado de um equilíbrio dinâmico dos processos de ligação com os organismos e com as partículas de solo, em relação às condições ambientais”.

WARRINGTON & SKOGLEY (1997): a quantidade de composto químico no solo presente nas formas em que os organismos vivos consigam absorver durante um período de tempo.

GARY *et al.* (1999) - “o fluxo do contaminante para a biota”;

SHOR & KOSSON (2000): “taxa na qual um composto químico pode ser transportado para a população biológica”.

REICHENBERG & MAYER (2006): “é composta pelo que está acessível para os seres vivos e pela atividade química do contaminante”.

ISO/FDIS 17402 (2007): “o grau no qual um composto químico presente no solo pode ser absorvido ou metabolizado por seres humanos ou receptores ecológicos ou que esteja disponível para interações com sistemas biológicos”

É interessante notar que, justamente em razão da falta de consistência e aplicabilidade de uma definição clara, em 2003, EHLERS & LUTHY resumiram um relatório do U.S. National Research Council (NRC, 2002) e evitaram qualquer uso do termo “biodisponibilidade”. Os autores utilizaram “processo de biodisponibilidade”, que definiram como: “as interações químicas, físicas e biológicas que determinam a exposição de um organismo a compostos químicos associados a solos e sedimentos”. Posteriormente, SEMPLE *et al.* (2004) notaram que a biodisponibilidade representava “a quantidade máxima de um contaminante disponível para a utilização por um organismo em um dado período de tempo”. É esse o conceito que, atualmente, descreve as duas frações distintas: a biodisponível e a bioacessível. Os autores utilizaram a rota etimológica para distinguir os dois termos, definindo:

Biodisponível como “aquele contaminante que está livremente disponível para atravessar a membrana (celular) de um organismo, no meio em que este organismo vive, em um dado tempo e,

Bioacessível como “aquele contaminante que está disponível para atravessar a membrana (celular) de um organismo no ambiente em que esse organismo vive, se o organismo tiver acesso a ele; entretanto, ele pode ser tanto fisicamente removido pelo organismo ou ficar biodisponível por apenas um período de tempo”.

Assim, a bioacessibilidade engloba o que está biodisponível, em um dado momento, mais o que é potencialmente bioacessível.

2.8.1 Métodos para Determinação da Biodisponibilidade e Bioacessibilidade de PAHs nos Solos

A única medida direta da biodisponibilidade é o uso de organismos alvo, levando a uma definição operacional de biodisponibilidade como a absorção (resultando na acumulação ou em um efeito) de um composto por um organismo específico, durante um período de tempo definido, a partir de uma unidade de massa de solo (HARMSSEN *et al.*, 2005). Nos últimos anos, uma quantidade considerável de estudos vem se dedicando a desenvolver métodos que meçam realisticamente a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos no solo. Para tal, tanto os testes biológicos quanto os químicos são usados (REID *et al.*, 2000a, 2000b; SEMPLE *et al.*, 2003; LANNO *et al.*, 2004; HARMSSEN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; DOICK *et al.*, 2006; BERGKNUT *et al.*, 2007; STROUD *et al.*, 2009), apesar de ainda não ter-se conseguido a padronização dos procedimentos.

Os métodos biológicos são, freqüentemente, imprecisos, lentos e onerosos, resultando em um esforço ainda maior para se desenvolver técnicas químicas mais precisas. Os testes químicos parecem estimar a fração bioacessível melhor que a biodisponível, de acordo com as definições de SEMPLE *et al.* (2004). Entretanto, esses métodos devem ser considerados como uma ferramenta que fornece uma indicação da biodisponibilidade para um organismo alvo. Assim, devem estar fortemente correlacionados com os ensaios biológicos e medidas de campo.

A maior parte dos estudos nesse campo de investigação vem tentando demonstrar a ligação entre a biodisponibilidade e a biodegradação dos contaminantes orgânicos por microrganismos (WANG *et al.*, 2005; DOICK *et al.*, 2006; BERGKNUT *et al.*, 2007; STROUD *et al.*, 2009). Por um lado, os estudiosos estão interessados em prever o potencial de biodegradação e, por outro, a concentração. Pelas definições acima, se torna aparente que um composto biodisponível (quimicamente ativo no caminho de

organismos degradadores) é um bom indicador da taxa potencial de biodegradação, enquanto que um composto bioacessível (composto químico que pode estar inativo, mas é potencialmente utilizável) é um indicador muito melhor (SEMPLE *et al.*, 2007).

As metodologias de extração que vêm sendo desenvolvidas para se avaliar a biodisponibilidade de contaminantes ligados aos solos estão apresentadas no Quadro 3. A maior parte dos trabalhos foca a avaliação de métodos de extração não exaustivos, como alcoóis primários, hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), surfactantes e extração com fluidos supercríticos. Além disso, métodos alternativos também vêm sendo desenvolvidos, como a dessorção utilizando polímeros porosos (resina XAD, Tenax TA) e a oxidação com persulfato.

As implicações da biodisponibilidade e bioacessibilidade na avaliação de risco e na biorremediação de solos contaminados são imediatamente aparentes, mesmo não representando a concentração total no solo. A distinção entre eles pode ser útil para explicar por que alguns protocolos de extração oferecem maior potencial para a medida de biodisponibilidade ou bioacessibilidade que outros. É importante entender que a fração de um composto químico que está sendo removida durante uma extração e a comparação das frações e mecanismos de ação dos processos microbianos pode ser a chave para a determinação da bioacessibilidade (SEMPLE *et al.*, 2007).

A extratibilidade química dos PAHs no solo compreende três domínios de dessorção: o rápido, o lento e o muito lento. Várias explicações para essa liberação múltipla vêm sendo abordadas em artigos e revisões (SEMPLE *et al.*, 2007; JUHASZ, 2008; NAIDU *et al.*, 2008). De modo simplista, a fração de dessorção rápida pode ser vista como a fração do contaminante dissolvida no meio mais a fração sorvida na superfície das partículas de solo (tanto nos componentes minerais quanto nos orgânicos). Essa última fração é caracterizada por associações químicas fracas (e.g. Van der Waals, dipolo-dipolo, dipolo-induzida, pontes de hidrogênio) e é intercambiável com os poros de água (nem sempre em equilíbrio). A fração lenta pode ser atribuída às ligações mais fortes, mas ainda reversíveis ou às liberações dos locais mais no interior (remotos) por difusão (intra-partícula e/ou intra-matéria orgânica) (CORNELISSEN *et al.*, 1997a,b). Já a fração muito lenta, provavelmente, inclui os compostos bem envelhecidos e bem seqüestrados, cuja liberação é controlada termodinamicamente e cineticamente. A fração (possivelmente) não-dessorvível e não-extraível também existe

e compreende as ligações eletrostáticas e covalentes do composto, bem como as moléculas que ficam presas fisicamente ao solo (SEMPLE *et al.*, 2007).

As técnicas de extração que vêm sendo empregadas para a avaliação da biodisponibilidade e bioacessibilidade compreendem métodos exaustivos e não-exaustivos. Os métodos exaustivos oferecem uma recuperação quantitativa e a precisão necessária para a padronização dos protocolos analíticos, mas superestimam a bioacessibilidade em laboratório e no campo (KELSEY *et al.*, 1997; REID *et al.*, 2000). As extrações não-exaustivas removem apenas as frações dissolvidas e de dessorção rápida e lenta e um pouco da fração muito lenta, e podem ter um maior significado na avaliação da bioacessibilidade (SEMPLE *et al.*, 2007).

Com isso, questiona-se se a técnica que extrai apenas as frações de dessorção rápida e lenta realmente indica a fração bioacessível, cuja medida pode também ser toxicologicamente relevante. Diferentemente do processo consumidor da biodegradação, que se baseia na biodisponibilidade do composto, a bioacumulação depende muito da sua bioacessibilidade (SEMPLE *et al.*, 2007).

Assim, pode ser razoável concluir que as medidas das frações bioacessíveis ou biodisponíveis dependem da perspectiva do estudo (avaliação de risco ou biorremediação). Entretanto, na prática, a biodisponibilidade é efêmera e difícil de ser medida, porque é influenciada pelas taxas do momento (dissolução, dessorção e difusão) e de absorção (degradação), enquanto que a fração bioacessível pode ser definida e quantificada, representando um alvo mais promissor e prioritário para o desenvolvimento das abordagens relacionadas com a contaminação dos solos por compostos orgânicos (SEMPLE *et al.*, 2007).

Quadro 3: Métodos usados na avaliação da biodisponibilidade de PAHs.

Ensaio de biodisponibilidade	Método	Comentários	Referências
Extração não exaustiva Co-solventes	Solos extraídos com álcoois primários de baixo peso molecular (metanol, etanol, propanol, butanol), acetona ou tolueno ou soluções diluídas dos solventes acima.	Boa correlação entre os PAHs biodegradáveis e a biodisponibilidade em solos contaminados com PAHs de baixo peso molecular (3 anéis). Sub e super estimam a biodisponibilidade de PAHs em solos.	KELSEY <i>et al.</i> (1997), CHUNG & ALEXANDER (1998; 1999), BREEDVELD & KARLSEN (2000), MACLEOD & SEMPLE (2000), REID <i>et al.</i> (2000), NORTHCOTT & JONES (2001), LISTE & ALEXANDER (2002), MACLEOD & SEMPLE (2003), REID <i>et al.</i> (2004), OLESZCZUK & BARAN (2004), JUHASZ <i>et al.</i> (2005).
Surfactantes	Triton X-100, Genapol UDD88 e Synperonic LF/RA30	Triton X-100 superestimou a fração de PAH biodisponível. Boa correlação entre a biodegradação e a biodisponibilidade de PAHs para Genapol UDD88 e Synperonic LF/RA30	CUYPERS <i>et al.</i> (2002), THIELE-BRUHN & BRUMMER (2004)
Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD)	Os solos são extraídos com solução de HPCD por 20 horas numa relação solo:solução de 1:20	Boa correlação entre a biodegradação de a biodisponibilidade para PAHs com 3 e 4 anéis. Super estima a biodisponibilidade para PAHs de 5 e 6 anéis.	CUYPERS <i>et al.</i> (2002), REID <i>et al.</i> (2000; 2004), JUHASZ <i>et al.</i> (2005)
Extração com fluidos super críticos	Os solos são extraídos com CO ₂ a 200 bar, 50°C por mais de 200 min.	Boa correlação entre a biodegradação de a biodisponibilidade para PAHs de baixo peso molecular (≤ 3 anéis). Super estima a biodisponibilidade para PAHs de alto peso molecular (≥ 4 anéis).	HAWTHORN & GRABANSKI (2000), HAWTHORN <i>et al.</i> (2001; 2002), SZOLAR <i>et al.</i> (2004)
Oxidação com persulfato	Adição de persulfato de potássio numa relação de persulfato para matéria orgânica de 12 g g ⁻¹ equivalente a 35,7mg L ⁻¹ de persulfato.	Boa correlação entre a biodegradação e a biodisponibilidade para PAHs com 3 e 4 anéis. Super estima a biodisponibilidade para PAHs de 5 e 6 anéis.	CUYPERS <i>et al.</i> (2000; 2001), JUHASZ <i>et al.</i> (2005)
Dessorção em fase aquosa	Experimentos de dessorção realizados com polímeros tipo Tenax TA, Amberlita XAD-2, resina de troca catiônica Amberlita ácido carboxílico, resina poliacrílica (SM7) ou resina divinil benzeno (SM2).	Boa correlação entre a biodegradação de a biodisponibilidade para PAHs com 3 e 4 anéis. Super estima a biodisponibilidade para PAHs de 5 e 6 anéis.	CARMICHAEL <i>et al.</i> (1997), CORNELISSEN <i>et al.</i> (1998), GROSSER <i>et al.</i> (2000), CUYPERS <i>et al.</i> (2001), LEI <i>et al.</i> (2004), HUESEMANN <i>et al.</i> (2004), BRAIDA <i>et al.</i> (2004)

Fonte: Adaptado de JUHASZ, 2008

Extração com álcoois primários de baixo peso molecular

A estimativa da fração biodisponível de PAHs ligados do solo usando álcoois primários se baseia no poder de co-solvência do álcool, que pode ser o etanol, propanol ou butanol. A fração recuperável do PAHs é determinada no extrato alcoólico (fração dessorvível ou biodisponível).

KELSEY *et al.* (1997) e LISTE & ALEXANDER (2002) obtiveram boa relação entre a dessorção do PAH, usando butanol, e a biodisponibilidade em solos envelhecidos contendo apenas um PAH. MACLEOD & SEMPLE (2003) usaram solos contaminados com pireno e a extração com butanol super estimou a sua biodisponibilidade, quando comparada com a mineralização bacteriana, medida num período de 24 semanas.

A predição da biodisponibilidade de PAHs em solos foi avaliada por BREEDVELD & KARLSEN (2000) utilizando medidas de biodegradabilidade e vários métodos de dessorção. A extração com butanol forneceu uma boa estimativa qualitativa para a fração potencialmente biodegradável dos PAHs, mas quantitativamente ela foi superestimada, dependendo do tipo de solo. Em solo com alto teor de carbono orgânico (16,6%), a biodisponibilidade foi subestimada para PAHs com 3 e 5/6 anéis em 52 e 36%, respectivamente, enquanto em solos com baixo teor de carbono orgânico (4,2%), a biodegradabilidade foi superestimada em mais de 300%.

JUHASZ *et al.* (2005) observaram pouca correlação entre a extração de PAHs com butanol ou propanol em solos contaminados e envelhecidos com creosoto. Aumentando o tamanho da cadeia de carbono do co-solvente e a sua percentagem resultou num aumento na quantidade de PAHs dessorvido do solo, mas a correlação entre a biodisponibilidade e a biodegradabilidade dos PAHs foi pequena neste estudo. A biodisponibilidade dos PAHs de baixo peso molecular foi subestimada enquanto que para os de alto peso molecular, foi superestimada.

Os estudos acima exemplificam a variação nos resultados presentes na literatura em relação à biodisponibilidade de solos contaminados e álcoois primários de baixo peso molecular. O tempo de contaminação e de envelhecimento sob condições de laboratório pode não ser longo o suficiente para refletir as verdadeiras condições de campo. Além disso, a biodisponibilidade do contaminante pode ser influenciada pela presença de co-contaminantes, que pode não refletir nos estudos com solos contaminados com um único componente.

Extração com hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos utilizados como agentes complexantes, principalmente na indústria farmacêutica, para aumentar a solubilidade aquosa de drogas pouco solúveis em água e sua biodisponibilidade e estabilidade. As ciclodextrinas são moléculas química e fisicamente estáveis, formadas pela modificação enzimática do amido, e consistem de seis, sete ou oito monômeros de glicose em anéis que são denominados alfa, beta ou gama ciclodextrina, respectivamente. O acoplamento específico dos monômeros de glicose dá a molécula de ciclodextrina uma estrutura molecular cônica e rígida, com cavidade hidrofóbica no interior. Essa cavidade confere à ciclodextrina a capacidade de complexar e conter uma variedade de moléculas (compostos aromáticos, álcoois, halidas, ácidos graxos, éster e outras). O complexo entre as ciclodextrinas e uma grande variedade de compostos orgânicos ajuda a alterar a solubilidade da molécula, aumentar a estabilidade do composto na presença da luz, de aquecimento e de condições oxidantes, além de diminuir a volatilidade do composto. As ciclodextrinas também podem ser usadas como auxiliar para isolar compostos de fontes naturais ou remover compostos indesejados como o colesterol de produtos alimentícios.

As principais aplicações das ciclodextrinas são nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos para proteção do ingrediente ativo contra oxidação, fotodegradação, decomposição, perda por evaporação e sublimação, eliminação ou redução de sabor ou odor indesejado, de contaminações microbiológicas e higroscopicidade. As ciclodextrinas também são utilizadas como aditivo na água de lavagem de solos para facilitar o processo de dessorção dos PAHs. A principal vantagem da sua utilização é sua não toxicidade e a biodegradabilidade (STOKES *et al.*, 2005).

REID *et al.* (2000) propuseram o uso da técnica de extração em solução aquosa usando hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD) para estimar a fração biodisponível de PAHs no solo. Esse método foi testado em relação à atividade catabólica de uma *Pseudomonas* sp., em solos contaminados com fenantreno. A biodisponibilidade foi avaliada usando a extração com HPCD e butanol e a mineralização do fenantreno. A extração com HPCD apresentou boa correlação com a mineralização do fenantreno (inclinação 0,977; intercepto 0,162; $R^2 = 0,964$), mas o butanol superestimou a biodisponibilidade do fenantreno em 60%.

Desde então, a utilização do HPCD para a predição da degradação microbiana de contaminantes orgânicos vem sendo investigada em solos e sedimentos contaminados. Esses estudos mostram uma diminuição na extratibilidade pelo HPCD e na degradação microbiana com o envelhecimento, indicando que essa técnica de extração pode prever qual a quantidade do contaminante orgânico pode ser degradado (REID *et al.*, 2000; CUYPERS *et al.*, 2001; 2002; DEW *et al.*, 2005; ALLAN *et al.*, 2006; DOICK *et al.*, 2006).

CUYPERS *et al.* (2001) mostraram que a extração de PAHs de solos com a HPCD se aproximou da biodegradabilidade para PAHs de baixo peso molecular, mas não para os de alto peso molecular. CUYPERS *et al.* (2002) usaram a extração com HPCD para estimar a fração biodisponível de PAHs em sedimentos e solos. Os autores mostraram que o HPCD extraiu e acelerou a dessorção dos PAHs prontamente biodisponíveis dos sedimentos, sem aumentar o tamanho da fração total ou induzir o co-metabolismo, refletindo um modo de ação similar ao da biodegradação, mas sem aumentar o tamanho da fração bioacessível. A biodegradação foi maior para os compostos de três anéis e diminuiu progressivamente com o aumento do peso molecular do PAH. A comparação entre a concentração residual de PAH após a biodegradação e a extração com HPCD mostrou que a biodegradação podia ser predita para compostos com 3 e 4 anéis. Acima desse número ela foi superestimada.

Resultados semelhantes foram obtidos por JUHASZ *et al.* (2005), quando a avaliação da biodisponibilidade foi feita em paralelo com os experimentos de biodegradação em solo contaminado com creosoto. A extração por HPCD foi capaz de prever a biodisponibilidade para PAHs contendo 3 e 4 anéis aromáticos, enquanto foi superestimada para os com 5 anéis.

A extratibilidade pelo HPCD foi comparada com a biodegradação em solos contaminados com PAHs por STOKES *et al.* (2005). Em solos incubados por 6 semanas, os autores observaram que a redução da concentração de 16 PAHs se correlacionava com a extratibilidade por HPCD ($R^2 > 0,98$), sugerindo que o HPCD pode mimetizar os processos controlados pela biodegradação, representando uma medida direta da disponibilidade microbiana para os PAHs.

Extração com Surfactantes

A extração utilizando surfactantes, como o Triton X-100, foi testada quanto sua capacidade de prever a biodisponibilidade de PAHs, por CUYPERS *et al.* em 2002.

Os autores estimaram a biodisponibilidade de PAHs em sedimentos contaminados, relacionando a extração com Triton X-100, HPCD, Tenax TA e a biodegradação. Os estudos mostraram que doses de Triton X-100 acima de 240 vezes o CMC resultou no aumento na extração dos PAHs. A concentração ótima para a extração foi de 155-190 vezes a CMC, dependendo do sedimento usado. A extração com Triton X-100 foi rápida e a concentração residual menor, quando comparada com a extração com HPCD e Tenax. A extração de PAHs dos sedimentos com Triton X-100 foi bifásica, com uma fase inicial de extração rápida, seguida por uma fase relativamente lenta. Quando comparada com os ensaios de biodegradação, a extração superestimou a fração biodegradável, o que foi atribuída à sua capacidade de extrair tanto as frações de PAHs disponíveis quanto as pouco disponíveis. Enquanto a extração de PAHs de sedimentos contaminados usando o Triton X-100 não foi um bom indicador de biodisponibilidade, a extração com HPCD apresentou boa correlação com os resultados de biodegradação.

Estudo similar foi realizado por THIELE-BRUHN & BRUMMER (2004), utilizando dois surfactantes não iônicos, Genapol UDD 88 e Synperonic LF/RA 30, em solos contaminados com PAHs e os resultados foram comparados com a biodegradação. A cinética de extração lembrou a cinética da biodegradação. Apesar da boa correlação entre o total extraído pelos surfactantes e a concentração de PAHs degradáveis, o coeficiente de correlação variou para os PAHs com baixo e com alto peso molecular. Conseqüentemente, foi proposto que os PAHs devem ser separados em grupos, de acordo com o seu grau de condensação, antes de se relacionar sua extratibilidade com surfactantes e a biodegradabilidade. Os autores concluíram que a fração de PAHs extraídos por surfactantes caracterizavam as frações móveis e mobilizáveis nos solos, sendo que a extração não exaustiva com surfactantes era uma metodologia adequada para estimar a fração de PAH degradável pela biorremediação.

Extração com fluidos supercríticos

A extração com fluidos supercríticos, como o CO₂, também vem sendo utilizado para estimar a biodisponibilidade de PAHs para a biodegradação, devido à similaridade da sua polaridade com a dos lipídeos (HAWTHORN & GRABANSKI, 2000; HAWTHORN *et al.*, 2001, 2002).

HAWTHORN *et al.* (2001) propuseram a extração com fluidos supercríticos para estimar as frações prontamente dessorvíveis de PAHs. As extrações foram realizadas com o CO₂ e a resina XAD-2 (por mais de 120 dias). Os resultados foram comparados

com a biorremediação (mais de 343 dias). Apesar da diferença entre os tempos para a estimativa do PAH biodisponível, os perfis de dessorção de PAH foram similares entre o CO₂ supercrítico e XAD-2. Ambos os métodos mostraram uma diminuição na biodisponibilidade com o aumento do peso molecular do PAH e com o tempo de tratamento do solo. Quando comparado aos dados de biodegradação, ambas as metodologias forneceram uma boa predição para a remoção do PAH, principalmente para os de baixo peso molecular. Para os PAHs de quatro anéis, ambos os métodos superestimaram a liberação. Os coeficientes de correlação entre a extração e a biodegradação foram de 0,67 e 0,80 para o XAD-2 e CO₂ supercrítico, respectivamente. Os autores concluíram, entretanto, que seria necessária a otimização do método para obter-se a estimativa da fração biodisponível. Posteriormente, HAWTHORN *et al.* (2002) determinaram que a taxa de liberação de PAH usando a extração com CO₂ supercrítico não se correlacionava com as características dos solos, como composição de C, N ou de carbono orgânico, indicando que o PAH biodisponível não pode ser estimado com base na composição da matriz.

Oxidação com Persulfato

A oxidação por persulfato vem sendo empregada para avaliar a biodisponibilidade de PAHs em solos e sedimentos contaminados. Quando o persulfato é aquecido, radicais sulfato atacam a matéria orgânica do solo, disponibilizando os PAHs (WEBER *et al.*, 1992; YOUNG & WEBER, 1995). Como resultado, a quantidade de PAHs que permanecem ligados ao solo, após a oxidação, pode ser medida como não disponíveis ou fração não degradável.

CUYPERS *et al.* (2000) utilizaram o método de oxidação por persulfato para estimar a fração biodisponível em 14 solos e sedimentos contaminados. A remoção dos PAHs apresentou boa correlação com a biodegradação para os PAHs com 2, 3 e 4 anéis. Entretanto, para os PAHs com 5 e 6 anéis, o potencial de biodegradação foi super estimado.

Testes de Dessorção em Água

Outra metodologia que vem recebendo atenção para a avaliação da biodisponibilidade de PAH são testes de dessorção em meio aquoso, utilizando polímeros porosos como o Tenax-TA (óxido 2,6-difenil-p-fenileno) e a resina XAD (CARMICHAEL *et al.*, 1997; CORNELISSEN *et al.*, 1998; HUESEMANN *et al.*, 2004; LEI *et al.*, 2004; SMRECZAK *et al.*, 2008; OLESZCZUK, 2008; 2009). O

polímero é misturado polímero com o solo contaminado, em meio aquoso. Durante o processo de agitação, o polímero absorve os compostos hidrofóbicos que são liberados da matriz do solo na fase aquosa (HUESEMANN *et al.*, 2004). Após a extração, o PAH sorvido é recuperado com solvente e a fração liberada ou biodisponível determinada.

LEI *et al.* (2004) estudaram a biodisponibilidade de PAHs em sedimento contaminado, com dessorção assistida por XAD, em conjunto com experimentos de biodegradação. Após 24 semanas, foi alcançado o nível residual de PAH de 2 a 4 anéis nos experimentos de biodegradação. Entretanto, a degradação dos PAHs de 5 anéis foi limitada e nenhuma degradação significativa foi observada para os PAHs de 6 anéis. Em contraste, a dessorção dos compostos de 2, 3 e 4 anéis se aproximou de zero após duas semanas, enquanto que os de 5 e 6 anéis foram dessorvidos dos sedimentos por mais de 8 semanas. Quando a concentração residual de PAH, após a biodegradação, foi comparada com a obtida com a dessorção por XAD-2, os níveis foram similares para os PAHs com 3, 4 e 5 anéis. Os autores sugeriram que a dessorção assistida por XAD-2 era promissora para a determinação da biodisponibilidade desses compostos. Entretanto, para as frações de PAHs com alto peso molecular, uma quantidade maior foi dessorvida do sedimento, comparada com a concentração degradada. Foi proposto, então, que estes compostos poderiam estar biodisponíveis para a fase aquosa em termos de acessibilidade, mas não estarem disponíveis para a biodegradação nas condições ambientais do experimento.

