

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL**

FRANCISCO WILAME SILVA AMARAL JUNIOR

**REMOÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS BTX (BENZENO,
TOLUENO E XILENO) E NUTRIENTES DE ÁGUAS POR USO DE
REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL COM BIOMASSA
IMOBILIZADA DE *ASPERGILLUS NIGER***

**FORTALEZA – CEARÁ
2010**



FRANCISCO WILAME SILVA AMARAL JUNIOR

REMOÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO) E NUTRIENTES DE ÁGUAS POR USO DE REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL COM BIOMASSA IMOBILIZADA DE *ASPERGILLUS NIGER*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa
Co-Orientador: Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo

FORTALEZA – CEARÁ

Agosto de 2010

Catálogo elaborado pela Biblioteca do IFCE – *Campus* de Fortaleza

A485r

Amaral Junior, F.W.S.

Remoção biológica de compostos de BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno) e nutrientes de águas por uso de reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada de *Aspergillus Niger* / Francisco Wilame Silva Amaral Junior. – Fortaleza, 2010.

114 f.

Dissertação (Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2010.

Orientadora: Prof^a Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

1. ÁGUAS SUBTERRÂNEAS – MÉTODO DE TRATAMENTO. 2. SANEAMENTO AMBIENTAL. 3. BIORREMEDIAÇÃO. I. Título. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará.

CDD – 628.35

FRANCISCO WILAME SILVA AMARAL JUNIOR

REMOÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO) E NUTRIENTES DE ÁGUAS POR USO DE REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL COM BIOMASSA IMOBILIZADA DE *ASPERGILLUS NIGER*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa (Orientador)

Instituto Federal do Ceará - IFCE

Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo

Instituto Federal do Ceará - IFCE

Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar/Sorocaba

DEDICATÓRIA

Ao Deus Todo Poderoso que nos concede a vida.
A minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar meus francos agradecimentos e demonstrar todos os meus sentimentos a todos àqueles que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, pois este foi um grande desafio, na verdade isto que parecia impossível para mim hoje se torna realidade, em especial:

A prof. Dra Kelly de Araújo pela orientação, dedicação, incentivo e principalmente paciência, serei eternamente grato e nunca me esquecerei da ajuda fornecida.

Ao prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo por ser co-orientador de meu trabalho e participar da banca examinadora.

A Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte por aceitar o convite de participar da banca examinadora.

Aos professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) pela oportunidade de crescimento educacional, pois é este o maior bem de um homem.

Aos bolsistas do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), em especial ao João Paulo, Marcus, Israel, Patrícia, Bárbara, Mayara, Nívea, Zuleika e Lílian e aos bolsistas do Laboratório de Tecnologia Química (LTQ), em especial a Mira, Julie, Jéssica e Ivan, todos muito importantes pela ajuda e amizade.

À minha namorada Kelly Viana pelo apoio e compreensão.

Aos meus pais e aos meus irmãos que na sua sábia simplicidade custearam meus estudos e me apoiaram mesmo com muita dificuldade.

Aos meus amigos Paulo de Freitas, Mayhara, Santiago e Paulo pelo incentivo.

Aos meus amigos do mestrado Bruno, Leorne, Aldenor, Renata, Daniele, Luana, Germana, Iara, Andrea e em especial a Jacqueline que me ajudou nas horas mais difíceis.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo estudar a viabilidade do *Aspergillus niger* AN 400 no tratamento de águas contaminadas por BTX (benzeno, tolueno e xileno). Os compostos BTX são hidrocarbonetos aromáticos de elevada ação tóxica que quando liberados no meio ambiente contaminam o solo e as águas subterrâneas, podendo inviabilizar a exploração de aquíferos, os quais atualmente representam uma fonte alternativa de água potável. Compostos BTX fazem parte da composição do petróleo e de seus derivados e podem entrar em contato com o meio ambiente por meio de acidentes no transporte e de vazamentos no armazenamento de combustíveis. O experimento foi dividido em três etapas: Etapa I com 5g/L de glicose, Etapa II com 1 g/L de glicose e Etapa III com 0,5 g/L de glicose. Cada etapa teve quatro ciclos operacionais, com tempo de reação total de sete dias. O reator possuía 5L de volume, mas foi operado com volume útil de 4,5L a biomassa foi imobilizada em mantas de polipropileno e a concentração de esporos utilizadas foi de 2×10^6 esporos/mL. Em geral, os compostos BTX foram eliminados com 3 dias de operação do reator na etapa I. Quanto ao valores de pH do afluente, o mesmo manteve-se em torno de 4, já no efluente a média foi de 2,5. A remoção de matéria orgânica da etapa I foi de 40%, 69% etapa II, 49% etapa III. Com relação aos nutrientes, houve a utilização preferencial do fungo pelo nitrogênio amoniacal, com remoção média de 93% de amônia na etapa I, 74% na etapa II e 51% na etapa III, quanto ao nitrito, ao final de todos os ciclos, a concentração permaneceu relativamente constante com pequena remoção no 12º ciclo. Houve acúmulo de nitrato no meio referente tanto à repressão das enzimas nitrito e nitrato redutase devido à presença de amônia, quanto à possível liberação do nitrato nos vacúolos fúngicos. Adicionalmente foram alcançados percentuais de remoção de ortofosfato de 70, 96 e 74% para as Etapas I, II e III, respectivamente. Após testes microbiológicos foi identificada a presença, de além da espécie inoculada, de contaminação no reator pelo fungo do gênero *Penicilium*, o que aparentemente não trouxe prejuízo ao sistema biológico em virtude das altas remoções alcançadas.

Palavras-Chaves: *Aspergillus niger*, batelada sequencial, BTX, nutrientes, remoção, biomassa imobilizada.

ABSTRACT

This research aimed to study the viability of the species *Aspergillus niger* AN 400 in the treatment of water contaminated with BTX (benzene, toluene and xylene). BTX compounds are aromatic hydrocarbons with high toxic action that contaminate the soil and groundwater when released into the environment, and may derail the exploitation of aquifers, which currently represent an alternative source of potable water. Compounds are part of the composition of petroleum and its derivatives, and may come into contact with the environment through accidents in the transportation and leaks in the storage of these fuels. The experiment was divided into three stages: Stage I 5 g/L glucose, Stage II 1 g/L glucose and Stage III 0,5 g/L glucose. Each stage has four operating cycles, with a total reaction time of seven days. The reactor had 5L volume but a useful volume of 4,5L and its biomass was immobilized in layers of polypropylene and the concentration of spores used was 2×10^6 spores / mL. The BTX compounds were eliminated with 3 days of reactor operation. In the remaining steps, after two days of the operation, the BTX compounds have not been detected in most cases. Concern to the pH of the effluent, it remained on around 4, while the effluent average was 2,5. In stage I, the removal of organic matter was of 40%, 69% in stage II and 49% in stage III. As to the nutrients, there was a preferential use of the fungus by ammonia, with 93% of ammonia average removal in stage I, 74% in stage II and 51% in stage III, as to nitrite, it remained, approximately, with the same concentration but with a small removal in 12^o cycle. There was an accumulation of nitrate in the cited middle as to the repression of the nitrate and nitrite reductase enzymes, due to the presence of ammonia, as the possible nitrate release in the fungal vacuoles. As a result, the orthophosphate removal percentage were 70, 96 and 74% for stages I, II and III, respectively. After microbiological tests, it was identified the contamination of the reactor by the fungus of the *Penicillium* genus, in addition to the inoculated specie, what apparently did not bring damage to the system biologic, due to the high removal achieved.

Key words: *Aspergillus niger*, sequential batch, BTX, nutrients, removal, immobilized biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Poços de água subterrânea catalogados pelo CPRM, em 2009, no Estado do Ceará.....	6
Figura 2 - Comportamento dos LNAPL e DNAPL após contaminação.....	10
Figura 3 - Fluxo multifásico dos (a) LNAPLs e (b) DNAPLs	11
Figura 4 - Evolução do número de áreas contaminadas cadastradas pela CETESB do ano de 2002 a 2008	15
Figura 5 - Atividades que causam a contaminação ambiental.....	15
Figura 6 - Participação de países selecionados no consumo mundial de petróleo no ano de 2008	18
Figura 7 - Estrutura química dos compostos BTX	20
Figura 8 - Crescimento dos fungos nas placas de Petri após 10 dias	41
Figura 9 - Câmara de Neubauer utilizada para a contagem dos esporos	42
Figura 10 - Ilustração do reator operado em regime de batelada sequencial (RBS)	45
Figura 11 - Variação de valores de pH ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	49
Figura 12 - Variação da concentração de amônia ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	50
Figura 13 - Variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	52
Figura 14 - Variação das concentrações de nitrito ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	53
Figura 15 - Variação das concentrações de ortofosfato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	53
Figura 16 - Variação das concentrações de DQO bruta ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	54
Figura 17 - Variação das concentrações de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	55
Figura 18 - Variação das concentrações Benzeno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	56
Figura 19 - Variação das concentrações de Tolueno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	58

Figura 20 - Variação das concentrações de Xileno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose	59
Figura 21 - Variação das concentrações de pH ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	60
Figura 22 - Variação das concentrações de amônia ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	61
Figura 23 - Variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	61
Figura 24 - Variação das concentrações de Nitrito ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	62
Figura 25 - Variação das concentrações de ortofosfato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	63
Figura 26 - Variação das concentrações de DQO bruta ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	63
Figura 27 - Variação das concentrações de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	64
Figura 28 - Variação das concentrações de Benzeno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	65
Figura 29 - Variação das concentrações de Tolueno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	65
Figura 30 - Variação das concentrações de Xileno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose	66
Figura 31 - Variação das concentrações de pH ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	68
Figura 32 - Variação das concentrações de amônia ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	68
Figura 33 - Variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	69
Figura 34 - Variação das concentrações de Nitrito ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	70
Figura 35 - Variação das concentrações de ortofosfato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	70
Figura 36 - Variação das concentrações de DQO bruta ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	71

Figura 37 - Variação das concentrações de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	71
Figura 38 - Variação das concentrações de Benzeno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	72
Figura 39 - Variação das concentrações de Tolueno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	72
Figura 40 - Variação das concentrações de Xileno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose	73
Figura 41 - (a) Placa com 16,25 mg/L de BTX, (b) 32,5 mg/L de BTX, (c) e 65 mg/L de BTX no quinto dia de cultivo para os testes de toxicidade.	77
Figura 42 - (a) Reator Original, (b) Contaminação do Reator.....	78
Figura 43 - Cultivo em placa de amostra da biomassa contida no meio suporte superfície da placa com crescimento de <i>Aspergillus niger</i> e contaminação por <i>Penicillium sp</i>	79
Figura 44 - Isolamento, em placas de Petri, do fungo <i>Penicillium sp.</i> , que contaminou o reator em batelada sequencial com inóculo de <i>A. niger</i> AN 400	79
Figura 45 - <i>Penicillium sp.</i> : hifas e respectivas cabeças conidiais presentes no reator em batelada sequencial com inóculo de <i>A. niger</i> AN 400. Aumento de 400 X.....	80
Figura 46 - <i>Aspergillus niger</i> : hifas e respectivas cabeças conidiais da espécie inoculada, cuja presença foi confirmada no início até o final da operação do reator em batelada sequencial	80
Figura 47 - Variação das concentrações de BTX no ensaio de volatilidade.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações máximas de compostos BTX	12
Tabela 2 - Normas Técnicas e suas especificações nos postos de serviço de combustível.	13
Tabela 3 - Reservas totais de petróleo, por localização (terra e mar), segundo Unidades da Federação - 2000-2008.....	17
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.....	21
Tabela 5 - Estrutura química e biodegradabilidade de compostos orgânicos derivados de petróleo	22
Tabela 6 - Solução de nutrientes utilizada no preparo da água contendo BTX	43
Tabela 7 - Variáveis monitoradas durante o desenvolvimento da pesquisa	47
Tabela 8 - Caracterização das águas oriundas do afluente e efluente do reator alimentado com 5 g/L de glicose	48
Tabela 9 - Caracterização das águas oriundas do afluente e efluente do reator alimentado com 1 g/L de glicose	59
Tabela 10 - Caracterização das águas oriundas do afluente e efluente do reator alimentado com 0,5 g/L de glicose	67
Tabela 11 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para a água tratada e não tratada	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA: Agência Nacional de Águas
ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural
BTX: Benzeno, Tolueno e Xileno
BTEX: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CI50: Concentração de Inibição de 50% de indivíduos
COH: Compostos Orgânicos Hidrofóbicos
CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente
CONCAWE: Conservation of Clean Air and Water in Europe
COT: Carbono Orgânico Total
CPRM: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNAPL: Dense Non-Aqueous Phase Liquids
DQO: Demanda Química de Oxigênio
DQOb: Demanda Química de Oxigênio bruta
FUNASA: Fundação Nacional de Saúde
HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LNAPL: Light Non-Aqueous Phase Liquids
NAPL: Non-Aqueous Phase Liquids
pH: Potencial Hidrogeniônico
POA: Processos Oxidativos Avançados
PVC: Policloreto de Vinila
SS: Sólidos Suspensos
TDH: Tempo de Detenção Hidráulica
UPGN: Unidade de Processamento de Gás Natural
VOC: Compostos Orgânicos Voláteis

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 A Disponibilidade Hídrica do Brasil	4
3.2 A Legislação Ambiental	12
3.3 Importância da Indústria Petrolífera no Brasil	15
3.4 Compostos BTX e suas Características	19
3.5 Métodos Utilizados para Descontaminação de Meio Contaminado por BTX	25
3.5.1 Atenuação natural	25
3.5.2 Fitorremediação	26
3.5.3 Tratamento químico	27
3.5.4 Processos oxidativos avançados (POA)	27
3.5.5 Biorremediação	28
3.6 Uso de Fungos na Biodegradação de Compostos Persistentes	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Inóculo	41
4.2 Cultivo e Produção dos Esporos	41
4.3 Adição do BTX e Nutrientes à Água	42
4.4 Teste de Toxicidade em Placas	43
4.5 Teste de Toxicidade com Sementes de Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	44
4.6 Reator em Batelada Sequencial (RBS) com Biomassa Imobilizada	44
4.6.1 Imobilização da biomassa fúngica	44
4.6.2 Montagem e operação do reator em batelada sequencial (RBS)	45

4.6.3 Análises microscópicas	46
4.7 Ensaio de Volatilidade	46
4.8 Métodos Analíticos	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Etapa I: Caracterização da Água Contendo BTX e Alimentada com 5g/L de Glicose.	48
5.2 Etapa II: Caracterização da Água Contendo BTX e Alimentada com 1g/L de Glicose.	59
5.3 Etapa III: Caracterização da Água Contendo BTX e Alimentada com 0,5g/L de Glicose.	66
5.4 Toxicidade com Sementes de Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	74
5.5 Teste de Toxicidade em Placas	76
5.6 Microscopia da Biomassa do Reator	78
5.7 Ensaio de Volatilidade	81
6 CONCLUSÕES	83
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICES	100

1. INTRODUÇÃO

A escassez de água motivada pela acentuada poluição dos mananciais superficiais e pela grande demanda de água, impulsiona o homem a buscar novas fontes de abastecimento e, neste contexto, a água subterrânea surge como refúgio para grande parcela da humanidade que a utiliza para diversos fins, tais como o abastecimento humano, na irrigação e em atividades industriais.

A reserva estratégica de água vem tendo sua qualidade ameaçada por compostos oriundos de produtos petrolíferos, particularmente, decorrente de vazamentos em tanques de armazenagem, problema que decorre do fato da maioria destes tanques estarem no final de sua vida útil, que é de aproximadamente 25 anos (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Segundo Kao *et al.* (2008), os vazamentos estão entre as maiores causas de contaminação das águas subterrâneas, sendo importante ressaltar que a dissolução de produtos contendo benzeno, tolueno e xileno aumentam a pluma de contaminação destas fontes de água.

De acordo com Silva *et al.* (2002), os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, por estarem presentes em concentrações significativas na gasolina, e possuírem razoável solubilidade em água (benzeno, 1760 mg/L; tolueno, 532 mg/L; e xileno, 163-185 mg/L) são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático.

A gasolina brasileira produz maior risco de contaminação ao atingir os lençóis subterrâneos, uma vez que apresenta o percentual obrigatório de álcool etílico de aproximadamente 25%, o qual aumenta a solubilização dos compostos BTX na água subterrânea e dificulta ainda mais a remediação. Isto ocorre porque o álcool misturado aos hidrocarbonetos e a água poderia causar o efeito de cossolvência que tende a aumentar a solubilidade e o transporte na água dos compostos aromáticos (CIMA, 2007; SILVA *et al.*, 2002).

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza microrganismos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo que podem ser biorremediados de ambientes contaminados, e que se destaca por ser muito eficiente na recuperação de ambientes poluídos e não resulta em alteração do equilíbrio ecológico (SOUZA *et al.*, 2005).

A realização de estudos sobre a biodegradação de compostos tóxicos, como o BTX, com o objetivo de restaurar a qualidade de águas subterrâneas e superficiais, até níveis que garantam seus usos múltiplos previstos pelos órgãos de fiscalização ambiental, é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de remediação.

Neste contexto merece destaque a capacidade de fungos filamentosos como agentes degradadores eficazes para uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, as quais são comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias têxteis entre outras bem como em aquíferos contaminados. A tecnologia de reatores com fungos no saneamento ambiental é uma realidade e estes microrganismos se constituem em poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento (SAMPAIO *et al.*, 2005; RODRIGUES 2006, SANTAELLA *et al.*, 2009).

Assim, visando contribuir para o fornecimento da tecnologia em prol da despoluição de águas contendo BTX, neste trabalho foi estudada a utilização de reator biológico com inóculo de *Aspergillus niger* para a remoção destes compostos em meio aquoso.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a remoção de compostos BTX (benzeno, tolueno e xileno) em meio aquoso por uso de reatores inoculados com *Aspergillus niger* AN 400 operados em regime de batelada sequencial.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a influência da concentração de glicose (5, 1 e 0,5 g/L) sobre a eficiência de remoção de compostos BTX e de matéria orgânica em reator em bateladas seqüenciais;
- Determinar a eficiência de remoção de amônia, nitrato, nitrito e fósforo de meio aquoso contendo BTX em reator biológico seqüencial inoculado com *Aspergillus niger* AN 400;
- Realizar ensaio para determinar o potencial de volatilização do BTX em meio aerado;
- Avaliar a tolerância da linhagem *Aspergillus niger* AN 400 aos compostos BTX em teste de toxicidade em placas;
- Avaliar a toxicidade dos compostos BTX em bioensaios de toxicidade com semente de alface (*Lactuca sativa*).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Disponibilidade Hídrica do Brasil e a Contaminação Ambiental

Segundo dados da ANA (2009), o Brasil detém 12% da água doce do planeta. A maior parte desta água está localizada na bacia amazônica, onde nossas demandas para usos consuntivos (os que consomem água), como o abastecimento doméstico e a indústria são insignificantes. No Nordeste, onde vive 30% de nossa população, somente 3% destes recursos hídricos estão disponíveis.

O Estado do Ceará está localizado na região Nordeste do Brasil e abrange uma superfície de cerca de 148.000 km² que apresenta regime pluviométrico marcado por extrema irregularidade de chuvas no tempo e no espaço. Neste cenário, a água constitui um bem natural de elevada limitação ao desenvolvimento socioeconômico desta região e, até mesmo, na subsistência da população (IBGE, 2009).

Para efeito de gerenciamento de recursos hídricos em um contexto emergencial, como é o caso das secas, merece destaque o grau de utilização das fontes de abastecimento de água subterrânea, pois este recurso torna-se significativo no suprimento hídrico da população e dos rebanhos. Adicionalmente a perfuração de poços tubulares vem sendo realizada de forma generalizada em todo o Nordeste e, mais particularmente na área semi-árida devido às estiagens prolongadas e a ausência de controle dos órgãos responsáveis (SANTANA, 2008).

A importância da água subterrânea é extremamente relevante como fonte de abastecimento doméstico, industrial e agrícola, pois mais da metade da água de abastecimento público no Brasil procedem das reservas subterrâneas (CETESB, 2004).

Segundo o Censo de 2000, aproximadamente 61% da população brasileira é abastecida com água subterrânea, para fins domésticos, sendo que 10% se auto-abastece das águas de poços rasos, até 30 m de profundidade, 20% de nascentes ou fontes e 70% de poços profundos, acima de 50 m de profundidade (IBGE, 2009).

Quase toda a água subterrânea existente na Terra tem origem no ciclo hidrológico, isto é, no sistema pelo qual a natureza faz a água circular do oceano para a atmosfera e daí para os continentes, de onde retorna, superficialmente ou subterraneamente ao oceano (CPRM, 2009).

Quando as águas meteóricas se precipitam da atmosfera na superfície da terra, parte da água escorre superficialmente até os rios, lagos e oceanos; parte infiltra e outra parte retorna a atmosfera por evapotranspiração que é a soma dos processos de evaporação direta da água e da transpiração da vegetação. Assim, os rios representam o sistema de drenagem da água doce para o mar, enquanto que os aquíferos representam os sistemas de armazenamento de água doce no continente (CETESB, 2004).

Conforme Donaire (2007) é importante ressaltar que, de forma sistêmica, o que ocorre com o solo repercute nas águas subterrâneas, já que fazem parte do mesmo contexto, podendo resultar em alterações na qualidade das mesmas. Assim, a migração dos poluentes através do solo para as águas superficiais e subterrâneas constitui uma ameaça para a qualidade dos recursos hídricos utilizados em abastecimento público, industrial, agrícola, comercial, lazer e serviços.

Os dados obtidos na Assembléia Legislativa do Estado Ceará, em 2008, demonstraram que até 2006 existiam na região Nordeste 96.134 poços tubulares cadastrados, dos quais mais de 49 mil (51%) foram perfurados em rochas cristalinas (aquíferos fissurais). Contudo, os dados demonstram que existe um numero muito superior a 100 mil poços no Nordeste, sem considerar o estado de Sergipe e 63% dos municípios da Bahia (SANTANA, 2008).

Segundo dados recentes da CPRM (Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais), no Brasil em 2009 foram catalogados 184.393 poços de água subterrânea, dos quais 20.107 estão no Estado do Ceará. No entanto, é estimado que em todo o país haja pelo menos 400.000 poços (ZOBY e MATOS, 2002). Na Figura 1 cada ponto em azul representa um poço de abastecimento de água existente no Ceará.

Conforme Tiburtius (2004), a contaminação de águas subterrâneas por compostos orgânicos representa sérios problemas à saúde pública, principalmente, compostos como benzeno, tolueno e xilenos (BTX) que são freqüentemente encontrados em águas subterrâneas, por causa de vazamentos em tanques de estocagem.

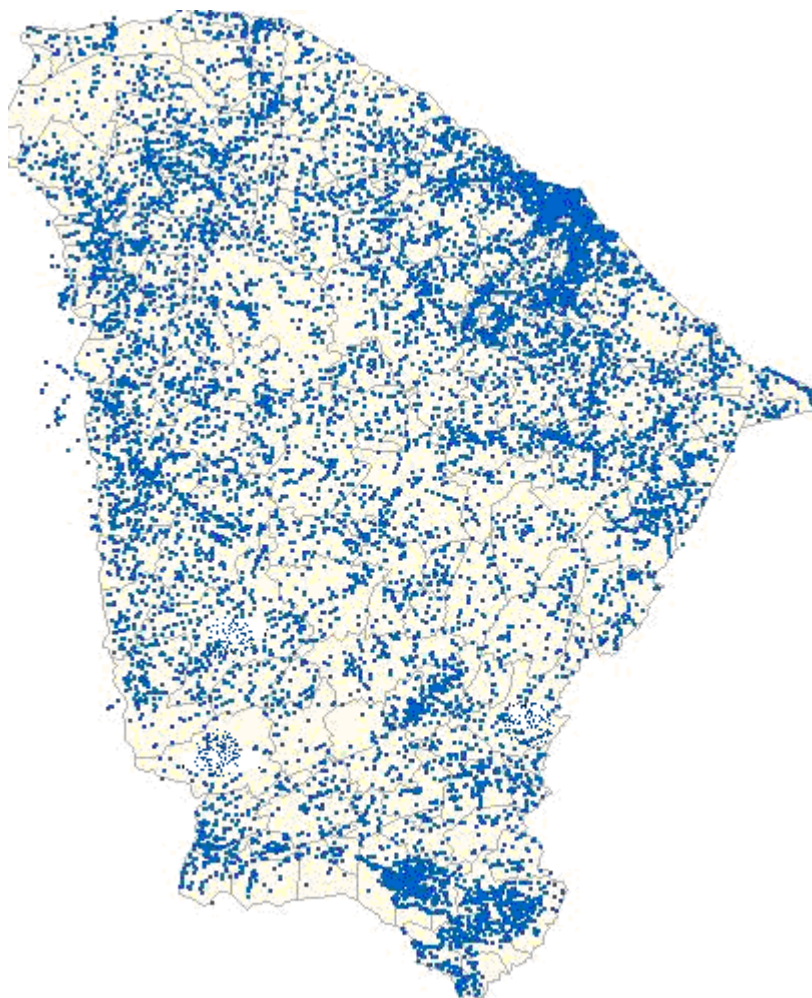


Figura 1- Poços de água subterrânea catalogados pelo CPRM, em 2009, no Estado do Ceará. Fonte: SIAGAS (Sistema de Informação de Águas Subterrâneas) 2009.

Conforme Manzochi (2001) citado por Tiburtius (2004), que acompanhou as atividades operacionais de abastecimento e descarga de combustíveis e troca de óleo em um posto de abastecimento de combustíveis de Florianópolis (SC) o material derramado dos postos de gasolina podem contaminar o solo e a água, atingindo rios, lençóis freáticos e galerias pluviais. Considerando o vazamento de 10 mL de gasolina por dia, durante um ano, estima-se que pode haver comprometimento de três milhões de litros de água. A extensão da contaminação depende do vazamento e das condições do local onde o posto está instalado (tipo do solo). A contaminação do solo e da água pode trazer graves consequências, inclusive riscos à saúde pública, principalmente em áreas urbanas. Exemplos citados são as cidades de Cascavel e Campo Largo (PR), que tiveram durante 2001 o

abastecimento de água suspenso, devido à contaminação dos mananciais fornecedores por postos de combustível da região.

Martins (2004) avaliou as emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos. Os tanques de gasolina figuraram como a segunda maior fonte de emissões atmosféricas, com perdas de 65,64 t.ano⁻¹. Em 1998, uma pesquisa realizada pela CONCAWE (conservation of clean air and water in europe), em 64 terminais marítimos da Comunidade Européia, concluiu que 13,2 mil toneladas de gasolina foram emitidas sem controle para a atmosfera (CONCAWE, 2002).

Um agravante a este problema é que a detecção da contaminação ambiental muitas vezes só é descoberta quando substâncias nocivas aparecem nos reservatórios de água potável em níveis que comprometam o seu uso, que ocorre quando o contaminante já se espalhou por uma grande área. A dimensão deste problema se expande quando se considera que, aproximadamente, 60% dos municípios brasileiros utilizam águas subterrâneas para consumo humano (CORSEUIL *et al.*, 2004).

Apesar dos aquíferos apresentarem uma proteção natural contra poluição em função do solo sobreposto e das camadas confinantes, se a água subterrânea for contaminada, os custos e o tempo para a descontaminação são superiores aos da água superficial, em muitos casos, inviabilizando seu uso. Em geral quando se detecta poluição nas águas subterrâneas, necessita-se de um intenso trabalho de investigação para delimitar as plumas e determinar a origem da contaminação, que pode ter ocorrido há vários anos ou em locais distantes do poço contaminado (CETESB, 2004).

O maior problema da contaminação por gasolina está relacionado aos hidrocarbonetos aromáticos, dentre os quais se destacam benzeno, tolueno e xileno. Estes hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possui uma maior mobilidade em água, característica que pode ser representada significativamente pelo menor coeficiente de partição octanol-água. Um menor coeficiente de partição implica em uma lenta adsorção no solo e um transporte preferencial via água (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Dentre os componentes do petróleo, o benzeno, tolueno e xileno constituem a parcela mais tóxica para os moluscos marinhos e peixes quando ocorre um

derramamento de petróleo no oceano, seja de um navio petroleiro ou de uma plataforma marítima de exploração de petróleo (BAIRD, 2002).

Segundo Baird (2002), os contaminantes orgânicos típicos dos suprimentos de água subterrânea, em geral mais importantes, são os solventes clorados, com destaque para os tricloroeteno (C_2HCl_3) e percloroeteno (C_2Cl_4) e os BTX: benzeno (C_6H_6), tolueno ($C_6H_5CH_3$) e os três isômeros do xileno (*o*, *m* e *p* - $C_6H_4(CH_3)_2$).

Diversos contaminantes químicos têm sido adicionados acidentalmente ou deliberadamente à água, alimentos e ao ar, resultando em degradação da qualidade ambiental, mesmo em baixas concentrações. A questão é se a presença destes poluentes, embora a baixas concentrações, afeta a saúde das pessoas e outros organismos vivos. Os efeitos são sutis e difíceis de serem detectados, porém estima-se que 80 a 90% do câncer humano podem ter causa ambiental (BAIRD, 2002).

A existência de áreas contaminadas causa diversos problemas, como danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de outros danos incalculáveis ao meio ambiente, muitas vezes ocasionado pelo desrespeito a procedimentos seguros e à ocorrência de acidentes ou vazamentos durante o desenvolvimento dos processos produtivos, de transporte ou de armazenamento de matérias primas e produtos (CETESB, 2008).

Segundo a CETESB (2001), em uma área contaminada, local ou terreno, onde há comprovadamente poluição ou contaminação pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural, os poluentes ou contaminantes podem se concentrar na sub-superfície ou nos diferentes compartimentos do ambiente, por exemplo, no solo, nos sedimentos, nas rochas, nos materiais utilizados para aterrar os terrenos, nas águas subterrâneas ou, de uma forma geral, nas zonas não saturada e saturada, além de poderem concentrar-se nas paredes, nos pisos e nas estruturas de construções.

Os poluentes ou contaminantes podem ser transportados a partir desses meios, propagando-se por diferentes vias, como, por exemplo, o ar, o próprio solo, as águas subterrâneas e superficiais, alterando suas características naturais ou qualidades e determinando impactos negativos e/ou riscos sobre os bens a proteger, localizados na própria área ou em seus arredores (CETESB, 2010).

As áreas comprometidas pela poluição os problemas gerados devido à existência destas podem ser originados a partir de grande quantidade de tipos de fontes potenciais de poluição, pois na maioria das atividades humanas são geradas substâncias, resíduos e/ou efluentes com potencial para comprometer os diferentes compartimentos do meio ambiente, destacando-se, o solo e as águas subterrâneas (CETESB, 2010).

De acordo com a CETESB (2004), as principais fontes de poluição para as águas subterrâneas estão relacionadas com o uso do solo para disposição de resíduos e infiltração de efluentes das atividades química, mecânica, metalúrgica e curtume, além de fontes consideradas difusas como a agricultura, notadamente a adubação pesada e o uso inadequado de pesticidas. Não são raros os casos de poços tubulares que apresentam contaminação por substâncias orgânicas tóxicas. Isso se deve ao fato da intensa industrialização e ao grande número de postos de serviço com tanques de combustíveis com possibilidade de vazamento, o que faz dessa atividade uma das principais fontes de poluição das águas subterrâneas nos perímetros urbanos.

Deotti (2005) relatou que a migração de compostos orgânicos no solo constitui um fluxo multifásico composto por fases não-aquosas (não dissolvidas em água), uma fase aquosa (do líquido intersticial e compostos solubilizados) e pela fase de vapor (compreendendo os vazios não preenchidos pela água na região não saturada e os gases liberados pela volatilização dos compostos orgânicos), esta última fase podendo não existir na zona saturada do solo.