CORNELISSEN *et al.* (1998) investigaram a relação entre a biodegradação e a biodisponibilidade de PAHs usando a resina Tenax TA. A remediação dos sedimentos contaminados foi feita em biorreatores ou em unidades de “landfarming”, até o platô de degradação ser atingido. Os estudos de dessorção com Tenax TA foram feitos com sedimentos contaminados. O Tenax TA foi limpo periodicamente e a concentração do PAH determinado após extração com hexano. A biorremediação variou de acordo com o sedimento tratado. Todos os PAHs de 2 a 6 anéis foram degradados significativamente em 4 meses. A dessorção com Tenax TA identificou rapidamente as frações de dessorção rápida e lenta. Após a biodegradação, entretanto, as frações rapidamente dessorvíveis foram significativamente menores, enquanto que para compostos recalcitrantes, a fração de dessorção rápida se manteve a mesma. Os autores sugeriram que a dessorção aquosa com Tenax TA foi um método adequado para prever a biodegradação de PAHs, sem as limitações observadas com microrganismos, que necessitam de um potencial catabólico.

SMRECZAK *et al.* (2008) estudaram a extração de fenantreno em 3 solos utilizando Tenax TA. Os resultados foram relacionados com o efeito ecotóxico do composto em bactérias nitrificantes para avaliar a fração biodisponível. Os resultados mostraram uma relação linear positiva ($r^2 = 0.95$) entre a fração biodisponível e a inibição da atividade nitrificante da bactéria. Os autores concluíram que o método de extração por Tenax TA é um bom indicador da biodisponibilidade do fenantreno para as bactérias nitrificantes em solos recém-contaminados. Entretanto, sugeriram que, para a aplicação desse método, é necessária a definição das condições ótimas de extração (tempo e temperatura) e modificações para se determinar a fração disponível para diferentes grupos de organismos.

Dos métodos de extração descritos acima, os mais usados para medir a acessibilidade dos PAHs para os organismos vivos são: oxidação com persulfato (CUYPERS, *et al.*, 2000), extração exaustiva e não-exaustiva com solventes (KELSEY, *et al.*, 1997), extração com a resina Tenax TA (CORNELISSEN, *et al.*, 1997), lavagem com surfactantes (CUYPERS, *et al.*, 2002) e complexação com ciclodextrinas (REID, *et al.*, 2000).

As avaliações químicas da bioacessibilidade vêm sendo centradas na extração com solventes orgânicos que particionam preferencialmente os contaminantes hidrofóbicos da matriz do solo. A principal vantagem desses métodos é o fato de serem rápidos e de fácil manuseio. Entretanto, a adequabilidade dos solventes orgânicos para medir a bioacessibilidade é contestada na literatura, principalmente pelas diferenças metodológicas do cálculo da “percentagem de extratibilidade”. A questão é se o denominador do tempo zero deve ser a concentração inicial após a contaminação ou a concentração residual após o envelhecimento (KELSEY *et al.*, 1997; WHITE *et al.*, 1998, 1999; CHUNG & ALEXANDER, 1999; REID *et al.*, 2000). Em termos práticos, nem a concentração total no tempo zero nem após o envelhecimento são figuras úteis, já que esses valores não são conhecidos para amostras ambientais. Assim, a bioacessibilidade deve ser normalizada para a fração total extraível, baseada nas técnicas de extração exaustivas ou, idealmente, ser expressa em termos de massa.

REID *et al.* (2000) foram os primeiros pesquisadores a descrever um método para medir a acessibilidade de PAHs, expondo amostras de solos contaminadas ao HPCD, em solução aquosa. Logo a seguir, CUYPERS *et al.* (2002) incluíram a amostragem sequencial para demonstrar que, uma vez esgotando-se a fração rapidamente

dessorvível, a aplicação de mais HPCD não levava a uma dessorção adicional. Isso levou os autores à interpretação de que o fator limitante para a liberação podia ser a acessibilidade e a cinética lenta de dessorção dos PAHs que permaneceram no solo. Se por um lado o procedimento mimetiza o mecanismo de transferência de massas envolvido na biodegradação, ele acelera sua taxa (CUYPERS *et al.*, 2002; REID *et al.*, 2000; DOICK *et al.*, 2006; SABATE *et al.*, 2006).

DOICK *et al.* (2005) mostraram que o HPCD prediz diretamente a biodegradação pela microbiota indígena e por um inóculo microbiano retirado de solo contaminado (correlação linear média de 0,9). As razões para essa alta correlação ainda precisam ser investigadas, mas podem incluir (i) o uso de microorganismos indígenas em vez de um inóculo microbiano catabolicamente ativo (CUYPERS *et al.*, 2002; STOKES *et al.*, 2005) ou (ii) diferenças físico-químicas dos solos (DOICK *et al.*, 2005; STOKES *et al.*, 2005), comparados com sedimentos (CUYPERS *et al.*, 2001, 2002).

O tempo de amostragem com HPCD para se medir a acessibilidade é controverso na literatura. Vários pesquisadores sugerem que se adote um passo único de dessorção (REID *et al.*, 2000; DOICK *et al.*, 2006; SABATE *et al.*, 2006), enquanto outros recomendam extrações consecutivas (CUYPERS *et al.*, 2002). A agitação da mesma amostra de solo várias vezes com HPCD é cara em tempo, material e em número de amostras. Parece que a fase de dessorção rápida se estende por aproximadamente 100 horas, o que é muito maior do que as 20 horas recomendadas nos procedimentos da literatura (REID *et al.*, 2000)

Outra questão é se a quantidade de HPCD utilizada é suficiente, nos casos onde a sorção dos PAHs ao solo é muito forte. CUYPERS *et al.* (2002) discutiram a sorção na matéria orgânica do solo em relação à estabilidade do complexo PAH:HPCD. É importante que exista uma forte complexação para manter a atividade química dos PAHs na fase aquosa e para manter o gradiente de atividade máxima (Δa) para a dessorção das moléculas ligadas às partículas do solo.

Os contaminantes passam da fase dissolvida para a fase absorvida pela microbiota. As frações de dessorção rápida (presentes nos poros preenchidos com água, solúveis na água ou fracamente sorvidas) e, provavelmente, a de dessorção lenta, são as que estão disponíveis para a biota. As técnicas de extração não-exaustivas refletem a necessidade de se obter uma remoção eficiente e quantitativa dessas frações de dessorção rápida e lenta. Uma técnica não-exaustiva eficiente precisa oferecer uma

melhor predição da bioacessibilidade do que apenas a extração com água (HICKMAN & REID, 2005). Diferentemente dos solventes, as técnicas de extração de fase sólida (SPE) (como Tenax TA e membranas C18) e a ciclodextrina usam água para transportar o contaminante. A variação do tempo de extração oferece um potencial para aperfeiçoar essas técnicas, de modo a se medir apenas a fase de dessorção lenta.

As técnicas de SPE oferecem uma fase sólida que tira os contaminantes orgânicos da fase aquosa. A resina Tenax TA é um polímero poroso sólido, baseado no óxido 2,6-difenil-fenileno, que parece ter uma afinidade similar tanto para os PAHs quanto pela matéria orgânica (CORNELISSEN *et al.*, 1997a,b). As extrações com Tenax TA, normalmente realizadas sob agitação em água ou cloreto de cálcio, mostram que: (i) a extração se aproxima da biodegradação dos contaminantes em sedimentos, especialmente para os PAHs de baixo peso molecular (CORNELISSEN *et al.*, 1998); (ii) a fração residual de PAHs que permanece nos sedimentos após a extração com Tenax-TA é similar à fração residual nos sedimentos biodegradados; (CUYPERS *et al.*, 2000); (iii) subestimam os PAHs que são prontamente degradados e super estimam os que são poucos degradados (CUYPERS *et al.*, 2001) e, (iv) exibem diminuição proporcional na extração e na biodisponibilidade, com o envelhecimento do composto no solo (WHITE *et al.*, 1999). CUYPERS *et al.* (2000) explicaram que a discrepância entre a extração rápida com TENAX e os estudos de biodegradação reflete a diferenciação entre a biodisponibilidade e a fração bioacessível, que engloba ambas as frações rápidas e lentas de dessorção e que são determinadas em um período de tempo de biodegradação.

2.8.2 Métodos Biológicos

Muitos esforços vêm sendo realizados para se validarem os métodos de extração não-exaustivos utilizando-se indicadores biológicos. As respostas biológicas induzidas por substâncias químicas em diferentes organismos vivos são bastante diversas e dependem da sensibilidade dos organismos aos compostos. Os indicadores biológicos são ferramentas para a determinação dos efeitos (positivos ou adversos) de uma substância ou mistura, quantificando esse efeito nos organismos vivos ou em seus componentes. Os bioensaios podem fornecer uma medida do impacto no ambiente de compostos químicos ou misturas, integrando diferentes fatores como pH, solubilidade, antagonismo, sinergismo, biodisponibilidade, etc.

Existem algumas vantagens no uso de medidas biológicas sobre os métodos

químicos na determinação da biodisponibilidade (SATERBAK *et al.*, 1999; CHARROIS *et al.*, 2001; SIJM *et al.* 2000; VAN GESTEL *et al.* 2001), a saber:

- 1 São sensíveis aos efeitos do tipo de solo e do envelhecimento sobre a biodisponibilidade;
- 2 São sensíveis às interações que ocorrem entre os contaminantes múltiplos em um solo (interações de toxicidade e físico-químicas, como a competição pelos sítios de adsorção);
- 3 São influenciadas por múltiplas rotas de exposição, além da via da solução do solo, dependendo do ensaio. Por exemplo, SPME mede a biodisponibilidade apenas da fração que pode ser transferida para a fase aquosa;
- 4 São influenciadas pelas reações de transformação e destoxificação pelos organismos, bem como a formação de produtos tóxicos da biodegradação, que podem alterar os riscos associados à contaminação. Não medem apenas a biodisponibilidade, mas pode ser um importante fator na avaliação de risco e;
- 5 Podem fornecer informações sobre a qualidade biológica geral dos solos contaminados, por integrarem os efeitos da presença do contaminante com as propriedades do solo, incluindo alterações físicas induzidas pela contaminação. Essas mudanças não estão necessariamente relacionadas com a biodisponibilidade.

Outras considerações importantes quando se interpretam os resultados desses testes incluem a tolerância das espécies e as condições dos testes. Podem ocorrer erros nas estimativas de risco e de biodisponibilidade se as espécies-teste forem intolerantes às condições dos ensaios (incluindo as propriedades do solo) e/ou aos contaminantes presentes. Da mesma maneira, precisa ser considerada a possibilidade de um contaminante não estar biodisponível, mas mesmo assim afetar as propriedades do solo, tornando-o inabitável para as espécies (VAN GESTEL *et al.*, 2001). Isso inclui o aumento da hidrofobicidade nos solos com hidrocarbonetos envelhecidos.

Os métodos de análise direta de toxicidade, baseados nos indicadores biológicos clássicos, ainda são muito trabalhosos. Os sistemas de testes biológicos rápidos, baseados em células ou microrganismos, abrem uma nova perspectiva de custo da análise, sem os problemas éticos provenientes do uso de organismos superiores. Alguns

desses testes, como a absorção do contaminante por organismos (concentração nos tecidos), determinam diretamente a biodisponibilidade para os organismos, enquanto outros, como a toxicidade em solos e alterações na atividade microbiana, são ensaios indiretos, pelos quais o nível de biodisponibilidade não pode ser diretamente medido, mas apenas inferido.

Vários testes biológicos com organismos terrestres estão disponíveis e alguns já foram padronizados. Muitos deles foram conduzidos especificamente para se determinar o efeito do seqüestro de PAHs pelo solo sobre a biodisponibilidade, durante o envelhecimento, para os organismos do solo. Os trabalhos de KELSEY & ALEXANDER (1997), KELSEY *et al.* (1997), NAM *et al.* (1998) e WHITE *et al.* (1997, 1998, 1999a) mostraram que a disponibilidade de PAHs, medida pela mineralização e absorção por vermes e plantas, diminuiu com o envelhecimento do contaminante no solo. Os resultados também foram correlacionados com a diminuição simultânea na extratibilidade do contaminante por solventes de extração suaves ou dessorção do contaminante.

Os métodos microbiológicos que vêm sendo padronizados para se medir a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos no solo partem do princípio de que a fração biodegradável também é a fração biodisponível.

As medidas de respiração no solo são usadas como um parâmetro microbiano sensível e fácil para caracterização de amostras de solos. A atividade de respiração está estreitamente conectada com outros parâmetros, como biomassa e número mais provável de células (NMP) (MARTENS, 1995; DILLY, 2001). Além disso, a atividade respirométrica também é usada para a avaliação dos efeitos ecotóxicos em solos contaminados (DOTT *et al.*, 1995; EISENTRAEGER *et al.*, 2000). HUND & SCHENK (1994) observaram uma forte correlação entre o quociente de respiração basal e induzida pelo substrato e a concentração de PAHs em uma área contaminada, durante a biorremediação. MARGESIN *et al.* (2000) usaram a respiração do solo como um instrumento de monitoração de um processo de descontaminação de solo contaminado com óleo mineral. Em outros estudos, a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos pôde ser calculada a partir do consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono (MILES & DOUCETTE, 2001). A respiração microbiana pode ser usada para se quantificar o impacto de um contaminante sobre os microrganismos do solo ou para se medir seu catabolismo a CO₂, sendo rotineiramente utilizada para se avaliar a fração do

contaminante disponível para os microrganismos no solo (HATZINGER & ALEXANDER, 1995; WHITE *et al.*, 1997; MACLEOD & SEMPLE, 2000; REID *et al.*, 2000a).

Uma técnica que vem ganhando espaço nos estudos de avaliação de toxicidade e de monitoramento ambiental é o uso de biosensores. As principais vantagens são a sensibilidade, o baixo custo e a rapidez dos ensaios, quando comparados com o uso de organismos superiores (WILSON & NAIDU, 2008). O ensaio é baseado em bactérias modificadas geneticamente para expressar luminescência. Na presença de contaminantes ocorre redução da luminescência, proporcional à concentração do composto. Esses testes parecem ser efetivos para uma série de poluentes orgânicos hidrofóbicos (BOYD *et al.*, 1997; REN & FRYMIER, 2005).

Uma variação metodológica da expressão do gene *lux* para a detecção de poluentes, especificamente da biodisponibilidade, é a fusão do gene *lux* com os genes envolvidos numa resposta particular aos contaminantes, criando um biosensor mais específico. Nesse caso, a bioluminescência é quantificada proporcionalmente na presença de um poluente-alvo. Essa técnica vem sendo usada com sucesso para vários poluentes orgânicos, incluindo o naftaleno e alguns PCBs (NIVENS *et al.*, 2004). Estes testes vêm sendo aplicados em extratos de solos e lodos, mas existem problemas associados com a necessidade da utilização de solventes para extrair os compostos dos solos, o que impacta o biosensor e também afeta a biodisponibilidade do poluente (REID *et al.*, 2000a).

As minhocas são organismos usados para se medir a biodisponibilidade de uma série de compostos orgânicos xenobióticos, incluindo pesticidas (MORRISON *et al.*, 2000, KELSEY *et al.*, 2005), PAHs (JAGER *et al.*, 2003a), PCBs, clorofenóis e clorobenzenos (VAN GESTEL & MA, 1988; JAGER *et al.*, 2003b). As minhocas são ideais para a avaliação da biodisponibilidade, porque estão em contato íntimo com o solo e a solução do solo. A biodisponibilidade pode ser medida em termos de bioacumulação ou de biodisponibilidade toxicológica (LANNO *et al.*, 2004). Entretanto, os testes com minhocas estão limitados aos compostos que são bioacumulados em níveis mensuráveis e também podem ficar temporariamente limitados devido a dessorção lenta do poluente do solo (HU *et al.*, 2005). Outros problemas relacionados com as diferentes sensibilidades das espécies aos poluentes não permitem que um estudo seja extrapolado para outro (JAGER *et al.*, 2005).

As plantas vêm sendo usadas para avaliações de fitodisponibilidade de contaminantes para vários contaminantes hidrofóbicos (SCHROLL *et al.*, 1994; MATTINA *et al.*, 2000). A concentração nas plantas pode ser relacionada com a presença no solo pelo uso de relacionamentos preditivos, mas a absorção de um contaminante em particular depende da espécie e das condições ambientais específicas. Dessa forma, os resultados de um estudo não podem ser extrapolados para outros ambientes (WILSON & NAIDU, 2008).

Para se aplicar os ensaios biológicos em avaliações de biodisponibilidade de contaminantes em solos, é importante se entender como os organismos-teste interagem com o sistema e o que está sendo medido. Conforme observado em alguns métodos de extração química, a degradação microbiana pode ser bem correlacionada com a quantidade do contaminante desorvida do solo para a fase aquosa (CORNELISSEN *et al.*, 1998a, REID *et al.*, 2000, SIJM *et al.*, 2000). Entretanto, essa correlação não conta para outras rotas de absorção. A degradação microbiana ou mineralização é um método indireto de se estimar a biodisponibilidade de PAHs e pode subestimar a verdadeira biodisponibilidade para outros organismos (REID *et al.*, 2000a). A estimativa de biodisponibilidade, baseada na mineralização do contaminante, assume que todo o composto que não foi mineralizado foi seqüestrado e, por isso, não está biodisponível. Entretanto, sabe-se que essa fração residual pode ser composta de contaminantes recalcitrantes, que não são biodegradados, mas que estão disponíveis para outros organismos (CUYPERS *et al.*, 2001; HUESEMANN, 2002). Isso sublinha a necessidade de se compreender os sistemas-teste e os benefícios da aplicação das baterias de teste, incluindo espécies e métodos diferentes. Por outro lado, outras medidas indiretas de biodisponibilidade, como toxicidade, podem superestimar a biodisponibilidade, quando outro fator, além da disponibilidade do contaminante, afeta adversamente a resposta dos organismos (VAN GESTEL *et al.*, 2001). Entretanto, para a determinação total do risco de um solo para uma entidade biológica, os testes biológicos parecem ser mais apropriados, pois estes incorporam em suas respostas outros fatores, além da toxicidade do contaminante.

2.9 Metodologia do Fósforo Remanescente

Para esse estudo foi selecionado o fenantreno ($C_{14}H_{10}$) como um PAH representativo, pois é um composto orgânico neutro que contém 3 anéis aromáticos e apresenta propriedades ambientais como solubilidade em água, coeficiente de partição

octanol-água (K_{ow}) e pressão de vapor similares às dos outros PAHs como acenafaleno, fluoranteno e fluoreno. A estrutura do fenantreno é similar à de PAHs de pesos moleculares maiores e mais carcinogênicos, como benzo(a)pireno, e por isso ele é considerado um composto representativo, que pode dar uma indicação geral do comportamento dos PAHs (KHODADOUST *et al.* 2004).

A metodologia do fenantreno remanescente aqui proposta foi baseada no método de P-remanescente, que é a concentração de P na solução de equilíbrio após 1h de agitação do solo com a solução extratora de CaCl_2 $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ em 60 mg.L^{-1} P. A partir dos dados obtidos, são construídas isotermas de adsorção, plotando-se a quantidade de fósforo adsorvido, na ordenada, e a concentração na solução de equilíbrio na abscissa. A forma hiperbólica da equação de Langmuir é dada pela Equação 2. Para estimativas das constantes K e q_{max} , a equação hiperbólica de Langmuir é transformada em sua forma linear, que corresponde à Equação 3.

De acordo com NOVAIS & SMYTH (1999), a capacidade máxima de adsorção do fósforo (q_{max} ou CMAF) é determinada pelo valor inverso da declividade da reta. A constante de energia de adsorção (K) pela relação entre a declividade da reta e a interseção da mesma com o eixo das ordenadas e o fator capacidade de P máximo (FCP máx.) pelo produto entre a capacidade máxima de adsorção de P e a energia de adsorção.

As isotermas de adsorção descrevem as relações de equilíbrio entre a quantidade de um elemento adsorvido e a quantidade remanescente na solução final, sendo úteis para se quantificar a adsorção no solo. Dentre os modelos de isotermas destaca-se o de Langmuir, que permite a estimativa da CMAF (q_{max}) pelo solo. Os valores obtidos apresentam estreita correlação com a capacidade tampão (CT). A isoterma de Langmuir permite estimar o nível crítico de P disponível, avaliando-se a declividade da equação da reta do P disponível em função do nutriente adicionado ao solo, os quais são dependentes da capacidade tampão do solo (característica intrínseca de cada solo). Então, a estimativa simples e rápida da capacidade tampão de cada solo pelo método do P-remanescente permite se estratificar, com maior segurança, a interpretação das análises de solos e recomendações de adubação (NOVAIS & SMYTH, 1999).

Entretanto, o método utilizado para p-remanescente não foi aplicável para o fenantreno, em razão da instabilidade deste composto nas soluções aquosas testadas. Assim, foi proposto um novo método para a determinação de fenantreno-remanescente,

utilizando-se uma solução aquosa com ciclodextrina, que é um oligossacarídeo cíclico, utilizado como agente complexante, principalmente na indústria farmacêutica, para aumentar a solubilidade aquosa de drogas pouco solúveis em água e sua biodisponibilidade e estabilidade.

Atualmente, as avaliações de risco dos solos contaminados com PAHs se baseiam nos resultados de análises químicas, que não consideram a heterogeneidade dos solos, a formação de metabólitos tóxicos, a biodisponibilidade e as características dos contaminantes. Por outro lado, vem aumentando a utilização de testes biológicos para a avaliação dos efeitos dos contaminantes para os solos. Vários autores tentam correlacionar os resultados das análises químicas com as respostas biológicas obtidas em diferentes bioensaios, com o objetivo de validar os métodos químicos e biológicos de detecção. Entretanto, o que vem sendo observado é que cada solo é único na resposta e cada teste de toxicidade é único na sua capacidade de detectar diferentes níveis de contaminantes, em diferentes solos (MAILA & CLOETE, 2005). Essas limitações têm imposto a necessidade de se entender com maior profundidade as relações entre os fatores bióticos e abióticos do solo, os contaminantes e as respostas dos bioindicadores aos mesmos.

As análises de toxicidade são normalmente conduzidas aplicando-se uma bateria de testes biológicos com diferentes sensibilidades aos contaminantes, os quais são então comparados com os obtidos com solos ou resíduos não-contaminados (REPETTO *et al.*, 2001). Atualmente, há uma expansão do uso de técnicas moleculares como ferramenta potencial de monitoração de comunidades microbianas e genes funcionais em ambientes contaminados, as quais carecem, ainda, de padronização e validação no contexto da avaliação de contaminação e de risco ambiental (MAILA & CLOETE, 2005). As técnicas que determinam o perfil fisiológico das comunidades microbianas pela utilização de substrato também vêm sendo aplicadas na avaliação das alterações causadas pela contaminação. Entretanto, essas estratégias também apresentam limitações, especialmente pelo fato de não permitirem avaliar a totalidade das populações microbianas presentes no solo.

O uso de plantas como possíveis indicadoras de contaminação ambiental, ou em etapas de descomissionamento de resíduos ou de análises de risco, também não está validado. Sua principal limitação é o fato de que a sensibilidade das plantas aos contaminantes pode variar substancialmente, dependendo das condições ambientais,

como teor de matéria orgânica, pH, presença de ligantes e interações com os contaminantes.

A despeito das limitações mencionadas e de outras relatadas na literatura especializada, é indiscutível a importância da utilização de indicadores biológicos, juntamente com os métodos químicos, quando se deseja uma informação precisa dos efeitos e da magnitude da contaminação ambiental em solos ou resíduos com características químicas e biológicas variáveis. Entretanto, a validação dos testes é pré-requisito obrigatório para que os mesmos sejam incorporados aos programas de controle da poluição.

Além da validação de um bioensaio para aplicação em experimentos de laboratório, a validação do seu uso como ferramenta de biomonitoração, para se estimar um efeito observado numa população, tem que ser considerado. A questão principal é: sob quais condições é possível extrapolar os resultados dos testes e tirar conclusões sobre as respostas observadas em um ecossistema? Na verdade, a relação entre os resultados dos testes e um efeito observado no ambiente frequentemente não é bem definida. A validação é a confirmação, por exame e provisão de evidências objetivas, de que as necessidades para um uso específico são preenchidas. A validação de um método demonstra que este é adequado para o seu propósito e que a incerteza nos resultados é aceitável. Para isso, são estabelecidas as características de desempenho e limitações do método, identificando-se os fatores que podem alterar essas características. Os métodos padronizados são, normalmente, considerados suficientemente validados para sua faixa de aplicação.

Muitos estudos ainda são necessários para se desenvolver novas abordagens que liguem os ensaios de biomonitoração com outros tipos de análises: as químicas, as toxicológicas, necessárias para o estudo da biodisponibilidade e predição das respostas dos organismos; e a de perfis de expressão gênica, que informam sobre os efeitos complexos nos organismos e podem auxiliar na descoberta de novos biomarcadores.

A presença de determinada substância no meio ambiente não é condição *si ne qua non* para a promoção e observação de efeitos ecotóxicos associados. A expressão da toxicidade (e da ecotoxicidade) de um composto químico depende das características da exposição e de seu comportamento no meio ambiente e no sistema biológico. Além das propriedades físico-químicas do composto, deve-se considerar a magnitude, a duração e a frequência da exposição, as vias de introdução e a suscetibilidade dos organismos,

estando esta última diretamente interligada aos processos (eco) toxicocinéticos e (eco) toxicodinâmicos.

A legislação brasileira contempla somente padrões de qualidade para água. Entretanto, verifica-se um grande interesse dos órgãos de regulamentação estaduais, no sentido de validar os níveis de alerta para contaminantes no solo. Um dos motivos dessa falta de regulamentação vem da carência de estudos, no Brasil, sobre o comportamento dos contaminantes no solo, incluindo os efeitos ecológicos adversos, a avaliação das respostas fisiológicas e bioquímicas das comunidades microbianas dos solos e a determinação da biodisponibilidade para a biota. Além disso, não se conhece um método de extração de PAHs do solo que acesse toda a fração instável do contaminante e mimetize as interações entre os microrganismos e o contaminante.