Conforme este autor, as características mais importantes ao se avaliar o comportamento de compostos orgânicos no solo envolvem:

- *Solubilidade em água*: os compostos miscíveis em água têm sua migração controlada preferencialmente pela fase aquosa, enquanto os compostos não miscíveis em água (também conhecidos como NAPLs – Non-Aqueous Phase Liquids) são controlados pela fase não aquosa e podem ser divididos em duas subfases: a) fase líquida não aquosa densa (DNAPL – *dense non-aqueous phase liquids*) e b) fase líquida não aquosa leve (LNAPL- *light non-aqueous phase liquids*).
- *Densidade relativa à água*: em especial, os líquidos menos densos que a água (LNAPLs) tende a ficar suspensos, acima do nível do lençol freático (podendo ser com o tempo lentamente dissolvido em água e transportado), enquanto os mais densos (DNAPLs), ou seja, os compostos que formam a fase líquida não aquosa

densa tendem a atravessar o meio aquoso e pela ação da gravidade, penetrando no solo, nas fissuras das rochas até encontrar alguma camada impermeável.

- *Volatilidade*: para o composto volátil existirá uma frente de vapores que atravessa a zona não saturada e chega à superfície.

- *Viscosidade relativa*: em geral, quanto maior a viscosidade menor a velocidade de percolação.

Segundo Donaire (2007), o comportamento dos compostos orgânicos que migram para o lençol freático depende de sua densidade relativa à da água (1,0 g/mL). Os chamados LNAPL (*Light Non-Aqueous Phase Liquids*) se caracterizam como líquidos não solúveis em água constituídos por COH (*Hydrophobic Organic Compounds*), os quais são compostos orgânicos hidrofóbicos menos densos do que a água e formam, portanto uma pluma de contaminação na subsuperfície do lençol freático. Todos os hidrocarbonetos que têm uma massa molar pequena ou média pertencem a esse grupo inclusive a fração BTEX da gasolina e outros derivados do petróleo.

Em contraste, todos os solventes policlorados são classificados como DNAPL (*Dense Non-Aqueous Phase Liquids*), também são constituídos de COH e mais densos do que a água. Em geral, tendem a descer até a parte mais profunda dos aquíferos e as principais moléculas envolvem: o cloreto de metileno, o clorofórmio, o tetracloreto de carbono e o 1,1,1- tricloroetano.

Na Figura 2 é ilustrado o comportamento das plumas de contaminação no lençol freático. Outros compostos orgânicos não-clorados, mas de massa molar elevada, como o creosoto e alcatrão também classificados como DNAPL (BAIRD, 2002).

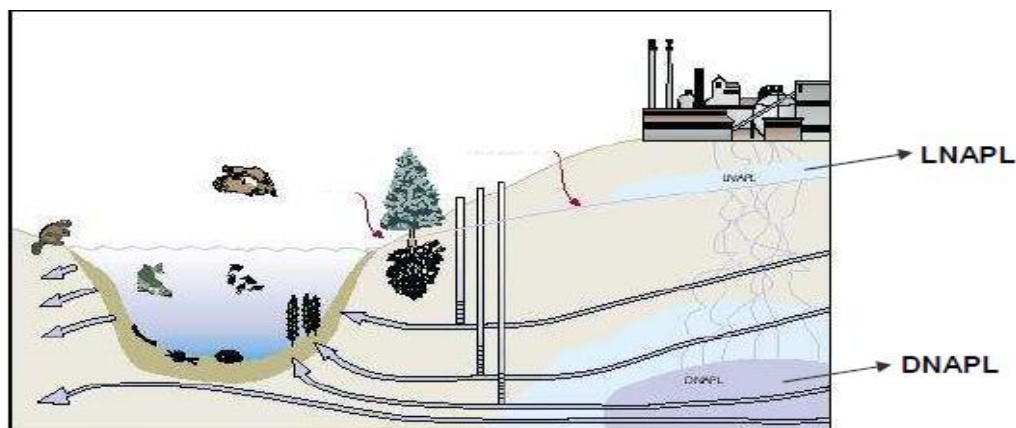


Figura 2 - Comportamento dos LNAPL e DNAPL após contaminação. Fonte: (Donaire, 2007).

Deve-se considerar que, mesmo contendo baixa solubilidade em água, tanto os LNAPL como os DNAPL solubilizam-se gradualmente com o tempo, tornando-se um suprimento contínuo de contaminantes para as águas subterrâneas, aonde plumas de contaminação vão se formando na direção do fluxo da água, comprometendo assim todo o volume do aquífero (DONAIRE, 2007).

Mariano (2006) avaliando um vazamento, ocorrido há dez anos, em um posto de gasolina observou uma espessa camada de óleo acima da água subterrânea, após ter sido coletada, a mesma foi analisada e apresentou as seguintes concentrações de BTEX: 112.1; 98.5; 115.7 e 865.8 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Comprovando a persistência destes compostos em aquíferos subterrâneos. Na Figura 3 é mostrado o fluxo multifásico dos compostos derivados de petróleo e ilustra alguns aspectos da migração destes contaminantes.

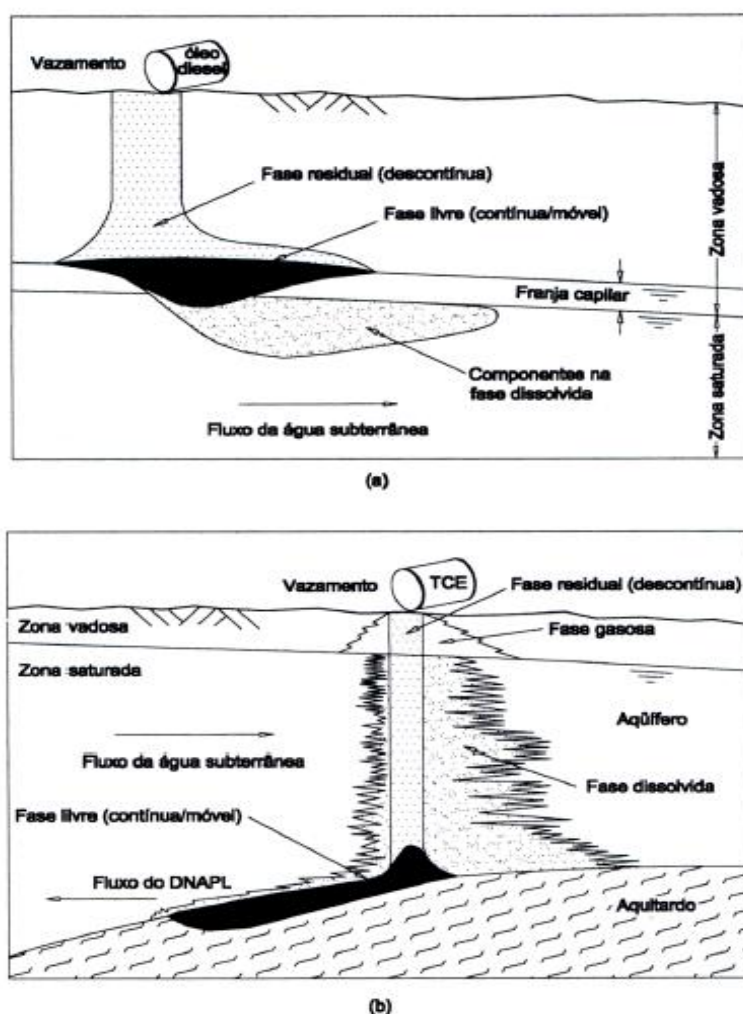


Figura 3 - Fluxo multifásico dos (a) LNAPLs e (b) DNAPLs. Fonte: (MIRANDA NETO, 2002).

3.2. A Legislação Ambiental

O avanço da industrialização de centros urbanos e da concentração e formação de pólos industriais nas décadas recentes têm promovido grande demanda por derivados de petróleo, o que vem a acarretar em aumento substancial dos riscos de ocorrência de acidentes com danos, tanto para a vida humana quanto para o ambiente (PEDRO, 2006).

A utilização da legislação como instrumento de prevenção e de controle visando à remediação de áreas contaminadas é ferramenta eficaz na busca pela proteção do meio ambiente. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), pela Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, estabeleceu critérios de lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora em corpos d'água receptores. Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações máximas permitidas de benzeno, tolueno e xilenos em águas de domínio nacional, segundo a referida resolução.

Tabela 1- Concentrações máximas de compostos BTX.

Composto	Valor máximo em águas doces	Valor máximo em águas salobras
Benzeno	0,005 mg/L	0,700 mg/L
Tolueno	0,002 mg/L	0,215 mg/L
Xilenos	0,300 mg/L	-

Fonte: Adaptado do CONAMA (2005).

O Artigo 24 da referida resolução determina que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis. O Artigo. 28 estabelece que os efluentes lançados não devem conferir ao corpo de água características em desacordo com as metas obrigatórias progressivas, intermediárias e finais do seu enquadramento.

No Brasil, a legislação vigente sobre postos de gasolina segue as Normas Brasileiras (NBR) desenvolvida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A NBR 7505-1, de agosto de 2000 fixou as condições exigíveis para projetos de instalações de armazenagem de líquidos inflamáveis e combustíveis

contidos em tanques estacionários, com capacidade superior a 250 L, à pressão manométrica igual ou inferior a 103,4 kPa (15 psig), medida no topo do tanque.

De acordo com o item 4.3.1.1 desta norma, as bacias de contenção nas quais os tanques de armazenamento líquidos inflamáveis estão inseridos, devem ter coeficiente de permeabilidade inferior a 10^{-6} cm/s, referenciado à água a 20°C e a uma coluna de água igual à altura do dique de proteção. Na Tabela 2 são apresentadas algumas normas técnicas relacionadas aos postos de serviço visando à prevenção de acidentes.

Tabela 2 - Normas Técnicas e suas especificações nos postos de serviço de combustível.

Norma Técnica	Especificação
NBR 17505/2006	Armazenagem e manuseio de líquidos inflamáveis e combustíveis
NBR 5363/1998	Equipamentos elétricos para atmosferas explosivas tipo de proteção – especificação
NBR 14867/2002	Posto de serviço – tubos metálicos flexíveis
NBR 5418/1995	Instalações elétricas em atmosferas explosivas
NBR 14639/2001	Posto de serviço – instalações elétricas
NBR 7505-1/2000	Armazenagem de líquidos inflamáveis e combustíveis parte de armazenagem em tanques estacionários
NBR 14722/2001	Posto de serviço – tubulação não metálica.
NBR 7505-4/2000	Armazenagem de líquidos inflamáveis e combustíveis para parte proteção contra incêndio
NBR 13788/1997	Proteção catódica para sistemas de armazenamento subterrâneo de combustíveis em posto de serviço
NBR 13781/2001	Manuseio e instalação de tanques subterrâneos de combustíveis
NBR 14605/2000	Posto de serviço – sistema de drenagem oleosa
NBR 13782/1997	Sistema de proteção externa para tanque atmosférico subterrâneo em aço carbono e suas tubulações para postos de serviço
NBR 14623/2000	Poço de monitoramento para detecção de vazamento.
NBR 13783/1997	Instalação hidráulica de tanques subterrâneos em posto
NBR 14606/2000	Entrada em espaço confinado
NBR 13784/1997	Detecção de vazamento em postos de serviço
NBR 13787/1997	Controle de estoque do sistema de armazenamento subterrâneo de combustível em posto de serviço
NBR 13785/1997	Construção de tanque atmosférico subterrâneo em aço carbono de parede dupla metálica ou não metálica
NBR 13786/2001	Seleção de equipamentos e sistemas de instalação subterrânea de combustível

No Brasil, o reconhecimento do potencial poluidor dos tanques de armazenamento subterrâneo levou à elaboração da Resolução nº 273 do CONAMA, de 19 dezembro de 1997, que estabeleceu normas para instalação e operação de postos revendedores de combustível em função de licenciamento prévio do órgão ambiental, pois a ocorrência de vazamentos, principalmente, em função da manutenção inadequada ou insuficiente, da obsolescência do sistema e equipamentos e da falta de treinamento de pessoal aumentou significativamente nos últimos anos.

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2008), em novembro de 2004, identificou, no Estado de São Paulo, 1.336 áreas contaminadas das quais 931 registros (69% do total) eram postos de combustíveis. Em novembro de 2008, o número de áreas contaminadas, aumentou para 2.514. O aumento destas áreas demonstrou o esforço na identificação de novas áreas contaminadas, passando de 2.272 no ano de 2007 para 2.514 o número de áreas contaminadas registradas. Na Figura 4 é mostrada a evolução do número de áreas contaminadas cadastradas no país.

Os postos de combustíveis destacaram-se na lista de novembro de 2008, conforme Figura 5, com 1.953 registros (78% do total), seguidos das atividades industriais com 337 (13%), das atividades comerciais com 120 (5%), das instalações para destinação de resíduos com 80 (3%) e dos casos de acidentes e fonte de contaminação de origem desconhecida com 22 (1%). Esta contribuição de 78% do número total de áreas contaminadas registradas atribuídas aos postos de combustíveis é resultado do desenvolvimento do programa de licenciamento que se iniciou em 2001 que exige a realização de investigação confirmatória, com o objetivo de verificar a situação ambiental do empreendimento a ser licenciado, bem como a realização da troca dos equipamentos com mais de 15 anos de operação (CETESB, 2008).

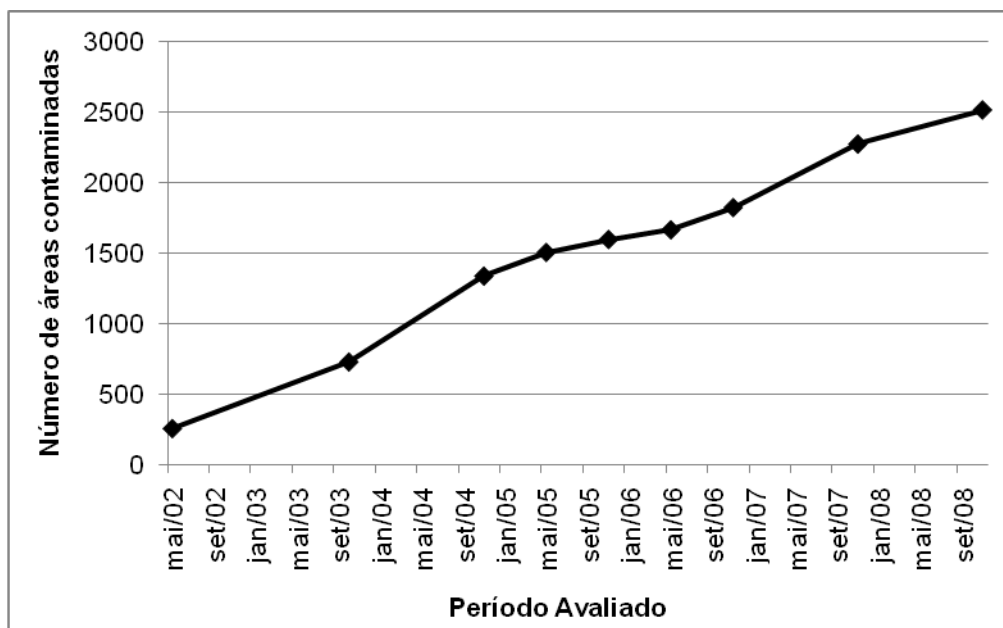


Figura 4- Evolução do número de áreas contaminadas cadastradas pela CETESB do ano de 2002 a 2008. Fonte: (CETESB, 2008).

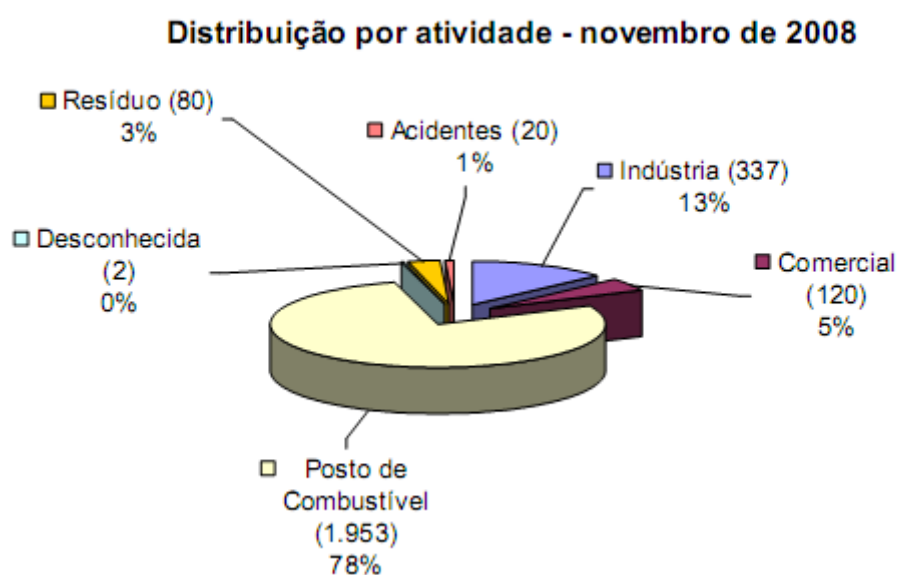


Figura 5- Atividades que causam a contaminação ambiental. Fonte: (CETESB 2008).

3.3 A Importância da Indústria Petrolífera no Brasil

A indústria petrolífera gera muitas riquezas através do petróleo que é uma das principais fontes de energia utilizadas pela humanidade. Além de sua importância como fornecedor de energia, os derivados do petróleo são a matéria-prima para a

manufatura de inúmeros bens de consumo, e, deste modo, têm papel cada dia mais presente e relevante na vida das pessoas (MELLO, 2007).

No ano de 2007, foi processado pelo parque de refino nacional cerca de 1,8 milhão barris/dia de petróleo (636,8 milhões de barris no ano), volume 1,8% superior ao processado no ano de 2006 (ANP, 2008). Ainda de acordo com a ANP (Agência Nacional de Petróleo (2008), no ano de 2007 as reservas provadas de petróleo no Brasil atingiram a marca de 12,6 bilhões de barris. Com isso, o país subiu duas posições no *ranking* mundial, passando a deter o 15º maior volume de reservas provadas de petróleo. A produção brasileira de derivados de petróleo energéticos e não-energéticos no ano 2007 foi de 110 milhões m³, 3% superior ao volume registrado em 2006. Deste total, 95,6% foram produzidos em refinarias, 3% em unidades de processamento de gás natural (UPGNs), 0,9% em centrais petroquímicas e o restante (0,5%) por outros produtores autorizados pela ANP. Os derivados energéticos representaram 84% do total produzido e seu volume teve um crescimento de 2,1% em 2007 com relação a 2006. Do volume total de derivados produzidos no Brasil, o óleo diesel participou com 35,5% (39,1 milhões m³) e a gasolina A com 19,6% (21,6 milhões m³).

Em 2008, as reservas totais de petróleo, soma das reservas provadas, prováveis e possíveis, foram contabilizadas em 20,9 bilhões de barris, o que refletiu a taxa de crescimento anual de 4,8%, dos últimos 10 anos. As reservas provadas corresponderam a 12,8 bilhões de barris em 2008 (volume 1,4% superior ao registrado em 2007), representando 61,4% das reservas totais. Nesse mesmo ano, o Brasil ocupou a 16º posição no ranking mundial quanto às reservas provadas de petróleo (ANP, 2008).

Das reservas provadas nacionais, 93% localizam-se em mar, com destaque para o Rio de Janeiro (que detém 80,7% das reservas provadas *offshore*, localizado ou operado no mar), e 7% situavam-se em jazidas terrestres. Em 2008, o maior crescimento das reservas provadas foi registrado nas jazidas *offshore* do Estado da Bahia, que aumentou 57,5% (ANP, 2008).

Na Tabela 3 são apresentadas as reservas totais de petróleo, por localização (terra e mar), segundo as unidades da federação no período de 2000 a 2008. Em termos de consumo de petróleo, segundo dados da ANP, em 2008, o Brasil consumiu 1,8 milhão barris/dia, 2,3% do total mundial e 0,1% a mais do que o

consumido em 2007, ocupando a 12ª posição entre os consumidores de petróleo (Figura 6).

Tabela 3 - Reservas totais de petróleo, por localização (terra e mar), segundo Unidades da Federação no período de 2000 a 2008.

Unidades da Federação	Localização	Reservas totais de petróleo (milhões barris)								
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Total		12.961	12.993	13.076	13.494	14.768	16.132	18.175	20.380	20.855
Subtotal	Terra	1.224	1.215	1.371	1.360,7	1.299	1.355	1.569	1.458	1.456
	Mar	11.738	11.778	11.705	12.133	13.469	14.778	16.606	18.922	19.399
Amazonas	Terra	157,0	150,8	140,7	130,8	123,8	115,7	121,2	156,4	164,2
Ceará	Terra	22,8	15,6	15,2	14,6	17,6	16,8	14,9	27,5	23,1
	Mar	206,7	71,9	75,3	72,4	79,2	79,4	79,6	74,4	77,6
Rio Grande do Norte	Terra	385,1	345,1	345,5	338,2	310,0	328,2	371,9	357,4	349,5
	Mar	120,5	111,5	114,2	117,5	116,0	138,6	131,0	169,6	197,5
Alagoas	Terra	18,2	21,7	19,1	20,4	24,7	23,3	20,3	19,7	15,9
	Mar	3,4	2,5	2,5	2,4	2,0	1,4	1,3	0,9	0,8
Sergipe	Terra	215,7	234,5	226,9	295,9	307,9	356,8	334,7	338,9	342,6
	Mar	75,6	59,0	57,9	60,0	93,1	110,9	128,8	133,4	137,4
Bahia	Terra	250,5	274,8	342,9	370,4	402,5	424,4	511,9	473,1	475,6
	Mar	22,4	15,1	6,4	6,1	6,1	20,2	35,1	120,3	143,0
Espírito Santo	Terra	174,4	172,0	280,3	190,5	112,7	89,5	194,3	85,1	85,1
	Mar	9,9	10,7	81,7	73,3	1.531	1.423	1.893	2.390	2.381
Rio de Janeiro	Mar	11.234	11.433	10.561	11.047	11.514	12.915	14.218	15.910	16.372
São Paulo	Mar	5,8	5,2	4,5	4,0	63,0	23,8	42,4	37,7	28,8
Paraná	Terra	-	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0
	Mar	59,5	69,1	66,0	61,9	44,0	31,4	27,7	54,3	27,4
Santa Catarina	Mar	-	-	-	28,9	21,0	33,2	48,0	31,8	33,1

Fonte: ANP, 2008.

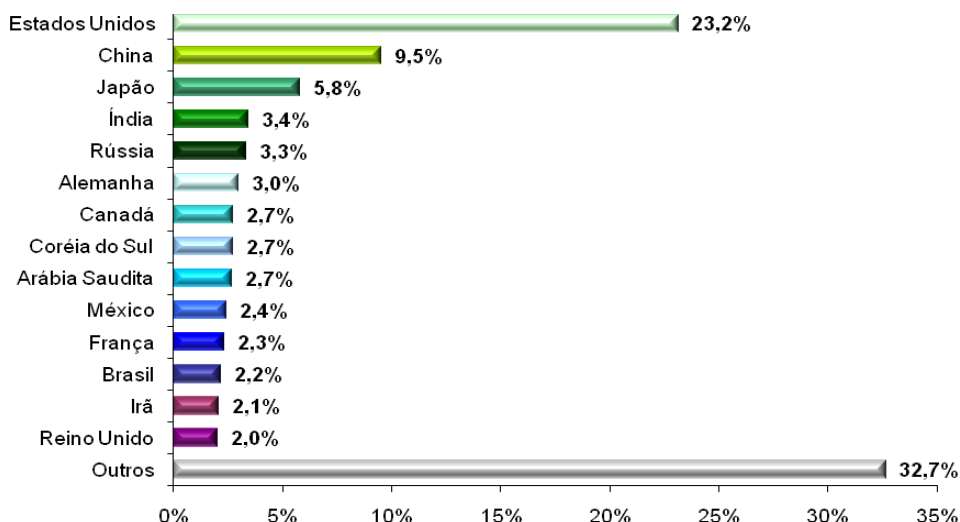


Figura 6 - Participação de países selecionados no consumo mundial de petróleo no ano de 2008. Fonte: (ANP, 2008).

No final de 2008, 36.730 postos operavam no país, número 4,9% superior ao observado no ano anterior. Deste total, 42,3% encontra-se na Região Sudeste, 21,2% na Região Sul, 21,3% na Região Nordeste, 8,8% na Região Centro Oeste e 6,5% na Região Norte. Ou seja, 84,8% dos postos revendedores localizavam-se nas Regiões Sudeste, Sul e Nordeste. São Paulo (23,4%), Minas Gerais (11,4%), Rio Grande do Sul (8,1%), Paraná (7,6%) e Rio de Janeiro (5,8%) concentram 56,3% dos postos revendedores de combustíveis automotivos (ANP, 2008).

No estado do Ceará o número de postos de gasolina cadastrados pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) foi de 1144, o que representa 3,11% dos postos de toda federação. No Brasil, conforme Brito *et al.* (2005), o número de postos que apresentam problemas varia de 20 a 30%, sendo que na maioria dos casos, os vazamentos somente são detectados depois da descoberta de seus efeitos.

Deste modo é extremamente importante o uso de monitoramento periódico da qualidade da água e do solo de poços próximos a postos de gasolina o que deve ser acompanhado pelo órgão público competente sobre o assunto para respaldar e proteger a população local, além de fiscalizar acompanhado de estudos geológicos e análises químicas efetivas fazendo uso de técnicas de detecção cada vez mais minuciosas.

3.4 Compostos BTX e suas Características

O petróleo é constituído de várias centenas de compostos orgânicos que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e poli aromático), asfaltenos (fenóis ácidos graxos e cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (piridina, quinolinas, carbazóleo, amidas, tiofeno entre outros) (MELO e AZEVEDO, 2008).

Segundo Bento (2005), as principais classes de hidrocarbonetos constituintes do petróleo são os alifáticos e os cíclicos. Os hidrocarbonetos alifáticos se dividem em: n-alcanos ou parafinas, alcanos ramificados ou isoprenóides e alcenos. Os hidrocarbonetos cíclicos são divididos em ciclos alcanos ou naftenos e aromáticos. Em média, o petróleo apresenta cerca de 30% de alcanos, 50% de ciclo alcanos e 15% de aromáticos.

Além de sua importância como fornecedor de energia, os seus derivados são a matéria-prima para a manufatura de inúmeros bens de consumo, e, deste modo, têm um papel cada dia mais presente e relevante na vida das pessoas. Como consequência de toda cadeia produtiva do petróleo e de seus derivados ocorre à geração de inúmeros impactos ao meio ambiente, pois o mesmo apresenta em sua composição hidrocarbonetos aromáticos de difícil biodegradação (MELLO, 2007).

No petróleo bruto, as frações de hidrocarbonetos leves formam os gases e as pesadas, o óleo cru. Entre os hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), os alcanos são encontrados no petróleo na faixa de 5 até 40 átomos de carbono. O gás natural associado ao petróleo contém os alcanos mais voláteis, isto é, aqueles com baixas massas molares (metano em sua maioria) e quantidades progressivamente menores de etano propano e butano. Os cicloalcanos são conhecidos também por naftênicos e os alcenos, também chamados de olefinas, são raros no petróleo (MELO e AZEVEDO, 2008).

Segundo Melo e Azevedo (2008), os hidrocarbonetos aromáticos compreendem o benzeno, os alquilbenzenos, como o tolueno, xilenos etilbenzeno e outros – e os policíclicos, entre os quais se citam o naftaleno, antraceno e o fenantreno. As resinas e os asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e condensação elevada de anéis aromáticos. Normalmente, tanto as resinas quanto os asfaltenos contém átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

A composição de 636 petróleos de diversas regiões do mundo foi avaliada, mostrando que as proporções de hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos variam muito dentro das seguintes faixas: 40 a 80% de hidrocarbonetos alifáticos; 15 a 40% de hidrocarbonetos aromáticos; 0 a 20% de resinas e asfaltenos o que dificulta a determinação de sua composição (MELO e AZEVEDO 2008). Os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (orto, meta e para), chamados compostos BTEX, são os constituintes da gasolina que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático (CORSEUIL, 2005; LEE e CHO, 2009). Na Figura 7 são apresentadas as estruturas químicas dos compostos BTX.

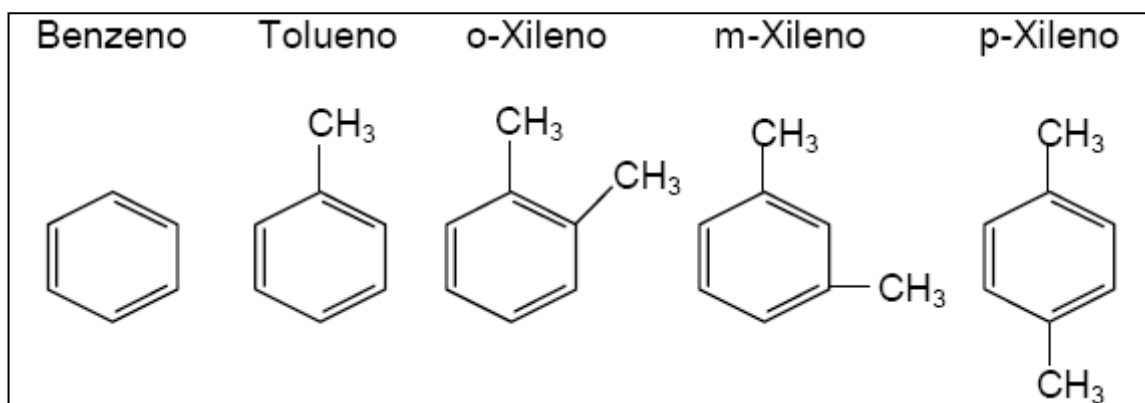


Figura 7 - Estrutura química dos compostos BTX.

Segundo Tiburtius (2004), os compostos aromáticos (BTEX e outros alquilbenzenos) perfazem cerca de 10% a 59% da gasolina (massa/massa), enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41% a 62%. Os compostos BTEX representam uma parcela de 18% a 25% em massa da gasolina os tornando os hidrocarbonetos mais abundantes na gasolina. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função da sua solubilidade em água ser da ordem de 3 a 5 vezes maior.

Ainda de acordo com Tiburtius (2004), hidrocarbonetos aromáticos têm também maior mobilidade em sistemas solo-água, característica que pode ser representada significativamente pelo menor coeficiente de partição entre octanol-água, como apresentado na Tabela 4, o que implica em uma lenta adsorção no solo

e, conseqüentemente, um transporte preferencial via água. Além de migrarem mais rapidamente através das águas atingindo mananciais de abastecimento, os compostos aromáticos apresentam uma toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos.

De acordo com Donaire (2007), a mobilidade dos hidrocarbonetos do petróleo no solo, na água e no ar é definida em função das suas características físico-químicas como a massa molar, a solubilidade, a polaridade, a densidade e os coeficientes de distribuição. O peso molecular afeta a densidade e a solubilidade do composto orgânico em água. A solubilidade, definida como sendo a máxima concentração de um composto químico em água considerando a influência da temperatura, tem grande importância na distribuição dos contaminantes para a água subterrânea. A polaridade está associada à presença de cargas positivas e negativas na molécula, o que influencia na distribuição dos contaminantes para a água. Os BTEX são compostos apolares e, portanto hidrofóbicos. A densidade relativa é a relação entre a densidade do composto e a densidade da água. A densidade relativa influencia a flotação dos compostos químicos.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.

Composto	Solubilidade em água (mg/L)	Log Kow
Benzeno	1760	2,12
Tolueno	532	2,73
Xileno	163-185	2,95-3,26
Nonano	0,122	4,67
Decano	0,021	6,69
Dodecano	0,005	7,24

Kow: coeficiente de partição octanol-água. Fonte: Tiburtius, 2004.

O aumento de contaminantes constituídos principalmente por compostos aromáticos tem despertado interesse no estudo da degradação destas substâncias. Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos orgânicos que contêm um ou mais anéis benzênicos, arrançados de forma linear, angular ou em grupos. A energia proveniente do efeito de ressonância das duplas ligações entre os átomos de carbono na estrutura do benzeno, tornando-o altamente resistente à degradação promovendo sua persistência na natureza (SOLOMONS e FRYHLE, 2004).