Neste projeto, é proposta a avaliação das respostas de indicadores biológicos ao fenantreno extraível de vários tipos de solos, por diferentes métodos de extração, definindo-se assim o valor limiar de resposta biológica ao contaminante. Os testes biológicos focaram na atividade bioquímica e fisiológica da microbiota dos solos. As avaliações foram precedidas da caracterização do que, nesta proposta, se identifica por **Fenantreno-Remanescente**, uma nova ferramenta de avaliação da capacidade de retenção de fenantreno por diferentes tipos de solo. Com essa estratégia, foi possível definir a concentração crítica de fenantreno capaz de induzir resposta biológica (concentração-limiar), por um método de extração/quantificação padronizado. Uma vez que a avaliação foi precedida da definição do valor de Fenantreno-Remanescente, os efeitos das variações de características de solo sobre a eficiência de extração pelo método proposto e sobre a biodisponibilidade do contaminante foram eliminados, tornando o método aplicável a uma variedade de tipos de solos ou de resíduos sólidos.

3. OBJETIVO

Validar as doses de alerta para fenantreno em solos com diferentes capacidades de retenção desse contaminante, empregando-se múltiplos indicadores para validação da metodologia de extração/quantificação do composto e a implementação de uma metodologia de avaliação de Fenantreno-Remanescente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solos - Amostragem e Processamento

Foram utilizados 6 tipos de solos pertencentes às classes texturais franco-arenosa, franco-argilosa e argilosa. As amostras foram coletadas da camada de 0 a 40 cm de profundidade, quarteadas e passadas por peneira de 2 mm para remoção de pedras e raízes. Os solos foram secos ao ar e analisados quanto às propriedades físicas e químicas, de acordo com metodologias adotadas pelo Departamento de Solos da UFV. A classificação dos solos está apresentada no Quadro 4 e as suas principais características físico-químicas na Tabela 2.

Quadro 4: Classificação dos solos

SOLO	DENOMINAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
ALTO PARANAÍBA	AP	Latossolo Vermelho-Amarelo, textura argilosa.
SETE LAGOAS	SL	Latossolo Vermelho
PARACATU	PAR	
VIÇOSA	TG	Latossolo Vermelho-Amarelo – Argiloso
TRÊS MARIAS	TM	Latossolo Vermelho-Amarelo textura Franco-Arenosa
JOÃO PINHEIRO	JP	Latossolo Vermelho-Amarelo

Tabela 2: Caracterização físico-químicas dos solos estudados

Características	AP	SL	PAR	TG	JP	3M
pH água 1:2,5	6,3	4,60	5,1	4,80	4,0	4,74
Mat. Orgânica dag.kg ⁻¹ (4)	4,65	4,96	4,5	2,96	1,5	1,20
P, mg/dm ³ (1)	4,4	4,0	0,0	0,8	1,3	0,2
K, mg/dm ³ (1)	36	20,0	4,1	24,0	21,0	28,0
Prem, mg/L (5)	8,5	7,48	3,2	7,0	28,65	29,7
Ca ²⁺ , cmol _c /dm ³ (2)	2,9	1,24	0,30	0,08	0,08	0,02
Mg ²⁺ , cmol _c /dm ³ (2)	0,7	0,20	0,10	0,00	0,004	0,00
Al ³⁺ , cmol _c /dm ³ (2)	0,0	0,50	0,36	0,20	0,90	0,10
H+Al, cmol _c /dm ³ (3)	6,1	8,3	7,46	6,9	6,6	2,9
SB, cmol _c /dm ³	5,2	1,49	0,41	0,14	0,14	0,09
CTC a pH 7, cmol _c /dm ³	9,7	10,25	7,97	7,04	6,77	2,99
CTC _{efetiva} , cmol _c /dm ³	5,2	2,45	0,77	0,34	1,07	0,19
V, %	53,4	14,5	5,1	2,0	2,5	3,0
m, %	0,0	20,4	46,8	58,8	84,1	52,6
Areia, % (6)	11,0	15,0	2,0	9,0	63,0	54,0
Silte, % (6)	28,0	14,0	14,0	4,0	7,0	5,0
Argila, % (6)	61,0	71,0	84,0	74,0	32,0	19,0

(1) Mehlich⁻¹ (DE FILIPPO & RIBEIRO, 1997). (2) KCl 1 mol.L⁻¹ (DE FILIPPO & RIBEIRO, 1997). (3) CaOAc 0,5 mol.L⁻¹ (DE FILIPPO & RIBEIRO, 1997). (4) Walkley-Black (DE FILIPPO & RIBEIRO, 1997). (5) ALVAREZ *et al.* (2000). (6) EMBRAPA (1997).

4.2 Determinação das Doses de Alerta de Fenantreno para os Métodos de Extração

As características dos solos utilizados para a determinação das doses de alerta de fenantreno para os métodos de extração estão apresentados no Quadro 4 e Tabela 2. Para a utilização nos experimentos, os solos foram acondicionados e esterilizados com 250 Kilogray de radiação γ por uma fonte ⁶⁰Co, no Laboratório de Irradiações do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN, Belo Horizonte, MG).

4.2.1 Contaminação e Manutenção dos Solos

Os solos foram contaminados com fenantreno (98% Sigma Aldrich, UK), dissolvido em acetona (MERCK, grau HPLC) (10 g.L⁻¹), de acordo com o método de contaminação - reidratação modificado, descrito por (REID *et al.*, 1998). A partir da solução estoque, o fenantreno foi adicionado a frascos com capacidade de 500 g, de forma a se obter concentração de 0, 1, 10, 20, 40, 70, 100 e 150 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em relação ao peso seco do solo (em triplicata). Após a evaporação da acetona, foi adicionada aos frascos água Milli-Q esterilizada suficiente para reidratar os solos para 65% da sua capacidade máxima de retenção de água (CMR). Porções de 20 g de solos foram sendo

adicionadas ao frasco contendo água e fenantreno e misturados vigorosamente com espátula esterilizada, até atingir 100 g de solo. Os frascos foram selados e armazenados no escuro, em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 5 e 120 dias. A perda de água foi determinada periodicamente pela medida de massa e controlada pela adição de água.

4.2.2 Determinação das Doses de Alerta de Fenantreno para os Métodos de Extração

Para a determinação das doses de alerta de fenantreno presente nas amostras de solo, foram testados três métodos de extração: ciclodextrina, resina Tenax-TA e lixiviação por água.

4.2.2.1 Extração com Hydroxipropil- β -ciclodextrina - HPCD

O método de extração com hydroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD) (Sigma Aldrich, UK) foi adaptado do descrito por REID *et al.* (2000a). As amostras de solo envelhecidas (2,0 g) foram pesadas em tubos de centrífuga de teflon e adicionadas de 20 mL de uma solução aquosa 50 mM de HPCD preparada em água Milli-Q, juntamente com 0,2% de azida sódica. Os tubos foram agitados a 150 rpm por 20 horas em agitador orbital (News Brunswick), centrifugados a 5.000 g (Centrífuga Jouan MR1822) e o sobrenadante analisado quanto à concentração de fenantreno por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), de acordo com o item 4.2.3.1.

4.2.2.2 Extração com TENAX-TA

A extração de fenantreno com TENAX-TA (TENAX-TA 60/80 – Supelco, Lote B107) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por CORNELISSEN *et al.* (1997) e BONTEN *et al.* (1999). Dois gramas das amostras de solo envelhecido por 5 e 120 dias foram adicionados a frascos de centrífuga, juntamente com 20 mL de água Milli-Q e 0,2 g do adsorvente TENAX-TA. Os frascos foram agitados por 20 horas, a 150 rpm, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 40 minutos e a resina coletada, lavada com água desionizada e adicionada a tubos de teflon, juntamente com 10 mL de acetona. Após agitação por 24 horas a 150 rpm e temperatura ambiente, os extratos foram recolhidos em frascos âmbar e mantidos em capela de exaustão até a acetona evaporar completamente. O fenantreno presente no frasco foi retomado com 2 mL de acetona e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), de acordo com o item 4.2.3.2.

4.2.2.3 Teste de Lixiviação de Fenantreno de Solos Contaminados

Atualmente, no Brasil, não existe uma norma reguladora específica para o gerenciamento de solos contaminados, que são considerados resíduos sólidos. De acordo com as leis brasileiras de regulação (NBR 10004), os resíduos sólidos são classificados em perigosos e não perigosos. Quando o resíduo é considerado perigoso, este é avaliado pelo protocolo experimental de lixiviação (NBR 10005) e/ou solubilização (NBR 10006). A lixiviabilidade é avaliada em função da concentração dos contaminantes encontrados no lixiviado e no resíduo bruto. Esses valores indicam a porção de resíduo liberada para o meio. O ensaio de lixiviação sofre interferência da temperatura, do tipo de solução lixiviante, da relação resíduo/lixiviante, do número de extrações, da superfície específica do resíduo e do grau de agitação utilizado no ensaio.

Assim, neste trabalho foi utilizada a técnica de lixiviação em água, para se verificar se existe alguma correlação entre este teste e os efeitos biológicos verificados com a contaminação de fenantreno nos solos. Os dados de concentração de fenantreno nos ensaios de lixiviação foram também comparados com os obtidos pelos outros 2 métodos de extração testados.

As amostras de solo foram transferidas para tubos de centrífuga, adicionando-se a seguir H₂O Milli-Q esterilizada. Os tubos foram selados e mantidos sob agitação de 100 rpm por 24 h e então centrifugados a 2.000 g por 10 min. Os extratos aquosos foram mantidos a -20°C até a análise química do fenantreno extraído. A quantificação do fenantreno presente nos extratos aquosos foi feita por HPLC, conforme metodologia descrita no item 4.2.3.1.

4.2.3 Análise do Fenantreno Extraído

O fenantreno extraído por HPCD, Tenax e lixiviação com água foram analisados conforme a matriz na qual o composto estava dissolvido, de acordo com a norma NCQC2722 do CETEC, que relata a metodologia utilizada na extração e A preparação de compostos orgânicos semi-voláteis para análise por cromatografia a gás (GC) ou líquida (HPLC). Esta técnica se baseia no método padrão 525.2 da EPA.

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa dada a possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas (10^{-9} a 10^{-12} g). A grande limitação desse método é a necessidade de que a substância a ser analisada seja volátil ou estável termicamente,

embora alguns analitos não-voláteis ou instáveis possam ser derivados quimicamente. Para que a análise do fenantreno extraído em solvente aquoso (ÁGUA e HPCD) fosse feita por cromatografia gasosa, seria necessário um procedimento de extração líquido-líquido, que demanda grande quantidade de solvente (hexano), além de ser trabalhoso e demorado podendo resultar na perda de amostra durante a manipulação. Assim, apenas as amostras extraídas com TENAX e retomadas em acetona foram analisadas por esse método.

Em contraste a CG, o principal mecanismo de separação da cromatografia líquida está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel líquida e a fase estacionária presa ao suporte sólido. A versatilidade dessa técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Por isso o método de análise por HPLC foi escolhido para as análises das amostras obtidas com HPCD e água.

4.2.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Os extratos (30 µl) dos solos extraídos com HPCD e água foram separados usando-se uma coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 250 mm X 4,6 mm, 30°C), tendo acetonitrila e água como fase móvel. A separação foi feita em fluxo constante de 1,5 mL.min⁻¹ com eluição isocrática (acetonitrila/água de 60/40). O comprimento de onda do detector foi ajustado para 260 nm e a concentração do fenantreno quantificada a partir das áreas dos picos segundo a interpolação linear do padrão de fenantreno injetado, que variou de 0,5 a 5 mg.L⁻¹.

4.2.3.2 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS)

Os extratos de solo obtidos com TENAX foram analisados em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas da Varian, modelo Saturno 4000MS. O injetor operou com He como gás de arraste e o split de 1:5, com temperatura de 300 °C e fluxo constante de 1 mL.min⁻¹. A coluna usada foi uma coluna 100% metilsilicone de 30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm de filme e a programação de temperatura foi uma isoterma a 180°C. O espectrômetro de massas operou com temperatura da interface de 300°C, 150°C no trap, com impacto de elétrons a 70 eV e monitorou o fragmento m/z 178 característico do fenantreno por 10 min.

4.2.4 Determinação da Massa Seca das Amostras de Solo

O fenantreno extraído foi normalizado pela massa seca dos solos. Para essa análise foram pesados dois gramas de amostra de solo, à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), em uma cápsula de porcelana, previamente seca e tarada. Esta cápsula foi levada a uma estufa com temperatura de 105°C por 24 horas. A amostra foi retirada da estufa e colocada em dessecador até entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo novamente pesada. Este procedimento foi realizado até peso constante. A massa seca foi calculada, em gramas, pela diferença dos pesos dos solos antes e após a secagem em estufa.

4.3 Determinação do Efeito do Fenantreno sobre Indicadores Biológicos nos Solos

Após o período de contato do fenantreno com os solos, foi avaliado seu efeito sobre a germinação de sementes, número de microrganismos nos solos e a respiração microbiana.

4.3.1 Ensaios de Germinação de Sementes

Os ensaios de germinação e crescimento das raízes foram realizados de acordo com YERUSHALMI *et al.* (2003), utilizando-se sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pimentão (*Capsicum annuum*) adquiridos no comércio local.

As sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e Tween 80 a 1% por 25 minutos, coletadas em papel de filtro, enxaguadas com excesso de água destilada e secas à temperatura ambiente.

Amostras dos solos (15 gramas) contaminados com fenantreno e envelhecidos pelos tempos determinados (5 e 120 dias) foram colocadas em placas de Petri de vidro, com dimensões de 48 x 12 mm, em triplicata. A partir dos dados de massa seca dos solos, determinado previamente, a umidade foi ajustada para 90% da CRM do solo com água destilada esterilizada. Os solos foram homogeneizados e utilizados para o plantio das sementes. Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com areia lavada.

As sementes, no número de 10 por placa, foram cuidadosamente colocadas no solo, por meio de uma pinça esterilizada e enterradas parcialmente. As placas foram incubadas por 5 dias em estufa a 25°C , por 5 dias. No terceiro dia, foi adicionado 1 mL de água destilada esterilizada a cada placa, para recompor a água perdida por evaporação. Após o período de incubação, as sementes foram cuidadosamente retiradas

dos solos, lavadas com água destiladas, dispostas em folha de plástico transparente e escaneadas em uma impressora multifuncional HP PSC 1315.

O número de sementes germinadas foi anotado e o índice de germinação (%IG) calculado pela Equação 10.

$$\%IG = \frac{(\% \text{ germinação das sementes}) \times (\% \text{ crescimento das raízes})}{100} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

$$\% \text{ Germinação de sementes} = (\% \text{ germinação no extrato}) / (\% \text{ germinação no controle}) \times 100$$

O crescimento das raízes foi determinado pelo programa SIARCS - Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo, disponibilizado pela EMBRAPA, que permite analisar raízes e folhas por meio de imagens captadas em vídeo ou por fotografia. O sistema apresenta precisão e rapidez em relação à contagem tradicional, como baixo custo e fácil uso (<http://www.cnpdia.embrapa.br/>).

4.3.2 Ensaio de Respirometria

Após a retirada das amostras de solo necessárias para a análise de germinação de sementes, os solos foram submetidos a ensaios de respirometria.

Como os solos estavam esterilizados por radiação, estes foram repovoados com microbiota autóctone de solo de jardim para as análises respirométricas. Um dia antes das medidas, 10 g das amostras de solos foram colocadas em garrafas de Duran e suplementadas com solução¹ nutriente de forma a ajustar o teor de água dos solos para 65% da CRM. Os solos foram repovoados com 0,01 g de solo de jardim, a mistura foi homogeneizada e os frascos selados e incubados por 24 h a 30°C.

Após o período de incubação, os frascos foram acoplados a um respirômetro automático com analisador de CO₂ (Sable System, Las Vegas, NE, USA) e as medidas de CO₂ realizadas por 72 h, a 30°C no escuro.

¹ Solução nutriente (g.L⁻¹): NH₄Cl, 1,0; Na₂HPO₄, 4,0; KH₂PO₄, 1,5; CaCl₂.2H₂O, 0,013; citrato férrico, 0,005; MgSO₄.7H₂O, 0,2. Suplementos: 15mM de L-glutamina; D-glucosamina; L-fenilalanina; L-asparagina; L-arginina; L-cisteína; L-tirosina; L-lisina; L-histidina; L-serina; ácido glutâmico. 75mM de D-glicose e D-manose, 100mM dos ácidos malônico, glucônico, ascórbico, cítrico, málico, pantotéico, oxálico, tartárico, fumárico, succínico, citrato de sódio. Tween 80: 36,94 mL.L⁻¹.

4.3.3 Contagem de Bactérias Heterotróficas (CBH) nos Solos

Após o ensaio de respiração, o número de bactérias heterotróficas presentes nas amostras de solo foram quantificadas pelo método da diluição serial. Esta é uma técnica simples, usada para se estimar o número de bactérias heterotróficas em amostras ambientais. Essa técnica também fornece um índice pelo qual diferentes tratamentos podem ser comparados.

Dez gramas do solo foram adicionados a frasco de diluição de leite contendo 95 mL de solução estéril de pirofostato de sódio 0,01% e 20 bolinhas de vidro de 3 mm de diâmetro (diluição 10^{-1}). Os frascos foram agitados vigorosamente com a mão por 30 segundos e colocados em agitador orbital (News Brunswick) a 200 rpm, por 20 minutos. Após esse período, os frascos foram retirados do agitador e colocados em repouso por 30 minutos. Uma alíquota de 1 mL da região mediana da suspensão foi retirada e transferida para tubos contendo 9 mL da solução de pirofosfato de sódio 1% (diluição 10^{-2}). A suspensão foi agitada em vortex por 30 segundos e uma alíquota de 1 mL foi transferida sucessivamente para novos tubos com pirofosfato, até a diluição de 10^{-7} .

O plaquamento foi realizado em triplicata, transferindo-se assepticamente 0,1 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} para placas de petri contendo o meio de cultura ágar nutriente, acrescido de 50mg.L^{-1} de ciclohexamida. A suspensão foi espalhada com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias, quando foi feita a contagem do número de colônias.

Foram observados os limites de leitura do método, descartando-se as placas que apresentaram número de colônias inferiores a 30 ou superiores a 300.

O cálculo do número de unidades formadoras de colônias por g de solo foi feito de acordo com a Equação 11:

$$UFC\text{ g}^{-1} = \frac{NC \times FD}{V \times M} \quad \text{Equação 11}$$

Onde,

NC = número de colônias contadas

FD = Fator de diluição

V = Volume da suspensão

M = Peso seco da amostra

4.4 Correlações entre as Doses de Alerta para os Métodos de Extração e o Efeito do Fenantreno sobre Indicadores Biológicos

A partir dos dados obtidos foi avaliada a correlação entre as respostas dos indicadores biológicos e o fenantreno extraível dos 6 tipos de solos, pelos 3 métodos de extração, definindo-se assim o valor limiar de resposta biológica ao contaminante, nos dois tempos de contato (5 e 120 dias).

4.4.1 Desenvolvimento da Metodologia para a Determinação do Fenantreno Sobrenadante

4.4.1.1 Fenantreno Sobrenadante em Solução Aquosa de CaCl_2

Para a determinação do fenantreno sobrenadante em solução aquosa de CaCl_2 , três gramas do solo TG foram pesadas em tubos de centrífuga de 50 mL (Beckman - Policarbonato) e adicionadas de 20 mL da solução de CaCl_2 0,01M (Merck) contendo azida sódica (200 mg.L^{-1}) (Sigma Aldrich).

A solução-estoque de fenantreno (Sigma Aldrich, 98%) foi preparada em acetona na concentração de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$. O volume necessário da solução estoque de fenantreno foi adicionado aos tubos, de forma a se obterem as concentrações finais de 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e $300 \text{ } \mu\text{g de fenantreno.g de solo}^{-1}$. As propriedades físico-químicas, termodinâmicas e o K_d estimado do fenantreno estão apresentados na Tabela 3. Os tubos foram fechados com tampa dotada de septo de teflon.

Os tubos foram pesados, cobertos com papel alumínio para prevenir a fotodegradação do fenantreno e colocados sob agitação em agitador orbital (New Brunswick Scientific) pelos tempos de 1, 2, 4 e 24 horas, a 100 rpm, por 24 h. O mesmo procedimento foi feito para tubos sem solo (BRANCO).

Após o período de contato do fenantreno com os solos, os tubos foram centrifugados (centrífuga FANEM-215) a 2.000 rpm por 20 minutos. A seguir, o fenantreno em solução foi analisado segundo a metodologia de extração com a fibra PDMS (fibra revestida com sílica adsorvente - SPME Fiber Assembly $100 \text{ } \mu\text{m}$ Polymethylsiloxane Coating For Manual Holder).

Os sobrenadantes foram adicionados em frascos âmbar de 50 mL. Uma barra magnética foi introduzida nos frascos, que foram fechados com septo de teflon. A solução foi mantida sob agitação sobre a base de um agitador magnético (CIMAREC) e

o fenantreno foi extraído introduzindo-se a seringa contendo a fibra de PDMS no frasco de extração por 10 minutos. A fibra foi recolhida, a agulha retirada do frasco e injetada no injetor do cromatógrafo a gás (Hewlett Packard 5890 Series) por 7 minutos. Antes de se iniciar a extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo a gás por 5 minutos (limpeza da fibra) e esfriada até à temperatura ambiente.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas, termodinâmicas e $K_{d_{oc}}$ estimado do fenantreno.

Características	Valores
Peso molecular (g mol^{-1})	178,24
Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$) (T_m)	99,5
Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$)	340,2
Densidade (g.cm^{-3})	1,02
Constante de Henry (25°C)	0,001
Log Kow	4,57
Solubilidade em água (mg.L^{-1}) (20°C)	0,788
Log Kd (25°C)	3,82

Fonte: VERSCHUEREN (1983)

A análise do fenantreno retido na fibra de PDMS foi feita por cromatografia gasosa, utilizando uma coluna de 30 m x 0,32 mm ID x 0,32 μm de filme. A fase estacionária foi 5% fenil polidimetilsiloxano, tendo o Hélio como gás de arraste (1 mL.min^{-1}) e temperatura do injetor de 250°C ; detector 260°C e coluna 200°C .

4.4.1.2 Fenantreno Sobrenadante em Solução Aquosa de HPCD

Para a determinação do fenantreno sobrenadante em solução aquosa de HPCD, foram preparadas soluções de fenantreno nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg.L^{-1} em balão volumétrico de 100 mL, a partir da solução estoque de fenantreno (10 g.L^{-1}), dissolvido em acetona. Os volumes necessários foram adicionados aos balões, de acordo com a Tabela 4.

Após a evaporação da acetona, o balão foi completado com HPCD comercial a $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ e agitado para dissolver o fenantreno. Aos tubos de teflon contendo 1 g (peso seco) de cada solo (AP, SL, PAR, TG, TM e JP), adicionaram-se 10 mL das soluções de HPCD contendo as diferentes concentrações de fenantreno. Os tubos foram agitados a 150 rpm por 1 hora e centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração de fenantreno analisada por HPLC. As concentrações iniciais de fenantreno nas soluções sem contato com solo também foram determinadas. Considerou-se a quantidade de fenantreno sorvida como sendo a diferença entre a

concentração inicial na solução e a concentração presente na solução após 1 hora de contato, de acordo com a Equação 12.

$$q = \frac{V \times (C_i - C_f)}{m} \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

q: fenantreno adsorvido (g de fenantreno.g de solo⁻¹)

C_i: Concentração inicial de fenantreno (mg de fenantreno.L⁻¹)

C_{eq}: Concentração de fenantreno no equilíbrio (mg de fenantreno.L⁻¹)

V: Volume da solução (L)

M: Massa do solo (g)

Tabela 4: Cálculo das doses de fenantreno adicionadas aos tubos, a partir da solução-estoque, de forma a se obter as concentrações desejadas de fenantreno

Fenantreno em solução (mg.L ⁻¹)	Volume da solução estoque adicionado (μL)	Concentração final de fenantreno (μg.g de solo ⁻¹)
0	0	0
1	0,1	10
5	0,5	50
10	1,0	100
15	1,5	150
20	2,0	200
25	2,5	250
30	3,0	300

Os resultados de sorção foram ajustados à equação linearizada de Langmuir e de Freundlich. A concentração de fenantreno no sobrenadante foi correlacionada com os valores limiares de detecção de resposta biológica nos solos contaminados com fenantreno, obtidos com os diferentes métodos de extração.

A concentração do fenantreno foi quantificada a partir das áreas dos picos, segundo a interpolação linear do padrão de fenantreno injetado. As curvas de calibração foram preparadas em HPCD, utilizando-se soluções-padrão com concentração de fenantreno entre 0,5 e 15 mg.L⁻¹. As curvas de calibração foram consideradas adequadas quando apresentavam um coeficiente de linearidade maior ou igual a 0,99, conforme apresentado na Figura 1.

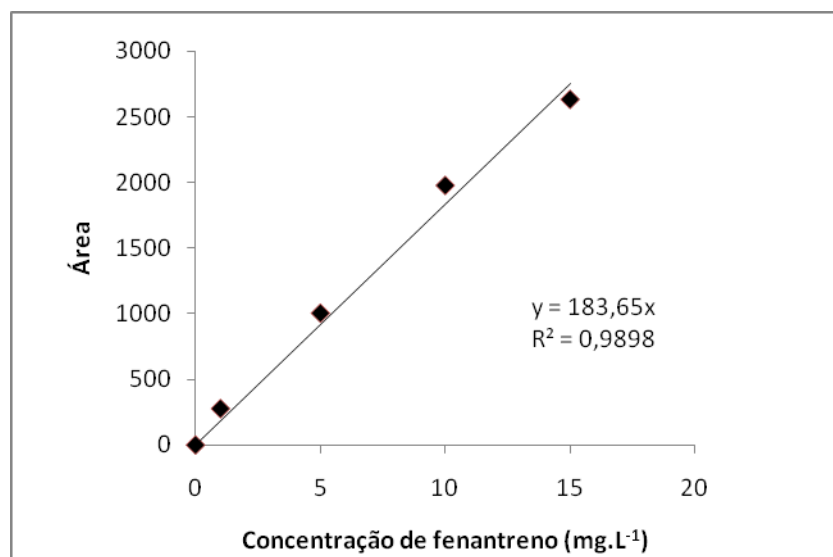


Figura 1: Curva de calibração para o fenantreno em HPCD, utilizada para o cálculo da concentração presente nas amostras de solo.

Os extratos dos solos foram analisados pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Os extratos (30 μ l) foram separados em uma coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 250 mm X 4,6 mm, 30°C), usando-se acetonitrila e água como fase móvel. A separação foi feita em fluxo constante de 1,5 ml.min⁻¹, com eluição isocrática (acetonitrila/água de 60/40). O comprimento de onda do detector foi ajustado para 260 nm.

4.5 Análises Estatísticas

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os erros-padrão foram determinados. O método estatístico empregado para se comparar os teores de fenantreno extraído pelos três extratores foi o da regressão linear (MILLER & MILLER, 1993). As associações entre as doses de fenantreno extraídas e as respostas biológicas variáveis foram medidas pelo coeficiente de correlação sugerido por Pearson.

As equações de regressão linear simples foram ajustadas para se estimar o teor de fenantreno recuperado pelos extratores HPCD, TENAX e ÁGUA como variável das doses de fenantreno aplicadas. Os valores dos coeficientes angulares dessas equações de regressão (declividades Δ fenantreno recuperado pelos extratores/ Δ fenantreno aplicado) foram correlacionados com características dos solos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Solos Estudados

Nesse trabalho foram selecionados seis solos de várias regiões do Estado de Minas Gerais, com diferentes características químicas e físicas, apresentadas na Tabela 2.

Os solos de diferentes localidades geográficas variam muito de composição. Foi observada grande heterogeneidade nas características gerais dos solos estudados, incluindo pH, os teores de Mg e Ca, a CTC, teor de matéria orgânica, os teores de areia, silte e argila e a saturação por bases.

O latossolo é um tipo de solo desenvolvido a partir de material submetido à intensa intemperização, resultando num empobrecimento em sílica e com acúmulo de ferro. O valor de saturação de bases V (%) define se o solo é eutrófico ou distrófico. Se esse valor for menor que 50%, o solo é considerado distrófico. Entre os solos estudados, apenas o solo AP é eutrófico, ou seja, é um solo de alta fertilidade, com saturação por bases de 53%. Os outros solos apresentaram baixos valores de V, indicando um caráter distrófico, altamente intemperizado.

A CTC total indica a carga negativa total existente no solo e a acidez potencial é determinada pela soma das cargas devidas ao Al^{3+} e ao H^+ . Os solos AP e SL apresentaram alta acidez potencial, enquanto que os solos PAR, TG e JP apresentaram acidez potencial média. Apenas o solo TM apresentou baixa acidez potencial.

Os solos SL, AP e PAR apresentaram o maior teor de matéria orgânica (4,96, 4,65 e 4,5 dag.Kg⁻¹, respectivamente), seguidos dos solos TG, JP e TM com menores teores (2,96; 1,5 e 1,2, dag.Kg⁻¹, respectivamente).

Os solos SL, AP, PAR e TG apresentam as maiores percentagens de argila (71, 61, 84 e 74, respectivamente) e as menores de areia (15, 11 e 13, respectivamente). Já os

solos JP e TM são considerados muito arenosos (63 e 54%, respectivamente) e a percentagem de argila é de 32% para o JP e 19% para o TM.

O caráter álico, definido pela quantidade de alumínio retido pela CTC, é expresso pelo valor de m (%). Solos onde m é maior que 50% são chamados de álicos e refletem a saturação das cargas superficiais das argilas por íons Al^{3+} . Entre os solos estudados, o de maior caráter álico foi o JP (84,1%), seguido do TG (58,8%) e do TM (52,6%).

5.2 Determinação das Doses de Alerta para os Métodos de Extração

Para a determinação das doses de alerta de fenantreno presente nas amostras de solo, foram testados três extratores: HPCD, resina TENAX-TA e lixiviação com água. O fenantreno extraído foi normalizado pela massa seca dos solos e expresso em μg de fenantreno $\times g^{-1}$ de massa seca.

5.2.1 Extração de Fenantreno com HPCD

A técnica de extração com HPCD se baseia na transferência de massa da fase sólida para a fase aquosa, mimetizando o processo que governa a biodisponibilidade microbiana. As Tabelas 5 e 6 mostram os valores de fenantreno obtidos no sobrenadante com a extração dos solos por HPCD, após o contato por 5 e 120 dias, respectivamente.

A eficiência de extração do fenantreno dos solos por HPCD nos dois tempos de contato foi estimada comparando-se as declividades das retas obtidas por regressão linear simples (Figura 2). A Tabela 7 mostra os valores das declividades das equações de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) para a extração por HPCD nos solos, em cada tempo de contato.

A partir dos dados apresentados na Tabela 7, pode-se observar que, com 5 dias de contato, a extração do fenantreno por HPCD foi maior nos solos PAR e TG, seguidos pelo AP, JP e TM. O solo SL foi o que mais reteve o fenantreno. Já com 120 dias, a extração do fenantreno foi mais eficiente para o solo AP, seguido pelo TG, SL, PAR, TM e JP.

No geral, a extratibilidade do fenantreno diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em quase todos os solos com o aumento do tempo de contato de 5 para 120 dias. As maiores diferenças foram observadas para os solos JP (2,17 vezes) e PAR (2,11 vezes), seguido pelo TM (1,88 vezes), TG (1,55) e AP (1,38). Entretanto, no solo SL esse efeito não foi observado, sendo que a relação de extração de 5/120 dias foi de 1,0.

Tabela 5: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 5 dias, com HPCD

Fenantreno adicionado (µg.g ⁻¹)	Fenantreno Extraído (µg.g ⁻¹ de massa seca)											
	AP		SL		PAR		TG		TM		JP	
0	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,1)	0,00	(±0,0)
1	0,00	(±0,0)	0,69	(±0,2)	0,00	(±0,0)	1,32	(±0,8)	1,83	(±0,1)	0,25	(±0,2)
10	4,88	(±2,5)	4,59	(±2,1)	0,53	(±0,0)	13,32	(±0,9)	7,45	(±1,1)	2,45	(±0,9)
20	12,88	(±3,7)	7,57	(±0,8)	1,50	(±0,2)	16,63	(±2,8)	11,14	(±0,1)	3,50	(±2,0)
40	28,30	(±4,8)	17,77	(±3,1)	4,82	(±1,5)	31,46	(±7,3)	24,99	(±3,1)	16,64	(±2,3)
70	32,72	(±4,3)	26,19	(±2,1)	13,07	(±2,8)	48,41	(±1,9)	40,29	(±4,1)	46,62	(±21,9)
100	70,75	(±8,2)	46,50	(±1,2)	58,92	(±29,0)	45,11	(±20,5)	59,81	(±3,1)	54,74	(±3,9)
150	101,37	(±10,8)	69,30	(±7,8)	118,16	(±11,4)	115,28	(±4,4)	81,04	(±18,1)	83,36	(±11,2)

Tabela 6: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 120 dias, com HPCD

Fenantreno adicionado (µg.g ⁻¹)	Fenantreno Extraído (µg.g ⁻¹ de massa seca)											
	AP		SL		PAR		TG		TM		JP	
0	0,00	(±0,5)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)
1	0,00	(±0,5)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)	0,00	(±0,0)
10	1,70	(±0,5)	0,77	(±0,1)	0,00	(±0,0)	2,17	(±1,5)	0,00	(±0,0)	1,50	(±0,7)
20	5,09	(±1,5)	4,55	(±0,4)	0,00	(±0,0)	5,22	(±2,2)	1,91	(±0,3)	4,20	(±0,2)
40	16,56	(±6,5)	13,27	(±4,3)	7,08	(±1,0)	12,59	(±2,7)	8,68	(±2,4)	6,61	(±1,7)
70	31,08	(±4,5)	30,00	(±5,0)	7,73	(±0,7)	35,44	(±11,1)	18,45	(±0,6)	20,68	(±5,2)
100	43,63	(±9,5)	49,02	(±8,0)	32,30	(±12,4)	41,15	(±13,3)	33,34	(±2,7)	25,23	(±6,8)
150	75,82	(±23,5)	66,51	(±6,6)	53,26	(±11,1)	72,60	(±13,0)	39,29	(±1,9)	22,11	(±0,5)

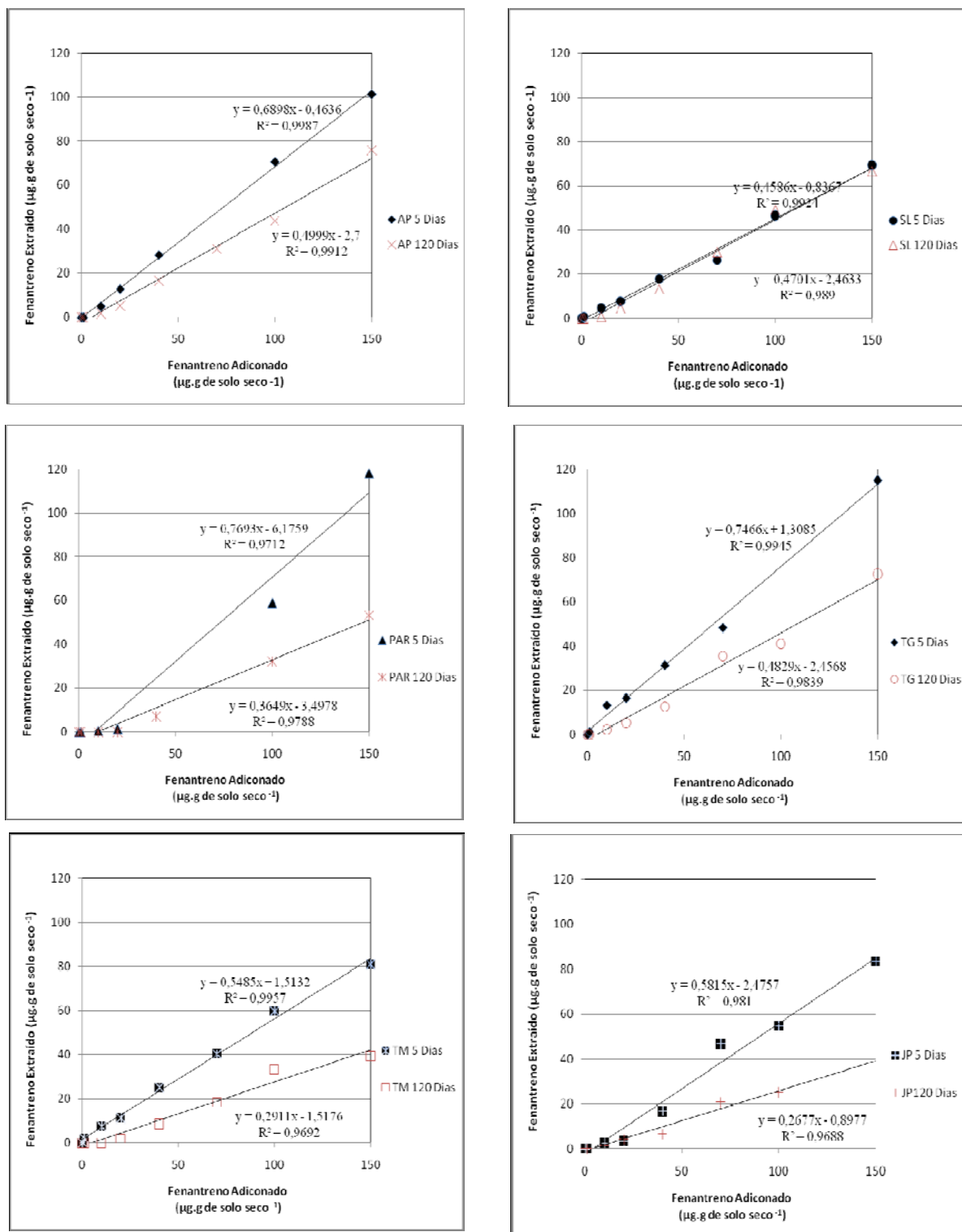


Figura 2: Fenantreno recuperado pela extração por HPCD, em função do fenantreno adicionado aos diferentes solos.

Tabela 7: Comparação entre as inclinações das equações da regressão linear entre as concentrações de fenantreno recuperado por HPCD e fenantreno adicionado aos diferentes solos

SOLO	5D	R ²	120D	R ²
AP	0,6898	0,9987	0,4999	0,9912
SL	0,4586	0,9924	0,4701	0,989
PAR	0,7693	0,9712	0,3649	0,9788
TG	0,7466	0,9945	0,4829	0,9839
TM	0,5485	0,9957	0,2911	0,9692
JP	0,5815	0,981	0,2677	0,9688

5.2.2 Extração de Fenantreno com TENAX

As Tabelas 8 e 9 mostram os valores de fenantreno obtidos no sobrenadante na extração dos solos com TENAX, após o envelhecimento por 5 dias e 120 dias, respectivamente. A eficiência de extração do fenantreno dos solos, nos tempos de contato, foi estimada comparando-se as declividades das retas obtidas por regressão linear simples, representadas (Figura 3).

A Tabela 10 mostra as declividades das equações de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) para a extração por TENAX, em cada tempo de contato. A partir dos dados apresentados nessa tabela, pode-se observar que, com 5 dias, os solos AP e TG foram os que menos retiveram o fenantreno, seguidos pelo TM, JP e SL. O solo PAR foi o que apresentou a maior capacidade de retenção do fenantreno.. Já com 120 dias, a extração do fenantreno foi mais eficiente para o solo TG, seguido por TM, SL, AP e PAR. Em ambos os casos, o solo PAR foi o que mais reteve o fenantreno.

Comparando-se as declividades das equações da regressão linear obtidas para cada solo, verifica-se diferença significativa na recuperação do fenantreno entre 5 e 120 dias para todos os solos, sendo ela mais pronunciada para o AP, que foi 4,7 vezes maior com 5 dias em relação à recuperação, e para o JP, que foi de 3,5 vezes. Para os solos PAR, TG e TM, a diferença de recuperação do fenantreno aos 5 e aos 120 dias foi de aproximadamente 3 vezes, enquanto que para o SL, a relação foi de 2 vezes.

Tabela 8: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído com TENAX dos solos envelhecidos por 5 dias

Fenantreno adicionado ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Fenantreno Extraído ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca)											
	AP		SL		PAR		TG		TM		JP	
0	0,16	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)
1	0,37	($\pm 0,5$)	0,03	($\pm 0,0$)	0,04	($\pm 0,0$)	0,11	($\pm 0,1$)	0,19	($\pm 0,0$)	0,02	($\pm 0,0$)
10	1,33	($\pm 1,0$)	0,35	($\pm 0,2$)	0,18	($\pm 0,0$)	0,73	($\pm 0,1$)	0,71	($\pm 0,1$)	0,23	($\pm 0,1$)
20	2,49	($\pm 0,4$)	0,67	($\pm 0,1$)	0,35	($\pm 0,1$)	1,20	($\pm 0,3$)	1,20	($\pm 0,1$)	0,83	($\pm 0,7$)
40	3,85	($\pm 0,9$)	1,42	($\pm 0,2$)	0,35	($\pm 0,1$)	2,64	($\pm 0,7$)	2,82	($\pm 0,3$)	1,36	($\pm 0,4$)
70	6,25	($\pm 3,6$)	1,73	($\pm 0,6$)	0,57	($\pm 0,2$)	4,46	($\pm 0,2$)	3,67	($\pm 0,5$)	4,63	($\pm 1,5$)
100	16,46	($\pm 3,1$)	3,86	($\pm 0,1$)	0,79	($\pm 0,1$)	4,76	($\pm 2,8$)	6,00	($\pm 0,6$)	3,33	($\pm 1,4$)
150	12,96	($\pm 3,4$)	5,52	($\pm 0,7$)	1,17	($\pm 0,2$)	12,00	($\pm 1,2$)	7,77	($\pm 2,3$)	8,42	($\pm 1,1$)

Tabela 9: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído com TENAX dos solos envelhecidos por 120 dias

Fenantreno adicionado ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Fenantreno Extraído ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca)											
	AP		SL		PAR		TG		TM		JP	
0	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)
1	0,02	($\pm 0,0$)	0,05	($\pm 0,1$)	0,026	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,03	($\pm 0,0$)	0,02	($\pm 0,0$)
10	0,17	($\pm 0,1$)	0,07	($\pm 0,0$)	0,077	($\pm 0,0$)	0,06	($\pm 0,1$)	0,03	($\pm 0,0$)	0,07	($\pm 0,0$)
20	0,35	($\pm 0,3$)	0,33	($\pm 0,1$)	0,072	($\pm 0,0$)	0,17	($\pm 0,0$)	0,20	($\pm 0,1$)	0,45	($\pm 0,4$)
40	0,59	($\pm 0,2$)	0,79	($\pm 0,1$)	0,258	($\pm 0,1$)	0,77	($\pm 0,4$)	0,38	($\pm 0,2$)	0,64	($\pm 0,5$)
70	0,82	($\pm 0,2$)	1,66	($\pm 0,3$)	0,176	($\pm 0,1$)	1,56	($\pm 1,3$)	1,00	($\pm 0,6$)	1,15	($\pm 1,1$)
100	1,13	($\pm 0,5$)	1,55	($\pm 0,5$)	0,288	($\pm 0,1$)	1,65	($\pm 1,5$)	1,31	($\pm 0,5$)	1,02	($\pm 0,4$)
150	2,67	($\pm 0,8$)	2,90	($\pm 0,4$)	0,410	($\pm 0,0$)	3,52	($\pm 0,7$)	3,18	($\pm 0,9$)	0,99	($\pm 0,3$)

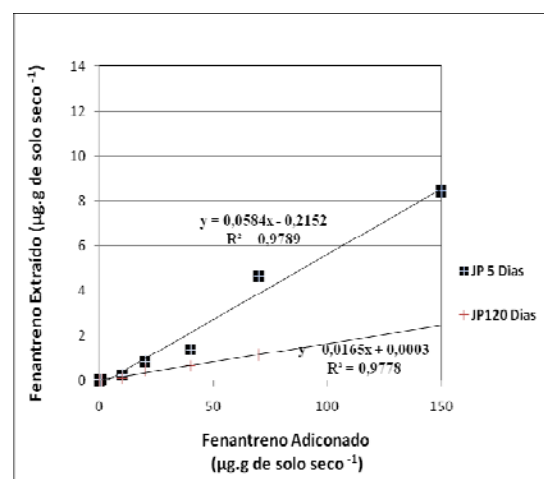
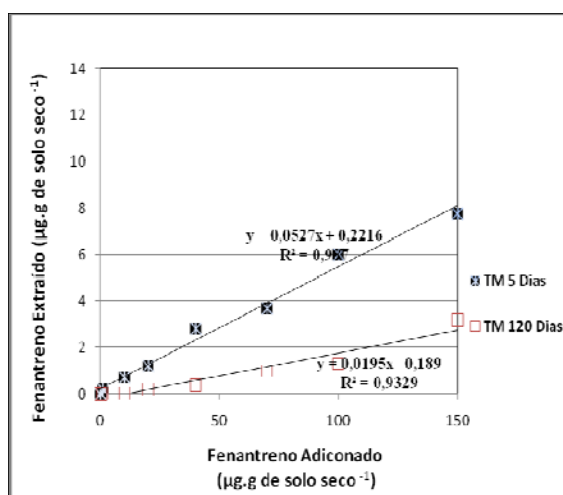
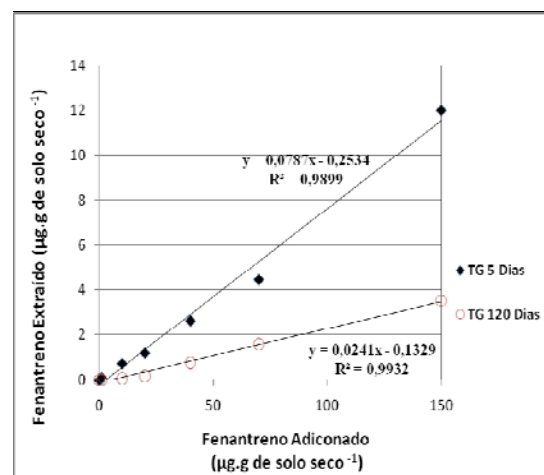
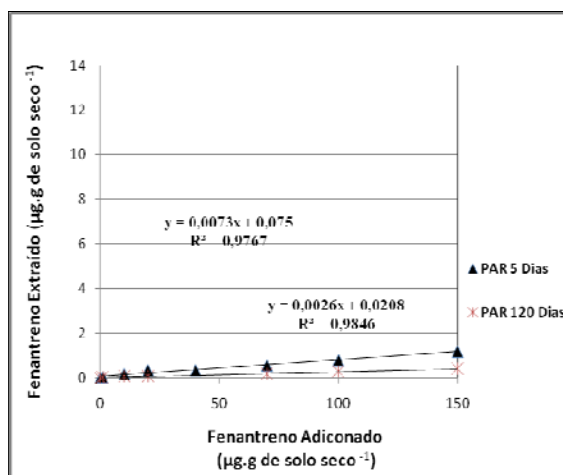
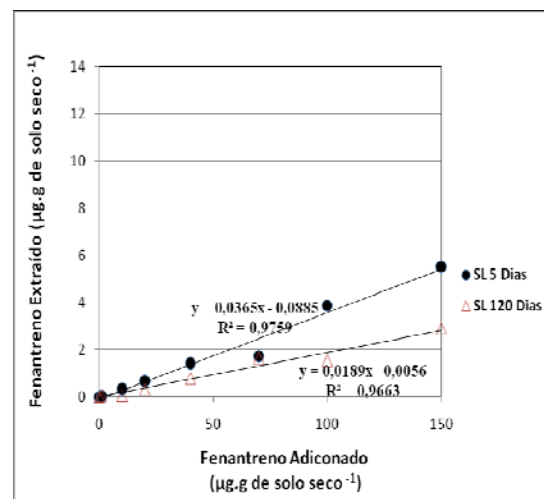
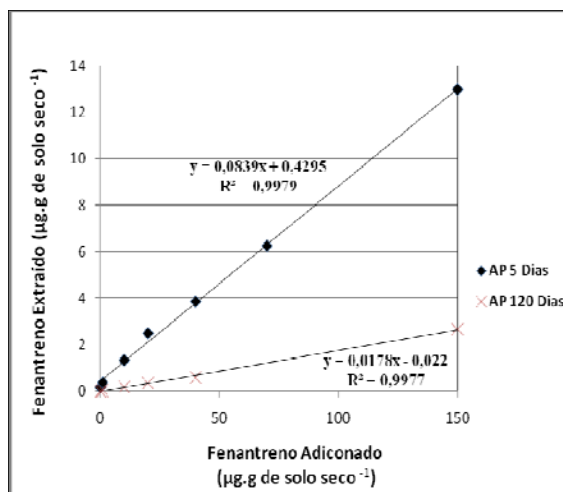


Figura 3: Fenantreno recuperado pela extração por TENAX, em função do fenantreno adicionado aos diferentes solos.

Tabela 10: Comparação entre as inclinações das equações da regressão linear entre as concentrações de fenantreno recuperado por TENAX e fenantreno adicionado aos diferentes solos

SOLO	5D	R ²	120D	R ²
AP	0,0839	0,9979	0,0178	0,9977
SL	0,0365	0,9759	0,0189	0,9663
PAR	0,0073	0,9767	0,0026	0,9846
TG	0,0787	0,9899	0,0241	0,9932
TM	0,0527	0,987	0,0195	0,9329
JP	0,0584	0,9789	0,0165	0,9778

5.2.3 Extração de Fenantreno com ÁGUA

As Tabelas 11 e 12 mostram os valores de fenantreno obtidos no sobrenadante, após a extração dos seis solos com ÁGUA, nos tempos de contato de 5 dias e 120 dias, respectivamente. Na Figura 4 está a representação gráfica dos resultados, que compara as inclinações das equações de regressão linear das extrações de fenantreno com ÁGUA, nos diferentes solos, nos tempos de contato.

A Tabela 13 mostra as declividades das equações de regressão linear e os coeficientes de determinação (R²) para a extração por ÁGUA, em cada tempo de contato. A partir dos dados apresentados nessa tabela, pode-se observar que, com 5 dias, o solo SL foi o que menos reteve o fenantreno, seguido por JP, AP, TM e TG. O solo PAR foi o que apresentou a maior retenção do fenantreno. Com 120 dias, a extração do fenantreno com ÁGUA foi mais eficiente para o solo AP, seguido por TM e PAR, SL e JP, sendo que o TG foi o que mais reteve o fenantreno.

Foi observada diferença significativa na relação entre a extração do fenantreno por ÁGUA aos 5 e aos 120 dias para todos os solos. A extração no solo SL após 5 dias de contato foi 16 vezes maior que aos 120 dias. No solo JP, essa diferença foi de 10 vezes, seguido pelo solo TG (5 x), PAR (2 x), AP (1,6 x) e TM (1,3 x).