Muitos destes compostos aromáticos apresentam grupos funcionais ou estruturas parciais não naturais, ou seja, foram adicionadas por via sintética, sendo

denominados compostos xenobióticos, já que são estranhos ao meio ambiente. A grande maioria dos compostos xenobióticos é recalcitrante, entretanto, existem enzimas microbianas envolvidas na degradação destes compostos como as *hidrolases*, *oxigenases* e outras também envolvidas nas reações de desalogenação (MELO e AZEVEDO, 2008).

Na Tabela 5 é apresentada relação entre a estrutura química de alguns hidrocarbonetos de petróleo, quais derivados são encontrados e sua biodegradabilidade.

Tabela 5 - Estrutura química e biodegradabilidade de compostos orgânicos derivados de petróleo.

Biodegradabilidade	Exemplo de Constituintes	Derivados nos quais os constituintes são usualmente encontrados
Mais degradável	n-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, dimetilpenteno, metiloctanos	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decanos	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Tetradecanos	Óleos lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis para aquecimento
Menos degradável	Acenafitenos	Óleos lubrificantes

Fonte: MELO e AZEVEDO, 2008.

Os valores máximos permitidos para potabilidade dos diferentes hidrocarbonetos monoaromáticos, de acordo com o estabelecido pela Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde (FUNASA, 2004) são 0,005 mg L⁻¹ para o benzeno, 0,17 mg L⁻¹ para o tolueno e 0,3 mgL⁻¹ para o xileno. Esses compostos são poderosos depressores do sistema nervoso central, apresentando toxicidade crônica, mesmo em pequenas concentrações o benzeno, por exemplo, é classificado

como cancerígeno e imunodepressor, pois promove decréscimo na quantidade de leucócitos, hemácias e plaquetas do sangue. A exposição prolongada ao benzeno também pode produzir fadiga, náuseas, perda do apetite, vertigem, dor de cabeça, irritabilidade e nervosismo (MARIANO, 2001).

O contato prolongado do benzeno com a pele causa secura, dermatite e danos ao fígado, quando da exposição prolongada. A exposição crônica ao benzeno pode produzir um ataque à medula óssea, o que pode traduzir-se em anemia aplástica e leucemia aguda. Aberrações nos cromossomos têm sido observadas em animais e homens expostos ao benzeno, tanto em células da medula óssea como em linfócitos da corrente sanguínea (MARIANO, 2001).

Por ser muito lipossolúvel, o benzeno é rapidamente absorvido pela via respiratória quando inalado, e devido à sua grande afinidade por gordura é distribuído e armazenado em tecidos ricos em gorduras, tais como o sistema nervoso central e a medula óssea. Cerca de 50% do total de benzeno inalado são absorvidos pelo organismo. Do total absorvido, 10 a 50% são eliminados pela urina, após serem metabolizados no fígado. O efeito agudo na via respiratória é de irritação dos brônquios e da laringe, surgindo tosse, rouquidão e edema pulmonar. Porém, o benzeno atua predominantemente sobre o sistema nervoso central, agindo como depressor do mesmo, levando ao aparecimento de fadiga, dores de cabeça, tonturas, convulsão, coma e morte em consequência de parada respiratória. O benzeno predispõe a arritmias cardíacas graves, devido à sensibilização do músculo do miocárdio. A exposição a altas concentrações (mais de 20.000 mg/L) é rapidamente fatal (MARIANO, 2001).

Bono *et al.* (2001), investigando a poluição de aromáticos no ar, destacam que os hidrocarbonetos aromáticos provocam danos à saúde, principalmente devido à toxicidade e/ou mutagenicidade ou carcinogenicidade do BTX. Os autores também advertem que a inalação de tolueno ou xilenos pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além de sugerirem a associação entre benzeno e xilenos e o surgimento de tumores cerebrais.

O benzeno é reconhecidamente o mais tóxico de todos os BTEX, pois se trata de uma substância comprovadamente carcinogênica (podendo causar leucemia, ou seja, câncer dos tecidos que formam os linfócitos do sangue). Uma exposição aguda (altas concentrações em curtos períodos) por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte de uma pessoa (BRITO, 2005).

Segundo Ribeiro (2005), o benzeno atua no sistema reprodutivo podendo causar deformações no feto (efeito teratogênico), disfunções sexuais como infertilidade e aborto, podendo ainda agir nos sistemas neurológico e imunológico. Mas, o principal prejuízo deste tóxico para o ser humano é sua comprovada carcinogenicidade.

De acordo com Gurnham (1965) citado por Mariano (2001), um modo comum através do quais substâncias químicas promovem intoxicações agudas, particularmente em organismos aquáticos, é a narcose. A narcose ocorre quando uma substância química se acumula, de maneira não específica, nas membranas celulares e interfere com o funcionamento normal dessas membranas. A resposta típica a este fenômeno é um decréscimo de atividade, redução da reação a estímulos externos e maior pigmentação, no caso dos peixes. Os efeitos são reversíveis, e os organismos normalmente retornam à condição inicial quando a substância é removida do meio ambiente no qual eles vivem. Entretanto, a narcose prolongada pode resultar em morte. O benzeno é uma das substâncias químicas que provocam a narcose.

Em relação ao tolueno, verifica-se que o mesmo está associado com as disfunções hepáticas e gastrointestinais sendo, também, teratogênico. Os distúrbios mais comuns observados com a exposição crônica aos vapores de xilenos são fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, fraqueza, perda de memória, sonolência, distúrbio do humor e do equilíbrio, zumbido, náuseas, e perda do apetite. Em concentrações elevadas pode levar a inconsciência e morte, por depressão do sistema nervoso central (RIBEIRO, 2005).

A resolução normativa - RN 15 do Ministério do Trabalho estabeleceu as atividades ou operações nas quais os trabalhadores ficam expostos a agentes químicos, abordando a questão de insalubridade, que ocorrerá quando forem ultrapassados os limites de tolerância. De acordo com esta legislação, o etilbenzeno, o tolueno e o xileno possuem grau de insalubridade médio, já o benzeno, de potencial muito mais cancerígeno, teve proibida a sua utilização, a partir de 01 de janeiro de 1997, para qualquer emprego, exceto nas indústrias e laboratórios que o produzem; em processos de síntese química ou na produção de combustíveis derivados de petróleo; ou em trabalhos de análise ou investigação realizados em laboratório, quando não for possível sua substituição; ou na produção de álcool anidro, até a data a ser definida para a sua substituição.

3.5 Métodos Utilizados para Descontaminação de Meio Contaminado por BTX

As atividades de remediação podem ser classificadas como *in-situ* ou *ex-situ*, critério que leva em consideração o local onde o processo de remediação será aplicado. Classifica-se também como ativa ou passiva quanto ao tipo de técnica. São consideradas técnicas passivas aquelas que promovem a descontaminação do meio sem que haja a necessidade de fornecimento de energia durante o seu funcionamento, para que o processo seja efetivo. Já nas técnicas consideradas ativas há a necessidade de fornecimento de energia durante o processo de remediação (DEOTTI, 2005).

Algumas tecnologias de remediação de águas subterrâneas e solos são: Barreira hidráulica; *Pump-and-treat*, Extração multifásica, Oxidação química, Extração de vapores do solo, *Air sparging*, *Air stripping*, Biopilhas, Biorremediação; *Soil flushing*, Bioventing, Atenuação natural, *Biosparging*, Dessorção térmica e Fitorremediação. Particularmente, conforme os objetivos deste trabalho irão ser destacados algumas técnicas utilizadas para remediação de áreas contaminadas.

3.5.1 Atenuação natural

De acordo com Silva (2009), a atenuação natural ou a biorremediação intrínseca é uma técnica que consiste na opção de não se intervir no local impactado, deixando que os fenômenos naturais atuem como agentes de remediação. Embora pareça um método cômodo, a biorremediação intrínseca requer constante monitoramento e adequação das análises requeridas ao acompanhamento do processo que auxiliam na avaliação da eficácia do tratamento.

A atenuação natural monitorada (ANM) é o uso de processos naturais encontrados em subsuperfície, que reduz as concentrações do contaminante a níveis que não ofereçam riscos a saúde humana e ao meio ambiente, num prazo de tempo razoável comparado aos oferecidos pelos métodos ativos. Esses processos físicos, químicos e biológicos, que atuam sem a ação do homem na redução de massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração dos contaminantes, incluem volatilização, dispersão, diluição, sorção, biodegradação e reações químicas com materiais de subsuperfície. A biorremediação intrínseca não é uma tecnologia propriamente dita, e sim uma estratégia de remediação. O uso desta abordagem requer avaliações da taxa de degradação dos contaminantes e de suas vias de transporte, uso de modelagem matemática para prever as concentrações dos

contaminantes a montante de pontos receptores sensíveis (poços de abastecimento de água, corpos d'água superficiais), principalmente quando a pluma de contaminação está ainda se expandindo (MELO e AZEVEDO, 2008).

Silva *et al.* (2002) estudaram um processo de atenuação natural de BTEX no município de Itaguaí-RJ, num lençol freático que havia sido contaminado com gasolina, na época do acidente, a água analisada estava com as seguintes concentrações: 800 µg L⁻¹ de benzeno, 600 µg L⁻¹ para o tolueno e 900 µg L⁻¹ para o xileno. Devido ao ambiente propício ao mecanismo de biodegradação, ou seja, presença de oxigênio dissolvido e nitrato como aceptores de elétrons, observou-se um decaimento na concentração inicial de aproximadamente 97% para o etilbenzeno, tolueno e xileno. No entanto para o benzeno, o decaimento foi de apenas 35% com 521 µg/L, isso após dois anos que havia acontecido o acidente. O que demonstra a persistência destes compostos, principalmente, do benzeno.

3.5.2 Fitorremediação

A fitorremediação é uma técnica *in situ* que utiliza vegetais superiores para facilitar a aeração do local, degradar, reter ou eliminar os contaminantes do solo. Neste processo pode atuar o vegetal e/ou microrganismos colonizadores. No primeiro caso, o crescimento das raízes e sua penetração no solo favorecem a aeração, podendo ocorrer à adsorção do contaminante em seus tecidos, assim como metabolização das substâncias tóxicas (SILVA, 2009).

Há diversos mecanismos utilizados pelas plantas na fitorremediação, tais como: biodegradação na rizosfera, a fito-extração ou fito-acumulação, a fito degradação a fito-estabilização. Na biodegradação da rizosfera substancias liberadas pelas raízes fornecem nutrientes aos microrganismos que incentivam a biodegradação dos contaminantes. As raízes das plantas também aumentam a permeabilidade do solo, o que facilita o transporte de água e sua aeração, aumentando a eficiência dos processos biodegradativos dos contaminantes (MELO e AZEVEDO, 2008).

Segundo Melo e Azevedo (2008), a fitorremediação pode ser aplicada para a remediação de metais, pesticidas, solventes, explosivos, petróleo e derivados, além de lixiviados de aterros. A profundidade da zona de tratamento é determinada pelas raízes. A eficiência do processo de fitorremediação diminui com o aumento da sorção dos poluentes no solo e os contaminantes podem ser mobilizados para água

subterrânea ou bioacumulados em animais. Diversas pesquisas têm avaliado a aplicabilidade desta técnica no tratamento de solos contaminados por metais.

3.5.3 Tratamento químico

Entre os processos físico-químicos de degradação de compostos aromáticos utilizados para a degradação de compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) se destaca os processos oxidativos avançados, como a fotocatalise heterogênea, ozônio, irradiação ultravioleta e a fotólise e destes se destaca as oxidações promovidas pelo uso de radiação solar são as mais promissoras visto que geram radicais hidroxilas (OH), que possuem caráter fortemente oxidante. Dentre as três espécies químicas em estudo, o benzeno costuma ser considerado o mais resistente frente aos processos de remediação físico-químicos e o seu processo de degradação age sobre a dupla ligação do anel aromático, gerando intermediários de natureza fenólica (TIBURTIUS *et al.*, 2005).

3.5.4 Processos oxidativos avançados (POA)

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são definidos como processos de oxidação em que radicais hidroxila são gerados para atuar como agentes oxidantes químicos e, devido a alta reatividade destes radicais, podem reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos. Estes processos de oxidação geram espécies altamente oxidantes, primariamente os radicais hidroxila OH e em alguns casos o oxigênio singlete, que quando em quantidade suficiente, provocam a mineralização da matéria orgânica à dióxido de carbono, água e íons inorgânicos devido à capacidade de converter poluentes em espécies químicas inócuas, tais como gás carbônico e água, levando à mineralização total do poluente (DONAIRE, 2007).

De acordo com Donaire (2007), os radicais hidroxila podem ser gerados por reações envolvendo oxidantes fortes, como ozônio (O₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), semicondutores, como o dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO) e radiação ultravioleta (UV).

3.5.5 Biorremediação

Desde meados dos anos 90 estratégias de biorremediação vêm sendo adotadas, como alternativas extremamente eficazes e de baixo custo para a

remediação de solos contaminados com petróleo e outros compostos orgânicos (TRINDADE, 2002).

A aplicação de processos biológicos no tratamento de solos e água contaminados por hidrocarbonetos aromáticos tem despertado um grande interesse na comunidade acadêmica, pois a sua utilização tem como principal vantagem o seu baixo custo em comparação com os processos convencionais (MELO e AZEVEDO, 2008).

Segundo Trindade (2002), há basicamente três técnicas de biorremediação: a bioestimulação, baseada no aumento da atividade microbiana nativa pela adição de nutrientes, ou seja, melhoramento dos fatores ambientais e, dentre eles, destacam-se o pH, o teor de umidade, a temperatura, a correção de nutrientes (fontes de carbono orgânico, fósforo, nitrogênio, etc.) e de aceptores finais de elétrons; a bioaumentação, baseada na adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras que promove a aceleração e aumento da eficiência de degradação do poluente pela inserção de linhagens hidrocarbonoclasticas alóctones que vão agir concomitantemente com os microrganismos autóctones; e a combinação destas duas técnicas.

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é freqüentemente empregada em projetos de biorremediação, mas para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se constatar que existe no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são suficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população. Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são: altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis (MARIANO, 2006).

Embora a disponibilidade de oxigênio possa limitar severamente a biodegradação de hidrocarbonetos, outros compostos são mais rapidamente degradados sob condições anaeróbias. Experiências práticas indicam que a descloração de hidrocarbonetos halogenados é favorecida em condições anaeróbias. Por exemplo, para a biorremediação de compostos altamente clorados é indicado tratamentos alternando condições anaeróbias e aeróbias o que demonstra

a necessidade de uma avaliação do composto a ser biodegradado e as condições favorecidas aos microrganismos (MARIANO, 2006).

Siqueira *et al.* (1994), definiram os métodos de biorremediação em duas categorias principais quanto ao local de aplicação da técnica: a biorremediação *in situ* e *ex situ*. A biorremediação *in situ* de áreas contaminadas pode ser feita através da estimulação da microbiota nativa com a adição de nutrientes e regulação das condições do meio ou através da inoculação de microrganismos com habilidade para a degradação. Estes são isolados em áreas contaminadas e, após estudo das condições do meio mais favorável para o crescimento e outros fatores que podem afetar a degradação, são enriquecidos e reinoculados. Alguns fatores a serem observados durante a biorremediação, além das condições do meio (pH, nutrientes, aeração), são a presença ou não de produtos inibitórios à atividade microbiana e se os produtos estão disponíveis para a ação dos microrganismos.

Degradações *ex-situ* podem ser conduzidas em biorreatores aeróbios ou anaeróbios, contendo cultura de microrganismos mista ou pura. Geralmente, a completa mineralização é adquirida por culturas mistas onde metabólitos produzidos por uma cultura são degradados por outro grupo de microrganismos, produzindo assim um produto seguro, livre de metabólitos tóxicos. Em geral culturas mistas são estáveis a variações de pH, temperatura e composição. Células podem ser imobilizadas de diversas formas dentro do reator, como por exemplo, em pellets ou em suportes fixos (SIQUEIRA *et al.*, 1994).

Segundo Bento *et al.* (2005), a melhor performance da bioaugmentação pode ser atingida pelo emprego dos microrganismos previamente selecionados aumentando assim a população e diversidade microbiana. A partir deste pressuposto, o aumento da comunidade microbiana específica, em conjunto com a adição de nutrientes, promove uma redução substancial no tempo de tratamento. Neste artigo foi obtida, através da bioaugmentação, uma maior degradação de hidrocarbonetos das frações leves (75,2%) e pesadas (72,7%) para um solo contaminado com óleo diesel.

O tempo de meia-vida destes compostos no ambiente depende quase que exclusivamente da estrutura química peculiar de cada um. A clivagem do anel benzênico pode ser considerada o passo mais difícil durante o processo de biodegradação de um composto aromático devido sua alta estabilidade. As reações envolvidas nesta degradação podem ser de oxidação, quando moléculas de oxigênio

estão presentes, ou de redução, na qual varias enzimas microbianas estão geralmente envolvidas. Os grupos substituintes encontrados nestes compostos, como carboxilas, metilas e hidroxilas, diminuem a energia de ressonância removendo elétrons e desestabilizando o anel benzênico, podendo facilitar o processo de clivagem (MELO e AZEVEDO, 2008).

Os processos ideais de degradação levam a mineralização completa dos compostos orgânicos, ou seja, à CO_2 e H_2O . Também existem as degradações parciais ou ainda simplesmente a biotransformação de um composto aromático em alguns respectivos derivados, que podem ao invés de diminuir, aumentar a toxicidade sobre o meio ambiente (KALBITZ *et al.*, 2003).

O potencial de biodegradação de compostos aromáticos depende principalmente do microrganismo utilizado e da sua capacidade de metabolizar as estruturas químicas dos compostos presentes nos resíduos disponibilizados para o tratamento. Devem ser consideradas ainda, as condições ambientais oferecidas para o desenvolvimento adequado do microrganismo, como a aeração, a temperatura, o pH, a umidade e a disponibilidade de nutrientes que permitam o bom desenvolvimento da população microbiana local (MELO e AZEVEDO, 2008).

As condições ambientais é fator primordial para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos na recuperação de ambientes contaminados, pois muitas substâncias depositadas no ambiente são adsorvidas pelo solo na forma de colóides e ácidos húmicos, e ficam, conseqüentemente, pouco disponíveis para os microrganismos dificultando a biodegradação (THIELE e BRUMER, 2002).

Um fator limitante à biodegradação pode ser a baixa concentração do contaminante no ambiente. A concentração do contaminante de interesse é a quantidade que está biodisponível. Mesmo que a quantidade total dos contaminantes seja alta, ele pode não estar necessariamente disponível aos organismos degradadores. Em solos, a sorção dos contaminantes pode diminuir a quantidade disponível para ser degradado (DEOTTI, 2005).

A degradação dos hidrocarbonetos no solo também pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar eficientemente esses compostos, pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade aos microrganismos degradadores, em vista da baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção dos hidrocarbonetos poli aromáticos à fase sólida do solo (JOHNSEN *et al.*, 2005).

Outro fator importante para o bom desenvolvimento dos microrganismos é a utilização do meio suporte, pois segundo Mello (2007) biorreatores com biofilme aderido apresentam como vantagens: maior concentração de biomassa retida com uma atividade metabólica mais elevada, maior eficiência na remoção de DBO, aplicação de maior carga orgânica; apresenta grande área de transferência de massa entre as fases, instalações mais compactas, maior capacidade de tolerar poluentes recalcitrantes e tóxicos, bem como outras condições ambientais adversas.

De acordo com Mello (2007), a formação de biofilmes é um fenômeno natural, através do qual os microrganismos aderem a superfícies sólidas toda a vez que estas estiverem em contato com a água. Os biofilmes desempenham um papel importante na natureza e em processos tecnológicos. Do ponto de vista do interesse do homem, podem ser benéficos ou não. Como exemplo de biofilmes benéficos, pode-se citar aqueles que são utilizados em biotecnologia ambiental com grande sucesso no tratamento de efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas; na tecnologia de enzimas; fermentações; produção de antibióticos. Como exemplo de não benéficos, pode-se citar a deterioração das superfícies e/ou ambiente circundante; nas ciências médicas, ocasionam grande número de problemas de saúde, tais como infecções em tecidos e entre outros.

Segundo Maki *et al.* (2003), é necessário à inclusão de macros nutrientes na área contaminada para acelerar o processo de biodegradação de petróleo e torná-lo mais eficiente.

De acordo com Ollivier e Magot (2005), a degradação biológica pode ocorrer através do metabolismo de respiração aeróbia ou anaeróbia. Na primeira atuam inicialmente as enzimas *oxigenases* para inserir átomos de oxigênio na molécula de hidrocarboneto e, posteriormente, este elemento funciona como aceptor final de elétrons, sendo os produtos finais do metabolismo o dióxido de carbono, água ou compostos resultantes da degradação parcial dos hidrocarbonetos.

Em estudo realizado por Usaldo *et al.* (2006) sobre a biodegradação de gasolina por bactérias presentes no solo constataram-se que a biodegradação nos reatores com concentração de 500 µL de gasolina, foi mais lenta para o Benzeno do que as amostras com menores concentrações e isso, se deve à ação mais tóxica deste componente em comparação com as demais. Observaram-se que algumas amostras com saturação de gasolina de 300 µL e 500 µL não houve degradação do BTEX.

Nardi *et al.* (2002), analisaram o desempenho na degradação de BTEX na presença de etanol em um reator anaeróbio de fluxo horizontal com biomassa imobilizada. O reator foi empacotado com espuma de poliuretano para crescimento da biomassa. Foi avaliada também, a capacidade de adsorção de BTEX na espuma de poliuretano, apresentando valores insignificantes, o que permitiu concluir que a biodegradação foi o principal fenômeno responsável pelo bom desempenho do reator, que obteve a quase completa biodegradação dos compostos BTEX na presença de um co-solvente.

Desta forma, a Biorremediação é uma opção atraente de remediação por causa de seu benefício econômico e tem sido considerada como um dos potenciais métodos para a limpeza de lugares contaminados com petróleo e derivados (SUTHERLAND *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006).

3.6 Uso de Fungos na Biodegradação de Compostos Persistentes

Segundo Griffin (1994) os fungos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos, caracterizados por serem unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (fungos filamentosos ou bolores).

O gênero *Aspergillus* caracteriza-se pela produção de esporos assexuais e seu nome deriva de uma estrutura chamada *aspergillum* (designação que se dá à parte superior do seu corpo, ou seja, o conjunto da vesícula e das células reprodutivas) que é especializada e característica do gênero. Eles possuem uma estrutura denominada conidióforo que é constituído pelo *aspergillum* e pelo estipe. Quanto ao gênero *Penicillium*, é composto por espécies pouco exigentes nutricionalmente, capazes de crescer em qualquer ambiente com uma fonte de sais minerais e qualquer fonte de carbono exceto as mais complexas, numa gama vasta de condições físico-químicas. Eles apresentam hifas septadas e os conidióforos na forma de pincéis. Seus esporos assexuados produzem uma estrutura típica do gênero designada de *penicillus* (penicilli, que em latim significa pincel). Os conídios nascem em cadeias produzidas pelas fiálides. O *penicillus* é toda a estrutura suportada pelo estipe. O conjunto do *penicillus* e do estipe designa-se por conidióforo. Os conídios são regra geral de cor verde, as fiálides têm pescoços curtos e paredes lisas (TORTORA, 2000; FASANELLA, 2008).

Os fungos assim como as algas têm parede celular rígida e podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares como os bolores (fungos filamentosos). Os fungos foram considerados como vegetais durante muito tempo, e só a partir de 1969, passaram a ser considerado em um reino à parte, denominado Fungi (PELCZAR, 1996).

Os fungos podem utilizar um largo espectro de nutrientes e até mesmo traços de matéria orgânica podem estimular seu crescimento, pois as enzimas extracelulares produzidas pelos fungos podem decompor os mais complexos compostos orgânicos dentre estas enzimas destaca-se as *pectinases*, *amilases*, *proteinases*, *ligninases*, entre outras, além de ácidos orgânicos e inorgânicos (MELO e AZEVEDO, 2008).

Juntamente com as bactérias, os fungos são os principais organismos responsáveis pela decomposição do carbono na atmosfera. Mas ecologicamente, os fungos apresentam duas vantagens em relação às bactérias: podem crescer em meios de baixa umidade e também em ambientes de baixo pH (METCALF, 1991), ainda que *archaeas metanogênicas* também possam estar metabolicamente ativas em meios com pH extremamente baixos (TORTORA, 2000).

De modo geral, o ideal para crescimento dos fungos é que o meio tenha pH de 4 a 6. Contudo, dependendo da espécie em questão, essa faixa ótima de pH pode assumir valores mais específicos, pois os fungos, devido à retirada diferenciada de cátions e ânions durante o transporte de substrato, frequentemente alteram o pH do meio onde se encontram (GRIFFIN, 1994). Em relação à sua reprodução, os fungos normalmente a fazem por meio de esporos, podendo ser sexuada ou assexuada (TORTORA, 2000).

Os fungos são morfologicamente complexos e podem exibir formas diferentes, sendo que a maioria se desenvolve por hifas que formam redes (micélios) mais ou menos organizadas como os bolores e os cogumelos (ALEXOUPOULOS *et al.*, 1996). Quanto ao crescimento de fungos filamentosos, pode ocorrer na forma de “*pellets*”, com as hifas formando pequenas esferas, ou na forma filamentosa, com as hifas dispersas no meio, dependendo de vários fatores, como: espécie do fungo, meio de cultura, agitação, pH, oxigênio dissolvido e o quanto de inóculo que foi utilizado (concentração de esporos, massa de micélio) (PAMBOUKIAN, 1997).

Determinados elementos presentes no meio são indispensáveis para o crescimento dos fungos, tais como: micronutrientes, em concentrações iguais ou

inferiores a 10^{-6} mol/L, e macronutrientes, em concentrações em torno de 10^{-3} mol/L. Entre os macroelementos estão: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio. Os micronutrientes mais importantes requeridos pelos fungos são: ferro, cobre, zinco, manganês e molibdênio, estes microelementos atuam como co-fatores de enzimas (GRIFFIN, 1994).

Os carboidratos são a fonte de carbono mais facilmente assimilada pelos fungos para seu crescimento (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004), sendo a glicose a fonte de carbono mais amplamente utilizada para obtenção de energia. Na natureza, a glicose é o açúcar mais comum, em função de sua participação na composição da celulose, do amido e de outros açúcares (PUTZKE, 2002). Esses hidratos entram na célula por difusão facilitada (sem gasto de energia), utilizando carreadores específicos para *hexoses* com diferente afinidade em relação a cada açúcar (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Além da presença de macronutrientes e micronutrientes, os aspectos físicos, tais como temperatura, luz, viscosidade e pressão hidrostática podem afetar o crescimento dos fungos. A umidade possui papel importante na germinação dos esporos, sendo que sua escassez pode limitar a esporulação. A luminosidade exerce maior influência sobre a reprodução que no crescimento dos fungos, contudo, a maior parte dos estudos está voltada para a temperatura (GRIFFIN, 1994).

Conforme apresentado por Rodrigues (2006), em relação ao crescimento dos fungos, em culturas no regime de batelada, podem ocorrer mudanças no pH do meio e na disponibilidade de oxigênio e de fatores nutricionais, que interferem diretamente na duração das diferentes fases do crescimento do microrganismo (fase *lag*, exponencial, estacionária e autólise ou fase endógena). No regime contínuo, se o suprimento de nutrientes for mantido constante, ocorrerá manutenção de crescimento exponencial e descarte de produtos excretados, bem como de biomassa morta (GRIFFIN, 1994).

Dentre os compostos produzidos pelos fungos durante o seu crescimento, a partir do consumo do substrato, citam-se alcoóis e ácidos orgânicos. O gênero *Aspergillus* é conhecido por sua capacidade de produzir ácidos orgânicos como o cítrico, málico, fumárico, glucônico, entre outros (WITTEVEEN, 1993; GRIFFIN, 1994).

O transporte dos ácidos orgânicos pela membrana celular se dá por difusão ou através de sistema específico, como o que envolve o ciclo do ácido tricarboxílico

e piruvato. Contudo, a difusão é o mecanismo mais simples e rápido, ocorrendo a partir da não dissociação do ácido. Se o pH estiver uma unidade acima do pK, o ácido fica na forma dissociada e o transporte do ácido e dos ânions orgânicos será mais lento, mas se o pH estiver abaixo do pK, então, a forma não dissociada é transportada mais rapidamente e o metabolismo é mais rápido (AINSWORTH e SUSSMAN, 1966 citado por RODRIGUES 2006).

Desta forma, o micélio de culturas inoculadas com menor concentração de esporos apresentou menor teor de nitrogênio, mostrando que grande parte de nitrogênio presente no meio de cultura inicial foi transformado em subprodutos orgânicos e excretado para o meio (PAMBOUKIAN, 1997).

Segundo Silva (2009), a biodegradabilidade dos componentes do petróleo é dependente primeiramente de sua estrutura química, sendo influenciada também pelo estado físico e pela toxicidade dos compostos. O aumento das cadeias implica em uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de microrganismos capazes de degradar estes compostos.

A degradação microbiológica possui uma seqüência preferencial de compostos a serem degradados. Os hidrocarbonetos aromáticos são menos facilmente biodegradáveis do que os alcanos, pois apresentam elevada estabilidade termodinâmica devido à significativa energia de ressonância do anel. Dentre os aromáticos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são os compostos mais preocupantes, pois levam a afeitos carcinogênicos e mutagênicos, além de apresentarem elevada recalcitrância (SILVA, 2009).

Conforme Silva (2009), a degradação abrangente dos HPA se dá pela clivagem de um, dois ou mais anéis. Os grupos substituintes laterais do anel são modificados inicialmente por hidroxilação, desmetilação ou descarboxilação para produção de uma ou duas moléculas básicas que são, então, clivadas por um segundo grupo de enzimas e, posteriormente, degradadas a moléculas que serão precursoras de outras vias metabólicas.

A biodegradação do petróleo envolve fenômenos de quebra dos componentes do petróleo para componentes de menor peso molecular ou mais polares. A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é formada por diversos gêneros microbianos, mas os principais são as bactérias e os fungos. Os organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente, de forma que muitas vezes pode ser necessária uma mistura de

populações com capacidade enzimática para degradar todos os hidrocarbonetos encontrados no petróleo (BENTO, 2005).

As bactérias, geralmente, empregam *dioxigenases* para incorporar duas moléculas de oxigênio no substrato para formar dioxetanos, que são então oxidados a cis-dihidrodióis formando produtos dihidroxilados. Os fungos produzem *monoxigenases* para incorporar um átomo de oxigênio no substrato formando óxidos de arenos, o que é seguido de atuação enzimática para produzir trans- dihidrodióis e fenóis (SILVA, 2009).

De acordo com Pereira (2008), posteriormente, ocorrem dois mecanismos de clivagem do anel: na posição orto ou meta. O mecanismo mais comum é o que envolve a posição orto, seguido por uma série de reações enzimáticas até chegar aos produtos finais: ácidos orgânicos de baixo peso molecular e aldeídos (que são incorporados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos).

Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para seu desenvolvimento na natureza, principalmente como macromoléculas insolúveis, as quais precisam ser transformadas primeiramente em unidades monoméricas solúveis antes de serem incorporadas. Os fungos absorvem nutrientes através da membrana plasmática mediante a secreção de enzimas especiais para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e atingir a solubilidade (PUTZKE, 2002).

Segundo Rodrigues (2006), a remoção de poluentes de um meio por fungos ocorre pelo processo conhecido como bioadsorção, dividido em duas fases distintas: adsorção (remoção passiva) e assimilação (remoção ativa).

De acordo com Del Rio (2004), a adsorção é a primeira etapa do processo de bioadsorção e não depende da atividade metabólica do microrganismo. A assimilação, ao contrário, é dependente do metabolismo. A compreensão do processo de bioadsorção é importante no tratamento de efluentes líquidos e também em vários processos industriais como panificação, cervejarias e destilarias.

Dentre os diversos tipos de reatores biológicos, os reatores com fungos representam uma alternativa para o tratamento de efluentes que possuem compostos de difícil biodecomposição, como é o caso dos corantes encontrados nas águas residuárias têxteis. Dentro deste contexto, o interesse em se empregar fungos para solucionar problemas relacionados ao meio ambiente ocorre devido à grande produção de enzimas (celulases, ligninases, peroxidases, entre outras) (LUKE e

BURTON, 2001 citado por RODRIGUES, 2006), as quais tornam o poluente mais acessível à biodegradação.

Rodrigues *et al.* (2007), ao estudarem a remoção de fenol de água residuária sintética, em reatores em batelada, observaram que a espécie *Aspergillus niger* AN 400 degradou mais eficientemente o fenol do meio ao usar glicose como co-substrato, chegando a 100% de remoção do referido composto, de modo que na ausência da glicose, a remoção de fenol do meio foi de apenas 48%.

De acordo com Esposito e Azevedo (2004), os fungos apresentam grande potencial de degradação de compostos persistentes, pois possuem a capacidade de adaptarem rapidamente seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia, devido à produção de grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradarem uma série de compostos de elevada complexidade. Essa flexibilidade metabólica torna os fungos capazes de degradar diferentes tipos de compostos, inclusive polímeros complexos, como hidrocarbonetos, pesticidas, e etc. Entre as enzimas fúngicas de maior potencial no tratamento de despejos industriais são citadas as ligninolíticas, como a lignina *peroxidase* e a *manganês peroxidase*, e as hidrolíticas, como as *proteases*, *celulases*, *amilases*, entre outras.

Os fungos tornam-se persistente no meio ambiente, devido sua capacidade de adaptar-se rapidamente a diferentes fontes de carbono e energia, sendo estes fatores essenciais a sua sobrevivência (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Estes organismos são considerados eficientes sob condições adversas do processo, como valores extremos de pH, limitação de nutrientes e baixo teor de umidade. Dentre os fungos filamentosos, algumas linhagens de *Penicillium sp* e *Aspergillus sp* são citadas como sendo capazes de degradar uma maior quantidade de hidrocarbonetos (ATAGANA *et al.*, 2006).

Oliveira (2001) verificou que um consórcio microbiano constituído por linhagens dos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Streptomyces* foi capaz de degradar 100% dos *n*-alcanos, compreendidos entre o decano e o eicosano, e 40% dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos avaliados (1-metil-naftaleno, 2-metil-naftaleno, fluoreno, pireno, criseno, fenantreno, benzo (a)antraceno e benzo (b) fluoretano).

Azevedo *et al.* (2009), avaliando o potencial de biodegradação de petróleo por fungos filamentosos observaram a predominância de *Aspergillus niger*, *Aspergillus*

terreus e *Penicillium*, encontradas em todas as amostras e que apresentaram o maior número de unidades formadoras de colônias comprovando que os gêneros de fungos filamentosos mais frequentes tanto em ambientes terrestres como em marinhos são *Aspergillus* e *Penicillium*, também relatados como os mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos.

Soares *et al.* (2009), em estudo sobre avaliação do potencial de fungos amazônicos na degradação do petróleo, verificaram que a espécie *Aspergillus niger* obteve os melhores resultados utilizando o petróleo bruto e as frações de petróleo em meio sólido. Pôde se perceber também que outras espécies como *Trichoderma* sp e *Aspergillus flavus* não cresceram no meio contendo petróleo bruto, consumindo apenas as frações de petróleo.

Garcia-Peña *et al.* (2008), citaram a dificuldade de bactérias em degradar os BTEX principalmente o o-xileno justificando a utilização de fungos, pois embora muitos resultados promissores tem sido obtidos na degradação de BTEX em biofiltros com fungos, poucas pesquisas tem sido efetuadas.

Qi *et al.* (2002), avaliaram cinco espécies de fungos por sua capacidade de assimilar nove compostos orgânicos voláteis (VOCs), comumente encontrada em emissões industriais, hidrocarbonetos aromático, cetonas e ácidos orgânicos. Esses autores demonstraram que *Exophiala lecanii-corni* e *Cladosporium sphaerospermum* podem oxidar cada um dos nove compostos orgânicos voláteis, etilbenzeno, tolueno, estireno, metil-etil-cetona, metil isobutil cetona, metil propil acetato de cetona, n-butil. O mesmo estudo mostrou que *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de degradar todos os VOCs testados exceto estireno e que *Cladosporium resinae* degradou os ácidos orgânicos, cetonas, e alguns compostos aromáticos, mas não foi capaz de crescer com benzeno.

Jou e Huang (2003) citado por Mello (2007) estudaram a degradação de efluentes de uma refinaria de petróleo usando um biorreator com biomassa fixa. O biorreator foi empacotado com espuma de poliuretano altamente porosa para o crescimento microbiano. O sistema foi mantido aerado para fornecer oxigênio necessário ao crescimento. Os autores compararam a degradação com lodo ativado e concluíram que a degradação dos resíduos foi maior para o sistema com biofilme. Com lodo ativado, a remoção de 50 a 60% se dava em 25 horas, enquanto que com biofilme, em 8 horas, a remoção foi de 85 a 90%. O resultado também mostrou que mais de 85% da DQO foi degradada em 2 horas. Os autores apresentaram duas

vantagens do método: menor produção de lodo (lodo ativado: seis toneladas de lodo em 100 toneladas de efluente, enquanto que para o sistema com biofilme duas toneladas de lodo em 100 toneladas de efluente) e menor área ocupada para o processo (lodo ativado 95.7 m² e processa 45 m³ de efluente, enquanto que com biofilme 3.24 m² para tratar 45.6 m³ de efluente por dia). Os fatores que contribuíram para alta remoção foram citados pelos autores como sendo: sistema de biofilme fixo, o que provocou uma elevada concentração celular (8000 mg/L); a estrutura física do suporte, que gerou uma alta relação área/volume e o sistema de oxigenação do biorreator.

Vendramel *et al.* (2005), avaliaram o desempenho de um biorreator aeróbio de leito fixo para tratamento de efluentes de uma refinaria de petróleo. O suporte utilizado para fixação da biomassa foi PVC corrugado. Foram estudados os parâmetros DQO, Carbono Orgânico Total (COT) e Sólidos Suspensos (SS). Os autores apresentaram como resultados que o biorreator proposto é capaz de tratar o efluente da refinaria obtendo valores de DQO, COT e SS abaixo dos limites propostos pelos órgãos ambientais locais. O biorreator não apresentou nenhum problema operacional durante o período experimental, permitindo que operasse sob circunstâncias estáveis e flexíveis. As remoções de DQO e COT foram de 75 e de 81%, respectivamente, alcançadas a uma carga orgânica de 2,36 kg DQO/m³dia.

No entanto, em virtude da dificuldade de degradar estes compostos torna-se necessário conhecer as espécies que melhor se adaptam a utilizar estas substâncias como substrato, por exemplo, Nikolova e Nenov (2005) avaliaram duas linhagens fúngicas (*Cladophialophora sp* e *Cladosporium sp*) para a degradação de BTEX num reator em batelada. Os autores relataram que nenhuma das duas espécies foi capaz de degradar benzeno. Já o etilbenzeno foi facilmente degradado em todos os casos, o *m*-xileno foi totalmente degradado pela espécie *Cladophialophora sp*, tanto quando foi utilizado como único substrato como também quando utilizado em misturas com o tolueno, enquanto isso *Cladosporium sp* não foi capaz de degradar o benzeno e o *m*-xileno, quando estes compostos estavam só, no entanto foram capaz de degradá-los plenamente quando estava misturado com tolueno. A espécie *Cladophialophora sp* apresentou os melhores resultados na degradação de BTEX se comparado com *Cladosporium sp.*, exceto no caso de degradação do *p*-xileno que foi melhor realizada pelo *Cladosporium sp*.

Kermanshahi *et al.* (2005), estudaram o desempenho de um biorreator para biodegradar aerobiamente hidrocarbonetos presentes no petróleo, tais como *p*-xileno e naftaleno. Os microrganismos se fixaram em fibras de poliéster. Foram investigados tempos de residências diferentes (0,5 a 6 h) e concentrações de alimentação diferentes (14 mg/L, 40 mg/L e 77 mg/L, para o *p*-xileno e 8 mg/L, 15 mg/L e 22 mg/L, para o naftaleno). Para a completa degradação dos compostos, a taxa volumétrica de biodegradação foi de 15 mg/L.h, para o *p*-xileno e 16 mg/L.h, para o naftaleno, com uma densidade de biomassa de 720 mg/L.

Em um estudo combinado de bioaumento, que é a extração de microrganismos do próprio solo contaminado, seu crescimento *in vitro* e re-introdução no ambiente contaminado em maior concentração e bioestímulo Mancera-López *et al.* (2008) descobriram que *Rhizopus sp.*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus sydowii* foram capazes de crescer numa mistura complexa de hidrocarbonetos de petróleo de elevado peso molecular, após sofrerem climatização em meio de cultura líquido. Os três fungos removeram, respectivamente, 36%, 30% e 17% mais HAPs do que quando o tratamento foi feito utilizando só o bioestímulo.

Desta forma, os fungos filamentosos demonstram ser hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa em compostos menores, dentre os fungos que se destacam na biodegradação de BTX, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo, esta especialidade é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (MARIANO, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada com reator em bateladas sequenciais e com biomassa fúngica imobilizada e visa à eficiência de remoção de compostos tóxicos BTX, de matéria orgânica e de nutrientes em água. O experimento com o reator em batelada sequenciais foi realizado em 12 ciclos, sendo dividido em três etapas. Na 1ª etapa foi adicionado à água 5 g/L de glicose; na 2ª etapa, 1g/L e na 3ª etapa 0,5 g/L. Cada ciclo operacional apresentava período reacional de 7 dias, sendo realizadas análises físico-químicas no 1º, 2º, 3º, 4º e 7º dias de processo.

4.1. Inóculo

Em virtude dos vários trabalhos apresentados, como os de Rodrigues (2006), Santos (2001) e Sampaio *et al.* (2005), das características da espécie *Aspergillus niger* AN 400, neste trabalho optou-se por utilizar esta espécie como inóculo, na forma de biomassa imobilizada, para a biorremediação da água contendo compostos BTX. A suspensão de esporos utilizada foi de (2×10^6 esporos/mL) de *Aspergillus niger* AN 400, fungo filamentoso muito utilizado na remoção de substâncias persistentes e na produção de metabólitos de interesse industrial.

4.2. Cultivo e Produção dos Esporos

A preparação da suspensão foi feita a partir da repicagem de cepa da linhagem *Aspergillus niger* AN400 em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud. O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a repicagem, as placas com esporos foram mantidas a uma temperatura de $\pm 28^\circ\text{C}$ e, após 10 dias, observou-se o crescimento dos esporos por toda a superfície das placas (Figura 8), procedendo-se, então, a remoção dos mesmos.



Figura 8 - Crescimento dos fungos nas placas de Petri após 10 dias de cultivo.

No procedimento de remoção dos esporos das placas de Petri foi utilizada uma solução de Tween 80 para facilitar a raspagem. Em seguida, os esporos foram transferidos para tubos de ensaio, previamente esterilizados, para posterior contagem.

Para contagem dos esporos, retirou-se dos tubos de ensaio 50 μL da suspensão de esporos, previamente agitada em agitador Vórtex, mais 950 μL de água destilada estéril, perfazendo diluição de 1:20, tendo sido transferido 20 μL da solução preparada para uma câmara de Neubauer (Figura 9), com profundidade de 0,1 mm e área mínima de 1/400 mm^2 . A contagem dos esporos foi realizada em microscópio ótico de campo claro de (PZO Polonês), com aumento de 400 vezes em 16 campos.

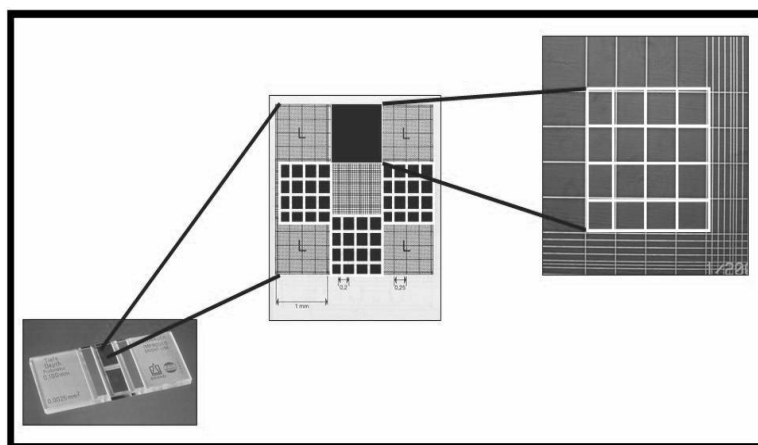


Figura 9 - Câmera de Neubauer utilizada para a contagem dos esporos.

4.3. Adição do BTX e Nutrientes à Água

Para operação em batelada com biomassa imobilizada foi utilizada água potável previamente esterilizada em autoclave por 15 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 121°C e, em seguida, após o seu resfriamento, adicionou-se à mesma solução de nutrientes, cujo reagentes estão descritos na Tabela 6. A água foi acrescida também de 1 g/L de cloranfenicol, antibiótico de amplo espectro para minimizar a contaminação por bactérias. A glicose (5 g/L; 1 g/L e 0,5 g/L) foi empregada como co-substrato visando melhorar a utilização dos poluentes pelos microrganismos.

Os compostos BTX foram adicionados até concentrações nominais no meio de 200 mg/L de benzeno e tolueno e 50 mg/L de xileno. O etanol (3000 mg/L) foi também adicionado visando à maior solubilização dos compostos BTX.

Tabela 6 - Solução de nutrientes utilizada no preparo da água contendo BTX.

Nome do reagente	Fórmula	Marca
Sulfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	VETEC QUIMICA
Nitrato de sódio	NaNO_3	VETEC QUIMICA
Dihidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	VETEC QUIMICA
Sulfato de magnésio	MgSO_4	VETEC QUIMICA
Cloreto de cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	VETEC QUIMICA
Sulfato de cobre heptahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	VETEC QUIMICA
Ácido molibídico	H_2MoO_4	VETEC QUIMICA
Sulfato de manganês pentahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	VETEC QUIMICA
Sulfato férrico	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	VETEC QUIMICA
Sulfato de zinco	ZnSO_4	VETEC QUIMICA
Benzeno	C_6H_6	VETEC QUIMICA
Tolueno	C_7H_8	VETEC QUIMICA
Xileno	C_8H_{10}	VETEC QUIMICA

Fonte: Adaptado de Rodrigues (2006).

4.4. Teste de Toxicidade em Placas

Aspergillus niger AN 400 foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud, ágar e uma solução inicial contendo BTX na concentração de 65 mg/L. A toxicidade foi avaliada utilizando as seguintes concentrações de 16,25 mg/L, 32,5 mg/L e 65 mg/L de BTX, em relação ao crescimento do fungo. Ou seja, nas placas com 16,25 mg/L existia de 4 mL de solução inicial de BTX e 12 mL de meio Sabouraud, enquanto que nas placas com 65 mg/L da solução inicial não havia Sabouraud, somente a solução de BTX.

Cada placa foi inoculada com 2×10^6 esporos de *Aspergillus niger*/mL e divididas em lotes, sendo cada lote constituído por uma duplicata. As placas permaneceram a 30°C, em estufa bacteriológica, durante 5 dias, ao longo dos quais foi observado o crescimento do fungo.

4.5. Teste de Toxicidade com Sementes de Alface (*Lactuca sativa*)

Nesta etapa foram colocadas 20 sementes de alface (*Lactuca sativa*) sobre papel de filtro Whatman nº1 em placa de poliestireno ($\varnothing = 9$ cm) contendo 2 mL de cada solução. Foram preparadas duas soluções com BTX, uma na concentração de 300 mg/L (100 mg/L de benzeno, 100 mg/L de tolueno e 100 mg/L de xileno) e outra na concentração de 450 mg/L na mesma proporção. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 300 mg/L da solução inicial de BTX, 225 mg/L da solução inicial de BTX, 150 mg/L da solução de BTX, 75 mg/L da solução e para concentração de 450 mg/L da solução inicial de BTX, 337,5 mg/L da solução inicial de BTX, 225 mg/L e 112,5 mg/L.

As placas contendo as amostras foram colocadas em estufa a 28°C, no escuro e envoltas por folha de alumínio. Após 72h foi avaliada a germinação das sementes e o comprimento das radículas visando o cálculo da CI_{50} (DUTKA, 1989). A concentração inibitória 50% ou CI_{50} (IC_{50} em Inglês *Inhibitory Concentration 50*) é um teste que mede a concentração de uma substância inibidora necessária para inibir à metade os organismos submetidos ao teste. A concentração inibitória foi calculada utilizando a análise de Probit (FINNEY, 1971).

Após o fim do tempo de exposição, foi medido cuidadosamente o comprimento da raiz de cada uma das plântulas, correspondente a cada concentração e controle positivo, quantificando-se o número de sementes que não germinaram e a porcentagem de variação do crescimento da raiz. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{\text{comprimento médio controle} - \text{comprimento médio da amostra}}{\text{comprimento médio do controle}} \right] \times 100$$

4.6. Reator em Batelada Sequencial (RBS) com Biomassa Imobilizada

4.6.1. Imobilização da biomassa fúngica

A biomassa foi imobilizada em manta de polipropileno 1 cm² acondicionados em redes de polietileno, no interior de frascos erlenmeyer de 250 mL. Neste procedimento as mantas foram previamente esterilizadas possuindo peso total de 5 g, equivalentes a 70 unidades, sendo imersas em 200 mL de meio de crescimento (item 4.3), contendo glicose na concentração de 5 g/L de glicose e cloranfenicol 0,10

g/L (Rodrigues, 2006), a fim de promover o crescimento da espécie antes da partida do reator.

O inóculo, na forma de suspensão de esporos (2×10^6 esporos/mL), era adicionado aos frascos que permaneciam sob agitação de 150 rpm durante 72 h e a temperatura de 28°C, de modo que, ao completar 24 horas, o meio antigo era substituído por um novo. Após a imobilização da biomassa, as mantas de polipropileno eram transferidas para o reator em batelada sequencial para a partida do mesmo.

4.6.2 Montagem e operação do reator em batelada sequencial (RBS)

O reator, confeccionado em vidro, possuía volume total de 5 litros e recebeu como inóculo biomassa de *Aspergillus niger* AN 400 imobilizada em manta de polipropileno. O reator foi alimentado com 4,5 L de água contendo BTX, sendo a aeração mantida por uso de mini-compressor como pode ser visto na Figura 10.

O experimento foi realizado em doze ciclos, cada um com duração total de sete dias, para avaliação da eficiência de remoção de BTX, matéria orgânica (medida como DQO) e nutrientes (N-NH_3 , N-NO_3^- , N-NO_2^- , PO_4^{3-}).

No início de cada ciclo, ou seja, a cada semana, o reator era alimentado com nova água contendo BTX e os demais compostos já citados. Ao longo de cada ciclo, foram retiradas alíquotas diárias para monitoramento da biorremediação, comprometendo-se até 10% do volume reacional do reator.



Figura 10 - Ilustração do reator operado em regime de batelada sequencial (RBS).

4.6.3 Análises microscópicas

Ao final da operação do reator em batelada repetida foram retiradas amostras do meio suporte contendo biomassa fúngica aderida, as quais eram preparadas e submetidas ao crescimento em placas com o objetivo de confirmar a presença da espécie fúngica inicialmente inoculada ou ainda identificar o surgimento de outra espécie por contaminação.

A biomassa contida nos meios suportes foi removida fazendo uso de água destilada, três cubos do meio suporte e pérolas de vidro, para aumentar o atrito. A agitação foi promovida por meio de sistema Vórtex.

Após a diluição de 1000x em água destilada e esterilizada (121°C, 1 atm por 15 minutos adicionada de NaCl 0,9%) retirou-se em seguida, 1 mL dessa solução que foi colocada em placas de Petri contendo meio de cultura *Sabouraud*. As placas foram mantidas à temperatura ambiente (27°C) durante sete dias para verificação do crescimento das colônias.

Amostras dos fungos em placas foram fixadas em lamínulas e submetidas à análise microscópica em microscópio óptico com câmera de captura de imagem para identificação dos microrganismos.

4.7 Ensaio de Volatilidade

A fim de se verificar que a eliminação dos compostos BTX se dava por meio do uso da espécie estudada, foi realizado ensaio similar, utilizando-se das mesmas condições impostas ao reator com fungo (RBS), como aeração e um reator de vidro similar ao RBS com o mesmo volume útil de 4,5 L, os compostos BTX foram adicionados até concentrações nominais no meio de 100 mg/L de benzeno e tolueno e etanol de 1000 mg/L, com a diferença de não se inocular o *Aspergillus niger* AN 400. Após isto as alíquotas foram retiradas ao longo de 24 horas e determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.8 Métodos Analíticos

Na Tabela 7 são apresentadas as variáveis analisadas durante as diversas etapas da pesquisa.

Tabela 7 - Variáveis monitoradas durante o desenvolvimento da pesquisa.

Variável	Método Empregado
Concentração de BTX	HPLC
DQO	Refluxação fechada
pH	Potenciometria
Amônia	Nesslerização Direta
Nitrito	Colorimétrico
Nitrato	Método colorimétrico do Salicilato
Ortofosfato	Método colorimétrico do Ácido Ascórbico

As análises físico-químicas para os parâmetros de DQO bruta, DQO solúvel, NH_3 , NO_3^- , NO_2^- , pH e PO_4^{3-} foram executadas no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do IFCE, segundo métodos descritos em APHA (1995), exceto a determinação da concentração de BTX, que foi realizada por meio de cromatografia líquida (HPLC) no Laboratório de Tecnologia Química (LTQ) do IFCE. Para determinação dos compostos BTX por HPLC foi utilizado um cromatógrafo marca Varian Pro Star conectado a um detector UV/visível, empregando uma coluna Agilent ZORBAX-C18 5 μm , 250 mm x 4,6 mm. A fase móvel era constituída de uma mistura de 80% metanol/ 20% água, modo isocrático e comprimento de onda de 200 nm para o benzeno e 207 nm para o tolueno e xileno com o tempo de corrida de 15 minutos. Junto ao sistema, está acoplado um microcomputador que monitora a resposta de saída da coluna cromatográfica através de um programa de aquisição de dados.

Para cada ponto obteve-se a leitura da área correspondente à concentração da amostra. Com os valores obtidos, foram elaborados gráficos da área dos picos *versus* a concentração do composto, obtendo-se a curva de calibração para cada uma das moléculas estudadas. De posse da curva de calibração, a concentração do composto de cada alíquota pode ser facilmente determinada. As curvas de calibração estão apresentadas no apêndice deste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Etapa I: Caracterização da Água Contendo BTX e Alimentada com 5g/L de Glicose.

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios e desvios-padrão para as variáveis monitoradas no afluente e no efluente do reator em batelada.

Tabela 8 - Caracterização das águas oriundas do afluente e efluente do reator alimentado com 5g/L de glicose.

PARÂMETRO (mg/L)	Valor médio $\pm$ Desvio-padrão	
	AFLUENTE (mg/L)	EFLUENTE FINAL (mg/L)
Amônia	132 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 9,8
Nitrito	0,063 $\pm$ 0,001	0,068 $\pm$ 0,013
Nitrato	89 $\pm$ 3,17	71 $\pm$ 68
Ortofosfato	88 $\pm$ 1,4	50 $\pm$ 22,2
pH	4,1 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 1,5
DQO bruta	7024 $\pm$ 598	4554 $\pm$ 2059
DQO solúvel	6586 $\pm$ 484	3970 $\pm$ 2212
Benzeno	65 $\pm$ 3	Não detectável
Tolueno	37 $\pm$ 1	Não detectável
Xileno	4 $\pm$ 0,2	Não detectável

Os resultados mostraram diminuição do pH, o que provavelmente ocorreu em virtude da absorção de ânions e cátions pelos microrganismos, durante o transporte de substratos, ou pela produção de ácidos orgânicos, próprios do metabolismo do fungo (GRIFFIN, 1994).

O afluente apresentou valor médio de pH 4,5 em todas as etapas iniciais e, posteriormente diminuiu, registrando-se para o efluente dos ciclos em questão valores médios de 2,5; provavelmente resultado da intensa degradação dos compostos aromáticos (benzeno, tolueno e xileno), bem como da glicose, utilizada

como substrato para melhor assimilação dos compostos tóxicos. A diminuição do pH ocorreu desde o primeiro dia em todos os ciclos de operação, como pode ser visto na Figura 11.

Rodrigues *et al.* (2007) ao empregarem água residuária sintética com 323 mg/L de fenol em reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger* observaram redução inicial nos valores de pH, e nos reatores com maior concentração de glicose, no caso 5 g/L de glicose, a diminuição nos valores de pH foi mais rápida em relação aos demais reatores, o que foi atribuído à atividade microbiana mais intensa.

É importante considerar que, na presente pesquisa, em todas as etapas, houve adição de glicose como co-substrato e isto pode ter contribuído para diminuição do pH do meio em virtude da conversão de glicose a ácidos orgânicos (ZNAD *et al.*, 2004).

A diminuição do pH, que ocorreu neste experimento, pode também ter sido favorecida pelo consumo de nitrogênio amoniacal pelos fungos. De acordo com Griffin (1994) o consumo de NH_4^+ pelos fungos pode conduzir à diminuição do pH do meio externo como resultado da liberação de H^+ pela célula.

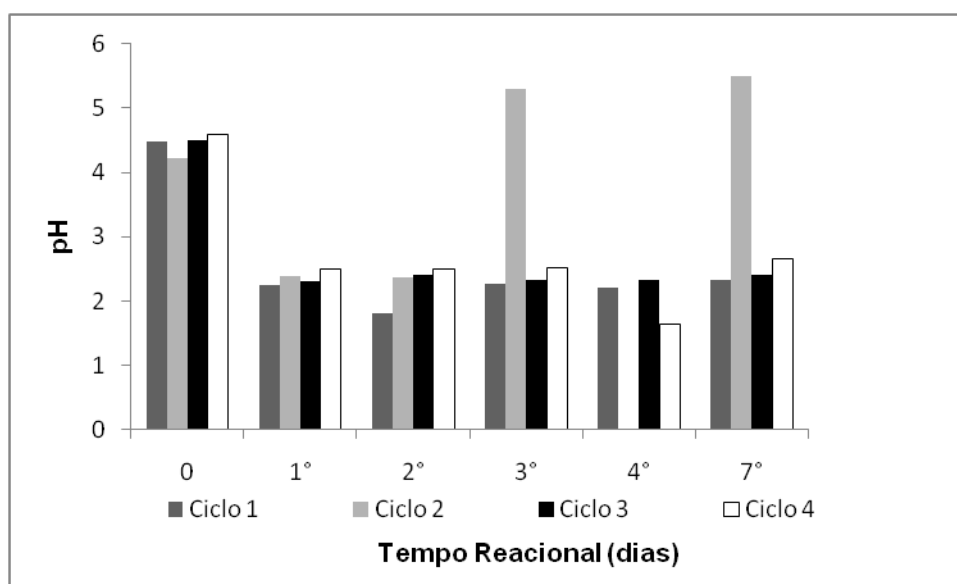


Figura 11- Variação de valores de pH ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

O nitrogênio é um macroelemento essencial para o metabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos, síntese de polissacarídeos da parede celular,

fosfolípidos, vitaminas e outros co-fatores, sintetizados a partir de formas inorgânicas do nitrogênio (GRIFFIN, 1994). Na composição elementar de uma célula fúngica, o nitrogênio corresponde, aproximadamente, 12% a 16% da matéria seca da biomassa (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

De forma geral, os fungos utilizam as fontes inorgânicas de nitrogênio, sob a forma de sais de amônio ou de nitratos, mas podem também extraí-lo de fontes orgânicas, utilizando preferencialmente o íon amônio em detrimento ao nitrato (GRIFFIN, 1994). A transformação de nitrato a amônia é mediada pela enzima *nitrato redutase*, que reduz nitrato a nitrito, e pela enzima *nitrito redutase*, que reduz nitrito à amônia (PUTZKE, 2002).

Nesta etapa, no final de cada ciclo operacional, alcançou-se boa eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, em torno de 90%, sendo que no 4º ciclo a remoção chegou a 100%. A concentração média de nitrogênio amoniacal inicialmente presente no meio foi de 132 mg/L e a concentração média registrada no efluente foi de 12,5 mg/L. Na Figura 12 é mostrada a diminuição da concentração de amônia no meio.

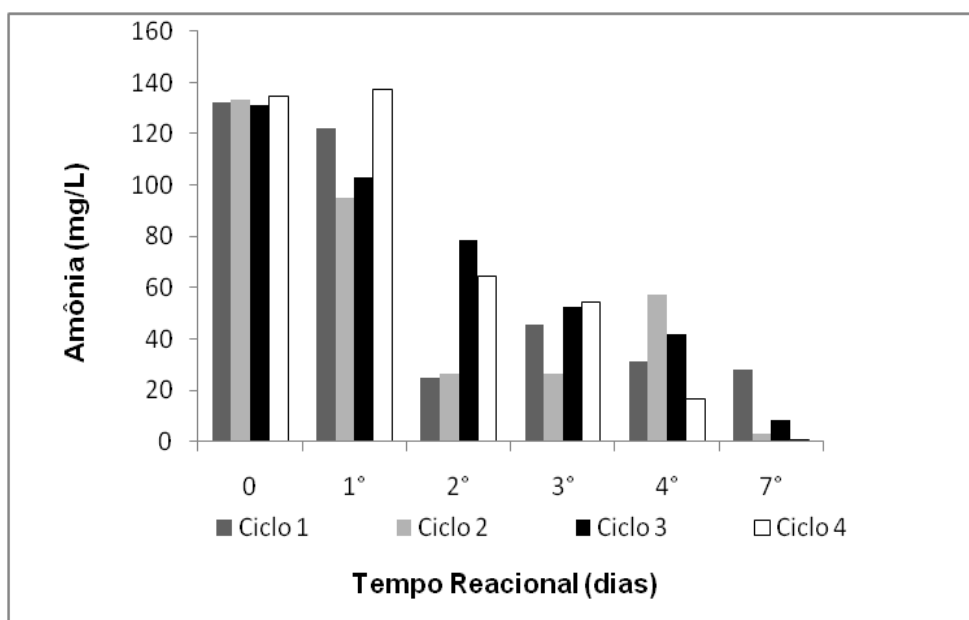


Figura 12 - Variação da concentração de amônia ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Segundo Foster (1949) citado por Rodrigues (1999), a preferência por amônia está sujeita a mudanças, dependendo do organismo, das condições do meio e do

seu cultivo, o que justificaria a utilização do nitrato, haja vista não ser este fonte preferida dos fungos em relação ao nitrogênio.

Sampaio *et al.* (2004) avaliaram a remoção de amônia da água residuária de indústria de beneficiamento de castanha de caju, rica em fenol, por reator biológico com fungos para diferentes tempos de detenção hidráulica. Os autores observaram baixos percentuais de remoção de nitrogênio amoniacal, sendo a maior remoção de aproximadamente 22% para um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 h.

De acordo com Celar (2003), em estudos com cinco espécies de fungos, a forma preferencial de assimilação de nitrogênio se dá pela forma amoniacal ou pelo nitrato. A preferência dos fungos pela amônia foi observada, porém para algumas espécies, enquanto o consumo de nitrato só se dar após a forma amoniacal já ter se esgotado. Em contrapartida, há espécies que apresentam a capacidade de assimilar o nitrato muito mais rápido do que outras e existem ainda certas espécies que utilizam as duas fontes de nitrogênio simultaneamente.

Neste trabalho, houve remoção simultânea de amônia e nitrato com destaque para o 2º ciclo que alcançou 97% de remoção deste íon, ainda que em relação ao nitrato tenha ocorrido, ao longo dos ciclos, aumento de sua concentração no meio. Semelhantemente, no trabalho desenvolvido por Freitas Neto *et al.* (2007) sobre a remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos, foi verificado acúmulo de nitrato no meio. Os autores operaram reator em escoamento contínuo durante 59 dias com carga orgânica volumétrica (COV) de 78,5 mg DQO/L.h, TDH de 8 h e adição de 0,5 g de glicose/L de afluente, como fonte primária de carbono. Foi observado que no período entre o 21º a 42º dia houve grande produção de nitrato e a concentração deste íon foi quase o triplo da concentração inicial.