Tabela 11: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 5 dias, com ÁGUA

Fenantreno adicionado ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Fenantreno Extraído ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca)											
	AP		SL		PAR		TG		TM		JP	
0	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)
1	0,00	($\pm 0,0$)	0,22	($\pm 0,0$)	0,38	($\pm 0,0$)	0,15	($\pm 0,0$)	0,19	($\pm 0,0$)	0,01	($\pm 0,1$)
10	0,96	($\pm 0,1$)	0,46	($\pm 0,1$)	0,43	($\pm 0,0$)	0,26	($\pm 0,0$)	0,18	($\pm 0,0$)	0,32	($\pm 0,0$)
20	1,03	($\pm 0,2$)	0,49	($\pm 0,1$)	0,52	($\pm 0,0$)	0,35	($\pm 0,0$)	0,58	($\pm 0,1$)	2,79	($\pm 2,6$)
40	1,46	($\pm 0,2$)	10,80	($\pm 0,9$)	0,60	($\pm 0,1$)	0,53	($\pm 0,0$)	1,06	($\pm 0,5$)	1,92	($\pm 0,7$)
70	1,93	($\pm 0,2$)	13,67	($\pm 1,9$)	1,24	($\pm 0,2$)	0,81	($\pm 0,2$)	2,54	($\pm 0,5$)	2,58	($\pm 0,4$)
100	5,35	($\pm 0,2$)	14,24	($\pm 0,6$)	2,95	($\pm 0,1$)	2,99	($\pm 0,1$)	4,75	($\pm 0,2$)	6,80	($\pm 0,6$)
150	9,84	($\pm 1,2$)	16,85	($\pm 1,5$)	5,05	($\pm 0,2$)	5,50	($\pm 0,4$)	6,25	($\pm 0,3$)	12,25	($\pm 1,7$)

Tabela 12: Média ($\pm$ desvio padrão) do fenantreno extraído dos solos envelhecidos por 120 dias, com ÁGUA

Fenantreno adicionado ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Fenantreno Extraído ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca)											
	AP		SL		PAR		TG		TM		JP	
0	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)
1	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,38	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)
10	0,20	($\pm 0,0$)	0,29	($\pm 0,0$)	0,43	($\pm 0,0$)	0,20	($\pm 0,0$)	0,00	($\pm 0,0$)	0,16	($\pm 0,0$)
20	0,34	($\pm 0,0$)	0,57	($\pm 0,1$)	0,52	($\pm 0,0$)	0,18	($\pm 0,0$)	0,44	($\pm 0,1$)	0,26	($\pm 0,0$)
40	0,52	($\pm 0,1$)	0,60	($\pm 0,1$)	0,60	($\pm 0,1$)	0,24	($\pm 0,1$)	1,01	($\pm 0,2$)	0,32	($\pm 0,0$)
70	0,75	($\pm 0,1$)	0,68	($\pm 0,1$)	1,24	($\pm 0,2$)	0,22	($\pm 0,1$)	2,00	($\pm 0,2$)	0,71	($\pm 0,0$)
100	3,49	($\pm 0,7$)	0,92	($\pm 0,0$)	2,95	($\pm 0,1$)	0,73	($\pm 0,4$)	3,63	($\pm 0,1$)	0,90	($\pm 0,2$)
150	5,51	($\pm 0,7$)	1,13	($\pm 0,2$)	5,05	($\pm 0,2$)	1,07	($\pm 0,1$)	4,87	($\pm 0,4$)	1,05	($\pm 0,13$)

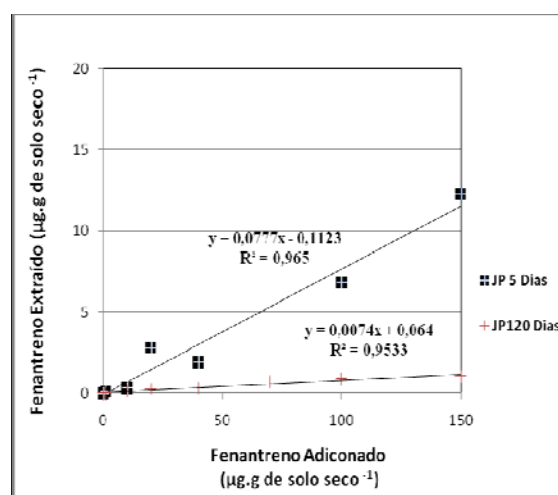
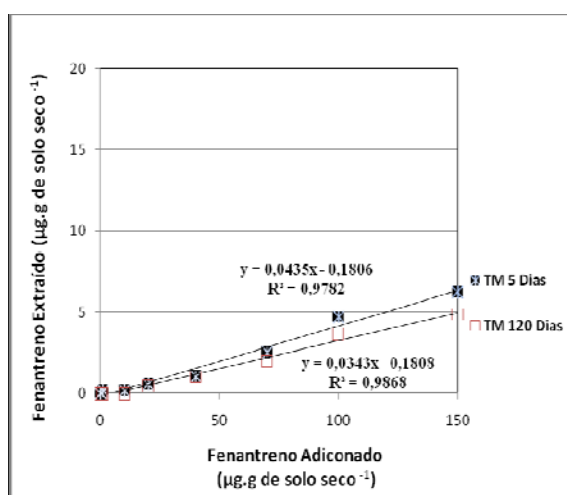
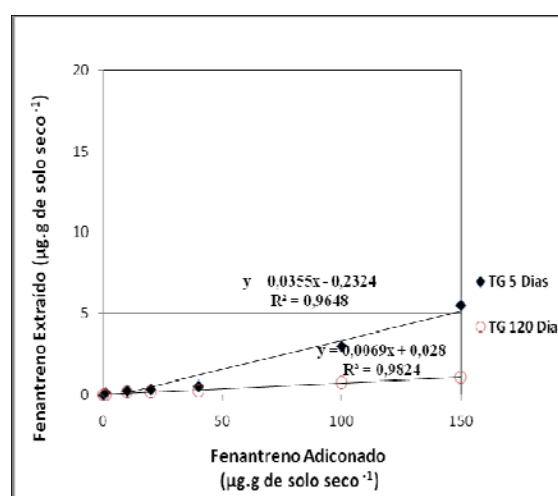
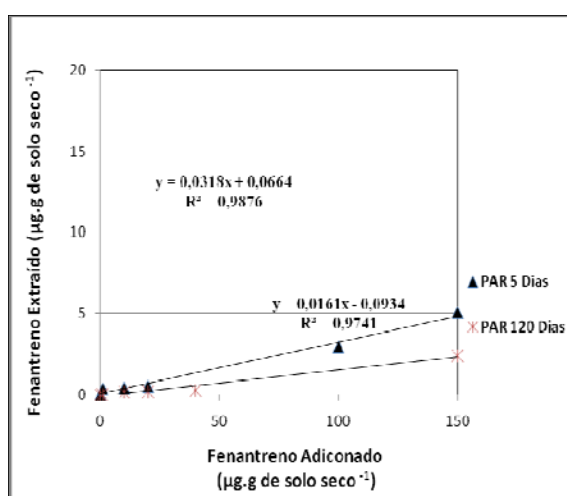
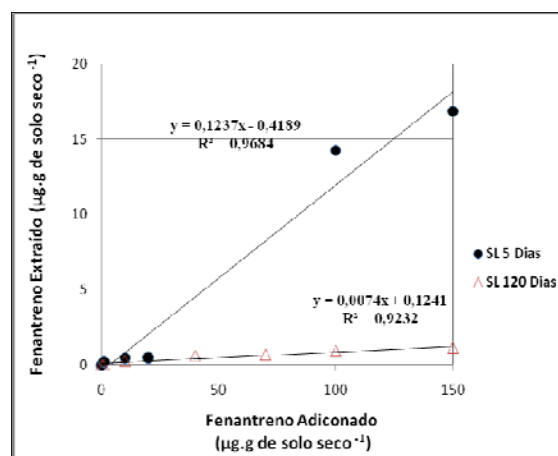
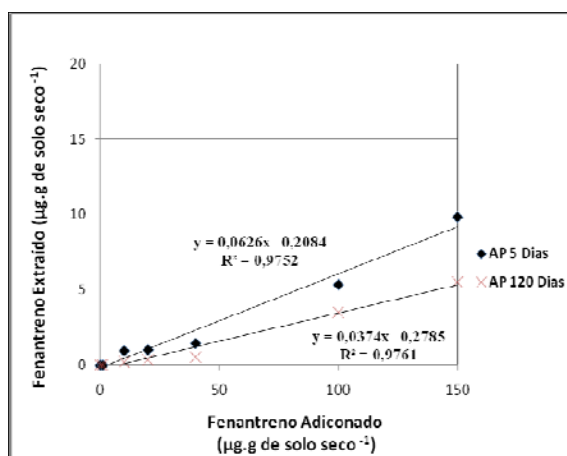


Figura 4: Fenantreno recuperado pela extração por ÁGUA, em função do fenantreno adicionado aos diferentes solos.

Tabela 13: Comparação entre as inclinações das equações da regressão linear entre as concentrações de fenantreno recuperado por ÁGUA e fenantreno adicionado aos diferentes solos

SOLO	5D	R ²	120D	R ²
AP	0,0626	0,9752	0,0374	0,9761
SL	0,1237	0,9684	0,00742	0,9232
PAR	0,0318	0,9876	0,0161	0,9741
TG	0,0355	0,9648	0,0069	0,9824
TM	0,435	0,9782	0,0343	0,9533
JP	0,0777	0,965	0,0074	0,9533

5.2.4 Eficiência de Extração de Fenantreno Pelos Três Extratores

A eficiência dos extratores foi avaliada por meio de análise do coeficiente de variabilidade (CV%) do fenantreno extraído com 5 e 120 dias de contato, análise de correlação de Pearson entre os extratores e entre as declividades das curvas de regressão. A influência do tempo de contato na extração do fenantreno foi avaliada pela relação entre a quantidade de fenantreno extraída com 5 e com 120 dias.

A sensibilidade do método de extração, em cada tempo de contato, foi avaliada comparando-se a média das declividades das curvas de regressão linear entre os teores de fenantreno extraído pelos diferentes extratores e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solo. A Tabela 14 mostra os valores de declividades média, máxima e mínima, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%) para os diferentes extratores, nos dois tempos de contato.

O Coeficiente de Variação de Pearson, ou simplesmente coeficiente de variabilidade, mede a dispersão em torno da média aritmética em termos relativos e pode ser expresso em porcentagem. Quanto menor for o valor do coeficiente de variabilidade, menor será a dispersão dos dados em torno da média aritmética, ou seja, mais representativa ela será. No caso das extrações de fenantreno pelos extratores, ele indica a sensibilidade do método de extração, em relação aos solos.

Os dados da Tabela 14 mostram que a recuperação do fenantreno diminui com o aumento do tempo de contato com os solos para os três extratores. As menores variabilidades foram obtidas para o HPCD, que também foi o que mais extraiu fenantreno dos solos. Os baixos valores de CV (19,4% e 25% para 5 e 120 dias, respectivamente) para a extração com HPCD indica que esse extrator tem uma

tendência a uniformizar a extração nos diferentes solos, sendo o menos influenciado pelo tempo de contato do fenantreno, ou seja, é o menos sensível ao envelhecimento do composto. Para a extração com TENAX e ÁGUA, os CVs obtidos com 5 dias foram maiores que com HPCD e muito similares (53,5 e 55,5, respectivamente), indicando maior sensibilidade desses métodos em relação ao HPCD. Entretanto, houve diminuição do CV para o TENAX com 120 dias de contato (44,1%), em relação ao tempo de 5 dias. A ÁGUA foi o método que apresentou maior sensibilidade em relação ao tempo de contato do fenantreno com os solos.

A capacidade de recuperação do fenantreno aplicado ao solo foi bem diferenciada entre os extratores usados, variando o CV médio na seguinte ordem: ÁGUA > TENAX > HPCD. De um modo geral, as quantidades de fenantreno extraídas pelos diferentes métodos variaram em termos relativos, em função das doses e do tempo de contato do fenantreno com os solos.

Tabela 14. Valores das declividades média, máxima e mínima, do desvio padrão e do coeficiente de variação (CV%) das equações de regressão linear entre o teor de fenantreno extraído pelos diferentes extratores e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solos, nos dois tempos de contato.

Parâmetro	HPCD		TENAX		AGUA	
	5 Dias	120 Dias	5 Dias	120 Dias	5 Dias	120 Dias
Média ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,6324	0,3961	0,0529	0,0166	0,0625	0,0183
Máxima ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,7693	0,4999	0,0839	0,0241	0,1237	0,0374
Mínima ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,4586	0,2677	0,0073	0,0026	0,0318	0,0069
Desvio Padrão ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,1224	0,1022	0,0283	0,0073	0,0347	0,0141
CV (%)	19,4	25,8	53,5	44,1	55,5	77,2
CV(%) Médio*	22,6	-	48,8	-	66,4	-

* CV(%) Médio por extração

A influência do tempo de contato na extração do fenantreno pelos extratores foi avaliada pela relação entre as declividades das equações de regressão da extração do fenantreno dos solos com 5 e com 120 dias, cujos resultados estão apresentados na Tabela 15. Essa relação mostra o quanto a declividade está sendo influenciada pelo tempo. De acordo com os resultados, o HPCD não é influenciado pelo tempo. Em média, a tendência desse extrator é recuperar 1,68% de fenantreno a mais com 5 dias do que com 120 dias. Já o TENAX recupera 3,16% a mais com 5 dias, em relação a 120

dias. A extração com ÁGUA é extremamente variável, mas muito sensível, pois reflete como o solo está sendo influenciado pela sorção do fenantreno.

Tabela 15: Relação entre as declividades das equações de regressão da extração do fenantreno dos solos com 5 e 120 dias

Relação entre as declividades 5/120 Dias			
SOLO	HPCD	TENAX	AGUA
AP	1,38	4,71	1,67
SL	0,98	1,93	16,72
PAR	2,11	2,81	1,98
TG	1,55	3,27	5,14
TM	1,88	2,70	1,27
JP	2,17	3,54	10,50
Máximo	0,98	1,93	1,27
Mínimo	2,17	4,71	16,72
Média	1,68	3,16	6,21
Desvio Padrão	0,46	0,94	6,21
CV(%)	27,6	29,7	100,0

A Tabela 16 mostra a correlação entre as declividades das equações de regressão linear entre as concentrações de fenantreno extraído e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solos, obtidos com os três extratores aos 5 e aos 120 dias, e independentemente do tempo de contato. De acordo com os dados dessa tabela, a correlação entre as declividades das curvas de regressão linear obtidas com os diferentes extratores, em cada tempo, não foi estatisticamente significativo, à exceção do HPCD x ÁGUA com 5 dias (-0,8058, $p < 0,15$). Já as correlações entre as declividades das curvas de regressão obtidas com os diferentes extratores, independentemente do tempo, foram significativas entre o HPCD x TENAX ($< 0,05$) e para TENAX x ÁGUA ($p < 0,15$).

A Figura 5 mostra a relação entre as declividades das curvas de regressão linear entre a concentração de fenantreno extraído por HPCD (Figura 2) e ÁGUA (Figura 4) e a dose de fenantreno aplicada aos solos, após 5 dias de contato. De acordo com essa Figura pode-se concluir que, com 5 dias de contato, o solo em que se obteve a maior extração por HPCD foi o que apresentou a menor extratibilidade de fenantreno com ÁGUA, indicando que ambos os extratores extraem o fenantreno por diferentes mecanismos.

Tabela 16: Coeficientes de correlação entre as declividades das equações de regressão linear entre as concentrações de fenantreno extraído e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solos, obtidos com os três extratores aos 5 e aos 120 dias, e independentemente do tempo de contato

Extrator	Correlação das Declividades					
	5 Dias		120 dias		Independente do tempo	
	TENAX	ÁGUA	TENAX	ÁGUA	TENAX	ÁGUA
HPCD 5 D	0,062	-0,806	—	—	—	—
TENAX 5 D	—	-0,043	—	—	—	—
HPCD 120 D	—	—	0,292	-0,004	—	—
TENAX 120 D	—	—	—	-0,018	—	—
HPCD	—	—	—	—	0,567	0,231
TENAX	—	—	—	—	—	0,447

Os valores marcados em negrito são significativos a $p < 0,15$ ($n=35$)

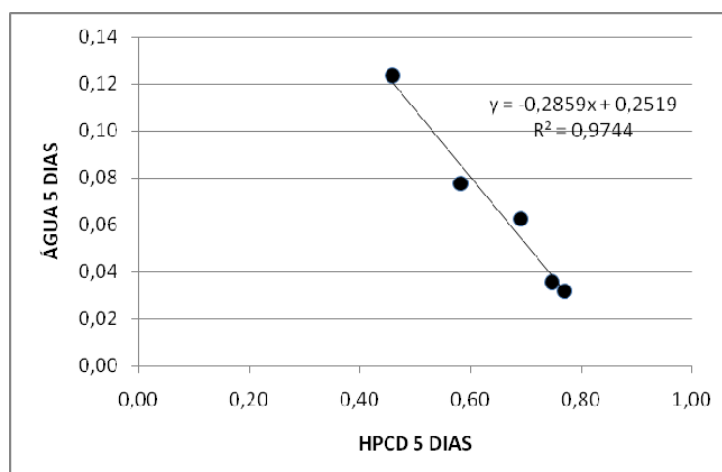


Figura 5: Declividades das equações de regressão linear entre as concentrações de fenantreno extraído por HPCD e ÁGUA e a dose de fenantreno aplicada aos solos, após 5 dias de contato.

A Tabela 17 mostra a matriz de correlação entre os teores de fenantreno obtidos pelos extratores, em cada tempo de contato, independentemente do tipo de solo. Todas as correlações foram positivas e significativas ($p > 0,001$), indicando que existe forte interação entre todos os parâmetros testados. Entretanto, não é possível prever, separadamente, quais interações estão ocorrendo.

5.2.5 Relação Entre os Atributos dos Solos e a Extração de Fenantreno pelos Extratores

A adsorção e a biodisponibilidade de poluentes orgânicos hidrofóbicos em solos têm sido relacionadas principalmente à matéria orgânica do solo (van GESTEL & van

DIS, 1988; van GESTEL, 1997; CORTES *et al.*, 1991; GRATHWOHL, 1990; PIGNATELLO, 1998). Na maioria dos trabalhos sobre esse assunto, os pesquisadores utilizam solos artificiais OECD, que são compostos de mistura de quartzo, argila e turfa de *Sphagnum* (OECD, 1984b). Esse solo foi criado para padronizar os experimentos e gerar dados reprodutíveis e comparáveis. Entretanto, as propriedades dos solos artificiais e naturais variam e levam a diferenças substanciais no comportamento de certos contaminantes, que são atribuídas ao alto nível de matéria orgânica presente no solo artificial (van GESTEL & van DIS, 1988; van GESTEL & MA, 1990; AMORIM *et al.*, 1999, 2002b; LOCK *et al.*, 2002). Por outro lado, o efeito da argila também é indicado como um atributo do solo que contribui para a adsorção de contaminantes orgânicos, cuja extensão ainda precisa ser melhor investigada (PIGNATELLO, 1998; LUTHY *et al.*, 1997; HOFMAN, 2007).

Para se identificar os atributos dos solos que afetam a extração do fenantreno pelos extratores, foram feitas análises de correlação entre as declividades das equações das retas dos extratores, em cada tempo de contato, e os valores desses atributos, a saber: pH em água 1:2,5, teores de matéria orgânica, fósforo e potássio, fósforo remanescente, Al^{3+} , H^+Al , CTC, V, m, areia, silte e argila. Os resultados estão apresentados na Tabela 18 e mostram que as declividades se relacionam fracamente com as características dos solos. Apenas a extração com HPCD após 120 dias de contato apresentou correlação com vários desses atributos: matéria orgânica, P remanescente, CTC, M, silte e argila.

As correlações entre as relações das declividades após 5 e 120 dias de contato para as características dos solos, ou seja, independentes do tempo de contato, também foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Tabela 19. De maneira similar, os valores mostraram que a capacidade de extração de fenantreno pelos diferentes extratores se correlaciona fracamente com os atributos dos solos.

HOFMAN *et al.* (2007) compararam o comportamento do fenantreno em solos artificiais e naturais, usando o carbono orgânico total como base de extrapolação. Os autores verificaram que a fração extraível por HPCD seguia o modelo de particionamento descrito por REID *et al.*, (2000a) e SEMPLE *et al.*, (2003). Entretanto, a extração foi bastante diferente entre os solos artificiais e naturais contendo o mesmo teor de carbono orgânico. Assim, os autores provaram que a mesma quantidade de carbono orgânico não implica no mesmo comportamento do fenantreno nos solos.

Como consequência, a extrapolação da extração e biodisponibilidade entre solos não deve se basear apenas na matéria orgânica, mas também nas suas propriedades. Dada a baixa correlação entre a extração do fenantreno pelos extratores testados e as características dos solos, não foi possível se determinar qual atributo do solo afetou consistentemente a extração do fenantreno pelos extratores testados.

Tabela 17: Coeficientes de correlação entre os teores de fenantreno obtidos pelos extratores em cada tempo de contato, independentemente do tipo de solo

	HPCD 5 D	HPCD 120 D	TENAX 5 D	TENAX 120 D	AGUA 5 D	AGUA120D
HPCD 5 D	1,000	0,9477	0,8351	0,832	0,6931	0,7756
HPCD 120 D	0,9447	1,000	0,8716	0,8943	0,8592	0,7235
TENAX 5 d	0,8351	0,8716	1,000	0,9218	0,6506	0,7811
TENAX 120 D	0,832	0,8943	0,9218	1,000	0,7845	0,7131
AGUA 5 D	0,6931	0,8592	0,6506	0,7845	1,000	0,5542
AGUA 120 D	0,7756	0,7235	0,7811	0,7131	0,5542	1,000

Os valores marcados em negrito são significativos a $p < 0,15$ ($n=35$).

Tabela 18: Coeficientes de correlação entre as declividades das extrações de fenantreno, em cada tempo de contato e as características dos solos

Variáveis	pH ⁽¹⁾	Mat. Orgânica ⁽²⁾	P ⁽³⁾	K ⁽³⁾	Prem ⁽⁴⁾	Al ³⁺ ⁽⁵⁾	H ⁺ Al ⁽⁵⁾	CTC ⁽⁵⁾	V ⁽⁶⁾	M ⁽⁶⁾	Areia ⁽⁶⁾	Silte ⁽⁶⁾	Argila ⁽⁶⁾
HPCD5d	0,4431	0,1793	-0,3672	-0,2349	-0,4867	-0,3452	0,1212	0,0476	0,0888	0,0488	-0,5297	0,1408	0,5022
HPCD120D	0,615	0,763	0,6424	0,2835	-0,8027	-0,4972	0,4846	0,7117	0,5824	-0,7363	-0,8137	0,5299	0,707
TENAX5d	0,293	-0,2483	0,3599	0,8857	0,1946	-0,3153	-0,281	-0,0362	0,4382	-0,12	0,1551	0,1099	-0,2828
TENAX120D	-0,105	-0,3265	0,3014	0,7624	0,2802	-0,1778	-0,2533	-0,1483	0,0709	-0,0133	0,2559	-0,2562	-0,342
AGUA5d	-0,2433	0,3009	0,7168	0,1336	0,0221	0,4596	0,4327	0,5358	0,1908	-0,2894	0,1227	0,2159	-0,0199
AGUA120D	0,7035	-0,0432	0,1535	0,5528	0,1933	-0,7232	-0,7056	-0,2622	0,6009	-0,5058	0,0682	0,4955	-0,3674

Os valores marcados em negrito são significativos a $p < 0,15$ ($n=6$)

⁽¹⁾ pH em água 1:2,5; ⁽²⁾ Dag.kg⁻¹; ⁽³⁾ mg.dm⁻³; ⁽⁴⁾ mg.L⁻¹; ⁽⁵⁾ cmolc.dm⁻³; ⁽⁶⁾ %

Tabela 19: Coeficientes de correlação entre as declividades das extrações de fenantreno e algumas características dos solos, independentemente do tempo de contato

Variáveis	pH ⁽¹⁾	Mat. Orgânica ⁽²⁾	P ⁽³⁾	K ⁽³⁾	Prem ⁽⁴⁾	Al ³⁺ ⁽⁵⁾	H ⁺ Al ⁽⁵⁾	CTC ⁽⁵⁾	V ⁽⁶⁾	M ⁽⁶⁾	Areia ⁽⁶⁾	Silte ⁽⁶⁾	Argila ⁽⁶⁾
HPCD	-0,3301	-0,6063	-0,7919	-0,4074	0,4739	0,3221	-0,3427	-0,6017	-0,4784	0,7359	0,4693	-0,3938	-0,3674
TENAX	0,6101	-0,158	0,2653	0,5547	0,0164	-0,2769	-0,1651	0,1321	0,6676	-0,1973	-0,0156	0,5261	-0,0896
AGUA	-0,5599	0,1795	0,4297	-0,1361	-0,139	0,6786	0,5955	0,4536	-0,1887	0,0581	0,115	-0,1378	0,0966

Os valores marcados em negrito são significativos a $p < 0,15$ (n=6)

⁽¹⁾ pH em água 1:2,5; ⁽²⁾ Dag.kg⁻¹; ⁽³⁾ mg.dm⁻³; ⁽⁴⁾ mg.L⁻¹; ⁽⁵⁾ cmolc.dm⁻³; ⁽⁶⁾ %

5.3 Desenvolvimento da Metodologia de Determinação do Fenantreno Sobrenadante

5.3.1 Ensaios de Sorção de Fenantreno em Solução Aquosa com CaCl_2

Para quantificar o fenantreno remanescente em solução, tentou-se introduzir o método de micro-extração por fase sólida (SPME), utilizando-se a resina de polydimethylsiloxane (PDMS). A SPME é considerada, na literatura, uma das técnicas mais promissoras para preparação de amostras sem o uso de solventes (NAMIESNIK *et al.*, 2005). A SPME é usada tanto para amostragem quanto para isolamento e enriquecimento de uma grande variedade de analitos, presentes em amostras gasosas, líquidas ou sólidas. A amostragem do analito é baseada no transporte e sorção em uma camada fina de uma fase estacionária revestida pelo SPME. A fase estacionária age como uma esponja, concentrando os analitos na sua superfície, que podem então ser transferidos para o cromatógrafo líquido ou gasoso. O equipamento usado para a amostragem em SPME não é complicado, mas a amostragem requer que o equilíbrio seja alcançado e por isso não pode ser usado para monitoramento de longo tempo.

Inicialmente foi necessário padronizar a metodologia de extração de fenantreno e sua quantificação por CG utilizando-se a fibra de PDMS, otimizando-se a curva de calibração e analisando-se o fenantreno no sobrenadante. Entretanto, vários problemas foram detectados em sua utilização. Não foi obtida reprodutibilidade dos resultados da curva de calibração. Além disso, foi observada a presença de fenantreno não-solubilizado em suspensão.