Leite *et al.* (2006) relataram que os fungos possuem estruturas denominadas vacúolos que realizam as funções de armazenamento de nitrogênio e fosfato, os quais podem ser acumulados e liberados em resposta às necessidades metabólicas do microrganismo.

Na Figura 13 é apresentada a variação da concentração de nitrato ao longo dos ciclos biológicos de degradação.

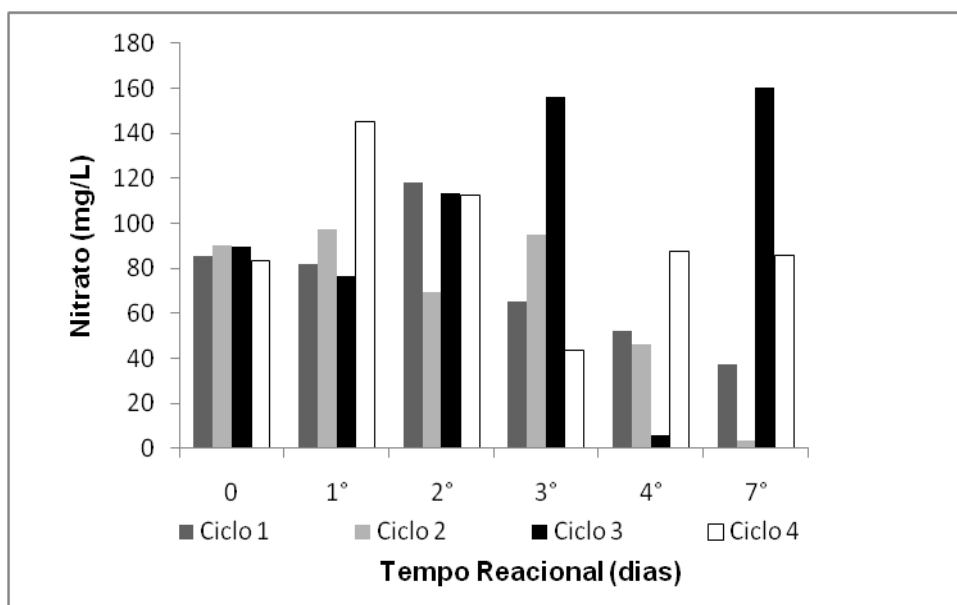


Figura 13 - Variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Os aumentos da concentração de nitrato nos ciclos 3 e 4 podem ser resultado de resposta metabólica da célula fúngica que pode ter liberado parte dos nutrientes armazenados em seus vacúolos ao longo dos ciclos operacionais, uma vez que estes podem ter ficado completamente preenchidos durante o processo biológico.

Em relação ao nitrito, como pode ser observado na Figura 14, não foi verificado praticamente nenhuma remoção, ocorrendo aumento deste íon no 4º ciclo e nos demais ciclos permanecendo praticamente constante.

No trabalho de Freitas Neto *et al.* (2007), embora no final de 59 dias de operação os autores tenham conseguido percentual de remoção de 60% de NO_2^- , verificaram-se períodos que a concentração de nitrito dobrou e este incremento foi ainda maior quando o reator passou a operar com TDH de 4 h, 1 g glicose/L e COV de 236 mg DQO/L.h, com valores de concentração final dez vezes maior do que a inicial.

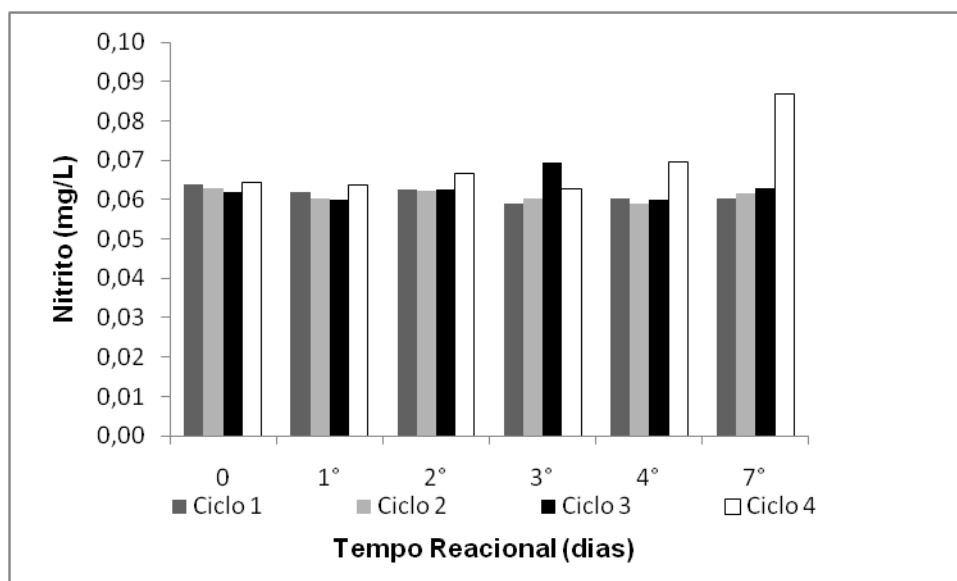


Figura 14 - Variação das concentrações de nitrito ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Os resultados desta pesquisa mostraram elevadas remoções de ortofosfato, com eficiência de 70,5% no fim do primeiro ciclo (Figura 15), embora no 3º ciclo este percentual tenha diminuído para 7%.

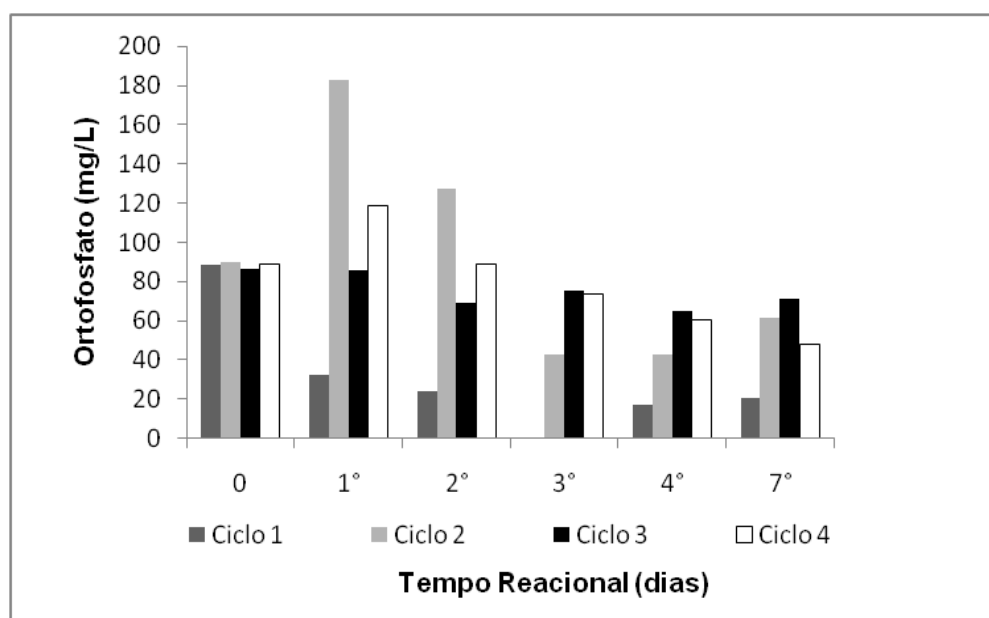


Figura 15 - Variação das concentrações de ortofosfato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Um fator que pode ter contribuído para a boa remoção de ortofosfato verificada pode ser atribuída ao desempenho da espécie estudada quanto ao uso de NH_4^+ , bem como a presença de ácidos orgânicos no meio resulta na diminuição do pH (GRIFFIN, 1994; PAPAGIANI *et al.*, 2005), o que aumenta a disponibilidade do fósforo, pois o mesmo torna-se mais solúvel, e portanto mais biodisponível para os microrganismos.

A adição de glicose que se constitui em um substrato de fácil assimilação, é capaz de melhorar o nível de remoção de compostos tóxicos pelos fungos (SINGH, 2006). Na presente pesquisa, embora os compostos BTX tenham sido totalmente removidos do meio até o terceiro dia de cada ciclo, a remoção de matéria orgânica carbonácea nesta etapa não foi boa.

Provavelmente, em função da fase de adaptação, no 1º ciclo não ocorreu remoção de matéria orgânica, o que contribuiu para a baixa eficiência de remoção registrada na Etapa I, de apenas 34%. Ainda assim, verificou-se melhora da remoção da matéria orgânica no 4º ciclo operacional onde foi alcançado percentual de eficiência de 54% de remoção de matéria orgânica bruta. A baixa eficiência registrada no 1º ciclo para remoção de matéria orgânica carbonácea pode ter sido influenciado pela grande quantidade de matéria orgânica presente em quantidade muito superior às necessidades da espécie, conforme apresentado na Figura 16.

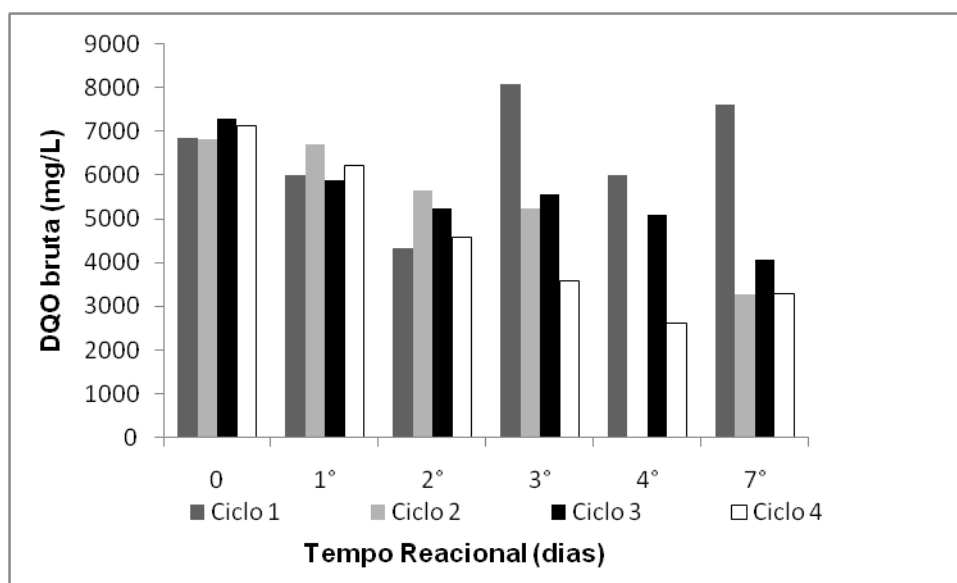


Figura 16 - Variação das concentrações de DQO bruta ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Quanto à remoção de DQO das amostras após centrifugação, o percentual de maior eficiência encontrado também se deu no 4º ciclo de operação, em torno de 63%, conforme apresentado na Figura 17.

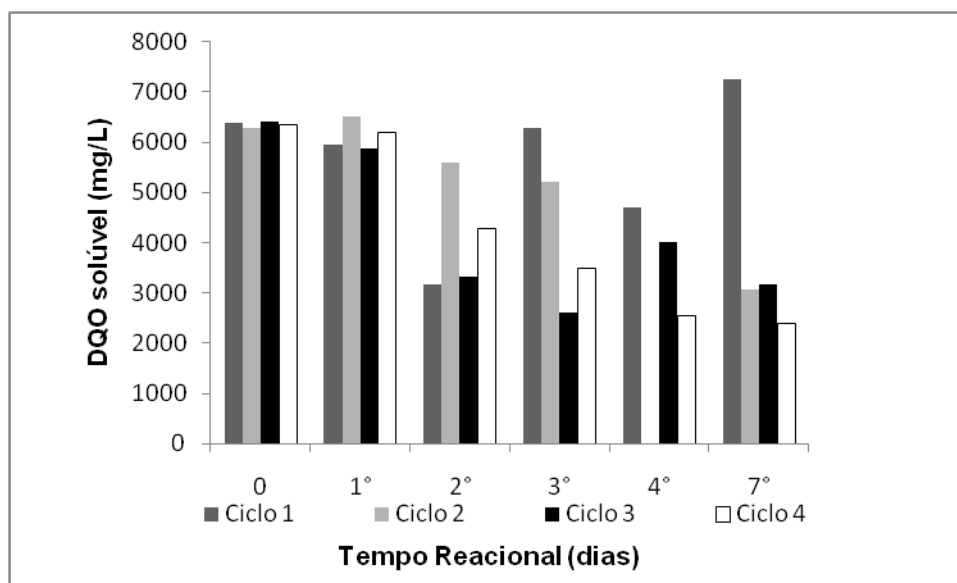


Figura 17- Variação das concentrações de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Desta forma, verificou-se que a grande quantidade de glicose (5 g/L) disponibilizada à espécie fúngica proporcionou uma certa inibição, resultando em percentuais baixos de remoção de matéria orgânica carbonácea.

Este comportamento é diferente do observado no estudo realizado por Rodrigues (2006), que utilizando reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética, comparou o tratamento de águas residuárias com e sem a adição de glicose (co-substrato) sobre a eficiência do tratamento. O autor constatou que a biodegradação de matéria orgânica foi mais significativa quando se usou glicose, alcançando remoções de DQO de 27% sem o uso da glicose e de 100% com a sua utilização.

De acordo com Rodrigues (2007) a presença de um co-substrato auxilia o microrganismo em seu metabolismo, uma vez que serve como fonte primária de carbono, entretanto a presença do co-substrato, glicose, também pode inibir a remoção de outros compostos mais complexos se estiver em excesso.

Damasceno *et al.* (2007) avaliando a remoção de fenol de água residuária de uma refinaria de petróleo por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada sem

agitação e com aeração artificial encontraram remoções de DQO, correspondentes a 82% no reator contendo biomassa imobilizada adicionada de açúcar, 85% no reator com biomassa fúngica dispersa adicionada de açúcar, e 95,5% no reator com biomassa fúngica dispersa. Se comparássemos estes resultados com os obtidos na presente pesquisa no 4º ciclo, pode-se considerar que o percentual de 63% obtido por ser considerado apropriado, pois os autores utilizaram 0,5 g/L de açúcar sacarose, concentração 10 vezes inferior a de glicose utilizada na presente pesquisa, o fenol é um composto de fácil assimilação pela espécie fúngica quando comparado com os BTX que geram diversos metabólitos que podem contribuir para o incremento da matéria orgânica final.

Ainda que a remoção de matéria orgânica carbonácea não tenha sido boa, houve eficiência de remoção dos compostos BTX, pois mesmo para uma concentração de glicose 5 g/L foi possível remover o benzeno, com 3 dias (72 horas) e tolueno com dois dias (48 horas) de operação do reator, conforme pode ser visto nas Figuras 18 e 19.

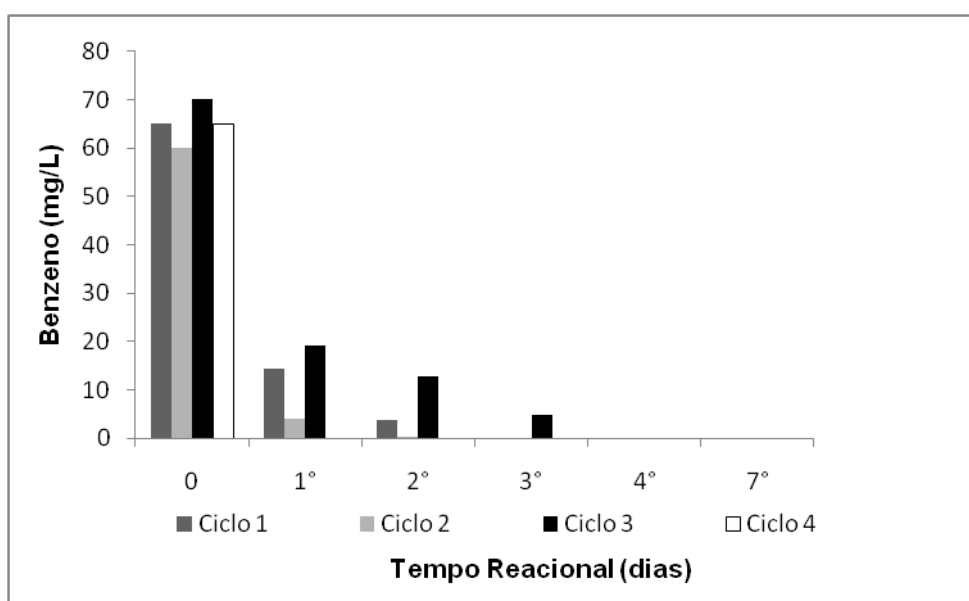


Figura 18 - Variação das concentrações benzeno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

O maior tempo encontrado para completa remoção de benzeno foi de 72 horas no 3º ciclo, na presença de 450 mg/L de BTX (Figura 18), em contrapartida os resultados obtidos por Fulekar e Singh (2010), que avaliaram a biorremediação de benzeno utilizando biorreatores inoculados com fungos e bactérias sob condições

aeróbias. Os autores conseguiram remoções na ordem de 100% e 67,5%, em concentrações iniciais de 100 mg/L e 250 mg/L no prazo de 72 horas e 168 horas, respectivamente, mas quando o reator foi submetido a uma maior concentração (500 mg/L), o benzeno inibiu as espécies.

Lee e Cho (2009) examinando a interação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno como substrato por *Rhodococcus sp* constataram que esta espécie poderia degradar aerobiamente todos os quatro componentes de forma isolada. Por outro lado à degradação de benzeno só se deu após ter se esgotado todo o tolueno presente. Nesta etapa da pesquisa não foi possível observar diferença nos tempos de degradação entre o benzeno e o tolueno. Na Figura 19 é observado o comportamento de remoção do tolueno, destacando-se o 3º ciclo no qual foi obtido menor percentual de remoção de 93% após 48 horas de operação, enquanto os 1º, 2º e 4º ciclos com o mesmo tempo reacional já alcançavam uma remoção de 100%.

Garcia-Peña *et al.* (2008), avaliando biofiltros com o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* na degradação de BTEX, constatou que o tolueno foi completamente degradado, seguido de etilbenzeno. O benzeno foi só parcialmente assimilado com 45% de remoção e o-xileno, apenas de 30%. Em misturas de benzeno, tolueno, etilbenzeno e benzeno, a taxa de degradação de tolueno foi inferior à taxa obtida apenas com tolueno. Já para etilbenzeno em mistura com benzeno a taxa foi nula, ou seja, a degradação do benzeno foi negativamente afetada tanto pelo tolueno quanto etilbenzeno. Os resultados obtidos mostraram leve diferença da ordem de degradação do benzeno se comparado ao tolueno, que permaneceu dois dias no reator, enquanto o benzeno permaneceu três dias.

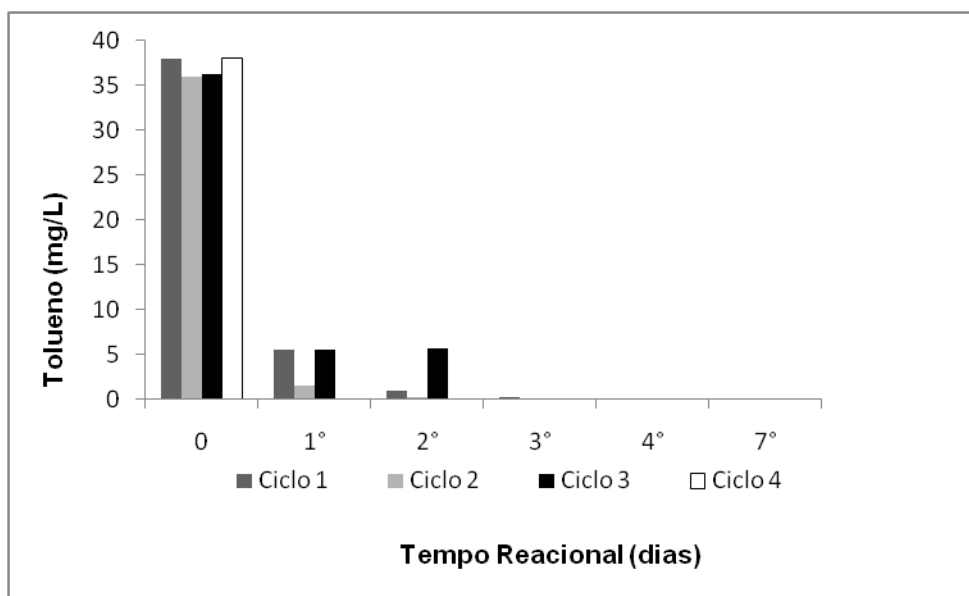


Figura 19 - Variação das concentrações de tolueno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

Embora o xileno seja, dentre os compostos BTX, o mais difícil de ser degradado, sendo resistente por mais tempo à degradação biológica (Garcia-Peña *et al.*, 2008), na presente pesquisa este composto foi o primeiro a não ser mais detectado nas análises cromatográficas. Provavelmente isto ocorreu em virtude da concentração teórica do benzeno e do tolueno no meio ser maior (200 mg/L), com a do xileno de 50 mg/L, de modo que este último, como era de difícil solubilização no meio, encontrava-se disponibilizado ao microrganismos em concentrações ainda menores, em média foi encontrado 3 mg/L nas amostras afluentes ao reator.

Com base na ordem de degradação dos compostos BTX, em concentrações similares, relatada em diversos trabalhos, tais como Littlejohns e Daugulis (2008); Garcia-Peña *et al.* (2008); Qi *et al.* (2002), foi de que o primeiro composto a ser degradado no meio seja o tolueno, seguido do benzeno e só por fim o xileno.

Na Figura 20 está apresentado o decaimento de xileno logo após um dia de operação (24 horas). Em geral, o benzeno e os xilenos são os menos degradáveis, se comparado aos outros compostos do grupo do BTEX, tanto por fungos como por bactérias. Alguns autores relataram que dos isômeros do xileno seja o-xileno o mais difícil de degradar, atribuindo este fato a posição do grupo funcional dos diferentes isômeros do xileno (GARCIA-PEÑA, 2008).

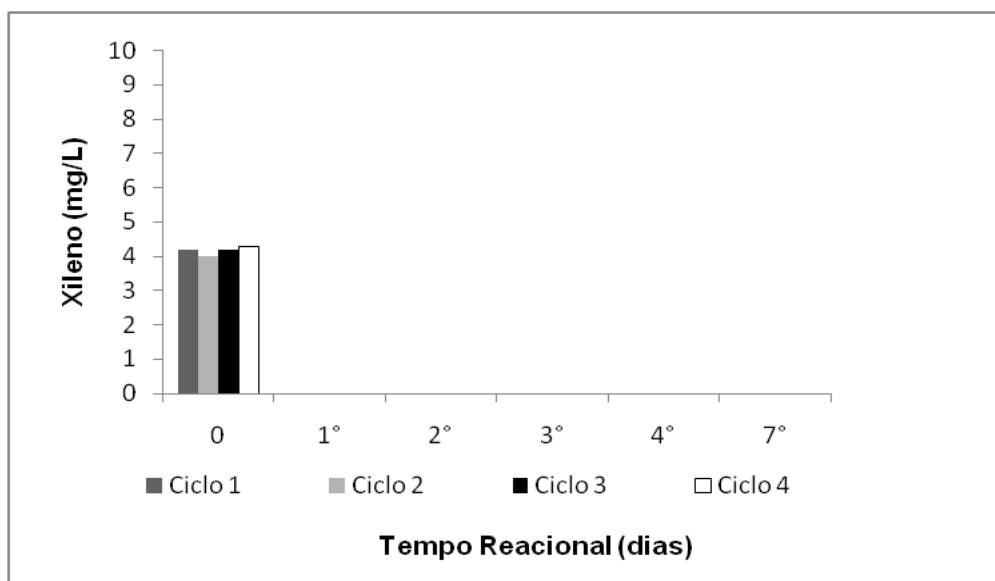


Figura 20 - Variação das concentrações de xileno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 5 g/L de glicose.

5.2. Etapa II: Caracterização da Água Contendo BTX e Alimentada com 1g/L de Glicose.

Nesta etapa foi variada a concentração do co-substrato e o meio passou a conter 1g/L de glicose. Na Tabela 9 são apresentados os valores médios e desvios-padrões para cada variável monitorada no afluente e no efluente do reator em batelada.

Tabela 9 - Caracterização das águas oriundas do afluente e efluente do reator alimentado com 1g/L de glicose.

Valor médio ± Desvio-padrão		
PARÂMETRO (mg/L)	AFLUENTE (mg/L)	EFLUENTE FINAL (mg/L)
Amônia	132 ± 2,8	36 ± 35
Nitrito	0,074 ± 0,009	0,036 ± 0,0094
Nitrato	84,4 ± 3,2	60 ± 35
Ortofosfato	86 ± 1,4	51 ± 49
pH	4,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2
DQO bruta	3156 ± 96	1514 ± 992
DQO solúvel	3128 ± 24	966 ± 570
Benzeno	60 ± 2	Não detectável
Tolueno	33 ± 1	Não detectável
Xileno	4,3 ± 0,5	Não detectável

Na presente etapa foi verificado que ao longo dos ciclos operacionais, o meio tendeu a acidificação e atingiu, no último tempo de reação de cada ciclo, o valor médio de pH de 2,5. O afluente apresentava valor médio de pH 4,2 como pode ser visto na Figura 21.

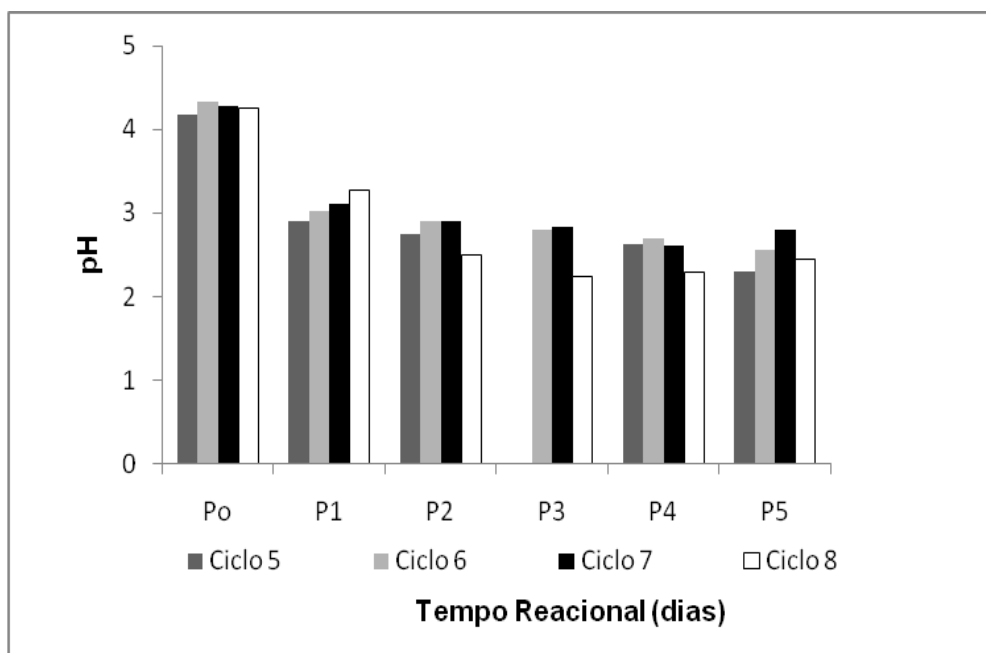


Figura 21- Variação das concentrações de pH ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

Quanto às variações de amônia durante o tratamento, no final de cada ciclo operacional foi alcançada eficiência de remoção média de nitrogênio amoniacal de 81%. Vale destacar o maior percentual encontrado no 7º ciclo que chegou a 97% de remoção.

A concentração de amônia no início da operação era em média de 132 mg/L e, após o tratamento a mesma foi de 36 mg/L no efluente final. Nos demais ciclos foram mantidos bons percentuais de remoção de amônia (Figura 22), observando-se o decaimento da concentração de amônia no final de cada ciclo estudado, sendo a pior resposta obtida no 6º ciclo, onde a remoção final foi de apenas 33%.

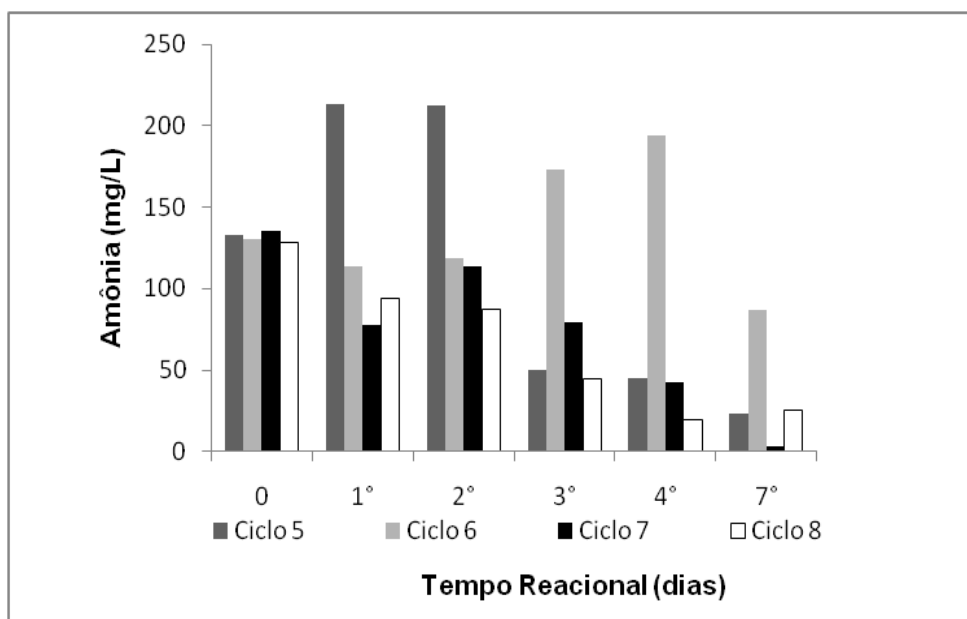


Figura 22 - Variação das concentrações de amônia ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

Quanto à remoção de nitrato é possível observar que a melhor eficiência de tratamento se deu no 7º ciclo com 64% de remoção. Nos demais ciclos não houve significativa remoção deste composto. A variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais desta etapa (1 g/L de glicose) é apresentada na Figura 23.

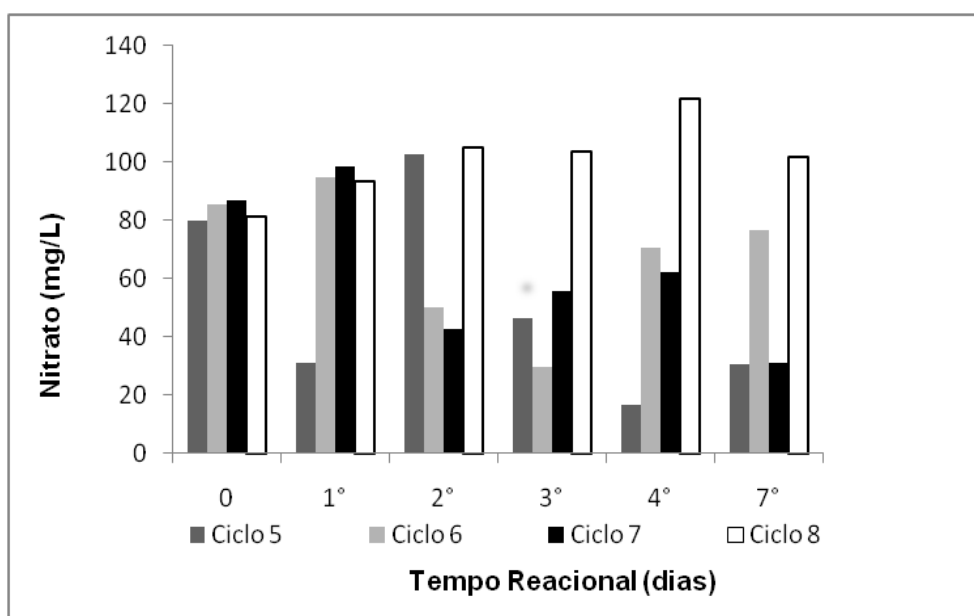


Figura 23 - Variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

No 8º ciclo, já não houve remoção de nitrato, ocorrendo incremento desta variável no meio. Segundo Griffin (1994), esta baixa remoção de nitrato pode estar associada à presença de íons amônio, já que quando há no meio tanto o íon amônio (NH_4^+) como nitrato (NO_3^-), observa-se uma tendência ao consumo preferencial pelos fungos de NH_4^+ . De acordo com este autor os fungos reduzem nitrato à amônia na fase catabólica do seu metabolismo através da atividade das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase. A enzima nitrato redutase é induzida pela presença de nitrato no meio, mas pode ser reprimida pela presença de amônia, mesmo na presença de nitrato.

Esta possível repressão quanto ao consumo de nitrato pode ter ocorrido em virtude da grande quantidade de NH_4^+ no meio, pois neste ciclo foram encontrada as maiores concentrações de NH_4^+ do estudo, com até 213 mg/L durante o tratamento. O percentual de remoção de amônia variou de 97% no 7º ciclo para 80% no 8º ciclo.

Em relação ao nitrito, é possível observar que a melhor eficiência de remoção se deu no 7º ciclo de tratamento e no 3º dia de operação, com 29% de remoção. Nos demais ciclos houve uma grande variação das concentrações de nitrito ao longo dos ciclos operacionais como apresentado na Figura 24.

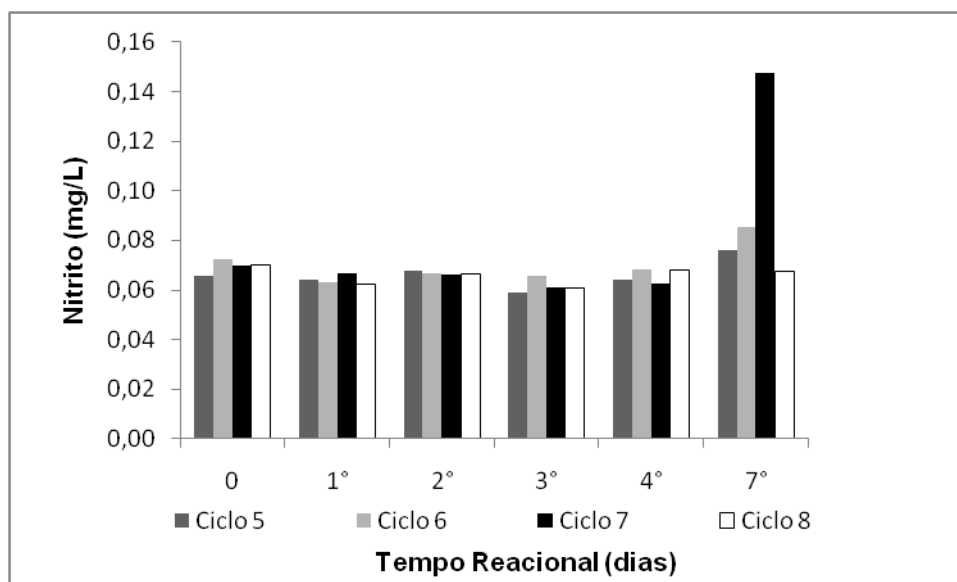


Figura 24 - Variação das concentrações de nitrito ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

Quanto à concentração de ortofosfato nesta etapa, a melhor remoção se deu no 8º ciclo, correspondente a 96%, sendo esta remoção a melhor de todo o

experimento. A média de remoção dos quatro ciclos foi de 45% como pode ser visto na Figura 25.

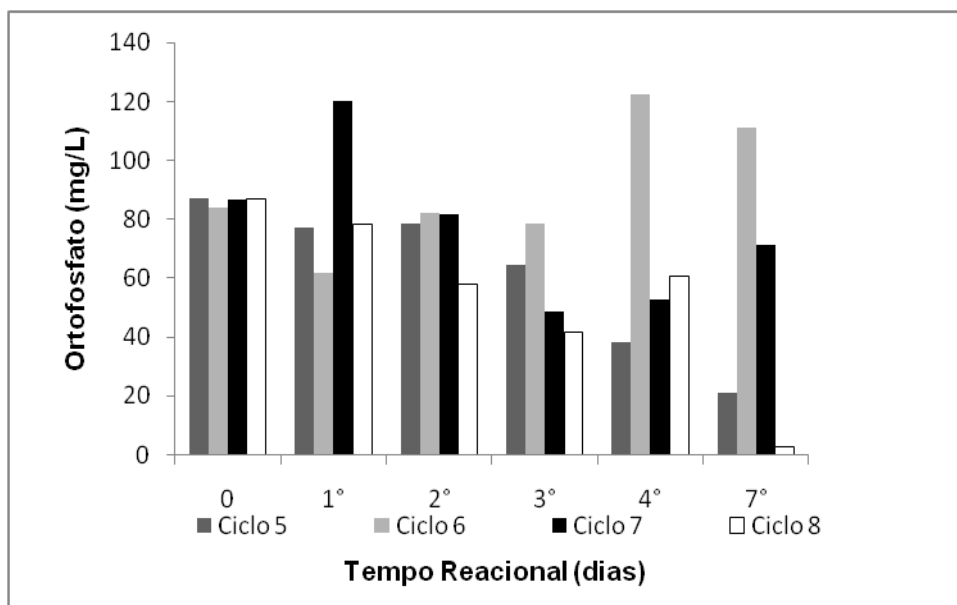


Figura 25 - Variação das concentrações de ortofosfato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

A remoção média em termos de matéria orgânica de DQO bruta, nesta etapa foi de 60%, embora no 8º ciclo operacional o percentual de remoção alcançado tenha sido de 93%, como pode ser visto na Figura 26.

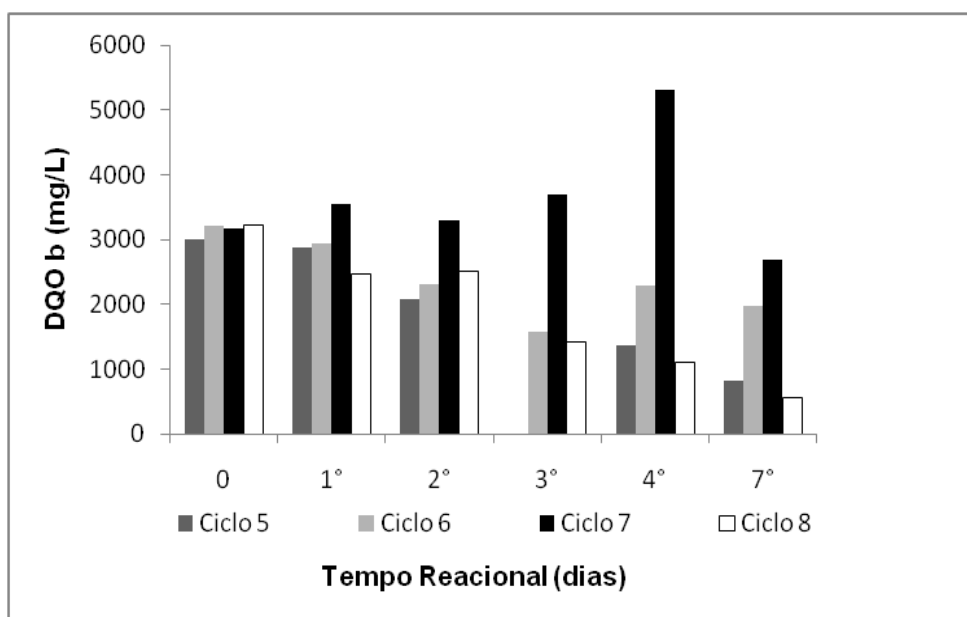


Figura 26 - Variação das concentrações de DQO bruta ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

Sampaio *et al.* (2005) ao estudarem o efeito da glicose na remoção de metil paration, composto de difícil degradação, presente em meio sintético usando inóculo de *Aspergillus niger*, obtiveram 82% de remoção do composto nos reatores que continham glicose, evidenciando que uso deste composto favorece a uma melhor remoção de compostos recalcitrantes. Este fato também foi constatado neste estudo onde foram alcançados resultados satisfatórios na remoção de DQO, pois a média dos quatro ciclos foi de 60% e se avaliado o 8º ciclo individualmente foram alcançadas remoções de 86%.

Na remoção de DQO solúvel a média de remoção encontrada foi de 71%, sendo a máxima remoção de 92%, no 8º ciclo operação, como pode ser visto na Figura 27. Esta similaridade nos percentuais de remoção de DQO bruta e a solúvel, provavelmente, esta associada à diminuição da concentração de glicose no meio, pois para a condição de 1g/L de glicose, os fungos aparentemente cresceram de maneira equilibrada, evitando grande desprendimento de biomassa, o que ocorreu na etapa anterior.

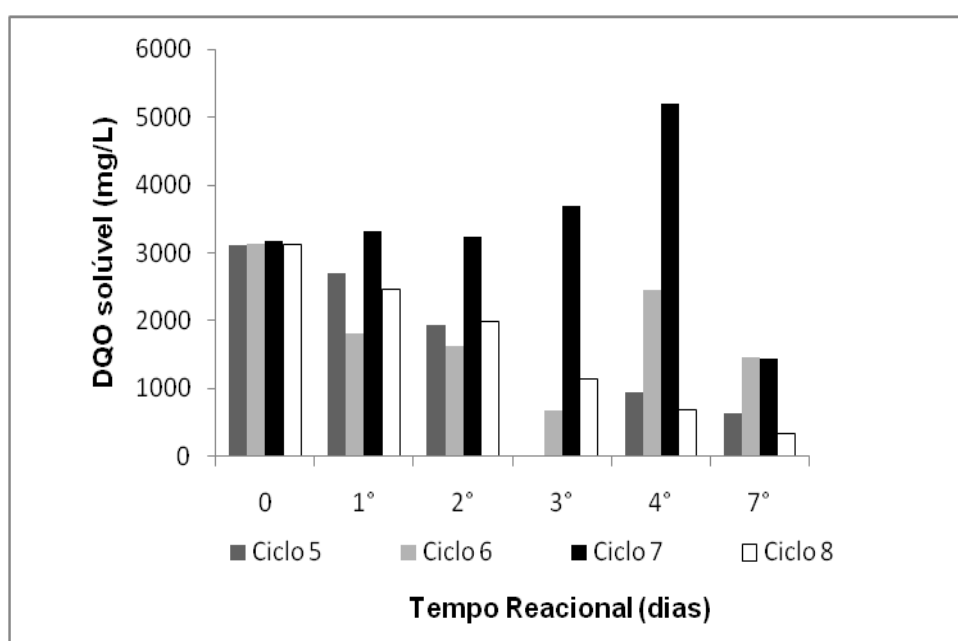


Figura 27 - Variação das concentrações de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

Quanto à remoção do benzeno nesta etapa do trabalho foi possível observar que a diminuição da concentração de glicose não inibiu a remoção dos compostos BTX, sendo possível remover totalmente tanto o benzeno quanto o tolueno, em

apenas 2 dias (48 horas) de operação, como pode ser observado nas Figuras 28 e 29.

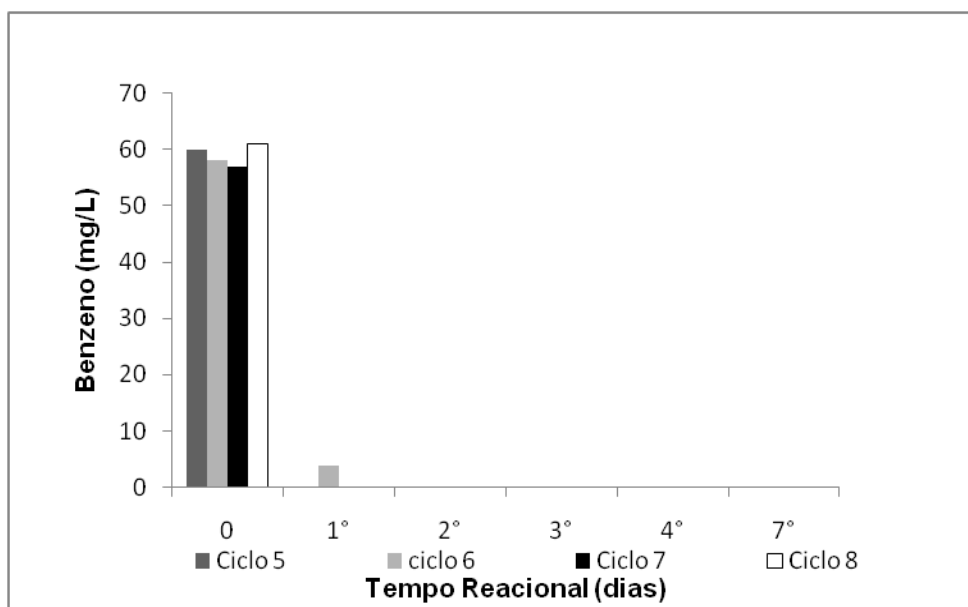


Figura 28 - Variação das concentrações de benzeno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

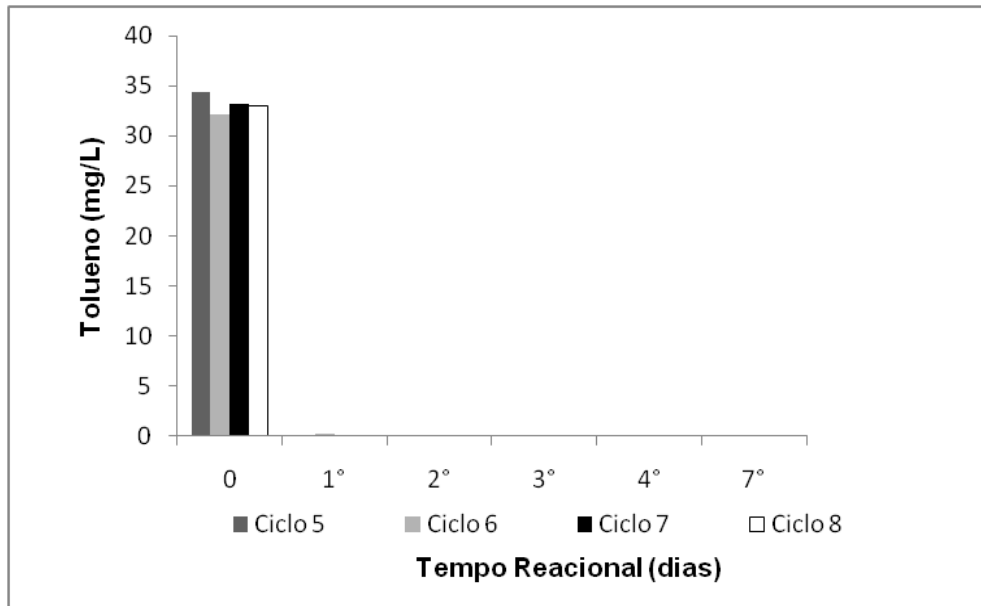


Figura 29 - Variação das concentrações de tolueno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

A degradação de xileno pode ser vista na Figura 30, e como verificado na Etapa I, a remoção deste aromático é muito rápida logo no 1º dia de operação, provavelmente em função da sua menor concentração no meio.

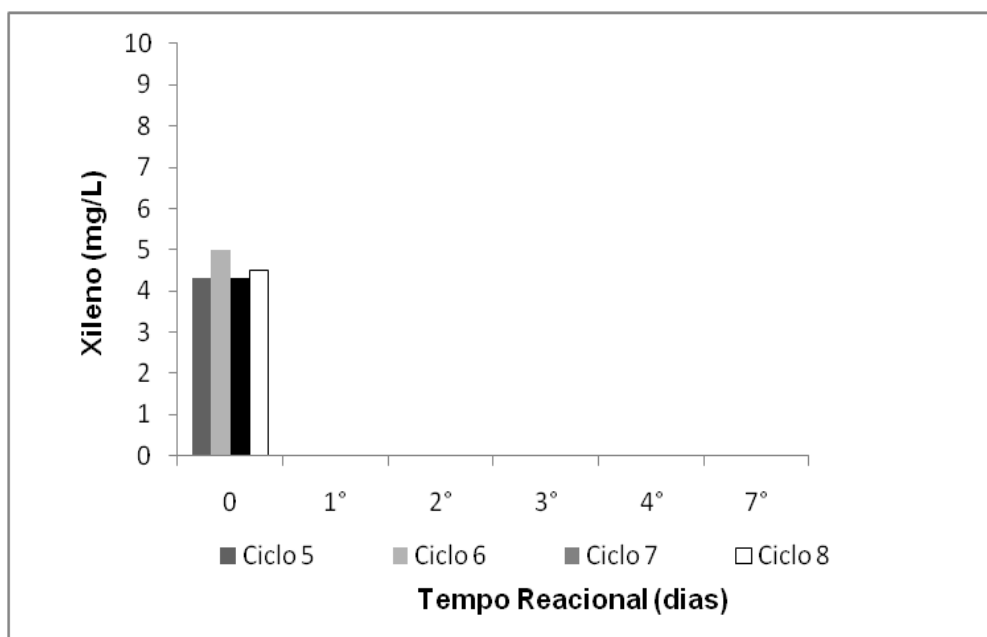


Figura 30 - Variação das concentrações de xileno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 1 g/L de glicose.

Apesar da variação da concentração de glicose imposta, foi possível constatar que a espécie estudada suportou bem a diminuição de glicose para o nível de 1g/L, permitindo eficiências de remoção de amônia e ortofosfato superiores as observadas na etapa I (5g/L). Quanto à remoção de BTX na etapa II, foi possível remover completamente os compostos logo no 2º dia de operação (48 horas).

5.3. Etapa III: Caracterização da Água Contendo BTX e Alimentada com 0,5g/L de Glicose.

Na presente etapa, semelhante às etapas I e II, foi verificado que ao longo dos ciclos operacionais, o meio tendeu à acidificação e atingiu, no último tempo de reação de cada ciclo, um valor médio de pH de 2,3 (Figura 31). Na Tabela 10 são apresentados os valores médios e desvios-padrão para cada variável monitorada no afluente e no efluente do reator em batelada.

Tabela 10 - Caracterização das águas oriundas do afluente e efluente do reator alimentado com 0,5 g/L de glicose.

Valor médio $\pm$ Desvio-padrão		
PARÂMETRO (mg/L)	AFLUENTE (mg/L)	EFLUENTE FINAL (mg/L)
Amônia	132 $\pm$ 2	64 $\pm$ 49
Nitrito	0,069 $\pm$ 0,003	0,090 $\pm$ 0,029
Nitrato	84 $\pm$ 3,1	59 $\pm$ 53
Ortofosfato	83 $\pm$ 2,6	24 $\pm$ 9,8
pH	4,1 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2
DQO b	3155 $\pm$ 92	1901 $\pm$ 1416
DQO solúvel	3032 $\pm$ 11	946 $\pm$ 927
Benzeno	67 $\pm$ 3	Não detectável
Tolueno	33 $\pm$ 2	Não detectável
Xileno	4,5 $\pm$ 0,5	Não detectável

Segundo El-Rahim *et al.*, (2009) avaliando a influência do pH, variando o pH de 2-11, na biorremediação de corantes violeta têxteis de difícil degradação por *Aspergillus niger* observou-se que os percentuais máximos atingidos na remoção do corante foram de 98,9%, 97,3% após 72 h de incubação e os valores de pH ótimo foram de 2 e 3 respectivamente. No final dos experimentos, o tratamento com os fungos possibilitou 91% de remoção de DQO. Isto comprova a excelente capacidade da espécie na degradação de compostos recalcitrantes em valores de baixos pH, exatamente como ocorreu na presente pesquisa onde este valor permaneceu nesta faixa de 2 a 3.

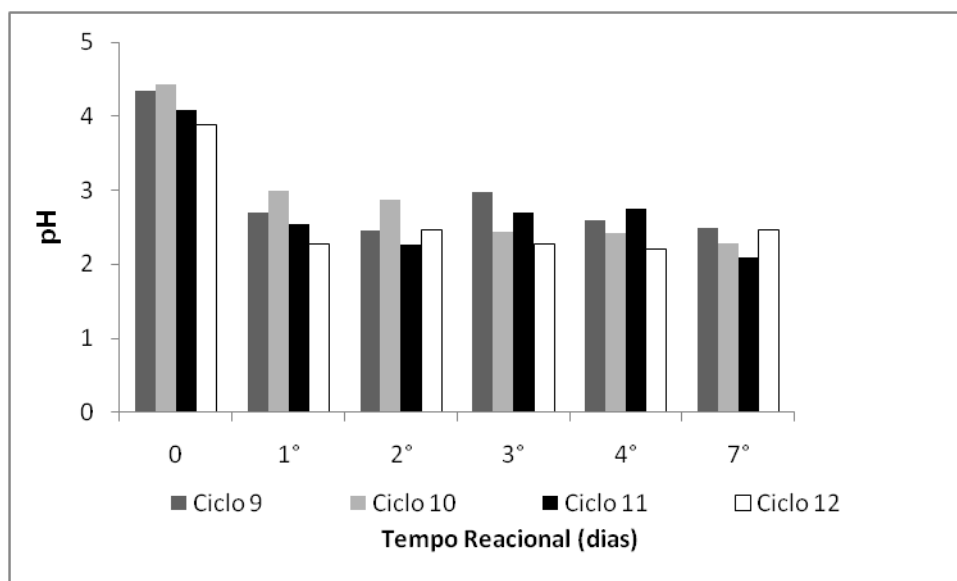


Figura 31- Variação das concentrações de pH ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Quanto ao percentual de remoção de amônia, no final de cada ciclo operacional desta etapa, foi alcançada eficiência de remoção média de nitrogênio amoniacal de 51%. Vale destacar o bom percentual encontrado no 9º ciclo desta etapa que chegou a 95% de remoção. A concentração de amônia no início da operação era em média de 132 mg/L e no final, após o tratamento a média foi de 64 mg/L. O perfil de remoção de NH_3 é apresentado na Figura 32.

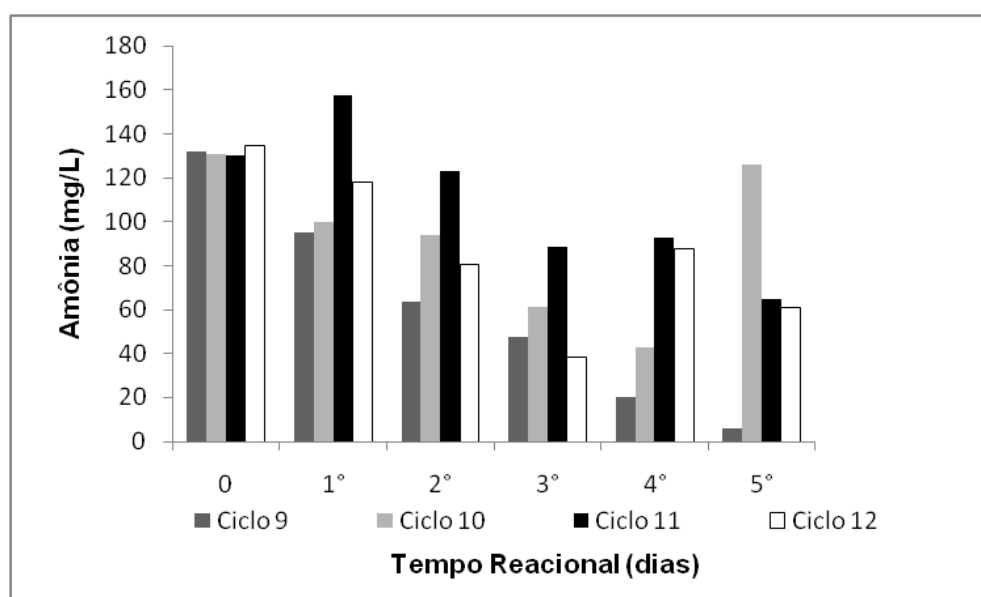


Figura 32 - Variação das concentrações de amônia ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Os fatores que podem ter contribuído para o incremento na concentração de amônia, observado no 10º ciclo, pode ser resultado de resposta metabólica da célula fúngica, podendo a mesma ter liberado parte dos nutrientes armazenados nos vacúolos como citado por Leite *et al.* (2006) ou pela conversão de nitrato e nitrito em amônia, bem como pela quebra de compostos nitrogenados na água residuária (GRIFFIN, 1994).

Na remoção de nitrato é possível observar que a melhor eficiência de remoção se deu no 12º ciclo com 66% de remoção. Nos demais ciclos não houve remoção deste composto, principalmente no 10º e 11º ciclos onde se verificou aumento deste composto. A variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais desta etapa é apresentada na Figura 33.

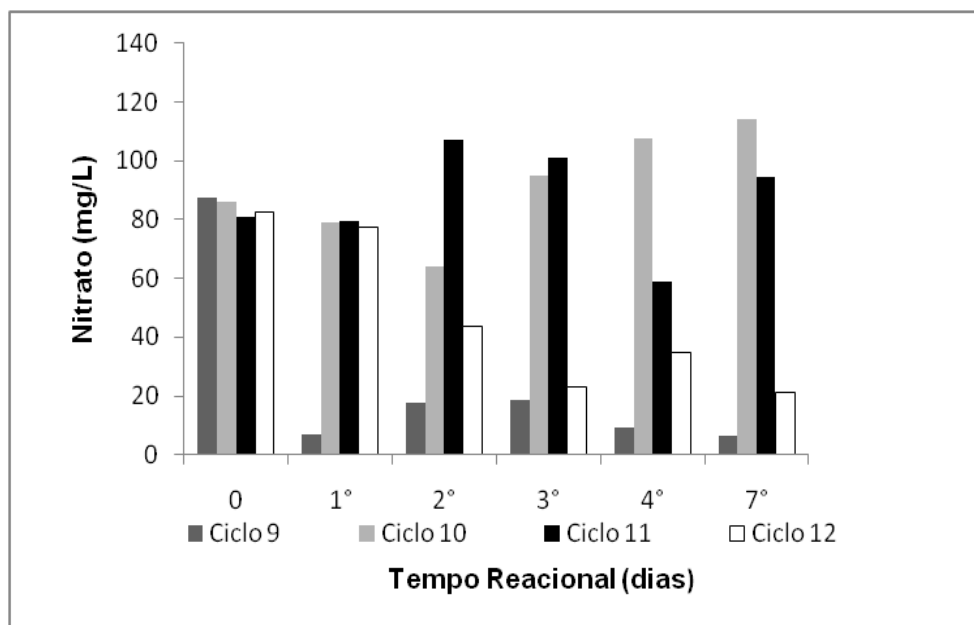


Figura 33 - Variação das concentrações de nitrato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Na remoção de nitrito é possível observar que a melhor eficiência de remoção se deu no 12º ciclo, com 13% de remoção. Nos demais ciclos houve uma grande variação das concentrações de nitrito ao longo dos ciclos operacionais como é apresentada na Figura 34. Não havendo considerável remoção quando se compara o início e o fim da operação.

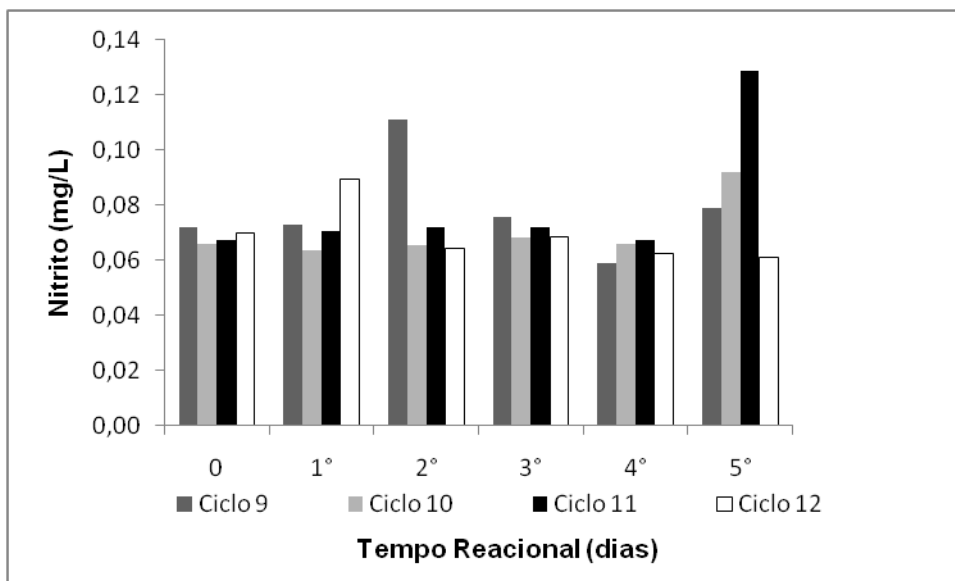


Figura 34 - Variação das concentrações de nitrito ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Quanto à concentração de ortofosfato nesta etapa, a melhor remoção (49%) se deu no 10º ciclo de operação (Figura 35).

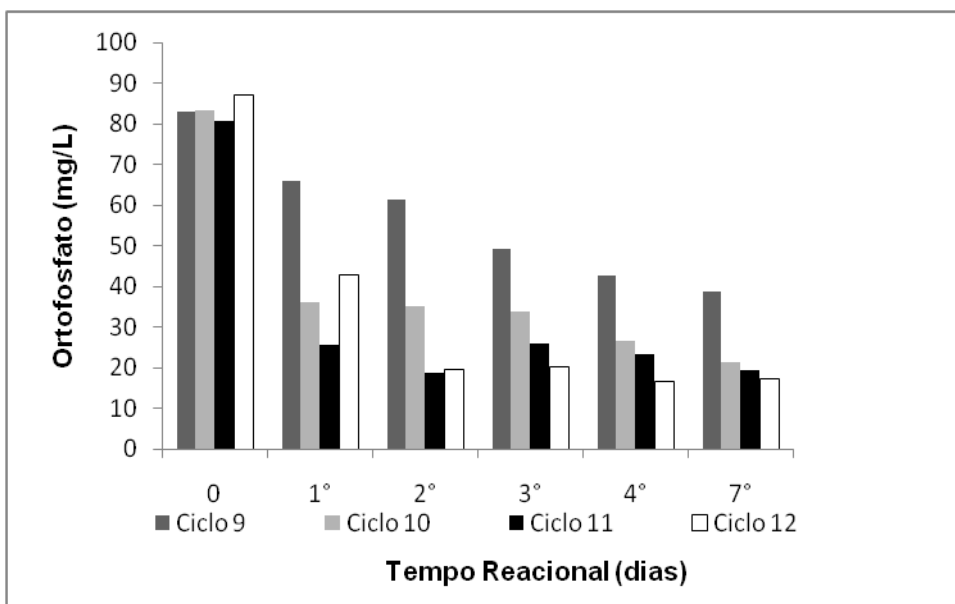


Figura 35 - Variação das concentrações de ortofosfato ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

A remoção média de matéria orgânica, em termos de DQO bruta, nesta etapa foi de 35%, embora no 9º ciclo o percentual de remoção alcançado tenha sido de 77% como pode ser visto na Figura 36.

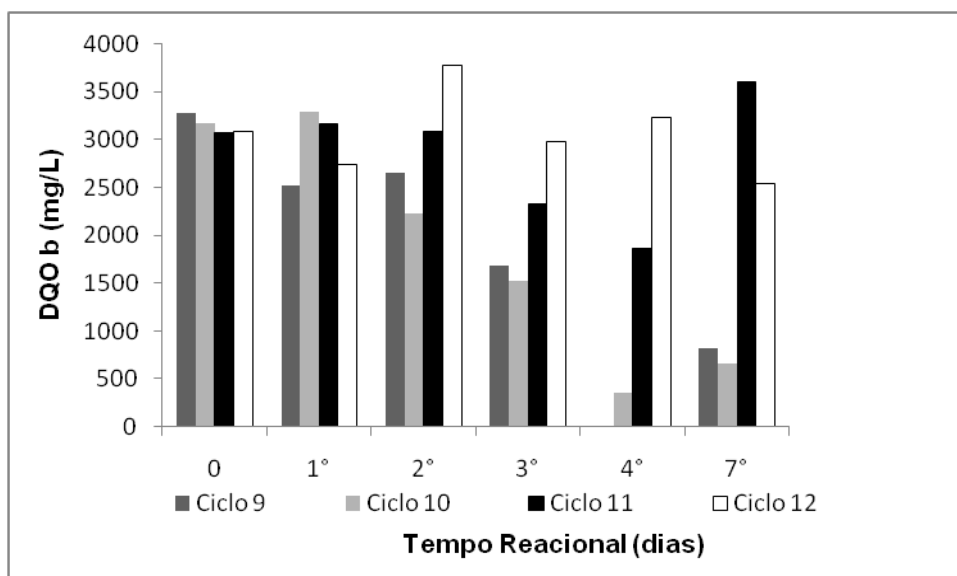


Figura 36 - Variação das concentrações de DQO bruta ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Na remoção de DQO solúvel a média de remoção encontrada foi de 65% e a máxima foi no 9º ciclo com 83% como pode ser visto na Figura 37.