Foram analisadas várias possibilidades de erros: contaminação da barra magnética ou da fibra de PDMS por fenantreno, variações na temperatura e tempo de extração. Assim, procedeu-se a uma extração em água apenas, sem a barra magnética, mas não se observou reprodutibilidade nos resultados. A fibra de PDMS não estava contaminada com quantidades significativas de fenantreno e o controle rigoroso do tempo e temperatura de extração não alterou os resultados.

Durante a tentativa de se usar o PDMS, vários problemas foram identificados. O principal deles foi a incerteza em relação a dois requerimentos necessários para equilibrar as amostras: o primeiro foi a adsorção sobre a superfície do polímero e a sujeira da fibra ao se analisar as amostras expostas aos solos. A superfície do PDMS

exposta pode atrair material particulado e outros compostos extraídos do solo, comprometendo a quantificação do fenantreno. A retirada dessa sujeira antes da análise pode remover também o HPA, interferindo na análise.

O outro problema refere-se à confirmação do equilíbrio, que deve ser feito pelo monitoramento constante da cinética de adsorção na fibra. Esse procedimento multiplicaria o número de análises, aumentando muito seu custo. Além disso, o limite do método de quantificação fica prejudicado pela necessidade de se quantificar os níveis de sub-equilíbrio do fenantreno. Por último, a cinética de adsorção é pouco reprodutível, como observado durante as tentativas de se proceder às análises. Assim, esses possíveis erros e complicações comprometem a confiabilidade do método e a validação dos resultados. Dada a instabilidade do fenantreno no meio aquoso e a dificuldade em se padronizar a curva de calibração, os testes passaram a ser realizados em solução aquosa de HPCD comercial e as análises a serem feitas por HPLC.

O trabalho de LIU & LEE (1997) mostrou que a quantidade extraída pela camada porosa do PDMS depende do coeficiente de distribuição do analito entre a fase da camada porosa e a matriz água. A diminuição da solubilidade em água do analito gera aumento no coeficiente de distribuição (K_d) e, assim, da quantidade extraída. A adição de sais à água da solução geralmente diminui a solubilidade dos compostos orgânicos na água e isso vem sendo usado para se aumentar a extração de analitos pelas fibras cobertas com polímeros. Entretanto, o efeito da força iônica na extração mostrou que a massa extraída pela camada porosa aumentou com o aumento da força iônica apenas em baixas concentrações de cloreto de sódio. Uma concentração maior que 5% (p/v) diminuiu a massa extraída. Em condições extremas, aonde a solução foi saturada com NaCl, a extração caiu muito, principalmente para PAHs maiores que o naftaleno. O K_d do antraceno diminuiu com o aumento da força iônica e apenas 20% foram extraídos em solução saturada de NaCl, quando comparada com solução sem a adição do sal. Esses resultados foram muito diferentes dos obtidos por PAWLISZYN (1997) que demonstrou que a quantidade extraída aumentou com o aumento da concentração de sais até que a extração máxima foi alcançada na concentração de saturação.

As características intrínsecas das amostras são também relevantes durante a extração por PDMS, uma vez que a massa do(s) composto(s) extraído(s) pela fibra é função do volume da amostra e da concentração inicial. Outro parâmetro importante é o efeito da força iônica, já que a adição de um eletrólito forte (ex. NaCl) pode modificar o

processo sortivo, diminuindo drasticamente a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na matriz da amostra, fenômeno designado por *salting out*, resultando no aumento dos Kds e conseqüentemente numa maior apetência dos mesmos pelo revestimento da fibra. É de se realçar que durante o processo extrativo, o pH pode ter igualmente influência nas características químicas dos analitos e, conseqüentemente, ser decisivo na apetência para com o material de revestimento da fibra.

5.3.2 Ensaio de Sorção do Fenantreno em solução aquosa de HPCD

Os resultados da sorção e da recuperação do fenantreno nos 6 solos estudados estão apresentados na Tabela 20. A Figura 6 mostra as isotermas de sorção obtidas para cada solo.

As curvas de sorção do fenantreno aos solos (Figura 6) não seguiram a tendência de algumas curvas de sorção apresentadas na literatura para compostos apolares, que têm sido reportadas como isotermas do tipo L (Langmuir) ou C (partição constante) (MEANS *et al.*, 1980; MCCARTHY & JIMENEZ, 1985; MAGEE *et al.*, 1991; RAV-ACHA & REBHUN, 1992). As isotermas obtidas nesse estudo indicam uma tendência à isoterma de sorção do tipo S (sigmoidal), que também foram observadas para compostos orgânicos apolares (MAO *et al.*, 2002; D'AGOSTINHO & FLUES, 2006). Entretanto, até o momento ainda não foi estabelecido um conceito claro para se explicar o comportamento de interação de compostos orgânicos apolares com o solo.

Os mecanismos de interação e comportamentos das curvas de sorção para compostos orgânicos apolares ainda não foram bem esclarecidos. A maioria dos estudos realiza os experimentos em meio aquoso e utilizam como adsorvedor solo artificial ou argilominerais específicos e ácido húmico puro que, na realidade, não representam fielmente o solo natural (D'AGOSTINHO & FLUES, 2006). Assim, fica difícil comparar os resultados deste trabalho com os obtidos por outros autores, pois foram utilizados solos naturais e experimentos de sorção realizados em meio água/HPCD.

Tabela 20: Resultados de sorção do fenantreno, em solução aquosa de HPCD, por 6 solos

Aplicado	Recuperado		Adsorção		Aplicado	Recuperado		Adsorção		Aplicado	Recuperado		Adsorção	
(Ci) $\mu\text{g.g}^{-1}$	(Cf) $\mu\text{g.L}^{-1}$	%	Q ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	%	(Ci) $\mu\text{g.g}^{-1}$	(Cf) $\mu\text{g.L}^{-1}$	%	Q ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	%	(Ci) $\mu\text{g.g}^{-1}$	(Cf) $\mu\text{g.L}^{-1}$	%	Q ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	%
	SOLO	AP				SOLO	SL				SOLO	PAR		
15,07	0,75	4,99	7,58	49,68	15,57	0,35	2,26	10,06	35,39	14,24	0,16	1,11	12,75	10,47
68,61	4,59	6,70	22,90	66,62	58,09	1,83	3,16	43,93	24,38	52,11	0,62	1,19	46,21	11,34
96,82	5,30	5,47	44,06	54,49	94,32	3,12	3,31	69,09	26,75	100,48	1,16	1,15	89,52	10,91
153,89	10,59	6,88	48,57	68,44	163,14	4,09	2,51	103,07	36,82	110,43	3,02	2,74	87,02	21,20
195,96	13,24	6,76	64,86	66,90	175,44	4,58	2,61	110,09	37,25	171,68	3,39	1,98	140,93	17,91
237,88	14,91	6,27	90,42	61,99	257,08	6,37	2,48	173,82	32,39	273,55	5,05	1,85	221,09	19,18
304,17	16,38	5,39	141,97	53,33	300,24	7,24	2,41	153,42	48,90	283,42	7,02	2,48	215,94	23,81
	SOLO	TG				SOLO	TM				SOLO	JP		
15,50	0,55	3,52	12,06	22,19	14,92	0,45	3,03	10,46	29,87	13,30	0,83	6,24	5,97	55,12
57,25	1,37	2,40	39,85	30,40	68,95	3,63	5,26	32,65	52,65	47,04	2,62	5,57	24,46	48,00
92,62	2,42	2,62	63,36	31,59	96,33	4,71	4,89	49,71	48,40	102,64	6,92	6,74	36,73	64,22
162,36	5,95	3,67	122,19	24,74	153,14	8,63	5,63	67,80	55,73	131,44	9,34	7,10	45,46	65,41
163,23	5,71	3,50	129,66	20,56	195,96	10,54	5,38	91,58	53,27	176,08	8,92	5,07	91,16	48,23
245,74	7,59	3,09	194,01	21,05	236,69	10,91	4,61	129,14	45,44	240,53	11,60	4,82	134,67	44,01
287,60	14,07	4,89	228,15	20,67	304,20	13,67	4,50	168,62	44,57	273,98	11,96	4,37	162,66	40,63

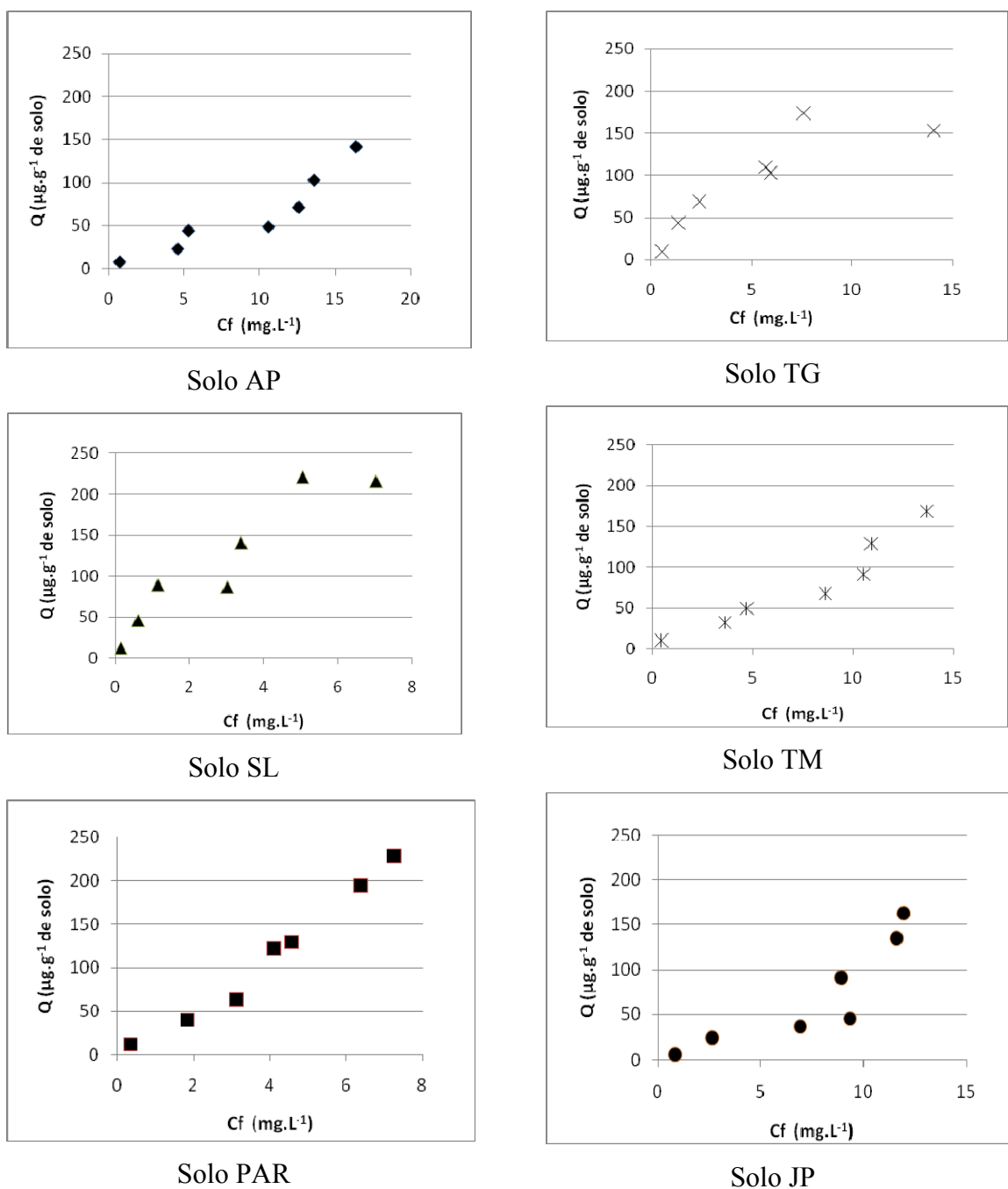


Figura 6: Isotermas de sorção do fenantreno por 6 solos.

A Tabela 21 mostra as equações da regressão linear dos dados de sorção de fenantreno pelos 6 solos. A inclinação das retas mostra que os solos SL e PAR foram os que apresentaram maior capacidade de sorver o fenantreno, seguidos do TG, TM, JP. A sorção no solo AP foi significativamente menor do que nos outros solos.

Os resultados obtidos no procedimento de sorção do fenantreno foram analisados pelo modelo de Langmuir, cujos resultados estão apresentados na Tabela 22. Entretanto, o coeficiente de determinação (R^2) das análises de regressão foram muito baixos,

mostrando que esses não se adequaram ao modelo. De acordo com LAAK (2005), a não-adequação dos dados de sorção do fenantreno ao modelo em questão sugere que, durante o processo adsorptivo, o composto não sorve em superfícies homogêneas com igual energia e, provavelmente, não ocorreu limitação do número de sítios de sorção.

Tabela 21: Análise de regressão linear dos dados de sorção obtidos nos 6 solos

Solo	Equação da reta	R ²
AP	$Y=6,8677x - 4,4649$	0,8133
SL	$Y=32,533x - 15,494$	0,9764
PAR	$Y=30,175x + 28,164$	0,8845
TG	$Y=12,035x - 18,141$	0,7607
TM	$Y=11,259x - 5,9483$	0,9078
JP	$Y=10,727x + 37,062$	0,727

Tabela 22: Análise de regressão provenientes do ajuste de sorção do fenantreno no modelo linear de Langmuir para os diferentes solos

Solo	Equação da reta	R ²
AP	$y = 1,0394x + 146,39$	0,0107
SL	$y = -0,3907x + 38,56$	0,0107
PAR	$y = 3,2131x + 12,711$	0,5604
TG	$y = 3,3626x + 35,55$	0,4012
TM	$y = 2,6521x + 75,807$	0,1247
JP	$y = -2,6114x + 148,74$	0,0417

Em razão da falta de ajuste dos dados experimentais à equação de Langmuir, optou-se por submeter os dados de sorção ao ajuste da equação de Freundlich. A Figura 7 apresenta as isotermas de Freundlich para a sorção de fenantreno pelos solos. As equações de regressão apresentaram ainda uma boa correlação com valores de $R^2 > 0,84$, apesar da incerteza dos resultados experimentais, principalmente no caso de curvas de sorção côncavas. A partir das isotermas calcularam-se os valores de N, Kf, Kd e Koc para cada solo e os resultados estão apresentados na Tabela 23. Para tanto, assumiu-se a sorção como processo instantâneo, reversível e linear, e estimou-se o valor de coeficiente de sorção (Kd) aparente pela Equação 13:

$$Kd = \frac{Q}{C_e}$$

Equação 13

Onde:

Q = massa do fenantreno sorvido por massa de solo ($\mu\text{g.g}^{-1}$), e

C_e = concentração do fenantreno no equilíbrio (mg.mL^{-1}).

O carbono orgânico presente no solo apresenta importante influência no processo de sorção e de distribuição de compostos orgânicos nos solos. Desse modo, o coeficiente de distribuição (K_d) passa a ser normalizado pelo teor de C_{org}, passando a ser expresso por K_{oc}, que é o coeficiente de partição do fenantreno na fração orgânica do solo, ou seja, é a partição do contaminante entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo. O valor de K_{oc} foi estimado pela Equação 7. Como a matéria orgânica é composta de cerca de 58% de C_{org} (EMBRAPA, 1997), há a possibilidade de se calcular a constante K_{oc} pela Equação 14:

$$K_{oc} = \frac{K_d}{\%C_{org}} \times 100$$

Equação 14

Embora as constantes K_F e N da isoterma de Freundlich sejam empíricas, sem significado físico, como o têm as constantes da isoterma de Langmuir, a correlação entre K_F e medidas relacionadas com o fator capacidade máximo de sorção são altamente significativas. Por outro lado, a constante N não se apresenta correlacionada com nenhuma dessas medidas. Essa correlação com K_F, mas não necessariamente com N, tem sido citada na literatura (NOVAIS, 1977; MEAD, 1981). Portanto, pode-se ter, na constante K_F de Freundlich, uma medida do fator capacidade máximo de sorção do solo, dando a essa constante caráter menos empírico.

Os valores de N apresentados na Tabela 23 variaram de 0,6 a 2,8. O parâmetro de Freundlich N está relacionado com a energia de sorção, ou seja, o tipo de processo de sorção. Quando N=1 a sorção é linear, que é o caso do solo SL (N=0,95), o que indica a predominância do processo de particionamento. O valor de N>1 indica que todos os sítios da superfície adsorvedora são considerados similares, que é o caso dos solos AP, TM e JP. Normalmente, quando o valor de N<1, a isoterma de sorção é côncava em direção ao eixo das abscissas, como as isotermas para os solos PAR (N=0,67) e TG (N=0,70). Acredita-se que isso seja devido à combinação de particionamento e adsorção, promovendo um processo não linear.

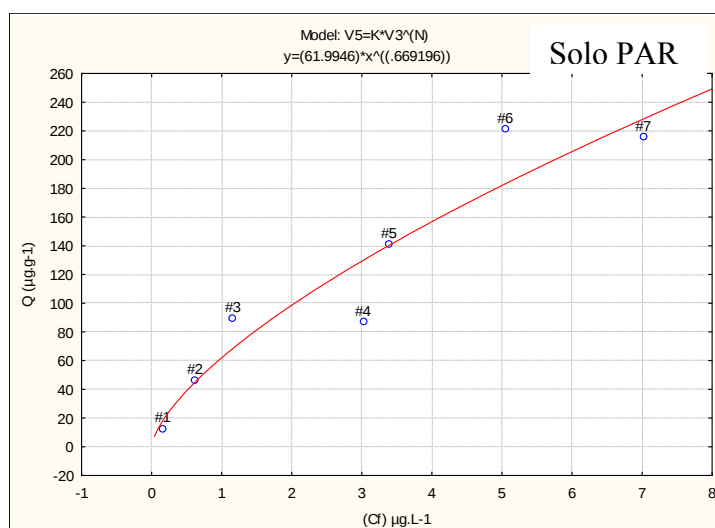
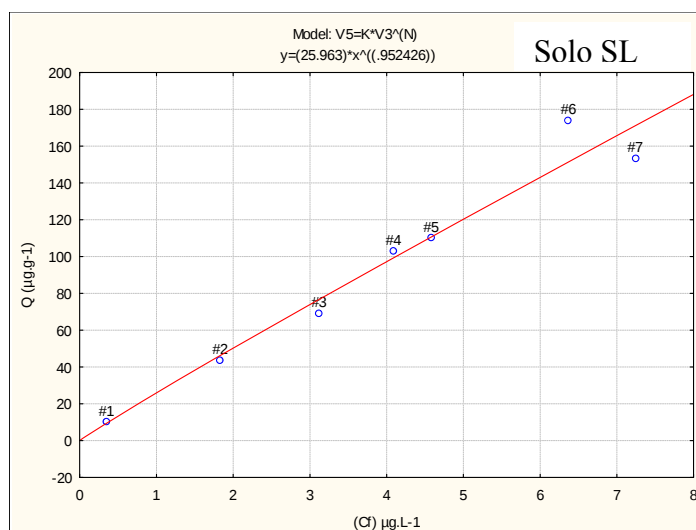
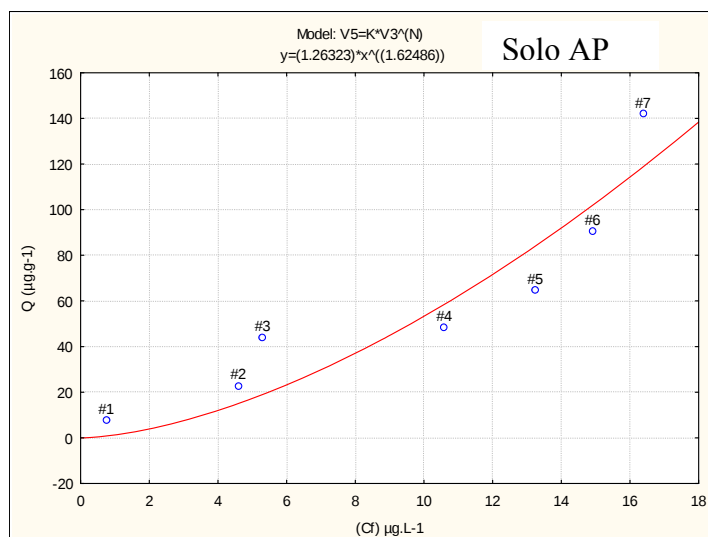


Figura 7: Isotermas de Freundelich linearizadas para os dados experimentais de sorção de fenantreno pelos 6 solos.

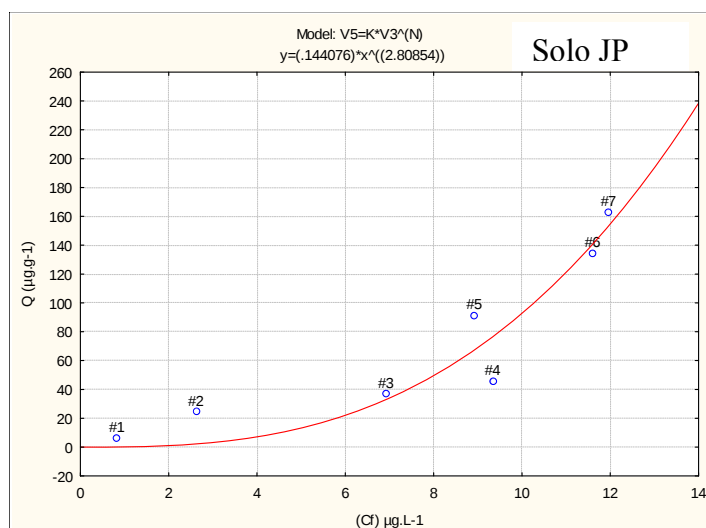
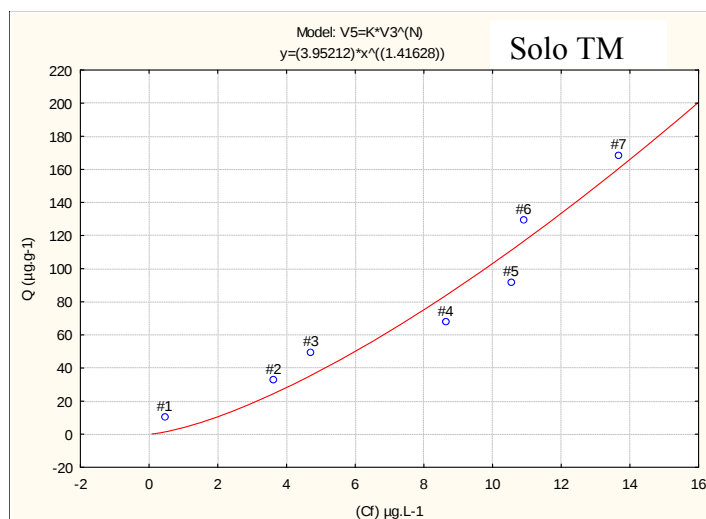
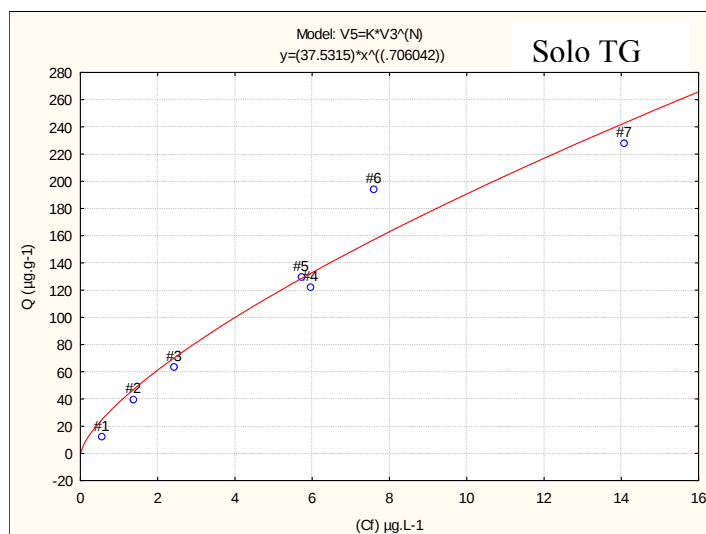


Figura 7 - Continuação

Tabela 23 Estimativa dos parâmetros de Freundlich para a sorção do fenantreno nos 6 solos estudados

Solo	K _F	N	R ²	K _d (mL.g ⁻¹)	K _{oc} (L. g ⁻¹)
AP	1,263	1,62486	0,8461	7,625	28,27
SL	25,963	0,95243	0,9564	23,371	81,24
PAR	61,995	0,6692	0,8993	30,175	115,61
TG	37,531	0,70604	0,9493	16,888	98,37
TM	3,952	1,416278	0,9349	12,166	139,84
JP	0,144	2,808539	0,8953	13,433	193,00

Como já mencionado, 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. Quanto maior o K_d, maior a tendência do contaminante ficar adsorvido ao solo. Os valores de K_d encontrados neste estudo mostram a seguinte seqüência de K_ds do fenantreno para os solos: PAR> SL >TG> JP >TM>AP.

É interessante notar que o solo AP, mesmo apresentando o maior teor de matéria orgânica, foi o que teve a menor tendência de adsorver o fenantreno. Isso pode ser explicado pelo caráter eutrófico desse solo. Como citado anteriormente, a adsorção de poluentes orgânicos hidrofóbicos foi atribuída principalmente à matéria orgânica do solo por vários autores (van GESTEL & van DIS, 1988; GRATHWOHL, 1990; CORTES *et al.*, 1991; van GESTEL, 1997; PIGNATELLO, 1998). Esse posicionamento vem sendo questionado por trabalhos mais recentes, como o de HOFMAN *et al.* (2007), que mostraram que a mesma quantidade de carbono orgânico não implica no mesmo comportamento do fenantreno nos solos e que a sorção depende mais da sua composição do que da quantidade. Para uma conclusão mais definitiva, seria importante se conhecer os teores de ácidos fúlvicos e húmicos dos solos estudados. LAOR *et al.* (1996) mostraram diferenças na sorção de fenantreno relacionadas com o tipo de ácido húmico presente na matéria orgânica dos solos.