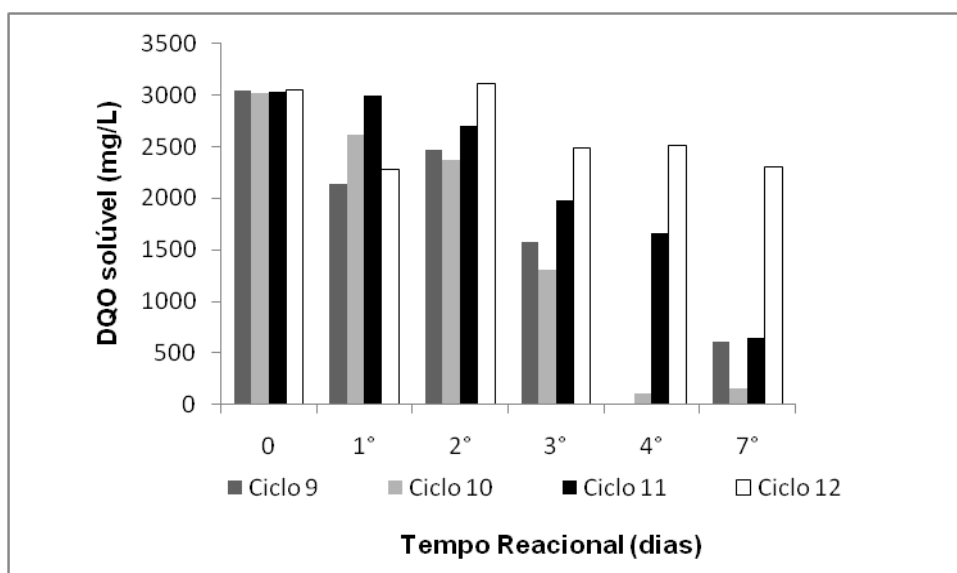


Figura 37- Variação das concentrações de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Na presente etapa, mesmo quando a alimentação recebeu a mais baixa adição de glicose (0,5 g/L), não foi possível constatar nenhuma inibição quanto à degradação dos compostos BTX, pois todos os compostos foram degradados, diferentemente do que observado por Littlejohns e Daugulis (2008) que avaliando a

biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno (BTX) por consórcio bacteriano, constataram a inibição da degradação do benzeno na presença de tolueno. Além disso, estes autores verificaram degradação acelerada do benzeno na presença de xileno e degradação favorável do tolueno na presença de benzeno. Ainda verificou-se que o xileno foi co-metabolizado na presença de tolueno e benzeno, o que indicou a preferência pelo tolueno e só depois o benzeno.

Nas Figuras 38 a 40 é apresentada a diminuição da concentração de benzeno, tolueno e xileno logo após as primeiras 24 h de tratamento com a espécie fúngica AN 400.

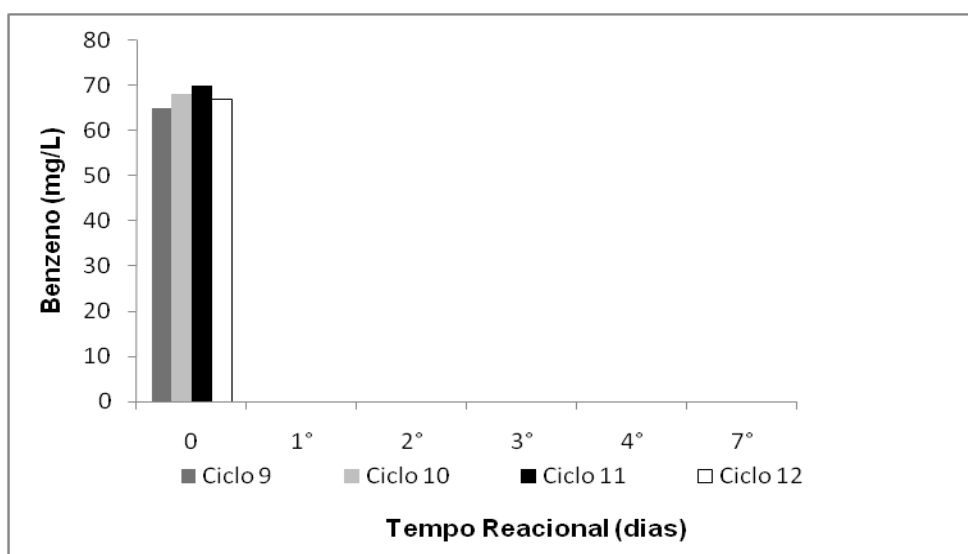


Figura 38 - Variação das concentrações de benzeno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

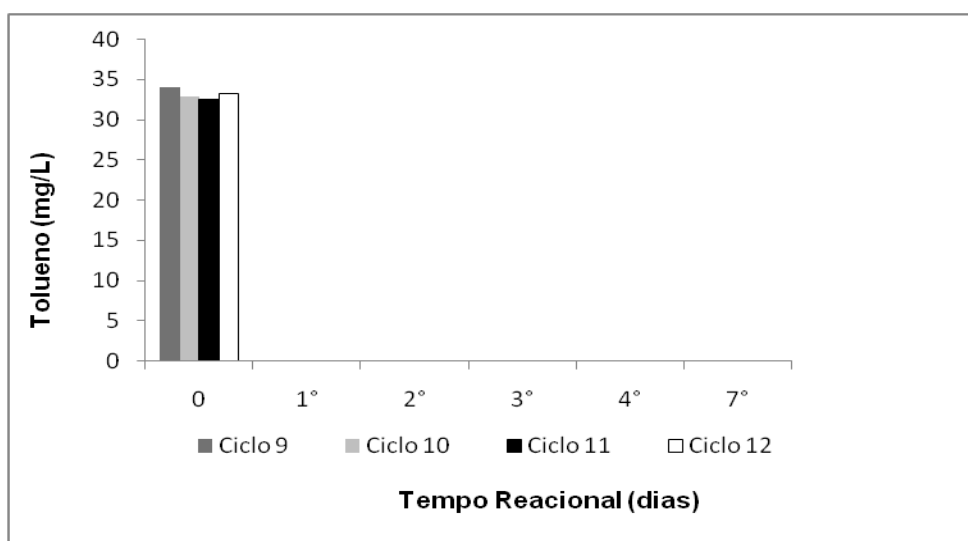


Figura 39 - Variação das concentrações de tolueno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Li e Liu (2006) utilizaram biorreator composto por duas zonas, uma contendo uma suspensão bacteriana e outro com fungos, para tratar os isômeros do xileno. A capacidade de eliminação média de xileno, com a concentração de 62 g/m³h foi de 90%, sendo 24% alcançado na primeira zona e 67,6% na segunda zona onde estavam os fungos. Diversas populações microbianas foram encontradas nas duas zonas do reator, de modo que os xilenos foram degradados por diferentes tipos de microrganismos, embora os autores destacassem dois fungos o *Aspergillus candidus* e o *Penicillium* os quais puderam crescer com o xileno como única fonte de carbono e energia.

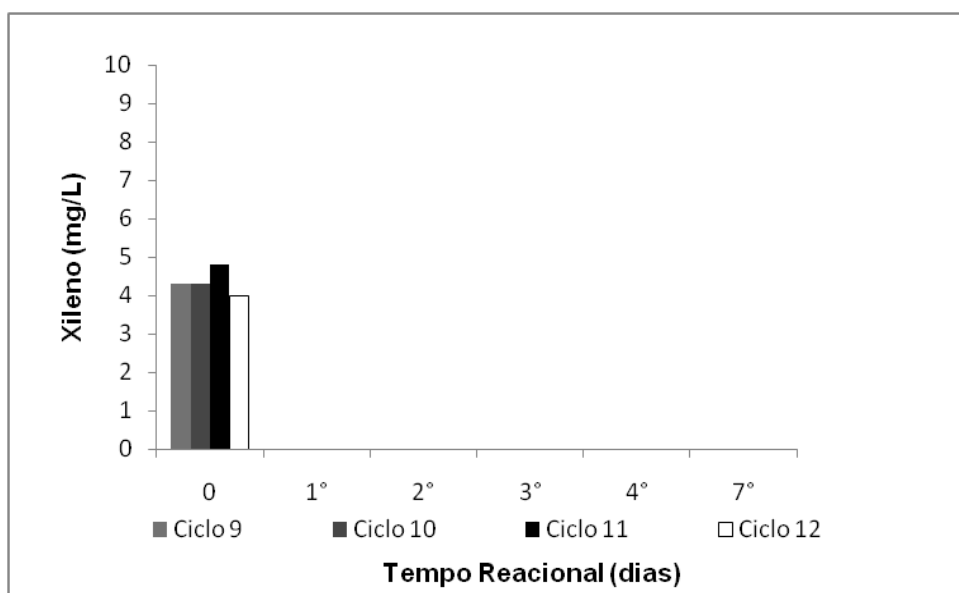


Figura 40 - Variação das concentrações de xileno ao longo dos ciclos operacionais na degradação de BTX em água adicionada de 0,5 g/L de glicose.

Lee e Cho (2009), examinando a interação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno como substrato por *Rhodococcus sp.*, constataram que a espécie poderia degradar aerobiamente todos os quatro componentes. Quanto à degradação de benzeno, essa só se deu após ter se esgotado o tolueno, quando ambos estavam presentes.

Na presente pesquisa nos tempos reacionais em que foram retiradas alíquotas para investigação obteve-se remoções, aparentemente, simultâneas sendo difícil estabelecer a ordem de degradação, uma vez que pode ter ocorrido a remoção dos compostos em tempos reacionais inferiores aos estudados.

No entanto, é possível constatar que o reator em batelada com inóculo fúngico pode ser uma alternativa para o tratamento de águas contendo BTX, pois estes compostos foram completamente eliminados, até 3º dia de operação. Os melhores percentuais encontrados na remoção de matéria orgânica foram de 69% na etapa II. Em relação aos nutrientes o melhor percentual foi na etapa I, onde houve a utilização preferencial do fungo por nitrogênio amoniacal, com remoção média de 93% e 74% na etapa II que garantiu um bom percentual de remoção. Quanto ao ortofosfato foram alcançados percentuais de remoção de 96% na etapa II.

Desta forma, é possível concluir que em virtude dos resultados apresentados a melhor remoção foi encontrada na etapa II de 1 g/L com vantagem sobre a etapa I com 5 g/L, aliás nesta etapa foi possível ver grande desprendimento de biomassa e maior permanência dos compostos BTX no reator com 3 dias, enquanto que nas etapas II e III com 2 dias já não era mais detectados os compostos aromáticos.

No entanto, a pesquisa deve ser analisada submetendo os ciclos reacionais a um menor tempo de duração, bem como a identificação dos metabólitos produzidos. Para verificação de que concentração de glicose é suficiente é necessário que a partida do reator seja em igual período, pois a adaptação da espécie pode ter sido relevante para os melhores resultado na etapa II e III.

5.4 Toxicidade com Sementes de Alface (*Lactuca sativa*)

Segundo Rand *et al.* (1995), a ecotoxicologia tem como objetivo proteger populações e comunidades de diferentes espécies da ação de substâncias tóxicas em concentrações que podem estar associadas a efeitos adversos. No entanto, é impossível conhecer e testar todas as espécies a serem protegidas. Embora seja comum o uso das espécies em questão serem utilizadas como organismos-teste, estes vivem em ambientes variáveis e a determinação da concentração e da dose de absorção é determinada somente por experimentos complexos de bioacumulação e metabolismo. Desta forma foi realizado ensaio com sementes de alface com intuito de avaliar o potencial de inibição de crescimento quando em presença de BTX e determinar o valor da CI_{50} (Tabela 11).

Tabela 11 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para a água tratada e não tratada.

Tratamentos [BTX]	Concentrações mg/L CI50	Solução com 1:4 da [BTX]	Solução com 1:2 da [BTX]	Solução com 3:4 da [BTX]	Solução com [BTX]
450 mg/L	375	1,0	12,0	15,0	85,0
300 mg/L	497	1,0	4,25	16,0	16,0
Após 2 dias de tratamento com 450 mg/L de BTX	*	50,3	64,5	84,4	90,78
Após 2 dias de tratamento com 450 mg/L de BTX	*	3,0	28,0	29,0	55,0

*Não foi possível avaliar a concentração inicial.

Os resultados obtidos dos testes de toxicidade de BTX em contato com as sementes de alface evidenciam que nas concentrações avaliadas os compostos exerceram efeitos prejudiciais e dificultaram a germinação das sementes, principalmente nas concentrações acima de 450 mg/L do composto. Quanto à diferença encontrada nos dois testes realizados com a mesma concentração de BTX após dois dias de tratamento, destaca-se o fato de que no primeiro teste realizado a qualidade do efluente tratado estava inferior do que quando foi realizado o segundo teste, vale à pena destacar que este segundo teste ocorreu três ciclos após, o que contribuiu para a melhor qualidade do efluente o que culminou numa menor toxicidade para espécie estudada.

Como testes para avaliação de caráter quantitativo estão sujeitos, entretanto, a vários fatores aleatórios que vão desde a qualidade da semente adquirida no mercado, até as condições ambientais no laboratório se faz necessário uma maior quantidade de testes para se comprovar os resultados obtidos.

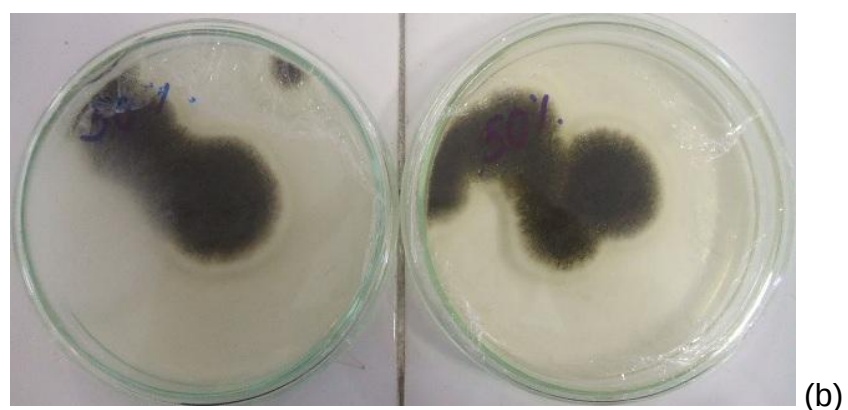
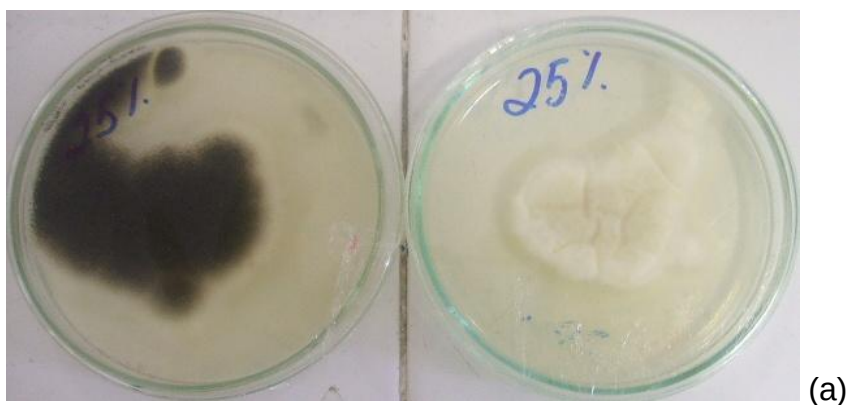
Minatti (2009), realizando testes de toxicidade aguda de compostos BTX de um efluente petroquímico sintético, expondo indivíduos jovens do microcrustáceo *Daphnia magna*, constatou que a maioria dos compostos analisados apresentou toxicidade aguda acima do limite máximo permitido. O composto benzeno, tolueno,

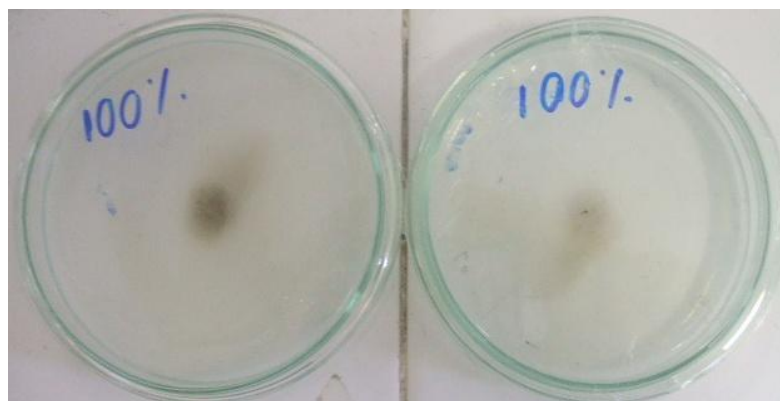
o-xileno e BT (benzeno e xileno) são os compostos mais tóxicos e o TX (tolueno e xileno) e BTX são os de menor toxicidade no efluente após seu tratamento. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o fator de toxicidade dos compostos BTX após o tratamento com biofilmes é menor do que o fator de toxicidade do composto não tratado.

5.5 Teste de Toxicidade em Placas

No teste de toxicidade a espécie fúngica exposta à solução de BTX nas concentrações de 16,25 mg/L e 32,5 mg/L apresentou crescimento logo nos primeiros dias após o início do ensaio, o que não se verificou para a concentração de 100%.

São apresentadas as fotos das placas no quinto dia de cultivo na Figura 41. A espécie *Aspergillus niger* AN 400 cresceu nas placas com 16,25 mg/L e 32,5 mg/L e apresentou crescimento muito pequeno e disperso na placa com 65 mg/L. Deve-se considerar que na placa com 65 mg/L havia somente Agar e BTX (solução inicial), enquanto que nas placas com 16,25 mg/L e 32,5 mg/L havia a diluição com meio de cultura *Sabouraud* para se obter as mesmas relações volume/volume.





(c)

Figura 41 - (a) Placa com 16,25 mg/L de BTX, (b) 32,5 mg/L de BTX, (c) e 65 mg/L de BTX no quinto dia de cultivo para os testes de toxicidade.

Houve limitação do crescimento da espécie fúngica com o aumento da concentração dos compostos tóxicos empregados na pesquisa, evidenciando o potencial nocivo e de difícil degradação dos compostos aromáticos BTX que também foram comprovados por Bergauer *et al.* (2005) ao avaliarem o efeito tóxico de 32 espécies de fungos quanto ao uso de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, fenol e outros hidrocarbonetos. Os autores constataram que o crescimento de todas as 32 espécies estudadas foi inibido por etilbenzeno e pelos três isômeros do xileno quando na placa havia 100% destes compostos na concentração de 50 mg/L, ou seja, sem nenhum outro composto de fácil assimilação. Já o tolueno inibiu o crescimento de 12 espécies quando as placas havia 90% do composto na concentração de 50 mg/L, quando as placas eram submetidas a 50% a inibição foi de apenas 5 espécies. O benzeno e nitrobenzeno não inibiram o crescimento de qualquer uma das 32 espécies quando estava na diluição de 50%. Uma inibição do crescimento de 76%, 18% e 7% foi calculada para o tolueno, nitrobenzeno e benzeno, respectivamente, numa concentração de 100 mg/L.

Realizando pesquisas com meio de cultura contendo fenol para avaliar a toxicidade deste composto sobre a espécie *Aspergillus awamori*, em concentrações de 0,3; 0,6 e 1,0 g/L, Stoilova *et al.* (2006) verificaram que em concentração superior a 0,6 g/L de fenol, nenhum crescimento da espécie fúngica era visualizado.

Por outro lado, quando se disponibiliza condições mais favoráveis ao fungo, podem-se obter melhores resultados, como demonstra o trabalho de Andrade *et al.* (2009), no qual utilizaram *Aspergillus niger* para degradação também de compostos fenólicos, assim como Stoilova *et al.* (2006), de água residuária adicionada de co-

substrato primário, solução de micronutrientes e ajuste de pH até faixa favorável aos fungos em bateladas repetidas, em um total de dezessete ciclos. Foi avaliada a concentração afluyente de até 64 mg/L de fenóis, obtendo-se remoção de até 96% desses fenóis, o que demonstrou que o desenvolvimento dos fungos depende não apenas da concentração das substâncias tóxicas no substrato, como também, das características da água residuária e do tempo de contato entre fungo e poluente. Por isso é necessário conhecer a especificidade de substrato, os padrões de toxicidade para cada espécie a fim de selecionar linhagens com as condições necessárias para biorremediação.

5.6 Microscopia da Biomassa do Reator

Nesta etapa do trabalho foi observada a contaminação do reator no 9º ciclo de operação, logo no início da Etapa III, por outra espécie fúngica, cujas características eram visualmente distintas das da espécie *Aspergillus niger*.

A presença da espécie contaminante alterou a coloração do meio no interior do reator, a qual se apresentou escura e esverdeada (Figura 42b). A realização das análises de microscopia confirmou a contaminação do reator por outro gênero de fungo, posteriormente identificado morfológicamente como *Penicillium* sp., fungo também de natureza filamentosa que em virtude dos seus conídios de coloração verde tornou o reator visivelmente esverdeado (Figuras 43 e 44).

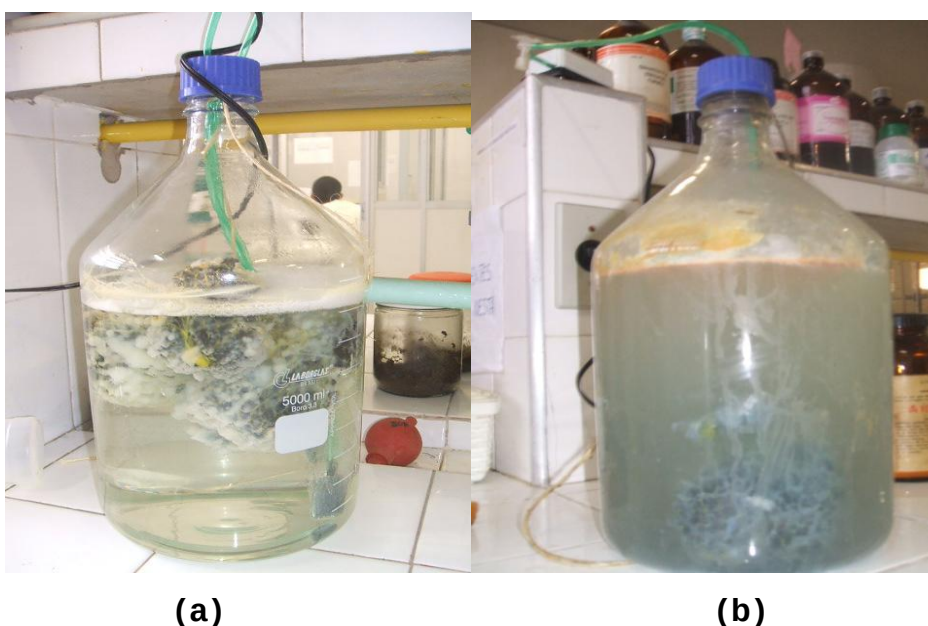


Figura 42 - (a) Reator Original, (b) Contaminação do Reator.

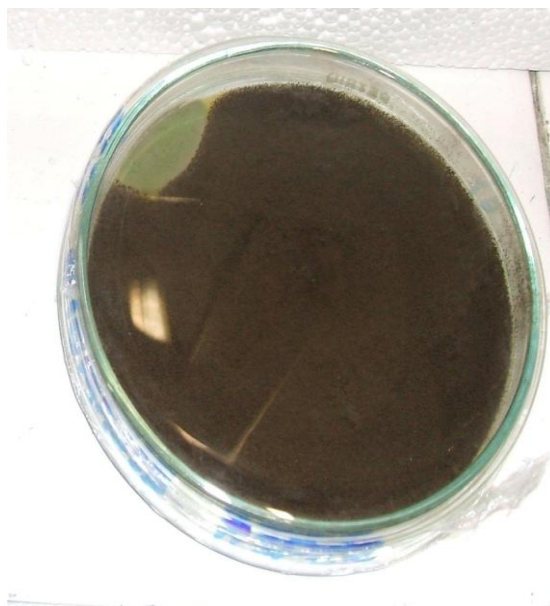


Figura 43 - Cultivo em placa de amostra da biomassa contida no meio suporte mostrando a superfície da placa com crescimento de *Aspergillus niger* e contaminação por *Penicillium* sp.

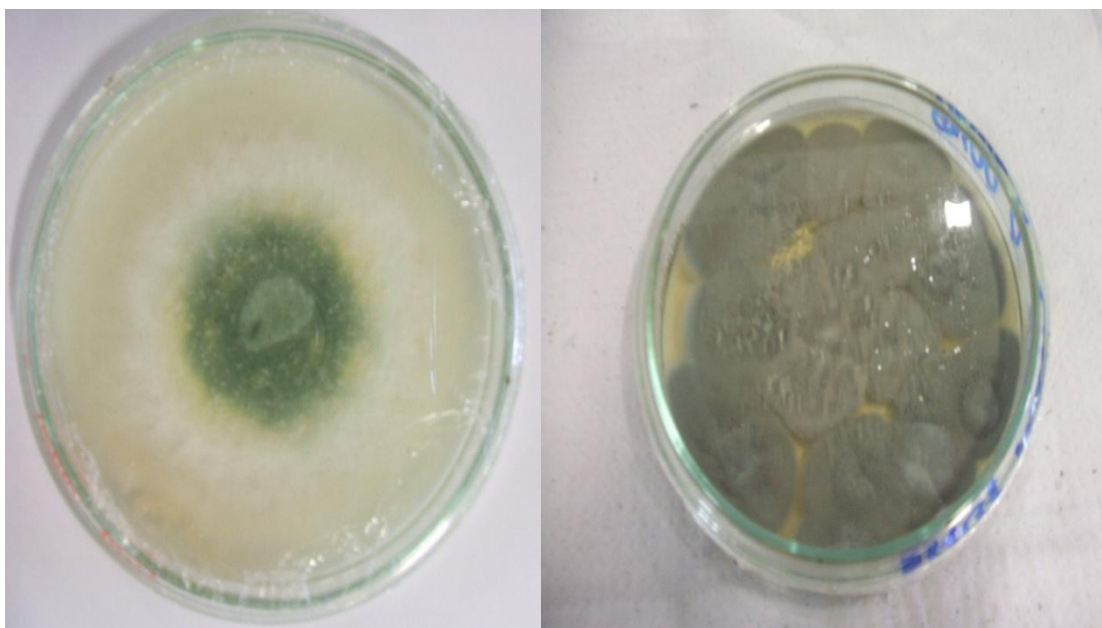


Figura 44 - Isolamento, em placas de Petri, do fungo *Penicillium* sp., que contaminou o reator em batelada sequencial com inóculo de *A. niger* AN 400.

Na Figura 45 são mostradas placas com o micro-cultivo de fungos, a partir do isolamento em lâmina.

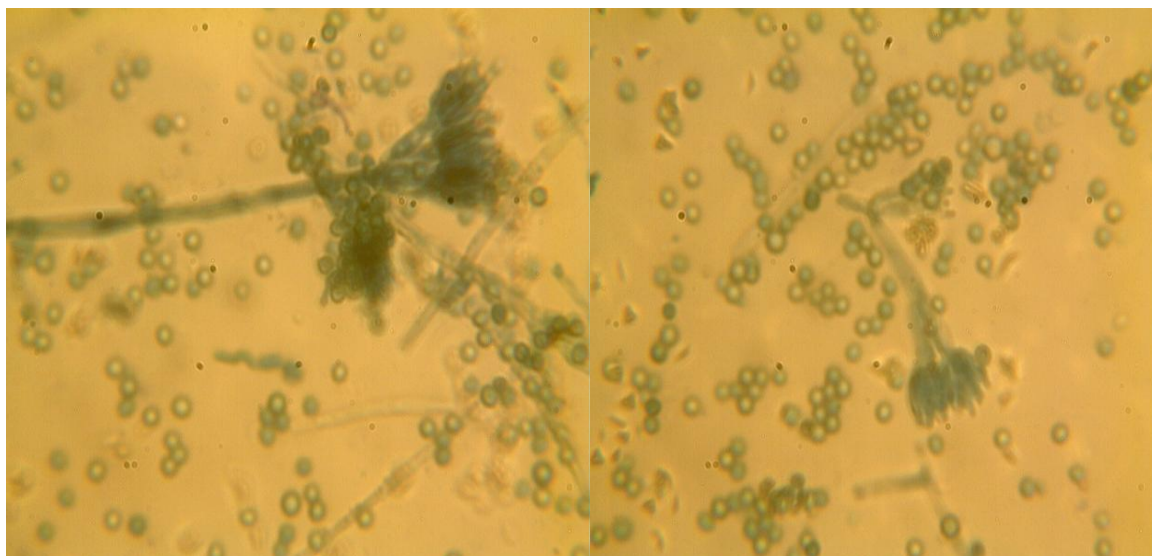


Figura 45 - *Penicillium* sp. : hifas e respectivas cabeças conidiais presentes no reator em batelada sequencial com inóculo de *A. niger* AN400. Aumento de 400 X.

A pesar da contaminação do meio com *Penicillium* sp., o crescimento em placas confirmou também a presença da espécie inicialmente inoculada, *Aspergillus niger*, conforme mostrado na Figura 46.

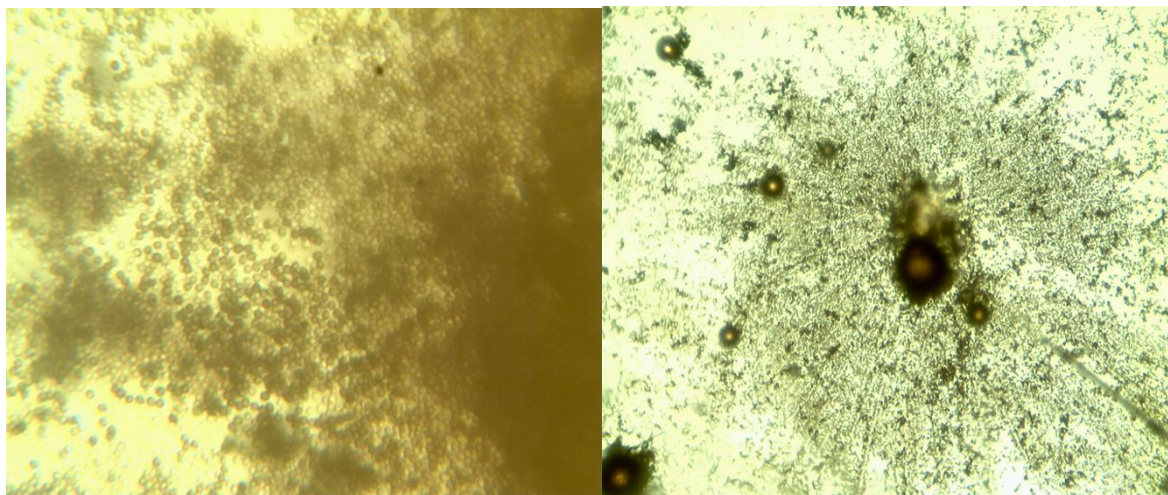


Figura 46 - *Aspergillus niger*: hifas e respectivas cabeças conidiais da espécie inoculada presentes no reator em batelada seqüencial.