A partir do K_d foi calculado o K_{oc}, coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo. Assim, os valores de K_{oc} para o fenantreno, corrigidos pela matéria orgânica dos solos, mostraram a seguinte seqüência: JP>TM>PAR>TG>SL>AP. Essa força de sorção entre o fenantreno e o solo, medida pelo K_{oc}, depende das propriedades físico-químicas deste contaminante e da

porcentagem de carbono orgânico do solo. Novamente o solo AP foi o que apresentou menor poder de sorção desse composto.

Os parâmetros de Freundlich K_F e N foram correlacionados com os atributos dos solos com o objetivo de se identificar sua influência na sorção do fenantreno. As correlações foram significativas ($p < 0,05$ $n=6$) apenas para o P remanescente (-0,7183 para K_F e -0,7421 para N) e argila (0,7982 para K_F e -0,7036 para o N). A partir desses resultados concluiu-se que, entre os atributos dos solos, a argila é o fator predominante que governa a sorção de fenantreno nos solos estudados. As partículas de argila mineral possuem superfícies reativas e estão normalmente cobertas com a matéria orgânica (OLESZCZUK & BARAN, 2003). Sua clara influência na sorção foi observada por HABERHAUER *et al.*, (2001) em solos com baixos teores de matéria orgânica (1,1-1,3%), e com os de argila acima de 25%.

5.3.3 Determinação do Fenantreno Remanescente

O desenvolvimento da metodologia de fenantreno remanescente, nesse trabalho, foi baseado na de fósforo remanescente. A capacidade máxima de adsorção de P (CMAP) de um solo é determinada adicionando-se ao solo concentrações crescentes de P e, após certo período de tempo de agitação, avaliando-se as concentrações do elemento em equilíbrio (sobrenadante). A diferença entre a concentração de P adicionada e a em equilíbrio, ou remanescente, refere-se ao P adsorvido pelo solo. Os diversos valores de P remanescente e os respectivos valores de P adsorvido são submetidos ao ajuste de isothermas de adsorção, incluindo-se a de Langmuir, que permite chegar à CMAP, o análogo, ou simétrico, da CTC. Quando se aumenta o tempo de contato do P com o solo, aumenta-se a quantidade de P adsorvida, fazendo com que resultados obtidos para um tempo não sejam quantitativamente comparáveis com os obtidos em tempos diferentes.

Assim, a partir dos dados de sorção apresentados na Tabela 20, foi feita a correlação entre as características dos solos estudados e o fenantreno recuperado em solução de HPCD (mg.L^{-1}) para cada dose aplicada aos solos (mg.L^{-1}). Os resultados das correlações estão apresentados na Tabela 24. A Figura 8 mostra a relação entre as doses de fenantreno adicionadas aos solos e a recuperada em solução.

Tabela 24: Coeficientes de correlação entre algumas características dos solos e o fenantreno recuperado em solução, para cada dose (mg.L⁻¹) adicionada aos solos

Características	DOSES APLICADAS (mg.L ⁻¹ DE SOLO)						
	1,5(±0,024)	6,0(±0,662)	10,0(±0,600)	15,4(±0,884)	18,6(±1,001)	25,5(±1,125)	30,2(±0,509)
Mat. Orgânica ⁽¹⁾	-0,45	-0,20	-0,54	-0,48	-0,36	-0,41	-0,36
Silte ⁽²⁾	0,12	0,44	0,10	0,21	0,33	0,30	0,13
Argila ⁽²⁾	-0,50	-0,62	-0,78	-0,70	-0,67	-0,67	-0,43
Areia ⁽²⁾	0,50	0,40	0,78	0,57	0,47	0,53	0,23
CRM ⁽²⁾	0,00	0,09	-0,31	-0,08	0,00	-0,03	0,21
pH	0,32	0,33	0,12	0,29	0,32	0,35	0,33
CTC a pH 7 ⁽³⁾	0,07	-0,11	0,12	-0,27	-0,26	-0,18	0,33
p REM ⁽⁴⁾	0,25	0,27	0,26	0,47	0,39	0,41	0,07
H+Al ⁽³⁾	0,00	-0,57	-0,20	-0,54	-0,65	-0,51	-0,53

⁽¹⁾ Dag.kg⁻¹; ⁽²⁾ %; mg.dm⁻³; ⁽³⁾ cmolc.dm⁻³; ⁽⁴⁾ mg.L⁻¹

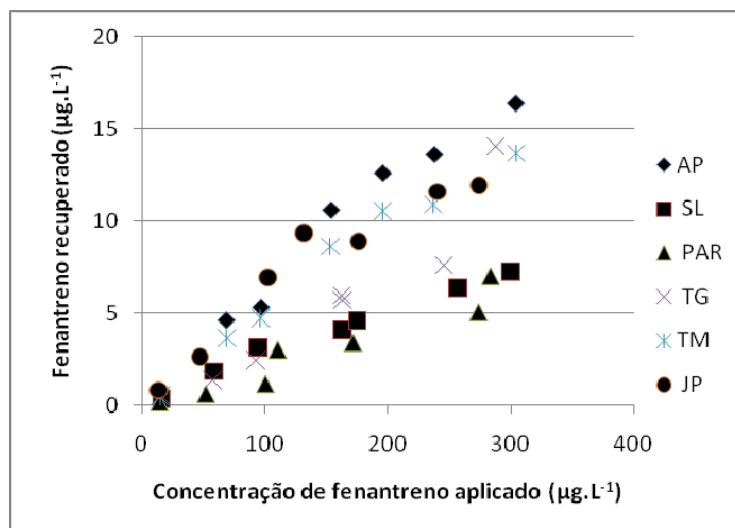


Figura 8: Relação entre as doses de fenantreno adicionadas aos solos e as recuperadas em solução de HPCD.

Os resultados da Tabela 24 mostram que, entre as características dos solos e o fenantreno recuperado em solução, a maior correlação foi verificada entre a dose adicionada de 10 mg.L^{-1} (dose 3) e os teores de argila (-0,78) e de areia (0,78).

O coeficiente de correlação entre a concentração de fenantreno remanescente e o teor de argila dos solos é inverso, ou seja, quanto maior o teor de argila no solo, menor a recuperação do fenantreno em solução (Figura 9). Esse resultado está de acordo com os maiores coeficientes obtidos para os parâmetros de Freundlich (K_F e N) das curvas de sorção do fenantreno. Ambos os resultados mostraram que a argila exerce um papel importante no processo, sendo este o parâmetro com maior importância na sorção. Já em relação à areia, a correlação é direta, ou seja, quanto maior o teor de areia, maior a recuperação do fenantreno em solução.

Assim, para a determinação do fenantreno remanescente, conclui-se que a dose de 10 mg.L^{-1} ou 100 µg de fenantreno.g de solo $^{-1}$ foi a que apresentou a maior correlação com o teor de argila do solo, sendo então a ideal para ser correlacionada com o fenantreno extraído pelos 3 diferentes métodos de extração e com as doses de respostas biológicas obtidas com os solos contaminados com fenantreno por 5 e 120 dias.

5.3.4 Validação do Método de Extração de Fenantreno Remanescente como Estimador da Dose de Alerta

Os resultados dos efeitos biológicos do fenantreno nos solos contaminados por 5 e 120 dias foram utilizados para validar o método de extração do fenantreno. A partir dos

dados obtidos nos testes de germinação de sementes, contagem de bactérias heterotróficas (CBH) e a respiração microbiana nos solos, foram identificadas as concentrações de fenantreno que causaram os primeiros efeitos adversos sobre esses indicadores biológicos. Os resultados estão apresentados na Tabela 25 e mostram que, com 5 dias de contato, a germinação do pimentão foi o teste mais sensível entre eles, seguido da respiração, CBH e germinação de tomate. Após o envelhecimento por 120 dias nos solos, a respiração foi o ensaio mais sensível, seguido da germinação do pimentão, CBH e germinação do tomate.

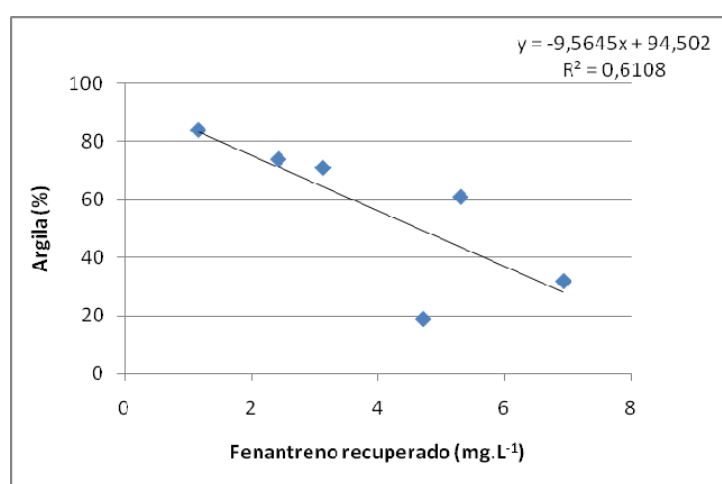


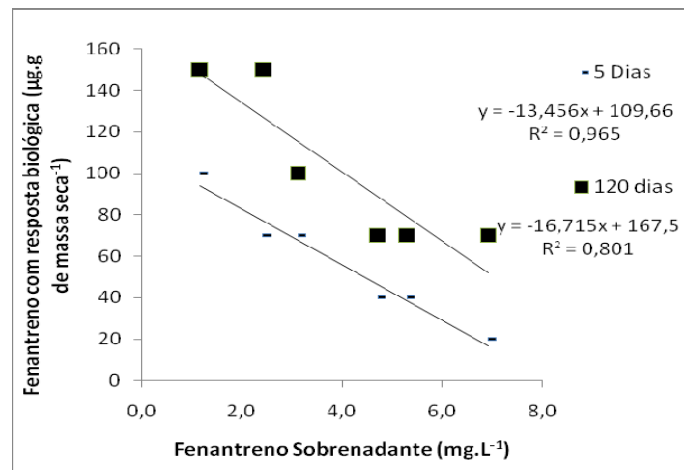
Figura 9: Correlação entre a recuperação do fenantreno em solução na dose 3 aplicada e o teor de argila dos solos.

Foi avaliada a relação entre as concentrações de fenantreno recuperado dos solos na dose de 10 mg.L⁻¹ nos ensaios de sorção e as concentrações de fenantreno presente nos solos (µg.g⁻¹), após 5 e 120 dias de contato, a partir das quais se observou efeito biológico. Os resultados estão apresentados na Figura 10. No geral, a dose de fenantreno necessária para causar efeito significativo nos indicadores biológicos testados foi menor no solo recém-contaminado (5 dias), quando comparado ao envelhecido por 120 dias. Esse resultado concorda com o observado por outros autores (REID *et al.*, 2000; MALISZEWSKA-KORDYBACH, 2005; SMRECZAK *et al.*, 2008), que verificaram que a permanência dos poluentes orgânicos nos solos por longo período resulta em processos de envelhecimento e seqüestro, que reduzem a biodisponibilidade do composto.

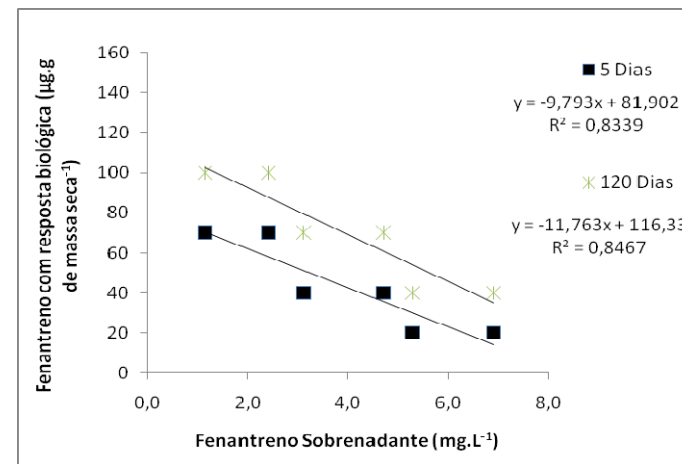
Tabela 25: Doses de fenantreno aplicado aos solos ($\mu\text{g.g}^{-1}$), para cada solo, onde foram identificadas os primeiros efeitos significativos nos ensaios biológicos

	Solos contaminados por 5 dias				Solos contaminados por 120 dias			
SOLO	Contagem ¹	Respiração ²	Germinação ³		Contagem ¹	Respiração ²	Germinação ³	
			Pimentão	Tomate			Pimentão	Tomate
AP	40	40	20	70	70	70	40	100
SL	70	70	40	100	100	20	70	150
PAR	100	70	70	100	150	100	100	100
TG	70	70	70	100	150	100	100	100
TM	40	40	40	100	70	40	70	100
JP	20	20	20	70	70	40	40	70
Média	56,67	51,67	43,33	90,00	101,67	61,67	70,00	103,33

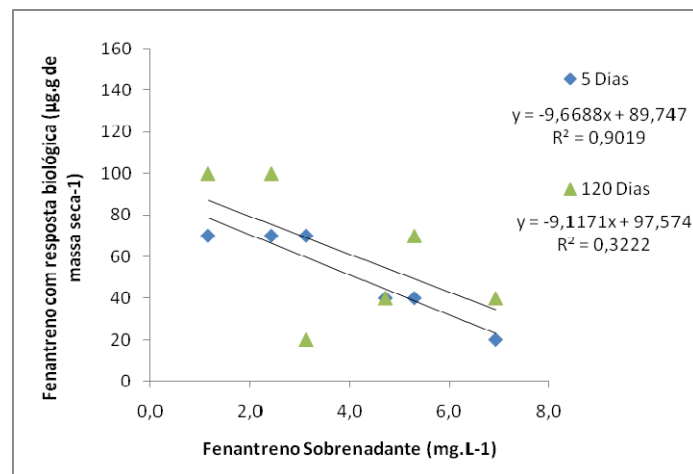
¹ (UFC.g⁻¹); ² CO₂ Acumulado ($\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{g solo}^{-1}$); ³ (%)



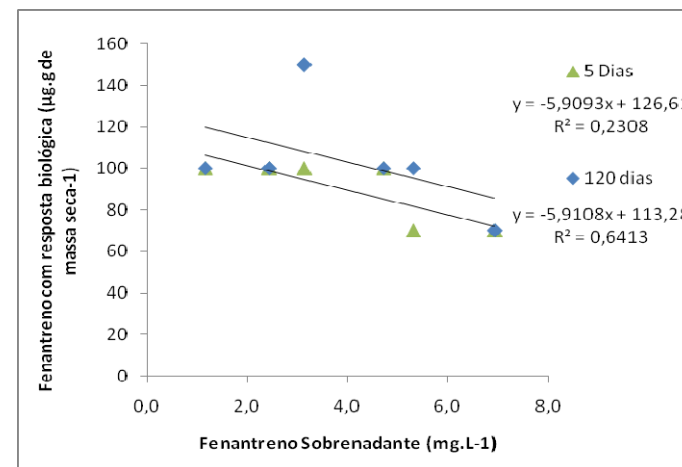
CBH



Respiração



Germinação de Pimentão



Germinação de Tomate

Figura 10: Relação entre as concentrações de fenantreno remanescente na dose de 10 mg.L⁻¹ e as concentrações de fenantreno nos solos (µg.g de solo⁻¹) a partir das quais se observou efeito biológico.

Os coeficientes de correlação entre o fenantreno no sobrenadante na dose de 10 mg.L⁻¹ de resposta biológica com 5 e 120 dias de contato estão apresentados na Tabela 26. À exceção da respiração e da germinação de tomate com 120 dias, os resultados foram significativos ($p > 0,01$), mostrando que existe relação entre a dose de resposta biológica e a concentração do fenantreno no sobrenadante nos ensaios de sorção.

Tabela 26: Coeficientes de correlação entre o fenantreno no sobrenadante na dose de 10 mg.L⁻¹ e a primeira dose de resposta dos ensaios biológicos, nos dois tempos de contato

	Respiração	Germinação Tomate	Germinação Pimentão	CBH*
5 dias	-0,94967	-0,80084	-0,91317	-0,98233
120 dias	-0,56759	-0,48037	-0,92016	-0,89498

*Contagem de bactérias heterotróficas

Para a validação dos métodos de extração testados (HPCD, TENAX e ÁGUA) como estimadores de dose de alerta para a contaminação dos solos com o fenantreno, foram feitas as relações entre a concentração de fenantreno recuperado para cada método de extração na dose de resposta biológica, em função do fenantreno recuperado na dose de 10 mg.L⁻¹ (Tabelas 27 e 28). Cada tempo de contato foi analisado separadamente.

Tabela 27: Concentrações de fenantreno recuperadas pelos diferentes métodos de extração nas doses adicionadas aos solos, a partir dos quais foi observado efeito significativo nos ensaios biológicos, após 5 dias de contato

Solo	Fenantreno Recuperado (10 mg.L ⁻¹)	Dose Efeito Biológico (µg.g ⁻¹)	Método de Extração		
			HPCD	TENAX	ÁGUA
PAR	1,16	70	13,07	0,57	1,24
TG	2,42	70	48,41	4,46	0,81
SL	3,12	40	31,46	1,42	10,8
TM	4,71	40	24,99	2,82	1,06
AP	5,30	20	12,88	2,49	1,03
JP	6,92	20	3,5	0,83	2,8

Tabela 28: Concentrações de fenantreno recuperadas pelos diferentes métodos de extração nas doses adicionadas aos solos, a partir dos quais foi observado efeito significativo nos ensaios biológicos, após 120 dias de contato

Solo	Fenantreno Recuperado (10 mg.L ⁻¹)	Dose Efeito Biológico (µg.g ⁻¹)	Método de Extração		
			HPCD	TENAX	ÁGUA
PAR	1,16	100	32,3	0,288	0,77
TG	2,42	100	41,15	1,65	0,73
SL	3,12	70	30	1,659	0,68
TM	4,71	100	33,34	1,311	3,63
AP	5,30	40	16,56	0,59	0,52
JP	6,92	70	20,68	1,146	0,71

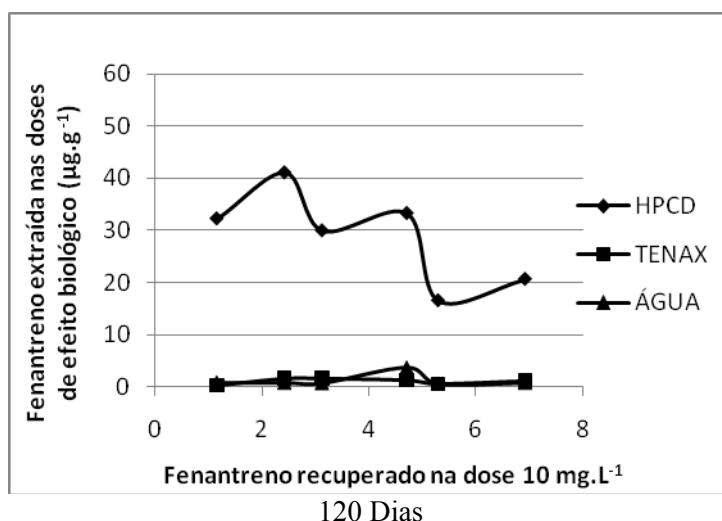
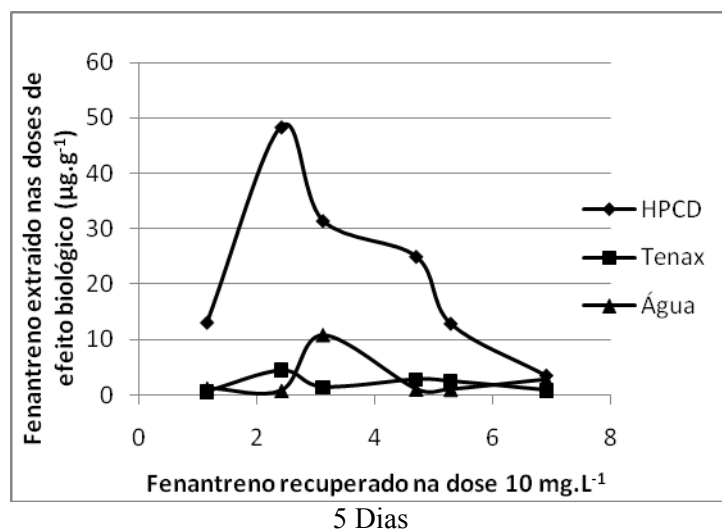


Figura 11: Relação entre a concentração de fenantreno recuperado para cada método de extração na dose de resposta biológica, em função da concentração do fenantreno no sobrenadante, durante os ensaios de sorção a partir de uma solução de HPCD contendo 10 mg.L⁻¹.

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que a relação entre a concentração de fenantreno extraído nas doses de efeito biológico ($\mu\text{g.g}^{-1}$) e o fenantreno remanescente na dose de 10 mg.L^{-1} indica o componente biodisponível, independente do solo. Dessa forma, para se definir se um solo contaminado com fenantreno deve sofrer intervenção para mitigação do problema serão necessárias apenas 2 etapas, a saber:

- 1) Determinação do fenantreno remanescente usando-se a dose de 10 mg.L^{-1} , de acordo com a metodologia descrita no item 5.3.3.
- 2) Extração do fenantreno pelos métodos validados nesse trabalho (HPCD, TENAX e ÁGUA). A decisão sobre a intervenção na área será baseada no valor de fenantreno extraído. Se estiver abaixo da concentração mínima de efeito biológico para o método de extração, essa não será necessária. Apenas os valores acima indicarão a intervenção para se evitarem os danos ambientais.

6. CONCLUSÕES

- 1) A extração de fenantreno dos solos é influenciada pelo tempo de permanência do composto em contato com o solo. Em média, a tendência desse extrator é recuperar 1,68% de fenantreno a mais com 5 dias do que com 120 dias. Já o TENAX recupera 3,16% a mais com 5 dias, em relação a 120 dias. A extração com ÁGUA é extremamente variável, mas muito sensível, pois reflete como o solo está sendo influenciado pela sorção do fenantreno.
- 2) Com 5 dias de contato, o solo que apresentou a maior extração por HPCD foi o que teve a menor extração com ÁGUA, indicando que ambos os extratores extraem o fenantreno por diferentes mecanismos. As correlações entre os teores de fenantreno obtidos pelos extratores em cada tempo de contato foram positivas e significativas ($p > 0,001$), indicando que existe forte interação entre todos os parâmetros testados. Entretanto, não é possível predizer, separadamente, quais interações estão ocorrendo.
- 3) Os coeficientes de correlação entre as declividades das equações de regressão linear entre as concentrações de fenantreno extraído e a dose de fenantreno adicionada aos diferentes tipos de solos, obtidos com os três extratores aos 5 e aos 120 dias e independentemente do tempo de contato mostraram que os extratores se correlacionam fracamente com os atributos dos solos, não sendo possível se determinar qual atributo influencia consistentemente a capacidade de extração do fenantreno pelos extratores testados.
- 4) Os dados de sorção do fenantreno nos solos não se adequaram ao modelo de Langmuir, sugerindo que durante o processo adsorptivo o composto não sorve em superfícies homogêneas com igual energia e, provavelmente, não ocorreu limitação do número de sítios de sorção.

- 5) Os dados experimentais de sorção se adequaram ao modelo de Freundlich. As equações de regressão apresentaram ainda uma boa correlação, com valores de $R^2 > 0,84$, apesar da incerteza dos resultados experimentais, principalmente no caso de curvas de sorção côncavas.
- 6) A correlação entre os parâmetros de Freundlich K_F e N e os atributos dos solos foram significativas apenas para o P remanescente e argila, sendo esse último considerado o fator predominante que governa a sorção de fenantreno nos solos estudados.
- 7) O coeficiente de correlação entre a concentração de fenantreno recuperado e o teor de argila dos solos é inverso, ou seja, quanto maior o teor de argila no solo, menor a recuperação do fenantreno em solução.
- 8) A dose de 10 mg.L^{-1} aplicada aos solos foi a que apresentou a maior correlação com o teor de argila dos solos, sendo então correlacionada com o fenantreno extraído pelos 3 diferentes métodos de extração e com as doses de respostas biológicas, obtidas com os solos contaminados com fenantreno por 5 e 120 dias.
- 9) Após 5 dias de contato do fenantreno com o solo, a germinação do pimentão foi o teste biológico mais sensível, seguido da respiração, contagem de bactérias heterotróficas e germinação de tomate. Após o envelhecimento por 120 dias nos solos, a respiração foi o ensaio mais sensível, seguido da germinação do pimentão, contagem e germinação do tomate.
- 10) A dose de fenantreno necessária para causar efeito significativo nos indicadores biológicos testados foi menor no solo recém-contaminado (5 dias), quando comparado ao envelhecido por 120 dias.
- 11) Os coeficientes de correlações entre o fenantreno recuperado na dose de 10 mg.L^{-1} e as doses de resposta biológica com 5 e 120 dias mostraram que existe relação entre a resposta biológica e a recuperação do fenantreno nos ensaios de sorção.
- 12) Os resultados permitiram a proposição de uma nova metodologia de avaliação da capacidade de retenção de fenantreno por diferentes tipos de solo, denominada de **Fenantreno-remanescente**. Os efeitos das variações de características de solo sobre a eficiência de extração pelo método proposto e sobre a biodisponibilidade do contaminante foram eliminados, tornando o método aplicável a uma variedade de tipos de solos ou de resíduos sólidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, A.M.A. & SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E. (eds.) Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.
- ALEXANDER, M. How toxic are toxic chemicals in soil? Environ. Sci. Technol., v.29, p.2713-2717, 1995.
- ALEXANDER, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environ. Sci. Technol., v.34, p.4259-4265, 2000.
- ALLAN, I.J.; SEMPLE, K.T.; ARYA, R. & REID, B.J. Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction. Environ. Poll. V.44, P.562-571, 2006.
- ALVAREZ, V.H.; NOVAIS, R.F.; DIAS, L.E. & OLIVEIRA, J.A. Determinação e uso do fósforo remanescente. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. 32p. (Boletim informativo, 25)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10.004: Resíduos sólidos - Classificação. Rio de Janeiro: ABNT 1987.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10.005: Lixiviação de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro: ABNT. 2004
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10.006: Solubilização de Resíduos Sólidos, Rio de Janeiro: ABNT. 2004
- BALL, W.P. & ROBERTS, P.V. Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material 1. Equilibrium. Environ. Sci. Technol. v.25, p.1223-1237, 1991a.
- BALL, W.P. & ROBERTS, P.V. Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material 2. Interparticle diffusion. Environ. Sci. Technol. v.25, p.1237-1249, 1991b.
- BAMFORTH, S. & SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. J. Chem. Technol. Biotechnol., Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.
- BERGKNUT, M.; SEHLIN, E.; LUNDSTEDT, S.; ANDERSSON, P.L.; HAGLUND, P.; TYSKLIND, M. Comparison of techniques for estimating PAH bioavailability: Uptake in *Eisenia fetida*, passive samplers and leaching using various solvents and additives. Environ. Poll., v.145, n. 1, p. 154-160, 2007.
- BONTEN, L.T.C.; GROTENHUIS, T.C.; RULKENS, W.H. Chemosphere, v.38, p.3627-3636, 1999.
- BORGES A.F. Avaliação dos Mecanismos de transporte de hexaclorociclohexano (HCH) no

solo da Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, RJ. 1996. 182p. Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, RJ.