Em estudos realizados por Cerniglia (1997) e Jacques *et al.* (2007) vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium*, se destacaram como

possuidores de habilidade para degradar hidrocarbonetos aromáticos. Estes relatos endossam a habilidade do *Aspergillus* e do *Penicillium* em degradar os compostos BTX, como observado no presente trabalho. O consórcio de microrganismos na biorremediação de áreas contaminadas com BTEX tem sido muito explorado, pois segundo D. Wolicka *et al.*, (2009) a utilização de apenas uma espécie de microrganismo na biodegradação de solos contaminados por compostos recalcitrantes possui pouca capacidade de decompor simultaneamente um ou vários hidrocarbonetos. Por isso, para uma biorremediação efetiva de áreas contaminadas por derivados de petróleo requer a aplicação de comunidades mistas de microrganismos.

5.7 Ensaio de Volatilidade

Como pode ser observado na Figura 47, não foi observada através das análises feitas no HPLC, à volatilização dos compostos BTX, pelo menos, até as primeiras 24 horas, tendo-se mantido estável a concentração dos BTX no final desse período, principalmente em relação ao benzeno. Vale destacar o comportamento dos compostos que nas primeiras horas aumentaram as concentrações, provavelmente, em virtude de sua maior solubilização ao passar das horas. Este aumento ocorreu até as primeiras 24 horas.

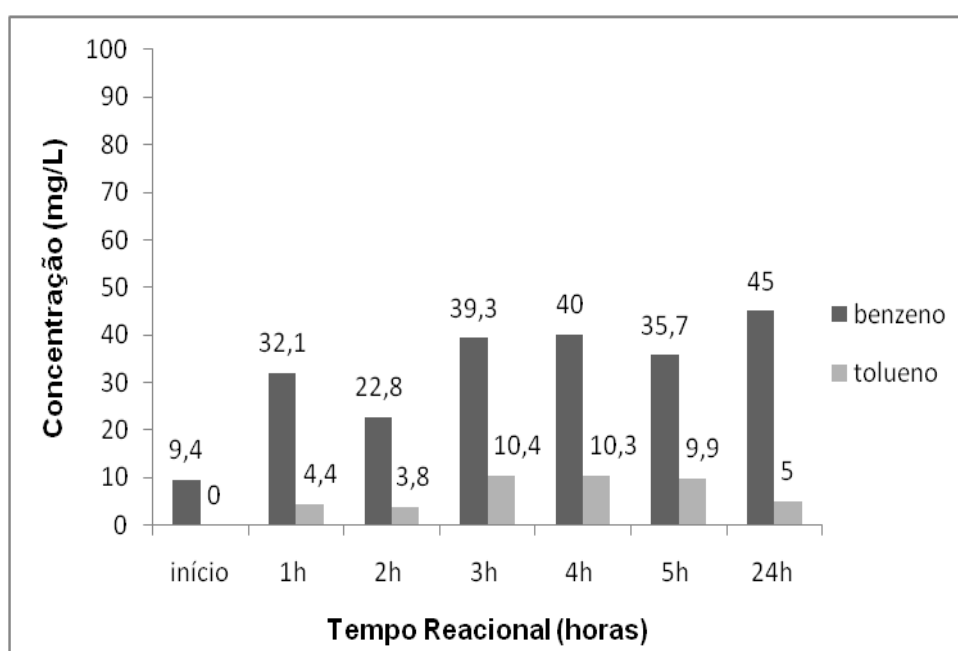


Figura 47 - Variação das concentrações de BTX no ensaio de volatilidade.

O último ponto analisado após 24 horas ainda apresentava concentração de benzeno próximo a 45 mg/L e 5 mg/L de tolueno, o que comprova que o percentual volatilizado é muito pequeno, pois a concentração encontrada no início do teste era similar este fato é confirmado por trabalho realizado por Finotti *et al.* (2009), avaliando a influência do etanol sobre o grau de volatilização BTEX em solos impactados por derrames de gasolina/etanol utilizando-se de frascos de vidro, com capacidade para 50 mL e contendo as amostras controladas que foram fechados com septo de borracha butílica, selados com anéis de alumínio e mantidos em repouso, durante 24 horas concluíram através de ensaios com amostras controladas, com exceção do tolueno, a adição de etanol à gasolina tem um importante efeito de redução da volatilização destes compostos, mas destaca que além das características físico-químicas de cada BTEX, as condições ambientais devem exercer grande influência sobre a volatilização destes compostos e, por isto, devem ser estudadas com maior profundidade.

De acordo com Bento (2005), os alcanos de baixo peso molecular degradam rapidamente, nas primeiras horas, após o derramamento (no máximo até uma semana), enquanto que os hidrocarbonetos de alto peso molecular (alifáticos e aromáticos como os BTX) sofrem lenta degradação, alguns com tempo de meia-vida superior a 1400 dias no caso do benzo(a)pireno e de 14 a 320 dias para o naftaleno o que comprova a degradação dos compostos BTX pela espécie estudada.

Outro ponto a ser analisado é o tempo necessário para dissolução dos compostos BTX, pois a diferença entre a massa total de BTX que deveria ter sido encontrada inicialmente e a massa real de BTX encontrada no meio pode ser atribuída ao lento processo de dissolução dos hidrocarbonetos monoaromáticos (Nunes e Corseuil, 2007). Estes autores avaliando a importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina realizando monitoramento por 6,5 anos constataram que o pico máximo de etanol foi aos 16 meses. Quanto aos compostos BTEX, a massa máxima encontrada foi de 8,6% da massa total disponível na fonte e ocorreu aos 32 meses. Em relação à atenuação natural dos substratos etanol e BTEX, constatou-se que a massa de etanol desapareceu totalmente 32 meses após o derramamento e que o processo de atenuação natural da massa dos hidrocarbonetos monoaromáticos ainda continuava na última coleta realizada 6,6 anos após o derramamento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados nesta pesquisa permitiram concluir que:

- Para os níveis de concentração estudados a ordem de degradação dos compostos BTX no experimento foi primeiramente o xileno, seguido por tolueno e benzeno, porém o ideal seria trabalhar com concentrações idênticas e em tempos reacionais menores. Foi constatado que nas etapas II e III após dois dias de operação os compostos BTX já não foram mais detectados, enquanto na etapa I isto ocorreu com três dias.
- A remoção de matéria orgânica da etapa I foi de 40%, na etapa II 69% e na etapa III 49%. Com relação aos nutrientes, houve a utilização preferencial do fungo por nitrogênio amoniacal, com remoção média de 93% de amônia na etapa I, 74% na etapa II e 51% na Etapa III, quanto ao nitrito, ao final de todos os ciclos, permaneceu com aproximadamente a mesma concentração inicial com pequena remoção no 12º ciclo.
- Em geral, foram alcançados percentuais de remoção de ortofosfato de 70%, 96% e 74% para as etapas I, II e III, respectivamente. Após testes microbiológicos foi identificada a presença, de além da espécie inoculada, contaminação do reator pelo fungo do gênero *Penicillium*. No entanto, esse consórcio aparentemente não trouxe prejuízo ao sistema em virtude das altas remoções alcançadas.
- Independente das concentrações (5, 1 e 0,5 g/L) de glicose utilizada houve remoção de BTX não sendo observada diferença significativa.
- No teste de toxicidade em placas houve crescimento da espécie fúngica nas placas com concentrações de 16,25 e 32,5 mg/L dos compostos tóxicos empregados.
- Os resultados obtidos dos testes de toxicidade de BTX em contato com sementes de alface evidenciam que nas concentrações avaliadas dos compostos houve efeitos prejudiciais na germinação das sementes, principalmente nas concentrações acima de 450 mg/L do composto.
- Não foi constatado perda de BTX por volatilização nas primeiras 24 horas.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaio com três reatores dando partida nos reatores ao mesmo período e variando apenas a concentração de glicose.
- Avaliar a capacidade do *Aspergillus* em degradar uma água contaminada com gasolina comercial.
- Realizar ensaio no reator apenas com *Penicillium* para verificar seu potencial de degradação.
- Realizar ensaio utilizando reator de leito fixo e escoamento contínuo.
- Promover a identificação dos metabólitos produzidos pela espécie na degradação dos BTX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOUPoulos, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**: 4^a ed., John Wiley and Sons, EUA, 1996.

ANA, Agência Nacional de Águas. **Conjuntura dos Recursos Hídricos do Brasil**. Disponível em <http://conjuntura.ana.gov.br/>. Acesso em: 20 set. 2009.

ANDRADE, M.; CELESTINO, P.; LOPES, M.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Efeito da concentração de glicose na remoção de fenóis e matéria orgânica em reator de batelada repetida**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Anais...** Recife-PE, 2009.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro ANP, 2008. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>> Acesso em: 20 set. 2009.

APHA, **Standard methods for the examination of water and wastewater**: 18^a ed., Washington: American Public Health Association, 1995.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Fungal bioremediation of creosote contaminated soil: A laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fung. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 172, p. 201-219, 2006.

AZEVEDO, L. M. L.; SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; ARAÚJO, J. M.; GUSMÃO, N. B.; SOUZA-MOTTA, C. M. **Avaliação do potencial de biodegradação de petróleo por fungos filamentosos**. In: XVII SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, **Anais...** NATAL/RN de 2 a 5 de Agosto de 2009.

BAIRD, C. **Química Ambiental**: 2^a ed., Colin Baird; trad. Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BENTO, D. M. **Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS.** Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, FURG, Rio Grande, 112p, 2005.

BENTO, F. M.; CARMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BERGAUER, P.; FONTEYNE, P. A.; NOLARD, N.; SCHINNER, F.; MARGESIN, R. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. **Chemosphere**, v.59, p. 909-918, 2005.

BONO, R.; BUGLIOSI, H. E.; SCHILIRÓ, T.; GILLI, G. The Lagrange Street story: the prevention of aromatics air pollution during the last nine years in a European city. **Atmosphere Environmental**, v.35, p.107-113, 2001.

BRITO, F. V.; OLIVEIRA, A. S.; NEVES H. C.; AZEVEDO, J. A. T.; BHERING, D. L.; REIS, S. M.; MACHADO, M. C. S.; AZEVEDO, G. C.; CARVALHAES, G. K. **Estudo da contaminação de águas subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil.** In: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, **Anais...** Salvador-BR, outubro de 2005.

CELAR, F. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. **Biological Control**, v.28, p.19-24, 2003.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.324-333, 1997.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
Relação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo Novembro / 2008.

Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov08.pdf.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.
Relação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Janeiro de 2010.

Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/areas.asp.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.
Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. 2ed, São Paulo, 389p, 2001.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
Relatório de qualidade das águas subterrâneas do Estado de São Paulo: 2001-2003. Série Relatórios Ambientais, São Paulo, 137p, 2004.

CHEN, K. F.; KAO, C. M.; CHEN, T. Y.; WENG, C. H.; TSAI, C. T. Intrinsic bioremediation of MTBE-contaminated groundwater at a petroleum-hydrocarbon spill site. **Environmental Geology**, v.50, p.439-445, 2006.

CIMA. **Resolução do conselho interministerial do açúcar e do álcool.** Nº 37, de 27.6.2007- DOU 28.6.2007.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente.** Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 20 abril. 2009.

CONCAWE. **VOC emissions from loading gasoline onto sea-going tankers in EU-15: control technology and cost-effectiveness.** Report Nº. 6/02. Brussels, 2002. Disponível em: <http://www.concawe.be>. Acesso em: 20 ago. 2009.

CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M.; ROSÁRIO, M. Weathering of Ethanol-Blended Gasoline in Aquifers - A Field Experiment. **Proceedings of the Environmental Science and Technology**, p. 26-31, 2005. Disponível em: <http://www.remas.ufsc.br/conteudo.php?id=48>. Acesso 10 out. 2009.

CORSEUIL, H. X.; KAIPPER, B. I. A.; FERNANDES, M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. **Water Research**, v. 32, p. 1449-1456, 2004.

CPRM – COMPANHIA DE PESQUISA DE RECURSOS MINERAIS – Serviço Geológico do Brasil. **Sistema de informação de águas subterrâneas**. Disponível em: <http://siagas.cprm.gov.br/wellshow/indice.asp?w=1024&h=764&info=1>. Acesso em: 10 set. 2009.

DAMASCENO, E. P.; SAMPAIO, G. M. M. S.; PINHEIRO, Z. B.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, G. M. M.; RODRIGUES, K. **Tratamento biológico de efluentes de indústria petroquímica em reatores em batelada com biomassa dispersa e imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400**. In: VII Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação (VII ENPPG) / VII Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica (VII ENICIT) / I Simpósio de Inovação Tecnológica do Instituto Federal do Ceará (I SIMPIT), **Anais...** Fortaleza-CE. 17 a 19 de Outubro de 2007.

DEEB, R. A., ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. **Bioremediation Journal**, v.4, n.1, p.1-9, 2000.

DEL RIO, D. T. **Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 54p, 2004.

DEOTTI, L. O. G. **Controle de pH na técnica de biorremediação eletrocinética**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 126p, 2005.

DONAIRE, P. P. R. **Tratamento de água subterrânea contaminada com btex utilizando fotocatalise heterogênea**. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Química, Unicamp/IQ, Departamento de Química Analítica, Campinas/SP, 101p, 2007.

DUTKA, B. **Short-term root elongation toxicity bioassay**. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. Ottawa: National Water Research Institute, Environment Canada, 1989.

EL-RAHIM, W. M. A.; EL-ARDY O, A, M.; MOHAMMAD F H. A. The effect of pH on bioremediation potential for the removal of direct violet textile dye by *Aspergillus niger*. **Desalination**, v. 249, p. 1206-1211, 2009.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 510p, 2004.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 80p, 2008.

FINNEY, D. J. **Análise de Probit**. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

FINOTTI, A. R.; TEIXEIRA, C. E.; FEDRIZZI, F.; CALGLIARI, J.; FILHO, I. N. Avaliação da influência do etanol sobre o grau de volatilização BTEX em solos impactados por derrames de gasolina/etanol. **Engenharia Sanitaria Ambiental**, v.14, n.4, p.443-448, 2009.

FREITAS NETO, M. A.; FELIX, J. P. L.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos. **Revista Tecnológica de Fortaleza**, v. 28, n. 1, p. 85-96, jun. 2007.

FULEKAR, M. H., SINGH, D. Benzene bioremediation using cow dung microflora in two phase partitioning bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v.175, p.336-343, 2010.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, 2004. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/internet/arquivos/legislacao/portariasMinisteriais/Pm_518_2004.pdf. Acesso em: 12 dez. 2009.

GARCIA-PEÑA, I.; HERNÁNDEZ, S.; REVAH, S.; ORTIZ, I. Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p.442-447, 2008.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Wiley-Liss, New York, 1994.

GURNHAM, C. F. **Industrial Wastewater Control**, 1ed. New York, Academic Press, 1965.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico 2000: **Anuário Estatístico do Brasil 2000**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/publicacao.html.

JACQUES, R. J. S. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, v.11, n.1, p.1-11, 2007.

JOHNSEN, A. R.; WICKB, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v.133, n.1, p.71-84, 2005.

JOU, C. G., HUANG, G. A pilot study for oil refinery wastewater treatment using a fixed-film bioreactor. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 463-469, 2003.

KALBITZ, K.; SCHEWESING, D.; SCHMERWITZ, J.; KAISER, K.; HAUMAIER, L.; GLASER, B.; ELLERBROCK, R.; LEINWEBER, P. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.1129-1142, 2003.

KAO, C. M.; CHEN, C. Y.; CHEN, S. C.; CHIEN, H. Y.; CHEN, Y. L. Application of in situ bioparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. **Chemosphere**, v.70, p.1492-1499, 2008.

KERMANSHAHI, P. A.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift bioreactor. **Water Research**, v. 39, p. 3704-3714, 2005.

LEE, E. H., CHO, K. S. Effect of substrate interaction on the degradation of methyl *tert*-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by *Rhodococcus* sp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 669-674, 2009.

LEITE, C. L.; GROPOSO, C.; SANTOS, E. R. D.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P.da S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo I - constituintes celulares. **Biotemas** (Revista do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, Florianópolis) Florianópolis-SC, v. 19, n. 2, p.17-27, 2006.

LI, L., LIU, J.X. Removal of xylene from off-gas using a bioreactor containing bacteria and fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58 p. 60-64, 2006.

LITTLEJOHNS, J. V., DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. **Process Biochemistry**, v. 43, p.1068-1076, 2008.

MANCERA-LÓPEZ, M. E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; BARRERA-CORTÉS, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 151-160, 2008.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético), Programa de Pós-Graduação em Engenharia, COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 216p, 2001.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, UNESP, Rio Claro-SP, 162p, 2006.

MAKI, H.; HIRAYAMA, N.; HIWATARI, T.; KOHATA, K.; UCHIYAMA, H.; WATANABI, M.; YAMASAKI, F.; FURUKI, M. Crude oil bioremediation field experiment in the sea of Japan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, p.74-77, 2003.

MARTINS, D. O. **Estudo do controle de emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos**. Dissertação (Mestrado em Gerenciamento e Tecnologia Ambiental no Processo Produtivo), Programa de Pós – Graduação em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo. Salvador-Ba, 179p, 2004.

MELLO, J. M. M. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis – SC, 152p, 2007.

MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2^a ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647p, 2008.

METCALF, EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 3^a ed. New York: Mc Graw-Hill, 1334p, 1991.

MINATTI, G. **Biodegradação dos compostos BTX de efluente petroquímico sintético**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis – SC, 143p, 2009.

MIRANDA NETO, M. I. **Investigação geoambiental em áreas de mangue na baía de Guanabara contaminada com resíduos industriais**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Engenharia, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 166p, 2002.

NARDI, I. R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 587-592, 2005.

NARDI, I. R.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. **Water Science and Technology**, v.45, nº10, p. 175-180, 2002.

NIKOLOVA, N., NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science and Technology**. v. 51, p.87-93, 2005.

NUNES, C. C., CORSEUIL, H. X. Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.12, nº3, p. 259-265, 2007.

OLIVEIRA, F. J. S. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 101p, 2001.

OLLIVIER, B., MAGOT, M. **Petroleum Microbiology. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future**. Washington D.C., USA, 215-237p, 2005.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 189p, 1997.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. **Biotechnology Advances**, v. 22, p.198-259, 2004.

PAPAGIANNI, M.; WAYMAN, F. M.; MATTEY, M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.11, p.7178-7186, 2005.

PEDRO, F. G. **Acidentes com transporte rodoviário de produtos perigosos: análise e aplicação de modelo conceitual georreferenciado para avaliação de risco ambiental no município de Campinas-SP**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, UNICAMP, Campinas, SP, 2006.

PELEGRINI, N. N. B.; PATERNIANI, J. E. S.; CARNIATO, J. G.; SILVA, N. B. E.; PELEGRINI, R. T. **Estudo da sensibilidade de sementes de Euruca Sativa (Rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura**. In: XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA), **Anais...** João Pessoa – PB, 2006.

PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2^a ed. São Paulo: McGraw-Hill, v.1, 1996.

PEREIRA, P. F. S. **Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru**. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, UFRJ/IQ, Rio de Janeiro, 215p, 2008.

PUTZKE, J., PUTZKE, M. T .L. **Os reinos dos fungos**: v.2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

QI, B.; MOE, W. M.; KINNEY, K. A. Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.684–689, 2002.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Introduction to Aquatic Toxicology**. In: Rand, GM (eds) Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. Taylor & Francis, Washington, p. 3-70, 1995.

RIBEIRO, R. **Recuperação da qualidade de águas contaminadas por gasolina usando reatores de leito fixo**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. USP, São Carlos, 2005.

RODRIGUES, K. A. **Tratamento biológico de água residuária sintética de laticínios por decomposição fúngica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental), UFC, Fortaleza, 113p, 1999.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 145p, 2006.

RODRIGUES, K. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; ZAIAT, M.; SANTAELLA, S. T. Influência da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12, n.2-abril/jun, p. 222-228, 2007.

SAMPAIO, G. M. M. S.; RODRIGUES, K. A.; LEITÃO, R. C.; ZAIAT, M.; SANTAELLA, S. T. **Efeito da glicose na remoção de metil paration presente em água por *Aspergillus niger* AN400**. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 18-23 set, 2005. **Anais...** Campo Grande, 2005.

SAMPAIO, G. M. M. S.; SANTOS, E. M. A.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M.; MENEZES, E. A.; SANTAELLA, S. T. Pós-tratamento de efluente de um reator UASB através de um reator biológico com fungos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9 n.1, p.73-81, 2004.

SANTAELLA, S. T.; SILVA JUNIOR, F. C. G.; GADELHA, D. A. C.; COSTA, K. O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitária e Ambiental** v.14, n.1, p.139-148, 2009.

SANTANA, E. W. **Cenário atual dos recursos hídricos do Ceará** / Conselho de Altos Estudos e Assuntos Estratégicos, Assembléia Legislativa do Estado do Ceará; (Coleção Pacto das Águas). Fortaleza: INESP, 174p, 2008.

SANTOS, E. M. A. **Otimização de um sistema UASB seguido de um filtro biológico com fungos para tratar efluentes da indústria de castanha de caju**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental, UFC, Fortaleza-CE, 2001.

SANTOS, E. M. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M.; MENEZES, E. A.; SANTAELLA, S. T. Influência do tempo de detenção hidráulica em um sistema UASB seguido de um reator biológico com fungos para tratar efluentes de indústria de castanha de caju. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, n.1, p.39-45, 2004.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p.1599-1607, 2002.

SILVA, L. J. da. **Processo de landfarming para tratamento de resíduos oleosos**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ/EQ, Rio de Janeiro, 91p, 2009.

SINGH, A.; WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in applied microbiology**, v. 58, p.1-75, 2006.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 142p, 1994.

SOARES, N. M. S.; PINHEIRO, G. P.; JÚNIOR, S. D.; ZANOTTO, S. P.; ALBUQUERQUE, P. M. **Avaliação do Potencial de Fungos Amazônicos na Degradação do Petróleo**. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, **Anais...** NATAL/RN de 2 a 5 de Agosto de 2009.

SOLOMONS, T. W., FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. 8^a ed., New Jersey: Wiley, 2004.

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A.; SOUSA, M. F. V. Q. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. In: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, **Anais...** Salvador-BA-Brasil, 2005.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STANCHEV, V.; DANIEL, D.; GERGINOVA, M.; ALEXIEVA, Z. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39. p.1036-1041, 2006.

SUTHERLAND, J.; ADAMS, C.; KEKOBAD, J. Treatment of MTBE by air stripping, carbon adsorption, and advanced oxidation: technical and economic comparison for five groundwaters. **Water Research**, v.38, p.193-205, 2004.

THIELE, S., BRUMER, G. W. Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p.733-735, 2002.

TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A. Treatment of gasoline-contaminated waters by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, p. 86-90, 2005.

TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P.; EMMEL, A; LEAL, E. S. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 61-64, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**: 6^a ed., Porto Alegre: Artmed, 827p, 2000.

TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ/EQ, Rio de Janeiro, 127p, 2002.

USALDO, M. R.; PASCHOALATO, S. M. M.; ROSA, C. F. P.; RIBEIRO, C. A. F; FERRARI, P; TUPINAMBÁ, D. **Estudo da biodegradação de gasolina por bactérias presentes no solo da área de armazenamento e de distribuição de combustíveis no município de Ribeirão Preto**. In: AIDIS; Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Sección Uruguay. Rescatando antiguos principios para los nuevos desafíos del milenio. Montevideo, AIDIS, p.1-12, 2006.

VENDRAMEL, S.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JR, G. L. **Treatment of petroleum refinery wastewater in a submerged fixed-bed aerobic bioreactor**. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, **Anais...** do ENPROMER, Angra dos Reis, 2005.

WOLICKA, D.; SUSZEK, A.; BORKOWSKI, A.; BIELECKA, A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. **Bioresource Technology**, v.100, p.3221-3227, 2009.

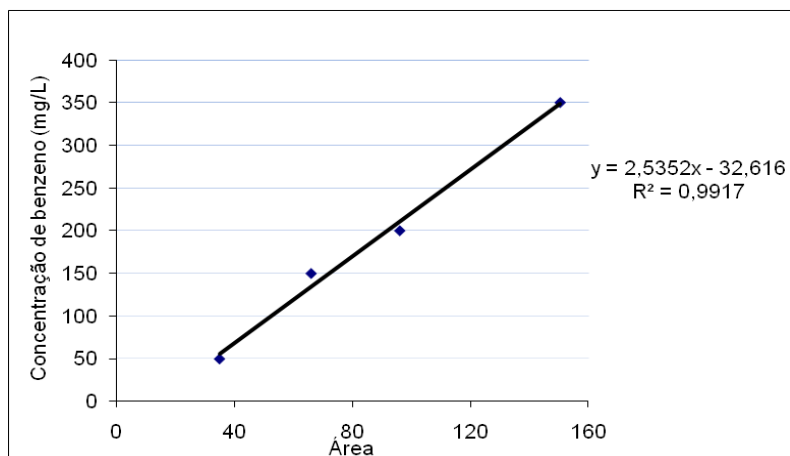
WITTEVEEN, C. F. B. **Gluconate formation and polyol metabolism in *Aspergillus niger***. Thesis, Wageningen University, Wageningen, 128p, 1993.

ZNAD, H.; MARKOS, J.; BALES, V. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1341-1345, 2004.

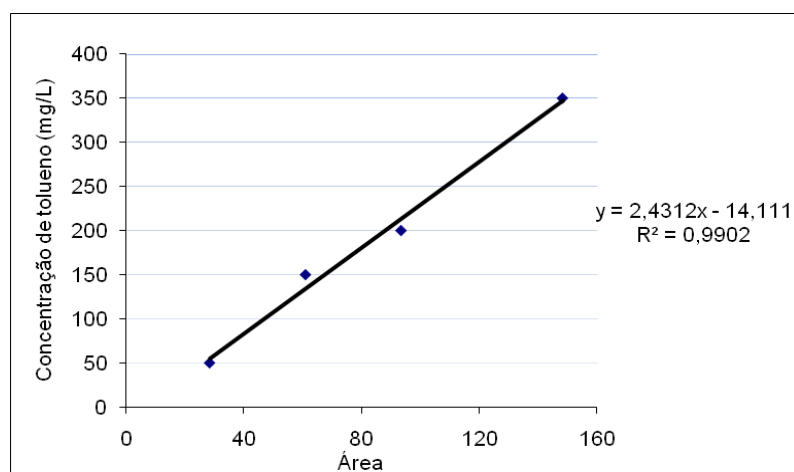
ZOBY, J. L. G., MATOS, B. **Águas subterrâneas no Brasil e sua inserção na Política Nacional de Recursos Hídricos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, **Anais...** Florianópolis, 2002.

APÊNDICES

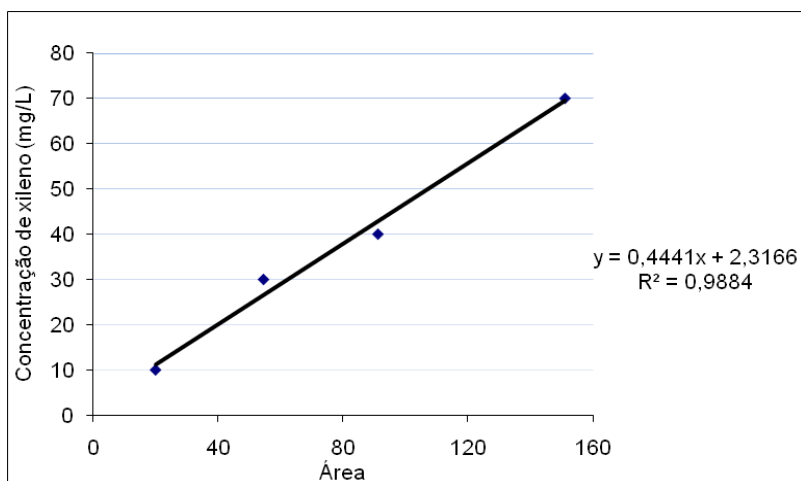
Curva de calibração para o Benzeno

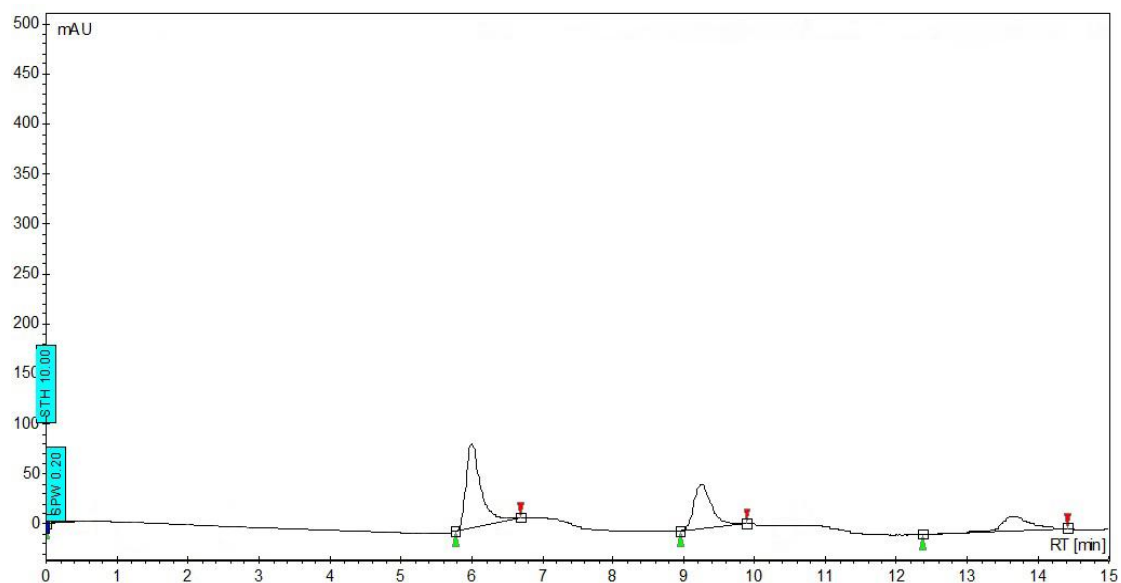


Curva de calibração para o Tolueno

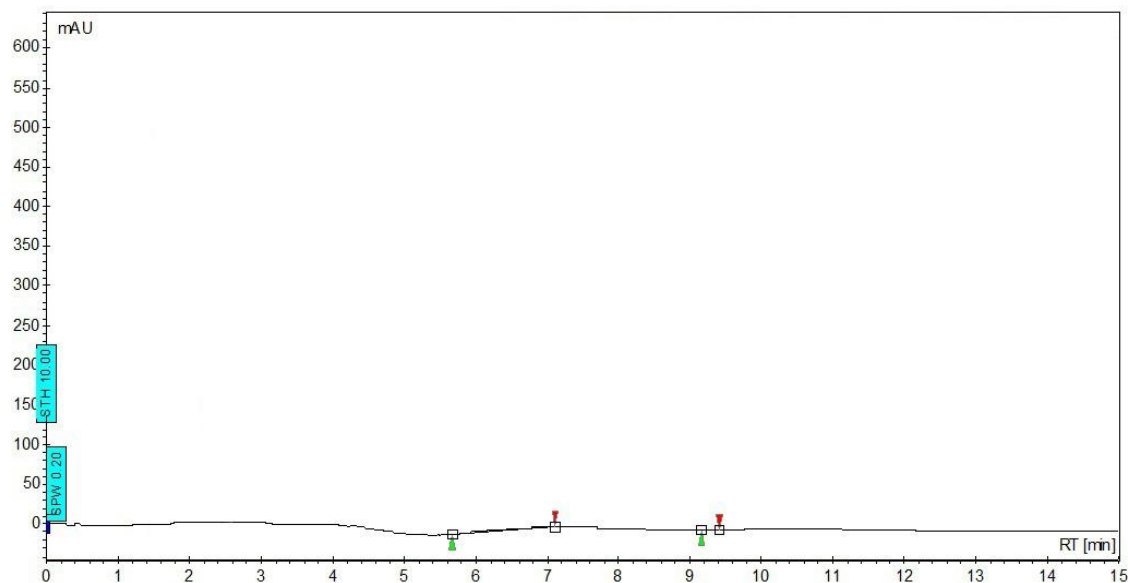


Curva de calibração para o Xileno





Cromatograma no início da operação com os picos de Benzeno, Tolueno e Xileno na respectiva ordem.



Cromatograma após o 1º dia de operação, já na ausência dos picos de Benzeno, Tolueno e Xileno.