BOSMA, T.P.; MIDDELDROP, P.M.; SCHRAA, G. & ZEHNDER, A.B. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* v.31, p. 248-252, 1997.

BOYD, E.M., MEHARG, A.A., WRIGHT, J. & KILLHAM, K., Assessment of toxicological interactions of benzene and its primary degradation products (catechol and phenol) using lux-modified bacterial bioassay. *Environ. Toxicol. Chem.* v.16, p.849-856, 1997.

BRAIDA, W.J.; WHITE, J.C. & PIGNATELLO, J.J. Indices for bioavailability and biotransformation potential of contaminants in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* v.23, p.1585-1591, 2004.

BREEDVELD, G.D. & KARLSEN, D.A. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.54, p.255-261, 2000.

CARMICHAEL, L.M. & PFAENDER, F.K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation*, v.8, n.1, p.1-13, 1997.

CHARROIS, J.W.A.; MCGILL, W.B. & FROESE, K.L. Acute ecotoxicity of creosote-contaminated soils to *Eisenia fetida*: a survival-based approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.20, p.2594-2603, 2001.

CHUNG, N. & ALEXANDER, M. Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds in aged and dissimilar soils. *Environ. Sci. Technol.* v.32, p.855-860, 1998.

CHUNG, N. & ALEXANDER, M. Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* v.33, p.3605-3608, 1999.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. 2001. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp. Acesso em 20 jul. 2005.

CORNELISSEN G; VAN NOORT, P.C.M. & GOVERS, H.A.J. Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environ Toxicol Chem* v.16, p.1351-1357, 1997.

CORNELISSEN, G.; RJGTERINK, H.; FERDINANDY, M.M.A.; VAN NOORT, P.C.M., Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, p.966-970, 1998.

CORNELISSEN, G.; GUSTAFSSON, O.; BUCHELI, T.D.; JONKER, M.T.O.; KOELMANS, A.A. & VAN NOORT, P.C.M. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, v.39, n.18, p.6881-6895, 2005.

CUYPERS, C.; GROTENHUIS, T.; JOZIASSE, J. & RULKENS, W. Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, n.10, p.2057-2063, 2000.

CUYPERS, C., CLEMENS, R., GROTENHUIS, T., RULKENS, W. Prediction of petroleum hydrocarbon bioavailability in contaminated soils and sediments. *Soil Sediment Cont.* v.10, p.459-482, 2001.

CUYPERS, C.; PANCRAS, T.; GROTENHUIS, T. & RULKENS, W. The estimation of PAH

- bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*, v.46 n.8, p.1235-1245, 2002.
- D'AGOSTINHO, A. & FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (kd) de benzo(a)pireno em solo por isotermas de sorção. *Quim. Nova*, v.29, n.4, 657-661, 2006.
- De FILIPPO, B.V. & RIBEIRO, A.C. *Análise química do solo - metodologia*. 2.ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 26p.
- DEW, N.M.; PATON, G.I. & SEMPLE, K.T. Prediction of [$3\text{-}^{14}\text{C}$] phenyldodecane biodegradation in cable insulating oil-spiked soil using selected extraction techniques. *Environ. Poll.*, v.138, p.316-323, 2005.
- DILLY, O. Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biol. Biochem.*, v.33, n.1, p.117-127, 2001.
- DOICK, K.; DEW, N. & SEMPLE, K. Linking Catabolism to Cyclodextrin Extractability: Determination of the Microbial Availability of PAHs in Soil. *Environ. Sci. Technol.*, v.39, p.8858-8864, 2005.
- DOICK, K.J.; CLASPER, P.J.; URMANN, K. & SEMPLE, K.T. Further validation of the HPCD-technique for the evaluation of PAH microbial availability in soil. *Environ. Pollut.*, v.144, n.1, p.345-354, 2006.
- DOTT *et al.* In: Kreysa, G., Wiesner, J. (Eds.), *Dechema Ad-Hoc Committee-Methods for Toxicological/Ecotoxicological Assessment of Soils: Bioassays for Soils: 4th Report of the Interdisciplinary Dechema Committee-Environmental Biotechnology-Soil*, Dechema e.V., Frankfurt am Main, ISBN 3-9626959-52-5, 1995.
- EHLERS, L.J. & LUTHY, R.G. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environmental Science and Technology* v.37, p.295A-302A, 2003.
- EISENTRAEGER, A.; MAXAM, G.; RILA, J.-P. & DOTT, W. A stepwise procedure for assessment of the microbial respiratory activity of soil samples contaminated with organic compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V.47, p.65-73, 2000.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Manual de métodos de análise de solo*. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997. 212p.
- FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, v.205, p. 223-240, 2004.
- FRITZ, W. & SCHLÜNDER, E. U. Competitive adsorption of two dissolved organics onto activated carbon-I: Adsorption equilibria. *Chem. Eng. Sci.*, v. 36, n. 4, p. 731-741, 1981.
- GILES, C. H.; SMITH, D; HUITSON, A.; *J. Colloid Interface Sci.*, v.47, p.755, 1974.
- GROSSER, R.J.; FRIEDRICH, M.; WARD, D.W. & INSKEEP, W.M. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene degrading isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* v.66, p.2695-2702, 2000.
- GUTHRIE, E.A. & PFAENDER, F.K. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, p.501-508, 1998.
- HABERHAUER G., PFEIFFER L., GERZABEK H., KIRCHMANN H., AQUINO A.J.A. TUNEGA D., LISCHKA H. Response of sorption processes of MCPA to the amount and origin of organic matter in a long-term field experiment. *Eur. J. Soil Sci.* v.52, p.279, 2001.
- HACON, S.S. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológica à saúde humana. In: AZEVEDO, F.A. & CHASIN, A.A.M. (Ed.). *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Carlos: RiMa, 2004, p.245-322.
- HARMSSEN, J., RULKENS, W., EIJSACKERS, H. Bioavailability: concept for understanding or tool for predicting? *Land contamination and reclamation* v.13, p.161-171, 2005.

- HATZINGER, P.B. & ALEXANDER, M. Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.*, v.29, p.537-545, 1995.
- HATZINGER, P.B. & ALEXANDER, M. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.16, p.2215-2221, 1997.
- HAWS, N.H.; BALL, W.P. & BOUWER, E.J. Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. *J. Cont. Hydrol.*, v.82, p.255- 292, 2006.
- HAWTHORN, S.B. & GRABANSKI, C.B. Correlating selective supercritical fluid extraction with bioremediation behaviour of PAHs in a field treatment plot. *Environ. Sci. Technol.* v.34, p.4103-4110, 2000.
- HAWTHORN, S.B.; POPPENDIECK, D.G.; GRABANSKI, C.B. & LOEHR, R. CPAH release during water desorption, supercritical carbon dioxide extraction and field bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* v.35, p.4577-4583, 2001.
- HAWTHORN, S.B.; POPPENDIECK, D.G.; GRABANSKI, C.B. & LOEHR, R.C. Comparing PAH bioavailability from manufactured gas plant soils and sediments with chemical and biological tests. 1. PAH release during water desorption and super critical carbon dioxide extraction. *Environ. Sci. Technol.* v.36, p.4795-4803, 2002.
- HERRCHEN, M.; DEBUS, R. & PRAMANIK-STREHLOW, R. Bioavailability as a key property in terrestrial ecotoxicity assessment and evaluation. Fraunhofer IRB Verlag. Stuttgart: 1997.
- HICKMAN, Z.A. & REID, B.J. Towards a more appropriate water based extraction for the assessment of organic contaminant availability. *Environ. Poll.*, v.138, p.299-306, 2005.
- HU, X.-Y.; WEN, B.; ZHANG, S. & SHAN, X.-Q. Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.62, p.26-34, 2005.
- HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S. & FORTMAN, T.J. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. *Bioremediat. J.* v.6, p.321–336, 2002.
- HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S. & FORTMAN, T.J. Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soil. *Biodegradation* v.15, p.261-274, 2004.
- HUND, K. & SCHENK, B., The microbial respiration quotient as indicator for bioremediation processes. *Chemosphere* v.28, p.477-490, 1994.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. FDIS 17402: Soil Quality – Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO 2007.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. EC 202: Selected Non-heterocyclic PAHs. Geneva: IPCS 1998.
- JACQUES, R.J.S. *et al.* Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Biorem. J.*, v.11, n.1, p.1-11, 2007a.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I. & CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007b.
- JAGER, T.; BAERSELMAN, R.; DIJKMAN, E.; DE GROOT, A.C.; HOGENDOORN, E.A.; DE JONG, A.; KRUITBOSCH, J.A.W. & PEIJNENBURG, W.J.G.M. Availability of

- polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, oligochaeta) in field polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. v.22, p.767-775, 2003a.
- JAGER, T.; FLEUREN, R.H.L.J.; HOGENDOORN, E.A. & DE KORTE, G. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. v.37, p.3399-3404, 2003b.
- JAGER, T.; VAN DER WAL, L.; FLEUREN, R.H.L.J.; BARENDREGT, A. & HERMENS, J.L.M. Bioaccumulation of organic chemicals in contaminated soils: evaluation of bioassays with earthworms. Environ. Sci. Technol. v.39, p.293-298, 2005.
- JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ. Poll., Oxford v. 133, p.71-84, 2005.
- JONKER, M. T. O. & SMEDES, F. Preferential sorption of planar contaminants in sediments from Lake Ketelmeer, The Netherlands. Environ. Sci. Technol. n. 34, v.9, p.1620-1626, 2000.
- JUHASZ, A.L. Can Bioavailability Assays Predict The Efficacy Of Pah Bioremediation? Developments in Soil Science, v. 32, p. 569-587, 2008.
- JUHASZ, A.L.; WALLER, N. & STEWART, R. Predicting the efficacy of PAH bioremediation in creosote contaminated soil using bioavailability assays. Bioremediat. J. v.9, p.1-16, 2005.
- KEHEW, A. E. Applied Chemical Hydrogeology, Prentice-Hall, Inc: New Jersey, 2001.
- KELSEY, J. W.; KOTTLER, B. D. & ALEXANDER, M. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. Environ. Sci. Technol., v.31, n.1, p. 214-217, 1997.
- KELSEY, J.W. & ALEXANDER, M. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. Environ. Toxicol. Chem. v.16, p.582-585, 1997.
- KELSEY, J.W.; COLINO, A. & WHITE, J.C. Effect of species differences, pollutant concentration, and residence time in soil on the bioaccumulation of 2,2,bis-(p-chlorophenyl)-1,1-dicloroethylene by 3 earthworm species. Environ. Toxicol. Chem. v.24, p.703-708, 2005.
- KENNISH, M.J. Pollution impacts on marine biotic communities. Marine Science Series. CRC Press. 1997, 308p.
- KHODADOUST, A.P.; KRISHNA, R.R. & MATURI, R. Removal of nickel and phenanthrene from kaolin soil using different extractants. Environ. Eng. Sci. v.21, n.6, p.691-704, 2004.
- LAACK, T. L. Sorption to soil of hydrophobic and ionic organic compounds: measurement and modeling. Dissertation. Proefschrift Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, IRAS, 2005. 157p. Disponível em: <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2006-0529-200329/index.htm> Acesso em Junho/2007.
- LANNO, R.; WELLS, J.; CONDER, J.; BRADMAN, K. & BASTA, N. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicol. Environ. Safety v.57, p.39-47, 2004.
- LAOR Y., STROM P.F., FARMER W.J. The effect of sorption on phenanthrene bioavailability. J. Biotechnol. v.51, p.227, 1996.
- LEI, L.; SUIDAN, M.T.; KHODADOUST, A.P. & TABAK, H.H. Assessing the bioavailability of PAHs in field-contaminated sediment using XAD-2 assisted desorption. Environ. Sci. Technol. 38, 1786-1793, 2004.
- LIMA, C.B.S. *et al.* Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. *et al.* (Ed). Atlas ambiental de Porto Alegre UFRGS. Porto Alegre: 1998. p.157-158.
- LISTE, H-H. & ALEXANDER, M. Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. Chemosphere, v. 46, p.1011-1017, 2002.
- MACLEOD, C.J.A. & SEMPLÉ, K.T. Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils, Environ. Sci. Technol., v.34, p. 4952-4957, 2000.

- MACLEOD, C.J.A.; MORRISS, A.W.J. & SEMPLE, K.T. The role of microorganisms in ecological risk assessment of hydrophobic organic contaminants (HOCs) in soils. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 48, p.171-212, 2001.
- MACLEOD, C.J.A., SEMPLE, K.T. Sequential extraction of low concentrations of pyrene and formation of non-extractable residues in sterile and non-sterile soil. *Soil Biol. Biochem.* v.35, p.1443-1450, 2003.
- MAILA, M.P. & CLOETE, T.E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *Int. Biodeter. Biodeg.* v.55, p.1-8, 2005.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH, B. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly contaminated soils - the effect of soil physicochemical properties and aging. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 168, p. 113-128, 2005.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A. & SCHINNER, F., Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, v.40, p.339-346, 2000.
- MARTENS, R. Current methods for measuring microbial biomass-C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils*, v.19, p.87-99, 1995.
- MATTINA, M.I.; IANNUCCI-BERGER, W. & DYKAS, L. Chlordane uptake and its translocation in food crops. *J. Agric. Food Chem.* v.48, p.1909-1915, 2000.
- MILES, R.A. & DOUCETTE, W.J. Assessing the aerobic biodegradability of 14 hydrocarbons in two soils using a simple microcosm/respiration method. *Chemosphere* v.45, p.1085-1090, 2001.
- MILLER, J.C. & MILLER, J.N. Statistics for analytical chemistry. 3.ed. Chichester: Ellis Horwood, 1993, p.120-124.
- MORRISON, D.E.; ROBERTSON, B.K. & ALEXANDER, M. Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD and dieldrin in soil. *Environ. Sci. Technol.* v.34, p.709-713, 2000.
- NAIDU, R.; SEMPLE, K.T.; MEGHARAJ, M.; JUHASZ, A.L.; BOLAN, N.S.; GUPTA, S.; CLOTHIER, B.; SCHULIN, R. & CHANEY, R. Bioavailability, Definition, Assessment and Implications for Risk Assessment. In: *Chemical Bioavailability in Terrestrial Environment*. Elsevier. Amsterdam: 2008. pp 39-51.
- NAM, K. & ALEXANDER, M. Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: tests with model solids. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, p.71-74, 1998.
- NAM, K., CHUNG, N. & ALEXANDER, A. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* v.32, p.3785-3788, 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools and Applications. National Academies Press, Washington, DC: NRC, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Oil in the sea, inputs, fates and effects. National Academy Press, Washington, DC: NRC, 1985.
- NETTO, A.D.P. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras ambientais. 1999. Tese de Doutorado - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- NETTO, A.D.P.; 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*, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.
- NIVENS, D.E.; MCKNIGHT, T.E.; MOSER, S.A.; OSBOURN, S.J.; SIUMPSON, M.L. & SAYLER, G.S. Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *J. Appl. Microbiol.*

v.96, p.33-46, 2004.

NORTHCOTT, G.L. & JONES, K.C. Partitioning, extractability and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1. Compound differences in aging and sequestration. *Environ. Sci. Technol.* v.35, p.1103-1110, 2001.

NOVAIS, R. F. & SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV. 399 p., 1999.

OLESZCZUK, P. & BARAN, S. Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil Polluted with Aircraft Fuel. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 12, n. 4 p. 431-437, 2003.

OLESZCZUK, P. & BARAN, S. The concentration of mild-extracted polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* v.39, p.2799-2815, 2004.

OLESZCZUK, P. Tenax-TA extraction as predictor for free available content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in composted sewage sludges. *J. Environ. Monit.*, v.10, p.883-888, 2008.

OLESZCZUK, P. The Tenax fraction of PAHs relates to effects in sewage sludges. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.72, n. 4, p. 1320-1325, 2009.

PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction – Theory and practice., Wiley-VHC, Inc. New York, USA, 1997.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; COURSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. *Caderno de Referência Ambiental*, v.12. Salvador: CRA. 2002. 230p.,

PICÓ, Y.; MOLTÓ, J.; MAÑES, J. & FONT, G. Solid phase techniques in the extraction of pesticides and related compounds from foods and soils. *J. Microcolumn. Sep.*, v.6, p. 331-359, 1994.

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

QUINONES-RIVERA, A.; ALEXANDER, R.R. & ALEXANDER, M. Effect of nonaqueous-phase liquids on the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil for worm uptake and bacterial genotoxicity, *Environ. Toxicol. Chem.* v.22, p. 2599-2604, 2003.

REICHENBERG, F. & MAYER, P. Two complementary sides of bioavailability: Accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 25, n.5, p. 1239-1245, 2006.

REID, B.J.; NORTHCOTT, G.L.; JONES, K.C. & SEMPLER, K.T. Evaluation of Spiking Procedures for the Introduction of Poorly Water Soluble Contaminants into Soil. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, p.3224-3227, 1998.

REID, B.J.; STOKES, J.D.; JONES, K.C.; SEMPLER, K.T. Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, n.15, p.3174-3179, 2000.

REID, B.J.; JONES, K.C. & SEMPLER, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Poll.*, v.108, p.103-112, 2000a.

REID, B.J.; STOKES, J.D.; JONES, K.C. & SEMPLER, K.T. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the extraction and biodegradation of phenanthrene in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* v.23, p.550-556, 2004.

REN, S. & FRYMIER, P.D. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays. *Chemosphere*, v.58, p.543-550, 2005.

REPETTO, G.; JOS, A.; HAZEN, M.J.; MOLERO, M.L.; DEL PESO, A. & SALGUERO, M. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicol. In vitro.*, v.15, p. 503-509, 2001.

SABATE, J.; VINAS, M. & SOLANAS, A.M. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere*, v.63, n.10, p.1648-1659, 2006.

SATERBAK, A.; TOY, R.J.; WONG, D.C.L.; MCMAIN, B.J.; WILLIAMS, M.P. & DORN, P.B. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, p.1591-1607, 1999.

SCHLEBAUM, W.; BADORA, A.; SCHRAA, G. & VAN RIEMSDIJK, W.H. Interactions between a hydrophobic organic chemical and natural organic matter: equilibrium and kinetic studies. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, p.2273-2277, 1998.

SCHROLL, R.; CAO, G.; LANGENBACH, T. & SCHEUNERT, I. Microcosm - a test system to determine the fate of pesticides in undisturbed soil columns. In: COPIN, A.; HOUINS, G.; PUSSEIMIER, L. & SALAMBIER, J.F., eds. *Environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*. European Study Service. Rixensart: 1994. p.236-241

SEMPLE, K.T.; DOICK, K.J.; JONES, K.C.; BURAUDEL, P.; CRAVEN, A. & HARMS, H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* v.38, p.228A-231A, 2004.

SEMPLE, K.T.; DOICK, K.J.; WICK, L.Y. & HARMS, H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environ. Pollut.*, v.150, n.1, p.166-176. ISSN 0269-7491, 2007.

SEMPLE, K.T.; MORRIS, A.W.J. & PATON, G.I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis, *Eur.J.Soil Sci.*, v.54, p.809-818, 2003.

SEMPLE, K.T.; REID, B.J. & FERMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants: a review. *Environ. Pollut.*, v.112, p.269-283, 2001.

SHOR, L.M. & KOSSON, D.S. Bioavailability of organic contaminants in soils. In: *Bioremediation*. Kluwer Academics Publishers, Amsterdam: 2000. p.15-43.

SIJM, D.; KRAAIJ, R. & BELFROID, A., Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environ. Pollut.*, v.108, p.113-119, 2000.

SIMS, R. C.; SIMS, J.L.; SORENSEN, D.L. & HASTINGS, L. Waste/soil treatability studies for four complex industrial wastes: methodologies and results. USEPA, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, v. 1, p.154, 1988.

SMRECZAK, B.; MALISZEWSKA-KORDYBACH, B. & KLIMKOWICZ-PAWLAS, A. Assessing the bioavailability of phenanthrene to soil microorganisms using the Tenax extraction method. *Environ Geochem Health*, v.30, p.183-186, 2008.

SPACIE, A. & HAMELINK, J.L. Bioaccumulation. In: *Fundamentals of aquatic toxicology, effects, environmental fate and risk assessment*. Taylor & Francis. Washington DC. 1995.

STOKES, J.D.; WILKINSON, A.; REID, B. J.; JONES, K.C. & SEMPLE, K.T. Prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using an aqueous hydroxypropyl- β -cyclodextrin extraction technique. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.24, n.6, p.1325-1330, 2005.

STOKES, J.D.; PATON, G.I. & SEMPLE, K.T. Behaviour and assessment of bioavailability of

organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. *Soil Use & Management*, v.21, p.475-486, 2006.

STROUD, J.L.; TZIMA, M.; PATON, G.I. & SEMPLE, K.T. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the biodegradation of ^{14}C -phenanthrene and ^{14}C -hexadecane in soil. *Environ. Poll.*, v. 157, n. 10, p. 2678-2683, 2009.

SZOLAR, O.H.J.; ROST, H.; HIRMANN, D.; HASINGER, M.; BRAUN, R. & LOIBNER, A.P. Sequential supercritical fluid extraction (SSFE) for estimating the availability of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in historically polluted soils. *J. Environ. Qual.* v.33, p.80-88, 2004.

THIELE-BRUHN, S. & BRUMMER, G.W. Fractionated extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polluted soil: estimation of the PAH fraction degradable through bioremediation. *Eur. J. Soil Sci.* v.55, p.567-578, 2004.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA/540/1-89/002: Risk assessment guidance for superfund. Human Health Evaluation Manual Part A. Washington, DC: USEPA 1989b, v.1.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA-823-R-00-001: Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment. Washington, DC: USEPA 2000.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: PAH Mixtures. Washington, DC: USEPA, 2003. Disponível em: www.epa.gov/nheerl/publications/files/PAHESB.pdf.

VAN GESTEL, C.A.M. & MA, W.C. Bioaccumulation of chlorophenols in earthworms in relation to bioavailability in soil. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.5, p.289-297, 1988.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN DER WAARDE, J.J.; DERKSEN, J.G.M.; VAN DER HOEK, E.E.; VEUL, M.F.X.W.; BOUWENS, S.; RUSCH, B.; KRONENBURG, R. & STOKMAN, G.N.M. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.20, p.1438-1449, 2001.

VEIGA, I.G. Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos /Bahia. 2003. 225p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração. UENF, Rio de Janeiro.

VERSCHUEREN, K. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 2nd ed.; van Nostrand ReinholdCompanyInc.: New York, 1983.

VOLESKY, B. Biosorption: Application aspects – Process modeling tools. *Hydrometallurgy*, v.71, n.1-2, p.179-190, 2003.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. *Principles of ecotoxicology*. 2nd edition, London: Taylor & Francis, 2001.

WANG, J.-M.; MAIER, R.M. & BRUSSEAU, M.L. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) on the bioavailability and biodegradation of pyrene. *Chemosphere*, v. 60, n. 5, p.725-728, 2005.

WARRINGTON, G.E. & SKOGLEY, E.O. Bioavailability and the Soil Solution. Wecca, Montana. 1997. Disponível em: <<http://www.wecsa.com/Refrence/soilsltn.htm>>.

WEBER, W.J.J.; MCGINLEY, P.M. & KATZ, L.E. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments. *Environ. Sc. Technol.* v.26, n.10, p.1955-1962, 1992.

WHITE, J.C.; KELSEY, J.W.; HATZINGER, P.B. & ALEXANDER, M. Factors affecting

sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environ.Toxicol.Chem.*, v.16, p.2040-2045, 1997.

WHITE, D.C.; FLEMMING, C.A.; LEUNG, K.T. & MACNAUGHTON, S.J. *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Meth.* v. 32, p.93-105, 1998.

WHITE, J.C.; HUNTER, M.; NAM, K.P.; PIGNATELLO, J.J. & ALEXANDER, M. Correlation between biological and physical availabilities of phenanthrene in soils and soil humin in aging experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* v.18, p.1720-1727, 1999.

WILSON, S.C. & NAIDU, R. Organic contaminant speciation and bioavailability in the terrestrial environment. *Developments in Soil Science*, v.32, p.187-229, 2008.

XING, B. & PIGNATELLO, J.J. Dual-model sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, p. 792-799, 1997.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G. & GUIOT, S.R. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. *Biorem. J.*, v.7, p.37-51, 2003.

YONG, R.; MOHAMED, A. & WARKENTINI, B. Principles of Contaminant Transport in Soils. *Developments in Geotechnical Engineering*, v. 73. p 327, 1992.

YOUNG, T. M. & WEBER, W. J. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, v.29, p.92-97, 1995.